

**GUSTAVO SOARES GUANDALINI**

Iniciação Científica UFPR/TN

**MORFOMETRIA E GEOMETRIA FRACTAL**

imageamento fractal como descritor de agressividade nas displasias epiteliais orais

Relatório apresentado à Coordenadoria de Iniciação Científica e Integração Acadêmica da Universidade Federal do Paraná por ocasião da conclusão das atividades de Iniciação Científica – Edital 2005-2006.

**CURITIBA**  
**Agosto, 2006**

## SUMÁRIO

1	RESUMO .....	2
2	OBJETIVOS .....	3
3	INTRODUÇÃO .....	4
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
6	RESULTADOS .....	19
7	DISCUSSÃO .....	20
8	CONCLUSÕES .....	25
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## 1 RESUMO

As diversas tentativas de estadiamento diagnóstico das displasias epiteliais da cavidade oral apresentam fraca correlação com o curso clínico dessas doenças, o que torna sua utilização pouco útil. Conseqüentemente, surge a necessidade da busca por novos métodos preditores de evolução de tais condições, as quais devem ser antes testadas segundo sua acurácia e precisão. Para tornar pertinente uma nova estratégia diagnóstica, ela deve apresentar *validade* – bons resultados quando comparada a um padrão-ouro – e *reprodutibilidade* – consistência em diferentes observações, com pouca variabilidade. No entanto, um novo exame proposto para tais lesões da mucosa oral é impossível de ser comparado a um padrão-ouro, justamente porque os critérios subjetivos atuais apresentam alta variabilidade interobservador (expressa por um baixo índice *kappa*). Portanto, visamos produzir um método objetivo que, além de evitar essa subjetividade do examinador, seja capaz de descrever o processo patológico. Os tradicionais estudos de correlação estatística já apontam para a forte associação entre a invasão local e a malignidade dos tecidos neoplásicos da mucosa oral, sugerindo que as células da borda tumoral tenham comportamento mais agressivo em relação ao resto da massa cancerosa. Essa constatação é explicada pelo maior aporte nutricional da borda tumoral, posto que o tecido epitelial avascular é alimentado através da difusão pelos capilares do conjuntivo subjacente. O processo de invasão local pode ser acessado pela tortuosidade da linha de interface entre epitélio e estroma, e a ciência exata que descreve a rugosidade das formas irregulares da natureza é a Geometria Fractal. A partir disso, aplicamos o método de contagem de caixas às linhas de interface entre epitélio e estroma, as quais foram traçadas manualmente a partir de imagens obtidas de biópsias da cavidade oral realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, coradas por hematoxilina e eosina. Calculamos a dimensão fractal dessas linhas de interface, baseados no preceito de que uma dimensão maior quantifica uma maior tortuosidade, demonstrando morfometricamente sua maior invasão local. Os resultados obtidos apontam para um incremento da dimensão acompanhando a agressividade no diagnóstico histopatológico, com valores comparáveis aos encontrados em literatura. O método mostra-se eficiente em auxiliar o patologista na sua compreensão fisiopatológica da malignidade do tecido observado, mas outras ferramentas devem ser desenvolvidas. A *lacunaridade* dessas imagens fractais, por exemplo, é tão relevante em sua caracterização quanto a sua própria *dimensão*. Apontamos assim para a geração de mais uma ferramenta de análise de textura: um novo método de cálculo de lacunaridade de linhas tortuosas (com dimensão entre *um* e *dois*) variante do *gliding box* – originalmente descrito para imagens descontínuas – e que batizamos *gliding yardstick*.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo inicial da presente pesquisa é a descrição dos fenômenos biológicos a partir de ciências não-lineares, capazes de modelar a complexidade tanto estrutural quanto funcional observada em todo fenômeno natural, especialmente nos seres vivos. Logo, esse projeto tem por ideal a integração interdisciplinar das Ciências Exatas às Ciências da Saúde, apropriando-se dos conhecimentos da Geometria Fractal para caracterizar o processo de carcinogênese.

Para tal, estudamos – em cooperação com o Departamento de Matemática – os fundamentos teóricos dos fractais, partindo de modelos bem descritos no corpo humano, como a estrutura fractal do glicogênio. Posteriormente, aplicamos essa descrição morfométrica ao processo de *invasão local* de tumores da cavidade oral. Esse modelo de câncer foi eleito porque, além da sabida relação da sua agressividade à infiltração aos tecidos adjacentes, ele apresenta de forma distinta a interface entre a neoplasia (tecido epitelial em proliferação) e o estroma (tecido conjuntivo que fornece o aporte nutricional). Sua utilidade também ganha importância pelo fato de que o comportamento das displasias da mucosa oral permanece até os dias atuais fracamente correlacionado aos correntes estadiamentos prognósticos. Visando aplicar o método ao modelo biológico de carcinogênese utilizamos como princípio a correspondência entre o aumento da dimensão fractal da borda de avanço ou de invasão tumoral dessas lesões e seu estadiamento histopatológico. Desse modo, a análise morfológica feita de modo subjetivo passa a ser realizada de forma quantitativa, permitindo uma maior profundidade do entendimento evolutivo das lesões teciduais, bem como uma análise comparativa mais acurada dos dados.

Com essa proposta, foi desenvolvido um programa computacional que opera na plataforma Visual Basic 5.0<sup>®</sup>, capaz de determinar, a partir do método de contagem de caixas, a dimensão fractal das linhas de interface tumor-estroma obtidas em biópsias de mucosa oral. Essas imagens foram coletadas após extensivo levantamento de casos registrados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, os quais foram submetidos à revisão sistemática e devidamente classificados de acordo com o diagnóstico histopatológico.

Portanto, pretendemos com esse trabalho a correlação da dimensão fractal encontrada nessas imagens com a classificação diagnóstica dos casos, demonstrando, por conseguinte, a viabilidade científica do método. Da mesma maneira, buscamos quantificar o grau de doença apresentado por cada paciente, diferenciando-os dos demais casos dentro de um mesmo grupo diagnóstico. Assim, imaginamos que a caracterização da tortuosidade da borda tumoral se constitua num parâmetro prognóstico complementar às tradicionais classificações diagnósticas, pois é gerado para cada indivíduo e de forma isenta das variações subjetivas de interpretação.

Por fim, gostaríamos que nossa atividade fosse acima de tudo um espaço de integração e divulgação científica, dado o pioneirismo do projeto e o grau de cooperação entre áreas aparentemente tão distantes: os números e os seres humanos.

### 3 INTRODUÇÃO

Muitos dos recursos diagnósticos empregados na prática médica são baseados em técnicas de imageamento. Embora esses métodos tenham passado por profundas transformações – fruto da crescente revolução tecnológica na geração e tratamento de imagens –, o papel do médico como intérprete final desses dados permanece intacto. Entretanto, esse fato submete a análise diagnóstica às variações subjetivas de cada examinador, o que gera a possibilidade de diferentes interpretações para um mesmo conjunto de dados e dificulta a extração de informações prognósticas consistentes.

Um grande exemplo dessa dificuldade são as classificações diagnósticas das lesões neoplásicas da mucosa oral. Nessa doença, mesmo os principais parâmetros de avaliação (comprometimento linfonodal, invasão perineural, doença multifocal ou *in situ*, pleomorfismo, entre outros) não se mostram úteis na previsão do comportamento clínico. Tanto que mesmo nos dias atuais ainda surgem tentativas de criar novos métodos de estadiamento, mas muitas delas o fazem com embasamento puramente estatístico e subordinadas ao viés da variabilidade na interpretação humana. Isso sugere a necessidade de novos descritores de tais lesões, os quais, para serem representativos, deverão ter sua precisão aferida segundo sua *validade* e *reprodutibilidade*. A validade se relaciona com o quanto seus dados se relacionam verdadeiramente com a situação de interesse, o que é demonstrado comparando-se a um padrão-ouro – tido como a representação mais próxima da verdade. Por sua vez, a reprodutibilidade expõe como esses dados se mantêm em repetidas aferições de um mesmo caso, isto é, reflete a variabilidade interobservador. Porém, não há até o momento um método que possa ser digno do título padrão-ouro no diagnóstico dessas neoplasias orais. Esses estadiamentos histopatológicos, gerados por correlação estatística – expressão máxima da Medicina Baseada em Evidências – são fracos preditores de comportamento justamente devido à variabilidade das interpretações.

Uma forma elegante de demonstrar esse viés é a aplicação da estatística *kappa* ( $\kappa$ ) aos diferentes métodos diagnósticos. Esse coeficiente ou índice, expresso pela equação abaixo, é capaz de demonstrar o grau de concordância entre os observadores acerca de uma mesma imagem ou conjunto de dados.

$$\kappa = \frac{P(A) - P(E)}{1 - P(E)} \quad (1)$$

Na fórmula,  $P(A)$  é a proporção de concordância encontrada entre os observadores – *agreement* – e  $P(E)$  é a proporção de concordância que seria esperada ao acaso – *expected by chance* –, como se o diagnóstico fosse definido sem base em critério algum. Apenas para ilustrar, podemos imaginar dois radiologistas que analisam as mesmas imagens de raio-X torácico, concluindo se há ou não há evidências de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (tabela 1):

Examinador A	Examinador B		Total
	ICC	Sem ICC	
ICC	20	12	32
Sem ICC	8	60	68
Total	28	72	100

**Tabela 1.** Exemplo de divergência diagnóstica entre dois observadores.

Nesse exemplo, percebemos que a proporção de concordância interobservador  $P(A)$  é igual a  $0.8$  (os examinadores A e B concordaram no diagnóstico de 20 pacientes com ICC e de 60 pacientes sem ICC, do total de 100 casos), enquanto a probabilidade de concordância ao acaso  $P(E)$  é igual a  $0.5$  (já que só há dois diagnósticos possíveis – *com* ou *sem* ICC –, a probabilidade de os dois examinadores concordarem é igual a 50%: para cada diagnóstico que um dá, o outro tem teoricamente uma chance em duas de concluir pelo mesmo diagnóstico). Calculando o índice kappa a partir da fórmula, temos:

$$\kappa = \frac{0.8 - 0.5}{1 - 0.5} = 0.6 \quad (2)$$

O cálculo do coeficiente kappa nos fornece um valor adimensional, cuja interpretação se dá sempre com valores oscilando até *um*. Se o diagnóstico for muito consistente e o grau de concordância entre os observadores for máximo ( $P(A) = 1$ ), o numerador na equação (1) se iguala ao denominador [ $P(A) - P(E) = 1 - P(E)$ ], resultando dessa divisão um índice kappa igual a *um*. Porém, quanto pior for a qualidade do diagnóstico, a proporção de concordância entre os observadores  $P(A)$  deverá se aproximar daquela encontrada ao acaso. Nesse caso,  $P(A) \cong P(E)$ , fazendo a subtração no numerador tender a zero e, por conseguinte, o índice kappa também tenderá a zero. Num caso extremo, em que o grau de concordância seja menor até mesmo que a esperada ao acaso, teremos o numerador negativo, já que  $P(A) < P(E)$ , do que resultaria um kappa *negativo*.

Além disso, vale ressaltar que o índice kappa é extremamente sensível ao número de categorias diagnósticas. Isso quer dizer que uma proporção de concordância diagnóstica  $P(A)$  de 80%, por exemplo, será interpretada de modo diferente se houver duas ou dez categorias diferentes. Isso porque, se houvesse dez possibilidades diagnósticas, a probabilidade de concordância ao acaso  $P(E)$  cairia de 50% para apenas 10%, elevando o índice kappa de 0.6 para 0.78 [ $(0.8 - 0.1)/(1 - 0.1)$ ]. Ou seja, se há mais categorias diagnósticas – e por isso menos chance de concordância ao acaso –, a concordância é mais valorizada, incrementando o índice kappa.

Contudo, há ainda várias formas de refinar a medida kappa para os processos diagnósticos. Isso porque existem muitas outras variáveis envolvidas quando se estuda essas

probabilidades; um exemplo que podemos demonstrar, a partir do modelo descrito anteriormente, é a variação do valor kappa em função da prevalência de resultados positivos e negativos.

No modelo de interpretação da insuficiência cardíaca congestiva, percebemos que a prevalência de exames positivos é bem menor que a de exames negativos; logo, é válido descrever qual foi o grau de concordância entre os observadores em relação aos indivíduos enfermos. Isso porque a interpretação do exame também é influenciada pela prevalência da doença: sabendo que uma moléstia é pouco prevalente, o examinador adota uma estratégia de interpretação em que, no caso de dúvida diagnóstica, ele tende a considerar o exame como normal. Desse modo, enquanto a proporção de concordância entre os examinadores  $P(A)$  foi de 80% em relação a todos os exames, percebemos que esse índice foi menor quando nos detemos apenas aos indivíduos afetados. Chamaremos de  $P_{pos}$  a proporção de concordância para os exames positivos, que é a soma dos exames concordantes do examinador A e do examinador B dividido pela soma de todos os exames positivos de A e de B:

$$P_{pos} = \frac{20 + 20}{(20 + 8) + (20 + 12)} \cong 0.67 \quad (3)$$

Chegamos, conseqüentemente, a uma nova proporção de concordância de 67% para os exames positivos, menor que a observada para o total de exames. De forma análoga, poderia ser feito o mesmo procedimento para os casos negativos ( $P_{neg}$ ), e, de forma semelhante, inúmeras outras ferramentas podem ser desdobradas a partir do conceito do grau de concordância.

Apesar dos trabalhos científicos de revisão que mostram a existência de publicações com índices kappa menores que 0.40, é claro que esses achados devem ser interpretados com parcimônia. O índice kappa é capaz de mostrar se há concordância entre os diagnósticos, mas claramente não entra no mérito do acerto ou erro diagnóstico, isto é, a acurácia. Se um grupo de examinadores erra sistematicamente em suas impressões, mas o fazem de modo semelhante, a qualidade da informação que fornecem é certamente duvidosa, muito embora apresentem um alto valor kappa. Todavia, mesmo que altos valores kappa não necessariamente descrevam boas estratégias diagnósticas, valores baixos de concordância provavelmente revelam a pobreza de um dado método.

No caso específico das neoplasias epiteliais da cavidade oral, os coeficientes kappa encontrados em literatura são desencorajadores, conforme seria de se esperar pela já sabida fraqueza de correlação dos diagnósticos com o comportamento biológico dessas doenças. Seus valores oscilam na faixa de 0.17 a 0.33, quando são considerados três níveis de graduação de displasia (Leve – Moderada – Severa), e de 0.27 a 0.34 quando são considerados apenas dois níveis (Baixa – Alta). A interpretação dos valores kappa para aferir a qualidade de um determinado método diagnóstico encontra-se expressa no modelo abaixo (tabela 2):

Valor kappa	Força da concordância sobre o acaso
<0	Pobre
0–0.20	Discreta
0.21–0.40	Razoável
0.41–0.60	Moderada
0.61–0.80	Substancial
0.81–1.00	Quase perfeita

**Tabela 2.** Interpretação da força da concordância sobre o acaso.

Percebe-se, a partir do exposto acima, que o exercício diagnóstico em Medicina – mesmo quando baseado em métodos complementares, intuitivamente considerados mais precisos – está sujeito a inúmeras influências alheias ao exame *per se*, fruto justamente da subjetividade do examinador. Em Anatomia Patológica, ciência de imageamento por excelência, uma tentativa de diminuir essa variabilidade interobservador (expressa então pelo índice *kappa*) é a categorização diagnóstica, em vez da mera descrição histopatológica. Desse modo, criam-se no vocabulário médico as escalas de graduação de doenças, como as famosas cruces (doente +, ++ ou +++), entre outros inúmeros exemplos. No entanto, essa verdadeira *crucificação* diagnóstica também está longe de ser a solução derradeira, conforme já demonstrado para as neoplasias da mucosa oral. Isso porque esses grupos diagnósticos também não serão homogêneos – muito embora a homogeneização fosse a meta final dessa estratégia. Além de agrupar sob um mesmo rótulo indivíduos que não são idênticos, surgem com isso as chamadas *zonas cinzentas*, representadas por aqueles casos intermediários, de difícil classificação dentro da graduação estabelecida. E é claro que se torna impossível criar mais grupos (como uma cruz e meia quando se sugere um grau de doença entre + e ++), já que essas escalas serão sempre *discretas*, nunca *contínuas*.

Parece lícita, a partir dessa discussão, a busca de métodos complementares ao diagnóstico humano que sejam capazes de gerar parâmetros objetivos, apropriados na quantificação do grau de saúde ou doença de cada paciente. Essa solução mostra-se capaz de fugir da categorização diagnóstica, pois fornecendo dados contínuos acaba com o surgimento das zonas cinzentas, fruto justamente da categorização. Do mesmo modo, tal tecnologia geraria informações que não estão subordinadas à individualidade do examinador, resolvendo a questão subjetiva da variabilidade interobservador. Com esse objetivo delimitado, buscamos com a presente pesquisa a aplicação da Geometria Fractal – ciência exata que trata das formas irregulares encontradas na natureza – à interpretação de imagens em Anatomia Patológica, dada a complexidade das estruturas biológicas tanto na saúde quanto nos processos patológicos. Usando como modelo as lesões epiteliais da mucosa oral, pretendemos construir ferramentas morfométricas capazes de gerar parâmetros objetivos aplicáveis tanto à descrição fisiopatológica do processo de carcinogênese quanto à graduação da malignidade dos tecidos estudados.

#### 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As famosas aberrações matemáticas – figuras altamente complexas e inusitadas geradas por processos iterativos simples – datam modernamente de cerca de um século atrás, quando JULIA (1918) e FATOU (1919) apresentaram suas iterações com números complexos. Porém, foi apenas com MANDELBROT (1975) que a Geometria Fractal de fato nasceu como corpo de ciência, sob sua obra LES OBJETS FRACTALS: FORME, HASARD ET DIMENSION. A partir desse ponto essa ciência teve sua pedra fundamental construída de forma sólida, e suas múltiplas aplicações cresceram enormemente desde então, até que esbarrasse na Medicina. Já na obra original de MANDELBROT (1975) há referências à correlação de objetos fractais com a arquitetura de certas partes do organismo (o próprio Benoît Mandelbrot lecionou fisiologia na Einstein School of Medicine). Ele cita, por exemplo, o padrão arborescente da árvore traqueobrônquica ou a complexa morfologia da rede vascular como modelos que lembram fractais, sugerindo reconstruções matemáticas que remetem com certa propriedade às funções dessas estruturas.

Conforme nos trazem MELÉNDEZ *et al* (1999), poderíamos postular que objetos fractais são estruturas complexas construídas usando-se pouquíssima informação; portanto, têm como característica a propriedade de apresentar função otimizada (constroem-se estruturas complexas economizando-se informação). Os exemplos clássicos da obra original de MANDELBROT (1975) são retomados, como a estrutura alveolar pulmonar e a rede capilar, para demonstrar esses ideais de funcionalidade dos fractais nos seres vivos. Porém, fica também clara uma distinção entre o que é denominado nesse artigo como duas classes de fractais encontrados na natureza: os fractais *úteis* e os fractais *curiosos*. Uma membrana celular, por exemplo, se submetida ao método de contagem de caixas, apresentará dimensão fractal; entretanto, segundo GOLDBERGER *et al* (1990) isso é um mero achado. Afinal, essa propriedade é simples fruto da fluidez da membrana: uma membrana plasmática não é mais eficiente na sua função biológica por ser um fractal (aliás, pelas propriedades físico-químicas da membrana plasmática, não há modo de se obter uma que não seja um fractal). É, dessa forma, um fractal curioso. Nesse mesmo artigo, por sua vez, chama-se a atenção para os fractais úteis, ou seja, aqueles que podem ser modelados em computador, através de processos recursivos simples, e que determinam uma função biológica otimizada por essa propriedade. Nesse artigo, demonstram-se com maestria as propriedades de objeto fractal da molécula do glicogênio, o primeiro exemplo a ser descrito com tantas dessas propriedades (auto-referência, auto-similaridade e dimensão fractal). Mostra-se, no funcionamento normal do corpo humano, o quanto a função de armazenamento de energia rapidamente mobilizável é otimizada por essas propriedades descritas no glicogênio.

Começando com o saudável e buscando o patológico, BAISH e JAIN (2000) demonstram a correlação entre incremento de dimensão fractal e evolução de redes capilares para o estado de câncer. Assim como pretendemos, essa obra irrefutavelmente mostra uma aplicação absolutamente viável dos métodos de determinação de dimensão fractal num contexto no qual a

subjetividade gera entraves científicos. Buscando métodos computacionais de obter parâmetros objetivos para comparação de imagens – princípios esses aplicados pela Morfometria – consegue-se distinguir claramente através do parâmetro *dimensão fractal* a rede capilar de tecido normal e de tecido tumoral, gerando-se mais uma ferramenta que pode melhorar o diagnóstico e o prognóstico num câncer, bem como permite a instituição de um tratamento mais refinado e um acompanhamento da evolução e/ou regressão do tumor de modo mais acurado. Ainda nesse mesmo trabalho, propõem-se modelos matemáticos capazes de reproduzir o surgimento de vasculatura tanto normal quanto patológica – com dimensões fractais correspondentes às observadas nos cortes histológicos –, através de um algoritmo matemático conhecido como *invasão por percolação*. O modelo proposto se encaixa com perfeição no conceito de fractal útil, com forte embasamento científico e viabilidade de aplicação.

O modelo da rede vascular é ótimo para a aplicação dos fractais porque, além de ter boa correlação com o grau de displasia, os dados gerados também são correlacionáveis com o próprio mecanismo da doença. É fácil admitir que a rede vascular de um tumor maligno deva ter dimensão fractal maior: já é muito bem descrita a relação entre a angiogênese tumoral e sua maior capacidade de crescimento. Entretanto, em SEDIVY *et al* (1999) essa compreensão da fisiopatologia tumoral já não é tão óbvia. Nesse artigo, que mostra a crescente dimensão fractal obtida em imagens de núcleos celulares da cérvix uterina, não se consegue compreender qual a relação dessa maior tortuosidade nuclear com o estágio mais avançado da neoplasia (embora seus resultados sejam pertinentes na graduação do processo patológico). Ampliando a visão do núcleo celular para a célula em si, RISTANOVIĆ *et al* (2002) mostram as estratégias de contagem de caixas e do compasso aplicadas ao estudo da rede dendrítica neuronal. Seus resultados mostram que foram capazes de distinguir neurônios de diferentes regiões da medula de ratos; logo, são bons descritores da morfologia singular de determinados grupos celulares.

Visualizando agora todo um tecido, LANDINI e RIPPIN (1994) demonstram o incremento da dimensão fractal da membrana basal da interface entre epitélio e tecido conectivo de lesões neoplásicas de células escamosas do assoalho da boca, apontando, dessa forma, para uma determinação geométrica do grau de invasão desse tipo de lesão maligna. A partir desse dado bibliográfico, abre-se um enorme leque de estudo de lesões invasoras e suas dimensões fractais incrementadas conforme se observa essa infiltração. Isso se torna valioso, já que além da contínua busca de mais informações diagnósticas, esse é mais um exemplo em que a Geometria Fractal se mostra capaz de descrever o processo patológico, quantificando a invasão local enquanto parâmetro relacionado ao grau de agressividade local de um tumor.

Devemos ainda citar que outras especialidades médicas além da Anatomia Patológica podem se valer dessa interface científica. Partindo agora para técnicas diferentes de imageamento, EVERTSZ *et al* (1994) estudam – através do modelo de densidade de massa – a dimensão fractal em ultrassonografia de fígados. Conforme os próprios autores apontam, é difícil a diferenciação subjetiva entre fígados saudáveis e esteatóticos a partir de imagens obtidas por

ultrassonografia. Propõe-se um modelo fractal de geração de parâmetros objetivos, os quais diferenciariam os fígados gordurosos dos normais. Mais uma vez, a aplicação do método mostra-se não apenas extremamente útil, mas também absolutamente versátil. Outro interessante exemplo é mostrado por BENHAMOU *et al* (1994), que apresentam um estudo de determinação de dimensão fractal em imagens de raio-X de osso trabecular. Alcançando os objetivos do estudo, os autores demonstram clara distinção entre a osteoporose e a normalidade, propondo o método para a obtenção de informações qualitativas sobre as alterações ósseas estruturais na osteoporose, indo além da mera descrição quantitativa que uma cintilografia óssea pode oferecer.

Por fim, migrando do campo da morfologia para o funcionamento biológico, nem mesmo LORENZ (1963) seria capaz de imaginar o grau de impacto na área médica dos seus trabalhos originais sobre o caos na meteorologia, com seu pré-histórico computador Royal McBee. Acabou concluindo aquilo que todos já sabem intuitivamente: esse sistema é *caótico, imprevisível* a rigor. E da mesma maneira que se pode expressar a imprevisibilidade dos fenômenos atmosféricos com seus famosos atratores estranhos, o mesmo pode ser feito com os sinais gerados pelos ritmos biológicos. GLASS e MACKEY (1988) o demonstram muito bem, como no caso da pressão arterial, dos níveis hormonais e do ritmo circadiano. Porém, o mais curioso é que também esses atratores estranhos têm a sua complexidade quantificada por sua *dimensão fractal*.

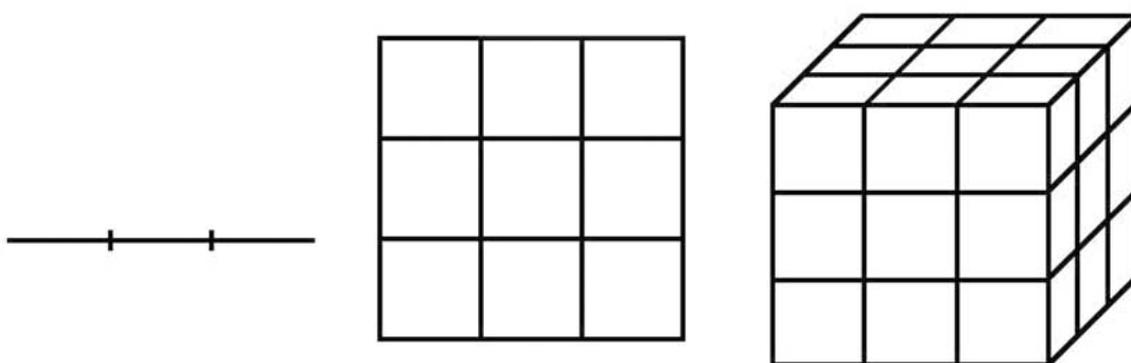
Dessa forma, mesmo os trabalhos pioneiros de BERNARD (1878) caem por terra ao postularem o princípio da constância do meio interno como fundamental à vida (*“La fixité du milieu interieur est la condition de la vie libre, independante.”*), batizado *homeostase* por CANNON (1926) (*“The coordinated physiological processes which maintain most of the steady states in the organism are so complex and so peculiar to living beings (...) that I have suggested a special designation for these states, homeostasis.”*). Na verdade, de acordo com GOLDBERGER (1996), é justamente a variabilidade nos ritmos biológicos que permitem aos seres vivos a adaptação às diferentes demandas às quais estão submetidos. Ele demonstra essa idéia justamente para o ritmo cardíaco, caótico por excelência e que, sob condições patológicas, perde sua complexidade e se torna mais próximo do linear, da *homeostase*.

Podemos ainda, para exemplificar a versatilidade da Geometria Fractal, citar a recente compreensão das obras de Jackson Pollock, representante do expressionismo norte-americano da metade do século XX. Segundo TAYLOR *et al* (1999), as gravuras nas obras desse genial pintor apresentam dimensão fractal, fruto justamente do processo caótico de sua criação: Pollock lançava a tinta sobre o chão, sem tocar a tela com seu pincel. Esse artista retratou os fractais antes mesmo do seu surgimento como ciência, que se deu apenas duas décadas mais tarde.

A vasta aplicabilidade da Geometria Fractal no campo das ciências naturais não deixa dúvida do seu potencial para descrever os fenômenos biológicos. A literatura que trata da sobreposição entre Geometria Fractal e Medicina já é bastante vasta, e quando buscamos sua integração com a Patologia Médica percebemos as enormes possibilidades de descobertas nessa área ainda tão jovem na história da ciência humana.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente, torna-se necessária a definição e a explicação do que é um objeto com dimensão fractal. Para isso, começaremos expondo uma relação matemática que define o que é dimensão. Sabemos que o espaço tem dimensão 3, como um cubo; já as figuras planas, como o quadrado, são de dimensão 2; os segmentos de reta têm dimensão 1; e os pontos, dimensão 0. Além disso, podemos postular que um segmento de reta, um quadrado e um cubo – respectivamente de dimensões 1, 2 e 3 – podem ser repartidos em partes semelhantes, cuja junção reconstitui as figuras originais (figura 1).



**Figura 1.** Divisão de figuras euclidianas em partes semelhantes.

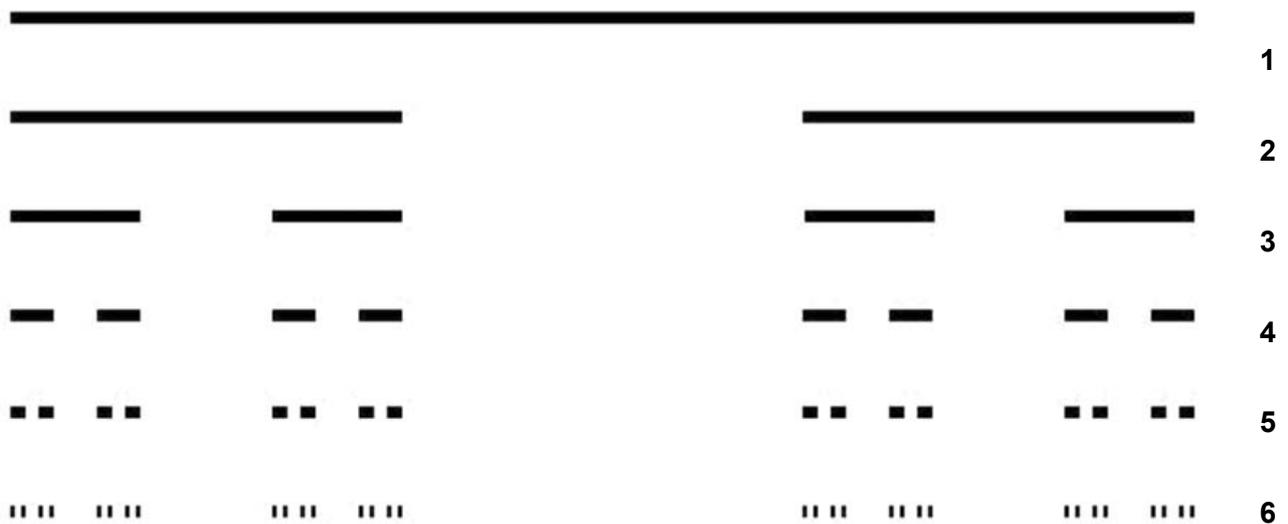
Na figura 1 ilustramos as divisões (1) de um segmento de reta em três peças; (2) de um quadrado em nove peças quadrangulares, repartindo o lado em três; e (3) de um cubo em vinte e sete peças cúbicas, dividindo cada aresta em três. Cada uma dessas peças é semelhante ao todo; deste modo, para que cada parte fique igual ao todo, basta ampliá-la por um fator de aumento (inverso ao fator de redução do lado) igual a, respectivamente, 3, 9 e 27 (tabela 4).

Figuras	Fator de redução do lado (L)	Número de figuras (N)	Dimensão (D)
Segmento de reta	$\frac{1}{3}$	3	1
Quadrado	$\frac{1}{3}$	9	2
Cubo	$\frac{1}{3}$	27	3

**Tabela 3.** Relação dos parâmetros de reconstrução a partir de figuras semelhantes.

Resumidamente, temos que (1) para o segmento de reta, precisamos de 3 segmentos (N) para refazer o segmento original, quando reduzimos o seu comprimento a um terço do original (L); (2) para o quadrado, precisamos de 9 quadradinhos (N) para refazer o quadrado original, quando reduzimos seu lado a um terço (L); e (3) precisamos de 27 cubinhos (N) para remontar o cubo original quando reduzimos sua aresta a um terço (L). A partir dessa tabela, depreendemos a relação  $N = L^{-D}$ , a qual servirá de base para o método de contagem de caixas para a determinação da dimensão.

Uma das características fundamentais dos fractais é que eles possuem dimensões não necessariamente inteiras, contrariamente às figuras geométricas convencionais que sempre possuem dimensão inteira. Um procedimento importante na caracterização quantitativa de um fractal é justamente a determinação da sua dimensão. Uma curva preenche uma porção do espaço com dimensão *um*, enquanto uma superfície preenche uma porção do espaço com dimensão *dois*; já um volume preenche uma porção *tridimensional* do espaço. Por sua vez, um fractal pode, por exemplo, preencher uma porção do espaço mais completamente que uma curva, porém não tão completamente quanto uma superfície. Sua dimensão é, de tal modo, um valor compreendido entre *um* e *dois*. Essas dimensões fracionárias são denominadas de dimensões fractais. Trataremos agora da determinação da dimensão não inteira de dois objetos fractais, a Poeira de Cantor (figura 2) e o Tapete de Sierpinski (figura 3).



**Figura 2.** Poeira de Cantor.

A Poeira de Cantor é uma figura obtida com o processo de, a partir de um segmento de reta, retirar o terço central, e assim sucessivamente com os segmentos resultantes até o infinito. Na figura 2, o processo foi representado em seis níveis. O objeto obtido é, no infinito, um conjunto de pontos alinhados, por isso o seu nome Poeira de Cantor. Esse objeto, claramente, tem dimensão menor do que 1, uma vez que é menos do que um segmento de reta; porém, sua dimensão é maior do que zero, já que não é constituído de apenas um ponto, e sim de infinitos pontos alinhados de uma maneira bastante peculiar. Fica estabelecida, desse modo, a noção intuitiva de uma dimensão não-inteira, nesse caso entre 0 e 1.

Entretanto, podemos quantificar essa dimensão através da já descrita relação:

$$N = L^{-D} \tag{4}$$

na qual (N) é o número de objetos de lado reduzido, (L) é o fator de redução e (D) é a dimensão.

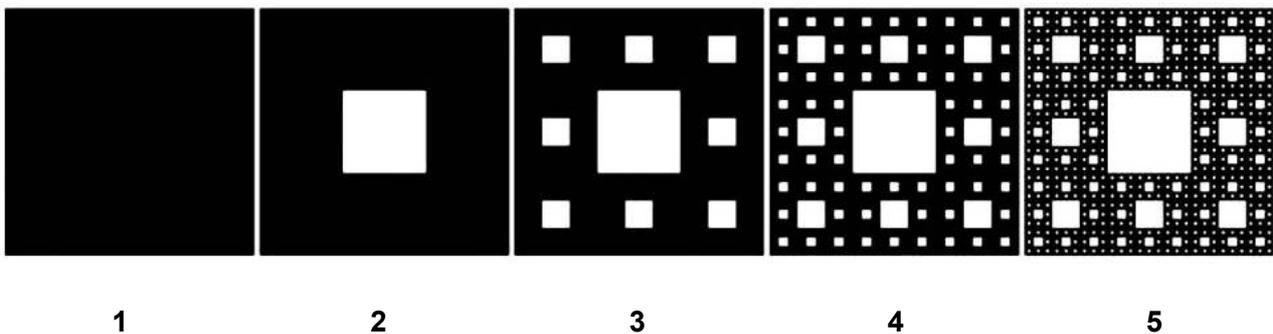
Dessa relação obtemos:

$$D = \frac{\log N}{\log L^{-1}} \quad (5)$$

No caso da Poeira de Cantor, temos como parâmetros  $N = 2$  e  $L = \frac{1}{3}$ , pois no lugar do segmento original traçamos 2 segmentos, cada qual com  $\frac{1}{3}$  do comprimento do segmento original. Com esses dados calculamos a dimensão do conjunto, a qual confirma a noção intuitiva de um valor compreendido entre zero e um:

$$D = \frac{\log 2}{\log 3} \cong 0,6309 \quad (6)$$

Rapidamente discutiremos a determinação da dimensão fractal de mais uma figura, o Tapete de Sierpinski (figura 3).



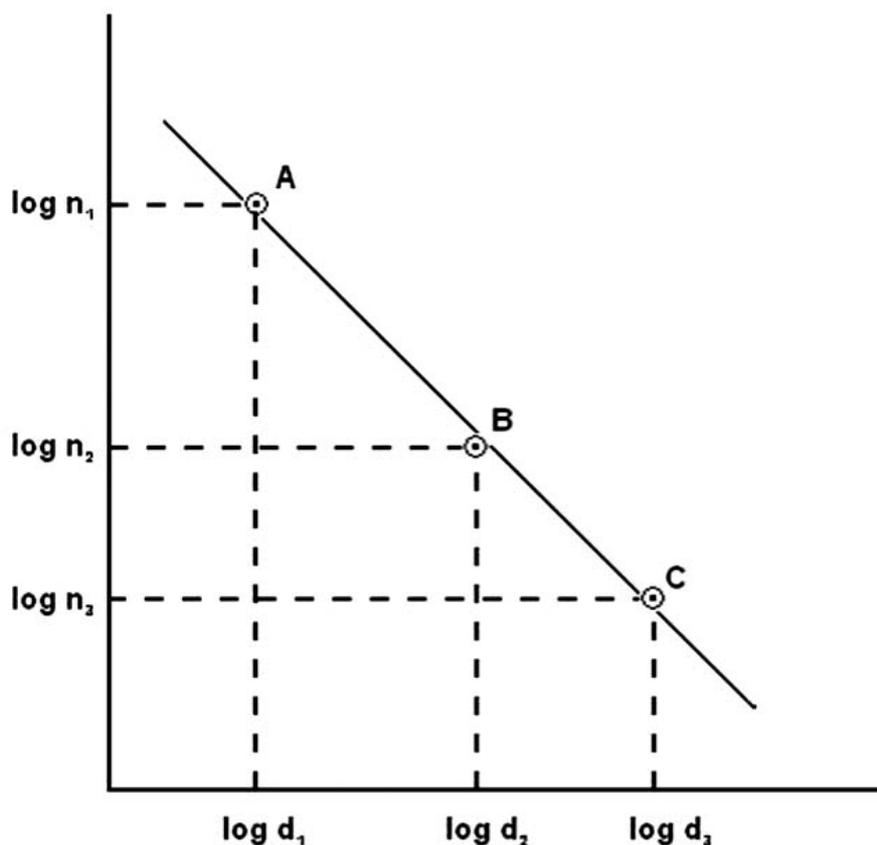
**Figura 3.** Tapete de Sierpinski.

O Tapete de Sierpinski é obtido a partir de um quadrado, retirando-se o quadrado central dos nove resultantes da redução do lado a um terço. Para cada quadrado restante se repete a mesma operação, infinitas vezes. Na figura 3 o processo foi efetuado 5 vezes. O objeto resultante tem dimensão menor que dois, uma vez que não preserva a área da figura original; porém, tem um aspecto de ocupar mais espaço que um simples segmento de reta, o que nos remete a uma dimensão maior que um. Logo, sua dimensão não-inteira encontra-se entre a de um segmento de reta e a de um quadrado (um e dois). Observando as etapas 1 e 2, percebemos que, ao reduzirmos o lado do quadrado 1 a um terço do original ( $L = \frac{1}{3}$ ), precisamos de apenas oito desses quadrados para obtermos a figura 2 ( $N = 8$ ). Logo, substituindo em (5), temos:

$$D = \frac{\log 8}{\log 3} \cong 1,8927 \quad (7)$$

Mais uma vez, confirmamos a noção intuitiva de que a dimensão seria um valor entre um e dois.

A determinação da dimensão fractal a partir da relação (5) é a base para o mais popular método de determinação da dimensão fractal, conhecido como *contagem de caixas*. O método de contagem de caixas consiste em se construir uma grade quadriculada cobrindo a figura a ser estudada. Cada quadrícula é um quadrado de lado  $d$ . Contamos o número  $n$  de quadrículas que contenham pelo menos um ponto da figura. O processo deve ser efetuado com diversas grades, cujas quadrículas têm por lados  $d_1, d_2, d_3, \dots$ ; os números de quadradinhos contados serão, respectivamente,  $n_1, n_2, n_3, \dots$ . Utilizando eixos cartesianos, construímos um gráfico em cujo eixo horizontal medimos  $\log d$  e em cujo eixo vertical medimos  $\log n$ . A cada ponto de coordenadas  $(\log d, \log n)$  corresponde um ponto nesse gráfico. É de se esperar que tais pontos estejam aproximadamente alinhados, sendo a reta que melhor se ajusta a esse conjunto de pontos determinada por sua equação  $y = a + bx$  (figura 4).



**Figura 4.** Gráfico da relação logarítmica entre o número de quadrículas e seus lados.

Se denominarmos por  $\delta$  o diâmetro da quadrícula em que a grade é composta por apenas uma quadrícula (ou seja, toda a figura estudada está contida nessa única quadrícula), teremos que a relação  $d_n/\delta$  é o fator de redução do lado ( $L$ ). Mesmo porque os diâmetros das grades seguintes serão sempre menores que  $\delta$  (afinal, teremos mais de uma quadrícula para cobrir todos os pontos da figura, conforme aponta a figura 5).

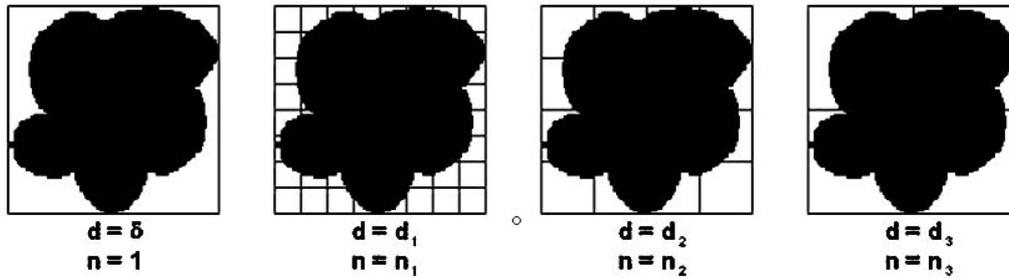


Figura 5. Contagem de caixas.

Substituindo na relação (4), teremos:

$$N = (d_n/\delta)^{-D} \quad (8)$$

A partir dessa relação, obtemos:

$$\log n_n = D \log \delta - D \log d_n \quad (9)$$

Como  $D$  é o parâmetro da dimensão e  $\delta$  é o maior diâmetro da figura estudada – e, portanto, ambos têm valores fixos –, temos que o termo da equação (9)  $D \log \delta$  é uma constante. Ou seja, a equação (9) é uma equação linear do tipo:

$$y = a + bx \quad (10)$$

Sendo:

$$y = \log n_n$$

$$a = D \log \delta$$

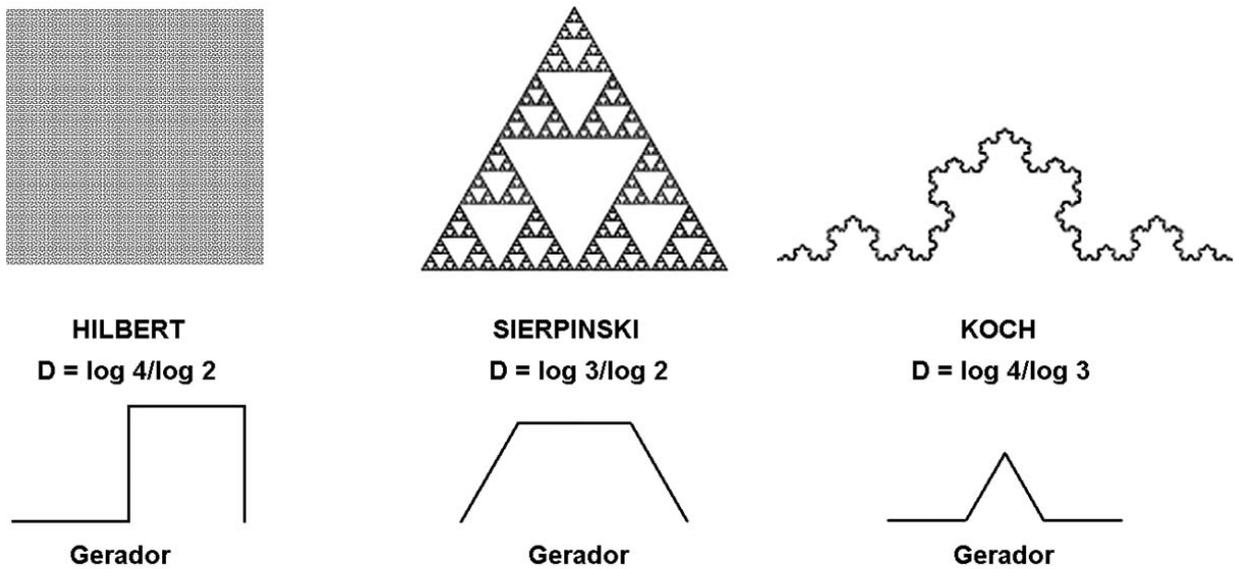
$$b = -D$$

$$x = \log d_n$$

Na equação acima (10), o coeficiente angular  $b$  é a dimensão fractal  $D$  procurada, obtida pelo método da *regressão linear*, que transformou a relação entre  $N$  e  $L$  numa reta (cuja inclinação nos fornece  $D$ ). O resultado confirma o que seria de se esperar intuitivamente. Como já descrevia a equação (5), a dimensão  $D$  é dada pela divisão de  $\log N$  por  $\log L$ , que mostra justamente a relação trigonométrica da *tangente* do ângulo formado pela reta obtida por regressão linear e o eixo das abscissas; ou seja, o *ângulo de inclinação* dessa reta de fato deveria ser a expressão da dimensão fractal  $D$ . Já o termo independente  $a$ , determinante da translação da reta no plano cartesiano, é variável dependente do tamanho da figura (expresso por  $\delta$ ) e sua dimensão.

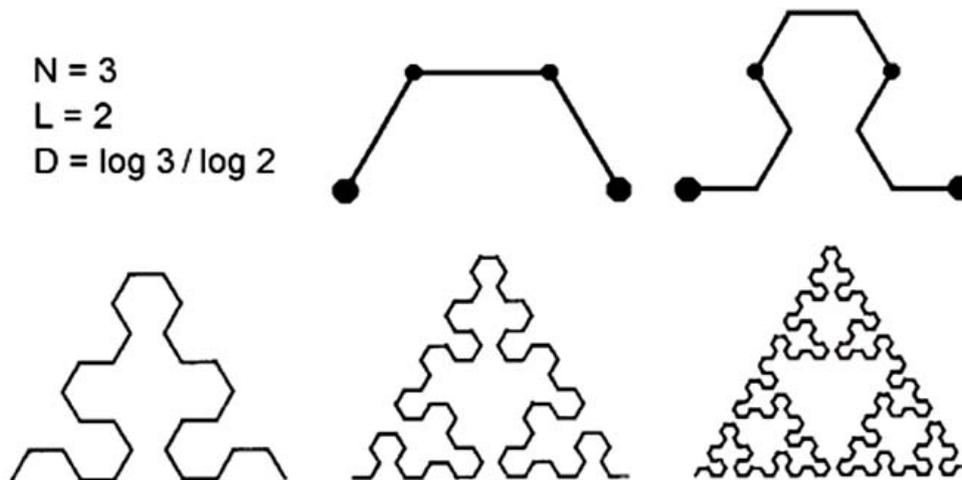
A partir desses conceitos básicos, desenvolvemos e aprimoramos um programa computacional na plataforma Visual Basic 5.0®, batizado *OncoFractal* pelo seu autor principal, Prof. Celso Penteado. O software trabalha justamente pelo processo de contagem de caixas,

sendo comprovado determinando com razoável precisão a dimensão teórica e bem conhecida de fractais clássicos gerados por computador, como as Curva de Koch, Hilbert e Sierpinski (figura 6).



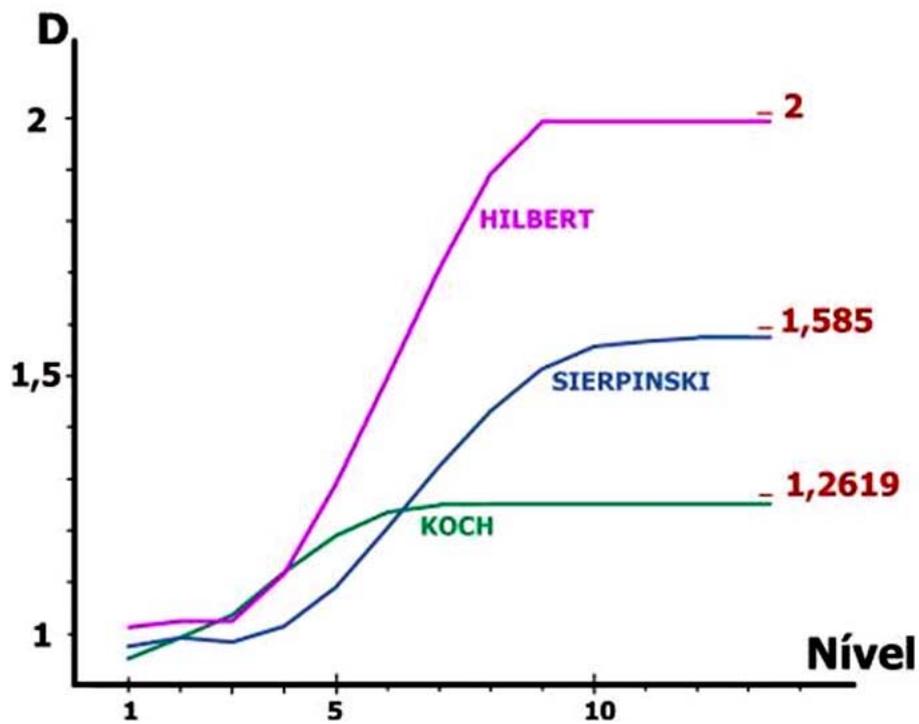
**Figura 6.** Fractais com dimensão conhecida usados para calibração, com seus geradores.

Esses conjuntos, construídos de forma recursiva, têm sua complexidade de estrutura fina crescente conforme o nível de iteração do processo de sua geração (figura 7). Desse modo, as dimensões fractais dos objetos com dimensão teórica conhecida foram determinadas de acordo com o os processos recursivos que sofreram.



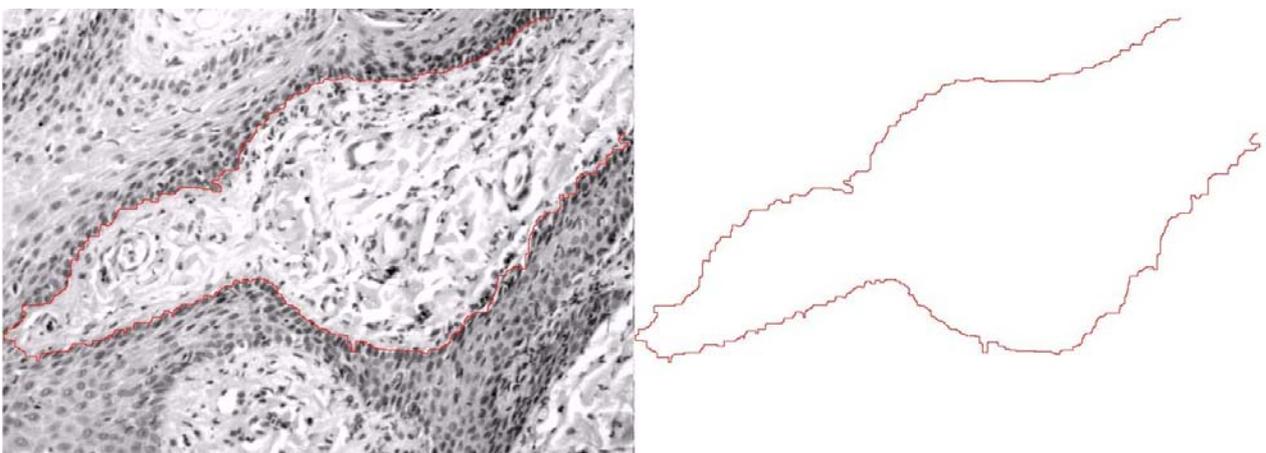
**Figura 7.** Complexidade crescente da Curva de Sierpinski em 5 níveis de iteração.  $D \cong 1.58$

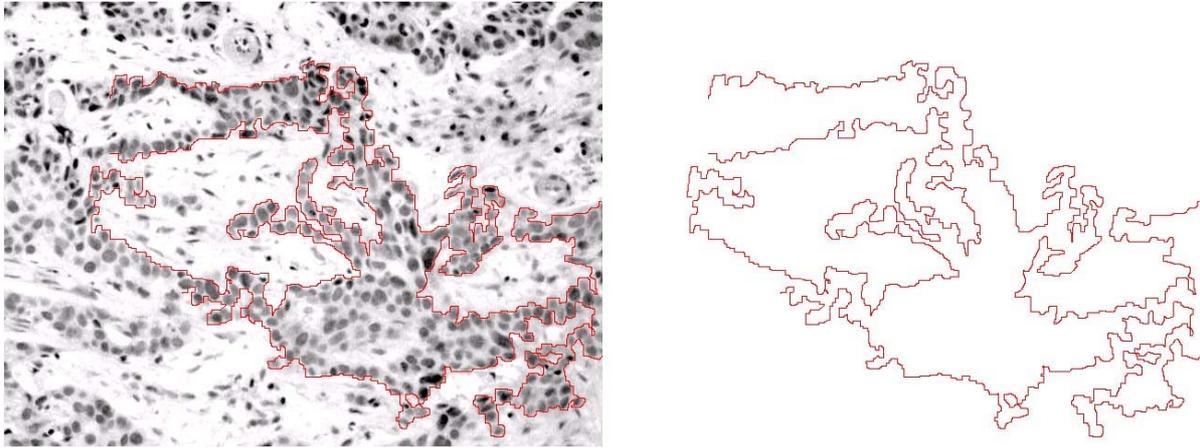
O programa demonstrou que, além de ter obtido dimensões muito próximas das dimensões teóricas desses objetos (figura 8), foi capaz de distinguir mesmo a complexidade mais grosseira (como grandes reentrâncias), posto que logo nas primeiras iterações a dimensão calculada já cresce substancialmente. Isso torna muito válida a sua aplicabilidade ao nosso modelo, uma vez que a tortuosidade apresentada nas nossas linhas de interface não tem o mesmo grau de fineza de estrutura dos fractais gerados por computador, pelo método IFS – *Iterated Function System*.



**Figura 8.** Gráfico das dimensões teórica e calculada para cada fractal ( $D$ ) em função do número de iterações em sua geração ( $Nível$  de complexidade).

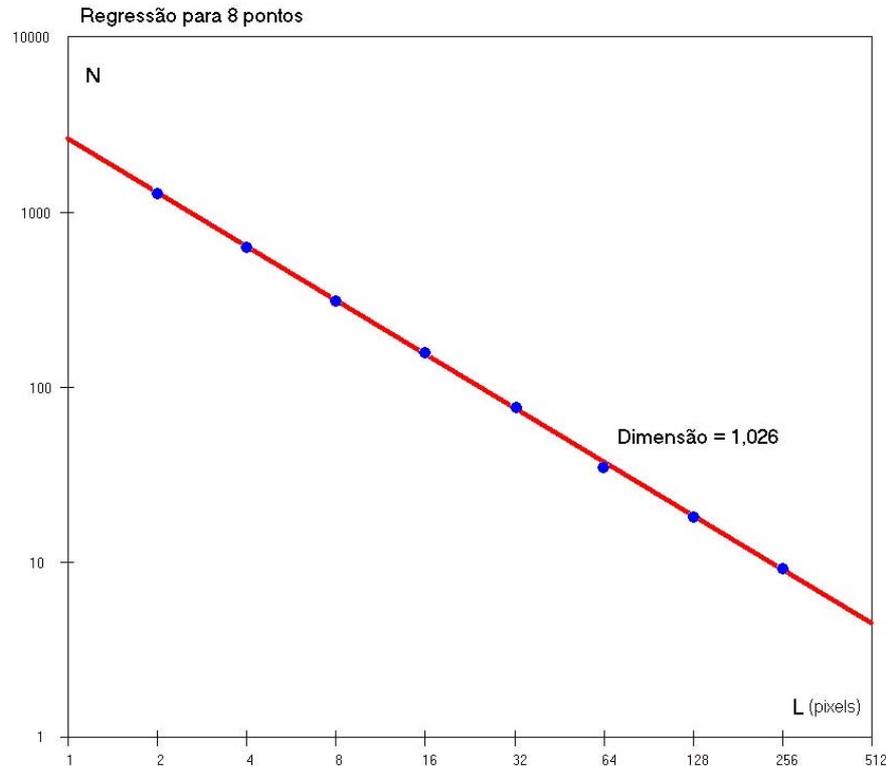
Paralelamente, foram levantados nos livros de registro do Serviço de Anatomia Patológica os casos de biópsia de cavidade oral, dos quais 16 foram selecionados com base na qualidade das lâminas e clareza de classificação diagnóstica. Os casos foram então divididos em quatro grupos diagnósticos, com crescentes graus de agressividade: Normal ou Reacional (correspondendo a inflamações), Displasia, Carcinoma Expansivo e Carcinoma Infiltrativo. Essas lâminas, coradas por hematoxilina e eosina, foram digitalizadas com o equipamento Image-Pro Plus®, sob microscópio óptico de médio aumento (magnificação em lente objetiva de 40 vezes) e com resolução de 1024 por 768 pixels, em escalas de cinza. Posteriormente, sofreram tratamento no Adobe Photoshop 7.0®, tanto para intensificar a distinção entre tecido epitelial e tecido conjuntivo quanto para permitir o traceamento da linha de interface epitélio-estromal, que foi realizado de forma manual (figura 9).





**Figura 9.** Imagens capturadas com interface traçada entre o epitélio e o estroma.  
Acima: normal/reacional; abaixo: carcinoma infiltrativo.

Por fim, essas linhas de interface foram submetidas ao método de contagem de caixas pelo programa *OncoFractal*, a fim de determinar as suas respectivas dimensões. A regressão linear representativa da dimensão fractal foi obtida com oito pontos dispostos em escala logarítmica, cujas caixas mediram respectivamente 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 pixels de lado (figura 10). Conforme já descrito, suas dimensões foram determinadas pelo grau de inclinação dessas retas (coeficiente angular).



**Figura 10.** Gráfico de regressão linear da contagem de caixas, com a respectiva dimensão fractal.

Procedemos, com esse material, a interpretação dos resultados obtidos.

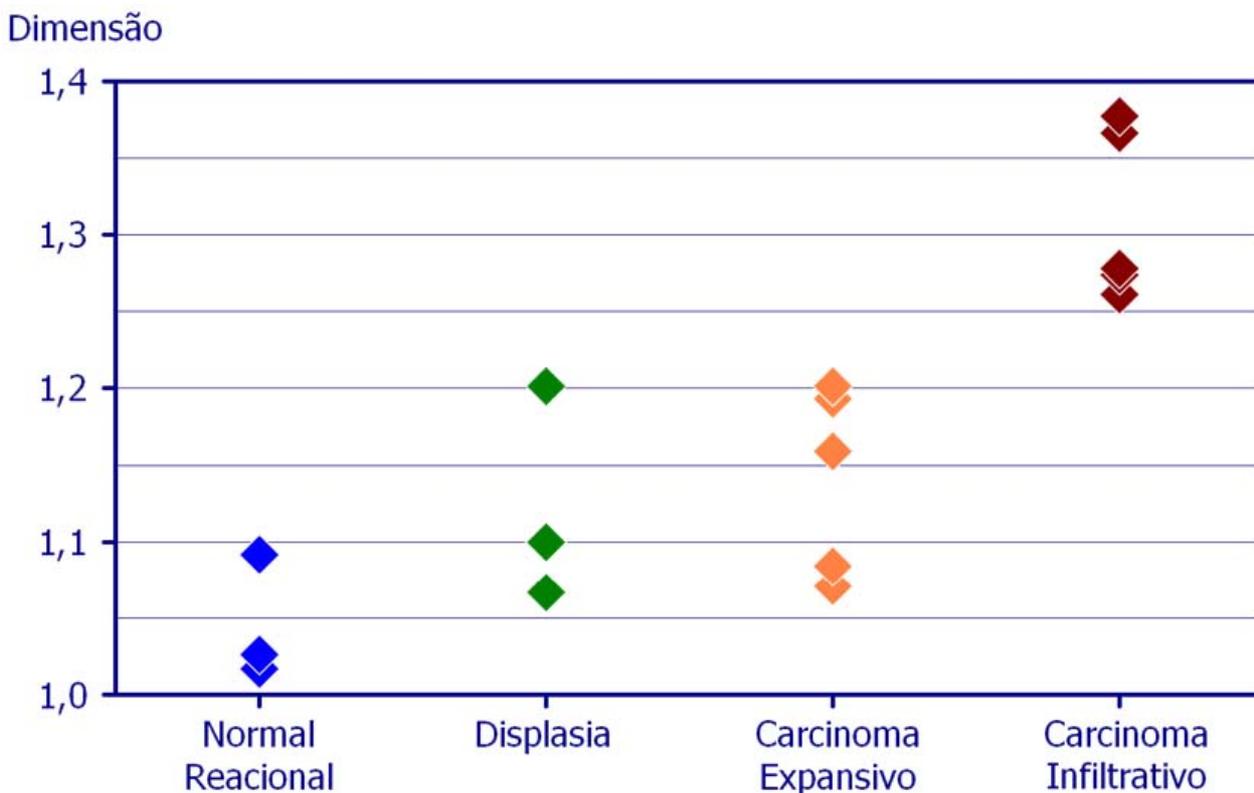
## 6 RESULTADOS

Os dezesseis casos revisados que foram incluídos no estudo foram distribuídos em quatro grupos diagnósticos, e a dimensão fractal da linha representativa da interface entre o tecido epitelial e o estroma subjacente foi calculada (tabela 4).

Normal ou Reacional	Displasia	Carcinoma Expansivo	Carcinoma Infiltrativo
1.017	1.067	1.070	1.261
1.026	1.100	1.084	1.274
1.092	1.202	1.159	1.278
		1.194	1.367
		1.202	1.378

**Tabela 4.** Dimensão fractal calculada para cada caso estudado.

Podemos, a partir desses dados, representar os resultados graficamente, explicitando a tendência de aumento da dimensão fractal conforme se incrementa o grau de displasia tecidual (figura 11).



**Figura 11.** Representação gráfica dos resultados em função dos grupos diagnósticos.

## 7 DISCUSSÃO

A crítica mais óbvia que essa pesquisa sofreria dos crédulos na Medicina Baseada em Evidências é o baixo número de casos estudados (N), o que impossibilitaria qualquer tratamento estatístico que se pretenda sério em demonstrar algum grau de correlação significativo dos resultados encontrados. Essa dificuldade foi claramente dependente do também pequeno registro de pacientes com lesões de cavidade oral no Hospital de Clínicas, atribuível ao fato de não ser esse um serviço de referência para tal tipo de neoplasias. Provavelmente um número mais expressivo de casos seria encontrado num hospital de referência oncológica, ou mesmo em serviços de odontologia e cirurgia buco-maxilo-facial.

Muito embora idealmente devêssemos ter lançado mão de um maior grupo de pacientes, cabe lembrar que estudos meramente estatísticos nessa área também têm falhado em obter dados prognósticos confiáveis. Isso é fruto não só de falhas metodológicas, como a dificuldade em se realizar estudos individuados, longitudinais e prospectivos – sejam eles observacionais (*coorte*) ou mesmo intervencionistas (*ensaio clínico*) – com um número grande de casos apreciados, mas também da própria limitação da confiabilidade dos critérios de estadiamento, como é bem relatado pelos baixos valores kappa encontrados nessas publicações. Portanto, a Medicina Baseada em Evidências peca nesse caso ao não conseguir valores prognósticos robustos. Daí a relevância do nosso trabalho: mesmo com baixo N, conseguimos revelar novos *insights* sobre o processo fisiopatológico da carcinogênese, ao descrevermos e quantificarmos o processo de *invasão local*.

Por outro lado, um projeto que almeja a geração de dados médicos objetivos, livres da subjetividade dos examinadores, deve sempre que possível afastar o fator humano de sua metodologia. A partir disso constatamos que, por mais que a dimensão fractal das bordas tumorais seja obtida com recursos computacionais, a construção dessas linhas se deu de forma manual. Isso significa que o objetivo da pesquisa foi parcialmente alcançado, pois tal traceamento também está submetido a interpretações pessoais. Ou seja, diferentes pessoas poderiam compreender os limites entre epitélio e estroma de cada imagem de forma individual, preservando a partir disso alguma variabilidade interobservador. É claro que isso é minimizado pela distinção visual razoavelmente clara entre o tecido epitelial e o conjuntivo; todavia, pode-se tornar um tanto mais complicada especialmente nos casos de significativa infiltração tumoral.

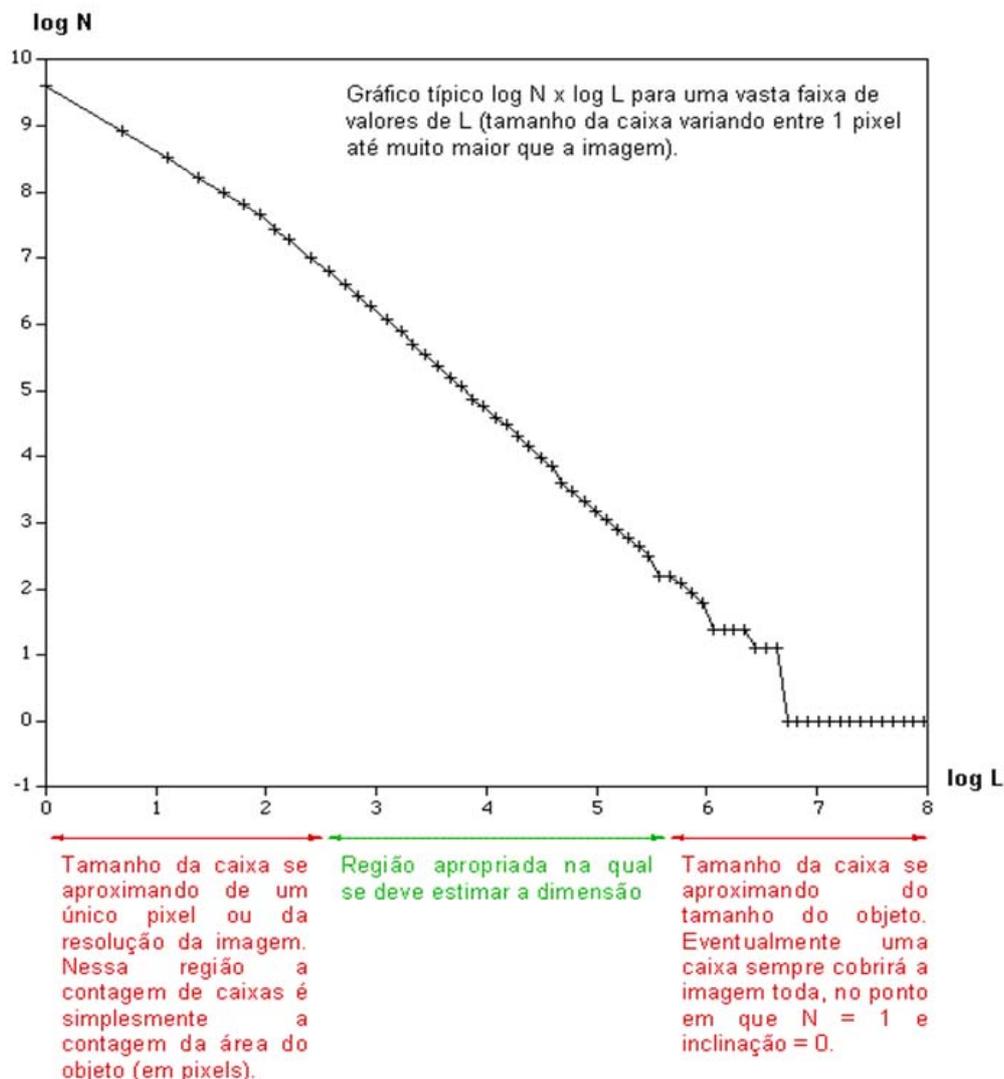
Conquanto nós tenhamos obtido um programa capaz de gerar automaticamente essas linhas de interface (ProntoMask 1.0<sup>®</sup>), não foi possível a sua aplicação ao nosso modelo. Isso porque, ainda que o olho humano diferencie os dois tecidos vizinhos (pela arquitetura, pelo aspecto, pela distribuição de vasos e dos núcleos celulares...), a coloração por hematoxilina e eosina não gera distinção de tons suficiente para o computador perceber esse encontro entre a mucosa e o estroma. Uma saída seria a coloração imunohistoquímica por citoqueratina, que marcaria de forma potente o tecido epitelial tanto normal quanto canceroso – já que é um

carcinoma *escamoso* –, gerando dessa maneira contraste suficiente para o programa perceber a diferença de nível de cores em RGB.

Outro ponto digno de nota no que concerne aos métodos refere-se aos pontos gerados pela contagem de caixas, usados na geração do gráfico de regressão linear representativo da dimensão fractal. Os fractais teóricos, gerados por computador (como os três aplicados à calibração do programa), apresentam como característica marcante – além da auto-similaridade estrutural – uma *textura fina*, isto é, uma complexidade estrutural que permanece ao infinito. Isso quer dizer que, mesmo ampliando essas figuras indefinidamente, elas ainda preservam o mesmo nível de rugosidade em seu aspecto, fruto dos também infinitos procedimentos recursivos que as geraram. Nesse caso, além de as suas reentrâncias estarem distribuídas de forma homogênea, elas continuam sendo apontadas pelo processo de contagem de caixas até próximo ao limite inferior de resolução do método – o *pixel*, quando computacional –, até que as distorções dessas imagens começam a se tornar aparentes. Disso resultam pontos extremamente bem alinhados na contagem de caixas, mostrando que a complexidade se preserva invariante em diferentes escalas. Por outro lado, os fractais que geramos a partir das nossas linhas de interface claramente estão longe de apresentar o mesmo grau de estrutura fina. Isso é fruto do próprio modo através do qual as imagens foram obtidas: cada célula não se comporta como um ponto; elas são grandes o suficientes para determinarem elas mesmas o limite inferior de resolução da imagem. Daí entende-se que, por mais tortuosa que seja a borda de infiltração tumoral, sua reentrância nunca poderá ser inferior ao tamanho de uma célula. Logo, o limite inferior de complexidade dessas linhas é o tamanho de cada célula, muito maior que o tamanho de cada unidade formadora de imagem, o *pixel*.

Fica dessa forma intuitivo para qualquer leitor que tais linhas de interface não deixaram de ser *curvas*, as quais contornam as células e cujas dimensões topológicas continuam sendo *um*. Porém, em uma dada *janela de escala*, tais curvas apresentaram tortuosidade constante – demonstrada pelo razoável grau de alinhamento dos pontos na contagem de caixas –, tornando-as assim fractais com propriedades *estatísticas* semelhantes em diferentes escalas, o que é denominado *fractal estocástico*. Isso significa que não é exatamente a *mesma imagem* que está se repetindo em diferentes escalas, como na Curva de Sierpinski, mas sim que a *rugosidade* dessas curvas se mantém em diferentes escalas, representada pela constante taxa exponencial de incremento no número de caixas necessárias para cobri-la quando reduzimos o seu lado, fruto do que obtemos um conjunto de pontos satisfatoriamente alinhados. Se essa propriedade estocástica não estivesse presente, perceberíamos que os pontos da regressão linear estariam extremamente mal alinhados, demonstrando dessa maneira que não houve preservação da complexidade nas diferentes escalas (propriedade que define um fractal). Mesmo que de seus pontos fosse possível extrairmos uma linha de regressão linear cuja inclinação poderia ser representativa de uma dimensão não-inteira, o mal alinhamento desses pontos impede que consideremos tal imagem como um objeto fractal.

A partir dessas reflexões, podemos estabelecer que as linhas de interface de borda tumoral deveriam apresentar, de forma distinta, uma *janela de escala* na qual poderia ser inferida uma dimensão fractal; isso significa dizer que os pontos da regressão linear da contagem de caixas deveriam estar alinhados apenas dentro de uma faixa de tamanhos de caixa ( $L$ ), e dessa inclinação deveríamos extrair a dimensão fractal. Assim, no extremo superior, em que as caixas fossem muito grandes, a figura estudada caberia completamente dentro da caixa, e aumentos no seu lado manteriam constante o número de caixas necessário para cobrir a figura. Nesse caso, a figura estudada se comportaria como um *ponto*, plenamente coberto por caixas de tamanhos diferentes e com número de caixas ( $N$ ) invariável, apresentando assim dimensão *zero*. Isso seria expresso por pontos dispostos de forma *horizontal* no extremo direito do gráfico, já que  $N$  seria constante. No outro extremo, quando as caixas fossem demasiado pequenas, a contagem de caixas se aproximaria de uma contagem de *pixels*, correspondendo dessa forma a uma espécie de medição linear do seu comprimento. Desse modo, a figura estudada se comportaria como uma curva, cuja tortuosidade não seria aferida posto que as caixas seriam menores que suas reentrâncias; conseqüentemente, apresentaria dimensão igual a *um* (figura 12).



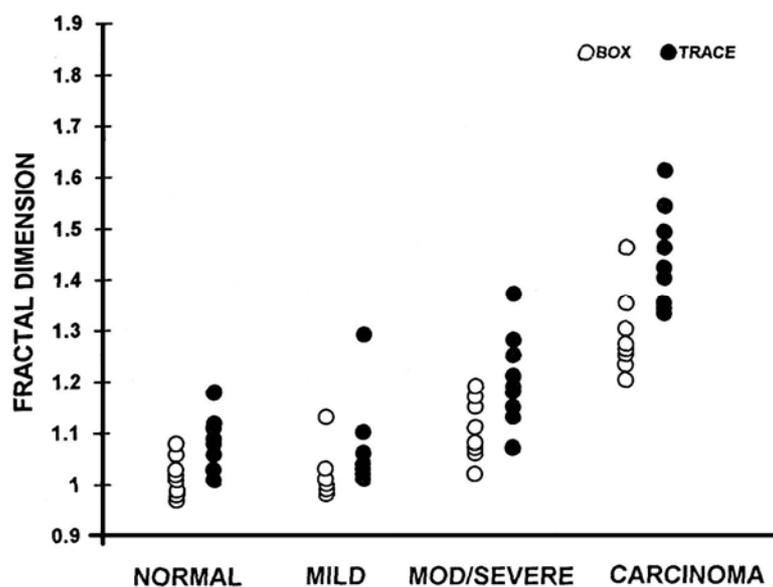
**Figura 12.** Janela de escala apropriada para estimar a dimensão fractal por contagem de caixas.

Um método ideal para a aferição da dimensão de fractais estocásticos deveria, portanto, ser capaz de delimitar essa *janela de escala* dentro da qual a imagem em questão apresenta dimensão fractal. Contudo, nosso experimento não deixa clara essa faixa de segurança. Por mais que outros artifícios tenham sido empregados para refinar esse cálculo, como a translação da grade de caixas para obtermos sempre a menor contagem possível, nossos pontos não evidenciam os limites do comportamento fractal das linhas de interface. Poderíamos atribuir esse achado à pequena amostra de tecido que tivemos: sua análise em menor aumento, ou a construção de um campo visual mais amplo do tecido, permitiria um número maior de tamanhos de caixas, o que possibilitaria uma regressão linear com bastantes mais pontos. Apesar disso, na verdade, é bem descrita a fraqueza da contagem de caixas perante outros métodos em explicitar a zona de comportamento fractal. Elegemos essa metodologia pela sua praticidade de execução e compreensão, mas outros métodos (como *Sandbox Dimension*, *Minkowski Sausage*, *Boundary Tracing*, entre inúmeros outros) seriam capazes de fornecer valores ainda mais confiáveis.

Quanto aos resultados, os valores obtidos mostram um claro incremento da dimensão fractal da interface epitélio-estromal acompanhando a crescente displasia dos tecidos estudados. A maior dimensão fractal mostra que essas linhas tendem a ocupar o plano mais densamente, tanto que seus valores crescem em direção à segunda dimensão. Isso demonstra que essa linha se torna cada vez mais tortuosa, o que fica visível a olho nu na figura 8. Esse achado revela o que já era esperado, posto que um dos mais importantes parâmetros de distinção entre neoplasias benignas e malignas é a invasão local: tumores malignos apresentam crescimento acompanhado de infiltração progressiva, dificultando a completa ressecção cirúrgica e permitindo seu implante em locais distantes (metástases).

Mais um fato curioso foi a significativa sobreposição dos valores encontrados entre os diferentes grupos diagnósticos. Podemos atribuir esse achado a vários fatores, como o baixo número de casos estudados (o que invalida nosso método como parâmetro único de distinção diagnóstica, em razão do que sequer submetemos esses dados a tratamento estatístico) e até mesmo a imprecisões da classificação diagnóstica nos quatro grupos, que é vulnerável a falhas justamente pela sua natureza subjetiva (representada pelo índice kappa). Mesmo com um grupo estudado pequeno, nossos resultados foram semelhantes aos encontrados em literatura, quando comparamos ao trabalho original de LANDINI e RIPPIN (1994) (figura 13).

Igualmente a eles, percebemos que o nosso grupo diagnóstico de *Carcinoma Infiltrativo* apresenta valores de dimensão sem sobreposição aos demais grupos, portanto plenamente diferenciado. Ainda, podemos notar que nesse trabalho houve valores de dimensão menores que 1.00 nos grupos *Normal* e com displasia leve (*Mild*). Esse achado inusitado mostra uma pequena fraqueza do algoritmo de contagem de caixas desses autores, já que não se espera encontrar valores inferiores a *um* para uma linha contínua e pouco tortuosa. Apesar do baixo número de casos do nosso estudo, é relevante o fato de não termos encontrado esse tipo de resultado.



**Figura 13.** Dimensão fractal por *box counting* (pontos brancos) e *boundary tracing* (pontos pretos).

Com isso, entendemos que o uso da dimensão fractal como ferramenta isolada não teria poder *diagnóstico*, já que só é capaz de distinguir aquilo que é claramente diferente do resto, isto é, o grupo *Carcinoma Infiltrativo*. Contudo, são preciosos os dados gerados por esse método quando a finalidade é *prognóstica*: ao quantificar o processo fisiopatológico de invasão local, as dimensões fractais das bordas tumorais se tornam relevantes em apontar, dentro de um mesmo grupo diagnóstico, quais os pacientes que apresentam lesões mais agressivas. Então, a grande virtude do que proporcionamos é o acréscimo de novas informações ao diagnóstico já estabelecido, apontando os pacientes com maior dimensão fractal como aqueles com maior potencial de ter uma evolução mais agressiva de sua doença.

Por exemplo: mesmo que um paciente seja diagnosticado no grupo de *Displasia* (com menor malignidade perante os outros diagnósticos), alguns desses pacientes evoluirão mais sombriamente em seus seguimentos. Nesse caso, não haveria mais sentido naquele agrupamento inicial: para eles, a malignidade se expressou como 100%. É, pois, justo que se busquem dentro desse grupo quais poderão ser os menos afortunados que terão o pior prognóstico e merecerão tratamento mais agressivo. A partir dos nossos resultados, poderíamos apontar o paciente que apresentou dimensão fractal igual a 1.202, visualmente distinta em relação ao resto do grupo. Isso porque esse valor representa um processo mais intenso de invasão local, predizendo, com isso, maior malignidade perante o resto do grupo.

Analogamente, dos pacientes com *Carcinoma Expansivo*, o que teve dimensão 1.070 deverá evoluir melhor que seus pares; logo, poderíamos esperar um melhor prognóstico. Isto é, conseguimos levantar hipóteses consistentes na compreensão do processo neoplásico, as quais poderão inclusive refinar as estratégias terapêuticas de cada paciente, o que pode levar a uma taxa de sobrevivência mais aceitável para as pessoas que recebem o diagnóstico de carcinoma escamoso na cavidade oral.

## 8 CONCLUSÕES

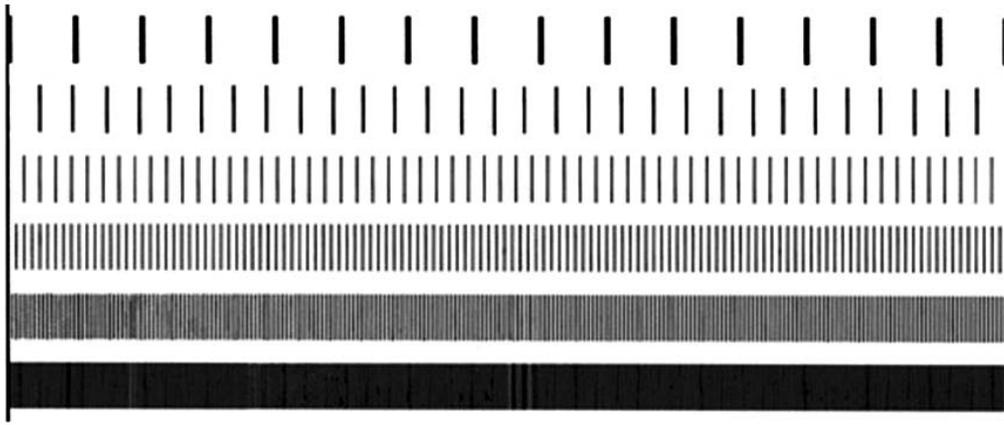
As lesões neoplásicas da cavidade oral são submetidas atualmente a uma categorização histopatológica pouco confiável. Isso se deve à subjetividade dos correntes parâmetros de avaliação e à sua incapacidade em descrever os mecanismos da doença. Tais constatações são expressas pelo baixo grau de concordância entre os examinadores (índice *kappa*) e pela fraca correlação do comportamento esperado e observado em pacientes com um dado diagnóstico.

A configuração do nosso projeto permitiu que o meticuloso traçado da interface entre tecido epitelial e estroma validasse o método desenvolvido, verificando crescentes valores de dimensão fractal nas bordas tumorais dos pacientes que apresentaram neoplasias mais agressivas. Conseguimos assim desviar o viés da variabilidade interobservador na geração de dados para avaliar as neoplasias da mucosa oral, já que obtivemos de forma semi-automatizada um parâmetro confiável na quantificação do fenômeno biológico de invasão tumoral. A partir disso evitamos a categorização diagnóstica, que agrupa pacientes distintos sob um mesmo rótulo e prejudica a valorização prognóstica dos dados. Além disso, a descrição da invasão local – por ser um determinante do comportamento dessas neoplasias pela maior agressividade observada nas células da borda tumoral – possibilitou uma compreensão mais profunda da fisiopatologia do câncer.

Buscando retirar ainda mais a subjetividade humana, ambicionamos o uso de colorações imunohistoquímicas para corar a citoqueratina expressa pelos carcinomas escamosos. Com isso, tornaríamos ainda mais evidente a distinção entre o tecido neoplásico e o estroma subjacente, gerando um gradiente de cores que permitirá o traceamento computadorizado das linhas de interface que fizemos manualmente.

Por fim, almejamos a comparação dos nossos resultados a outros métodos, posto que os correntes estadiamentos estão longe de ser um padrão-ouro. Uma possibilidade é a utilização de técnicas que analisam a integridade do DNA: constatações de alterações significativas na estrutura do material genético das células da borda tumoral obviamente se correlacionam diretamente ao grau de displasia do tecido, propiciando a perspectiva de uma análise multivariada robusta o suficiente para permitir um diagnóstico automatizado.

Outra estratégia que estamos desenvolvendo é o cálculo da *lacunaridade* das linhas de interface que obtivemos. Assim como a dimensão fractal quantifica a *rugosidade*, a lacunaridade expressa a *heterogeneidade* das figuras fractais. É uma ferramenta tão universal que pode inclusive ser aplicada a modelos não-fractais, como a análise da distribuição de dados binários. No caso particular dos objetos fractais, observamos que figuras com dimensão teórica idêntica podem ter aspecto absolutamente distinto, decorrente da variação em sua lacunaridade (figura 14). Isso é fruto dos diversos processos que podem ser aplicados em sua construção, mesmo que se mantenha a relação entre o fator de redução do lado ( $L$ ) e o número de figuras necessárias à sua construção ( $N$ ) – que invariavelmente leva a uma mesma dimensão ( $D$ ).



**Figura 14.** Poeira de Cantor com lacunaridade tendendo a  $um$  (acima) e zero (abaixo).  $D = 0.5$

Com essa finalidade, propomos um método que batizamos de *gliding yardstick*. Consiste na realização do método do compasso (ou *yardstick*, *boundary tracing*, semelhante à contagem de caixas), no qual a figura é coberta – em vez de caixas com lados variados – por compassos com diferentes raios. Esse método é clássico na determinação da dimensão de fractais que topologicamente são curvas (dimensão entre um e dois), pois correlaciona o número de compassos ( $N$ ) ao seu raio ( $L$ ), relação cujo expoente expressa a dimensão ( $D$ ). Posteriormente, deve ser efetuada a contagem do número de pixels dentro de cada compasso usado para percorrer a figura. A partir disso é construído um histograma da distribuição dos pixels em cada compasso, com valores ordenados de acordo com a ordem das suas posições. Esse histograma torna-se representativo do grau de *agrupamento* ou de *dispersão* dos pixels na linha, e é realizado para diferentes tamanhos de abertura do compasso. A cada um desses histogramas é aplicado o método *gliding box* (originalmente descrito para a avaliação de lacunaridade de fractais com dimensão entre zero e um): agora, agrupam-se seqüencialmente as colunas das somas de pixels contadas para cada compasso, em diferentes escalas. Isso é feito pela translação de caixas (*gliding box*) com diferentes lados, dentro das quais passa a ser encontrado o número total de pixels da figura em cada segmento, de modo seqüencial.

Esse método é capaz de aferir a *variância translacional* da densidade de massa na linha estudada, pois calculamos estatisticamente a variabilidade do número de pixels dentro de cada caixa deslizante. Assim, uma linha invariante (baixa lacunaridade) se mostraria mais homogênea, do que poderíamos deduzir menor hostilidade da massa em proliferação. Por outro lado, para um mesmo valor de dimensão, uma linha com densidade de massa muito variável (alta lacunaridade) seria a representação da heterogeneidade das regiões limítrofes do tumor, do que depreenderíamos um comportamento mais agressivo.

Tais perspectivas nos permitem novos *insights*: diferentemente da contagem de caixas, em que comparamos as *partes ao todo* para aferir a *rugosidade*, conseguiríamos com esse método a comparação das *partes* com as *outras partes*, aferindo assim a *homo-* ou *heterogeneidade* das bordas tumorais, que por sua vez é expresso numericamente como sua *lacunaridade*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC *et al*: **Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia**. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 80(2):188–191, 1995.
- [2] Allain C, Cloitre M: **Characterizing the lacunarity of random and deterministic fractal sets**. *Phys Rev A*, 44(6):3552–3558, 1991.
- [3] Baish JW, Jain RK: **Fractals and cancer**. *Cancer Res*, 60(14):3683–3688, 2000.
- [4] Barbosa RM: **Descobrimos a geometria fractal**. Belo Horizonte, Autêntica, 2002.
- [5] Bauer W, Mackenzie CD: **Cancer detection via determination of fractal cell dimension**. Workshop on Computational and Theoretical Biology, Michigan State University, 1999.
- [6] Benhamou CL, Harba R, Lespessailles E *et al*: Changes in fractal dimension of trabecular bone in osteoporosis: a preliminary study. *In*: Nonnenmacher TF, Losa GA, Weibel ER (eds): **Fractals in biology and medicine**. Basel, Birkhäuser, 1994; 292–299.
- [7] Bernard C: **Les phénomènes de la vie**. Paris, Baillière, 1878.
- [8] Berry CC: **The kappa statistic**. *JAMA*, 268(18):2513–2514, 1992.
- [9] Brothwell DJ, Lewis DW, Bradley G *et al*: **Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia**. *Community Dent Oral Epidemiol*, 31(4):300–305, 2003.
- [10] Bryne M, Koppang HS, Lilleng R *et al*: **Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value**. *J Pathol*, 166(4):375–381, 1992.
- [11] Bryne M, Nielsen K, Koppang HS *et al*: **Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients**. *J Oral Pathol Med*, 20(8):369–372, 1991.
- [12] Cannon WB: **Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics**. Jubilee volume for Charles Richet, 1926; 91–93.
- [13] Carletta JC: **Assessing agreement on classification tasks: the kappa statistic**. *Comput Linguist*, 22(2):249–254, 1996.
- [14] Cicchetti DV, Feinstein AR: **High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes**. *J Clin Epidemiol*, 43(6):551–558, 1990.
- [15] Cipra BA: **A healthy heart is a fractal heart**. *SIAM News*, 36:7, 2003.
- [16] Conte CC, Ergin MT, Ricci A Jr *et al*: **Clinical and pathologic prognostic variables in oropharyngeal squamous cell carcinoma**. *Am J Surg*, 159(6):619–620, 1990.
- [17] Cotran RS, Kumar V, Collins T (eds): **Robbins patologia estrutural e funcional**, 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.
- [18] Crissman JD, Liu WY, Gluckman JL *et al*: **Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx**. *Cancer*, 54(12):2995–3001, 1984.

- [19] Demir C, Yener B: **Automated cancer diagnosis based on histopathological images: a systematic survey**. Technical Report 05-09, Rensselaer Polytechnic Institute, 2005.
- [20] Evertsz CJG, Zuhlten C, Peitgen H-O *et al*: Distribution of local-connected fractal dimension and the degree of liver fattiness from ultrasound. *In*: Nonnenmacher TF, Losa GA, Weibel ER (eds): **Fractals in biology and medicine**. Basel, Birkhäuser, 1994; 307–314.
- [21] Falconer K: **Fractal geometry: mathematical foundations and applications**. Tiptree Essex, John Wiley & Sons, 1990.
- [22] Fatou P: **Sur les équations fonctionnelles**. *Bull Soc Math France*, 47:161–171, 1919.
- [23] Feinstein AR, Cicchetti DV: **High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes**. *J Clin Epidemiol*, 43(6):543–549, 1990.
- [24] Glass L, Mackey MC: **From clocks to chaos: the rhythms of life**. Princeton, Princeton University Press, 1988.
- [25] Gleick J: **Chaos: making a new science**. New York, Penguin, 1988.
- [26] Goldberger AL: **Non-linear dynamics for clinicians: chaos theory, fractals, and complexity at the bedside**. *Lancet*, 347(9011):1312–1314, 1996.
- [27] Goldberger AL, Rigney DR: Nonlinear dynamics at the bedside. *In*: Glass L, Hunter P, McCulloch A (eds): **Theory of heart: biomechanics, biophysics, and nonlinear dynamics of cardiac function**. New York, Springer, 1991; 583–605.
- [28] Goldberger AL, Rigney DR, West BJ: **Chaos and fractals in human physiology**. *Sci Am*, 262(2):42–49, 1990.
- [29] Goldman RL: **The reliability of peer assessments of quality of care**. *JAMA*, 267(7):958–960, 1992.
- [30] Julia G: **Mémoire sur l'iteration des fonctions rationnelles**. *J Math Pure Appl*, 8:47–245, 1918.
- [31] Kundel HL, Polansky M: **Measurement of observer agreement**. *Radiology*, 228(2):303–308, 2003.
- [32] Lacy PD, Spitznagel EL Jr, Piccirillo JF: **Development of a new staging system for recurrent oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma**. *Cancer*, 86(8):1387–1395, 1999.
- [33] Landini G: Complexity in tumour growth patterns. *In*: Losa GA, Merlini D, Nonnenmacher TF, Weibel ER (eds): **Fractals in biology and medicine, volume II**. Basel, Birkhäuser, 1994; 268–283.
- [34] Landini G, Rippin JW: Fractal dimension as a characterisation parameter of premalignant and malignant epithelial lesions of the floor of the mouth. *In*: Nonnenmacher TF, Losa GA, Weibel ER (eds): **Fractals in biology and medicine**. Basel, Birkhäuser, 1994; 315–322.
- [35] Landini G, Rippin JW: **Fractal dimensions of the epithelial-connective tissue interfaces in premalignant and malignant epithelial lesions of the floor of the mouth**. *Anal Quant Cytol Histol*, 15(2):144–149, 1993.

- [36] Landis R, Koch G: **The measurement of observer agreement for categorical data.** *Biometrics*, 33(1):159–174, 1977.
- [37] Lorenz EN: **Deterministic nonperiodic flow.** *J Atmos Sci*, 20(2):130–141, 1963.
- [38] Mandelbrot BB: A fractal's lacunarity, and how it can be tuned and measured. *In*: Nonnenmacher TF, Losa GA, Weibel ER (eds): **Fractals in biology and medicine.** Basel, Birkhäuser, 1994; 8–21.
- [39] Mandelbrot BB: **Les objets fractals: forme, hasard et dimension.** Paris, Flammarion, 1975.
- [40] Mandelbrot BB: **The fractal geometry of nature**, 3<sup>rd</sup> ed. New York, W. H. Freeman and Company, 1983.
- [41] Meléndez R, Meléndez-Hevia E, Canela EI: **The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism.** *Biophys J*, 77(3):1327–1332, 1999.
- [42] Miracco C, Bianciardini G, Perrone A *et al*: Fractal dimension of epithelial-connective tissue interface in basal cell carcinoma of the skin. *In*: Losa GA, Merlini D, Nonnenmacher TF, Weibel ER (eds): **Fractals in biology and medicine, volume II.** Basel, Birkhäuser, 1994; 284–293.
- [43] Nekka F, Li J: **A continuous translation based method to reveal the fine structure of fractal sets.** *Arab J Sci Eng*, 28(1C):169–188, 2003.
- [44] Plotnick RE, Gardner RH, Hargrove WW *et al*: **Lacunarity analysis: a general technique for the analysis of spatial patterns.** *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 53(5):5461–5468, 1996.
- [45] Plotnick RE, Gardner RH, O'Neil RV: **Lacunarity indices as measures of landscape texture.** *Landsc Ecol*, 8(3):201–211, 1993.
- [46] Rew DA: **Tumour biology, chaos and non-linear dynamics.** *Eur J Surg Oncol*, 25(1):86–89, 1999.
- [47] Ristanović D, Nedeljkov V, Stefanović BD *et al*: **Fractal and nonfractal analysis of cell images: comparison and application to neuronal dendritic arborization.** *Biol Cybern.*, 87(4):278–288, 2002.
- [48] Sedivy R, Windischberger CH, Svozil K *et al*: **Fractal analysis: an objective method for identifying atypical nuclei in dysplastic lesions of the cervix uteri.** *Gynecol Oncol*, 75(1):78–83, 1999.
- [49] Serra CP, Karas EW: **Fractais gerados por sistemas dinâmicos complexos.** Curitiba, Champagnat, 1997.
- [50] Smith TG Jr, Lange GD: Biological cellular morphometry – fractal dimensions, lacunarity and multifractals. *In*: Losa GA, Merlini D, Nonnenmacher TF, Weibel ER (eds): **Fractals in biology and medicine, volume II.** Basel, Birkhäuser, 1994; 30–49.
- [51] Smith TG Jr, Lange GD, Marks WB: **Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals.** *J Neurosci Methods*, 69(2):123–136, 1996.

- [52] Sudbo J, Bryne M, Johannessen AC *et al*: **Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia.** *J Pathol*, 194(3):303–310, 2001.
- [53] Sudbo J, Kildal W, Risberg B *et al*: **DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia.** *N Engl J Med*, 344(17):1270–1278, 2001.
- [54] Taylor RP, Micolich AP, Jonas D: **Fractal analysis of Pollock's drip paintings.** *Nature*, 399(6735):422, 1999.
- [55] Yueh B, Feinstein AR, Weaver EM *et al*: **Prognostic staging system for recurrent, persistent, and second primary cancers of the oral cavity and oropharynx.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124(9):975–981, 1998.