

Original

Morfometría computarizada en aspirados celulares del carcinoma ductal infiltrante de la mama. Modelo de estadística multivariada

I. Antúñez-Potashkina¹, R.M. Coro-Antich² y S. Rodríguez-Ceballos¹

¹Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras,

²Laboratorio de Morfología, Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Ciudad de La Habana, Cuba.

SUMMARY

Background: High interobserver variabilities affect the reliability of nuclear grades determined from cellular aspirates. This study explores a way to diminish subjective elements in nuclear grading by using computerized image analysis together with the Bayesian method of multivariate statistics. Materials and methods: Ten slides from each of the three nuclear grades, diagnosed according to conventional criteria (visual diagnosis), were used as a training set to determine class descriptors (computerized diagnosis). Results: Because of the low level of correspondence between visual and computerized diagnoses (66.7%), a new classification of the slides was made considering only low and high nuclear grades; the level of correspondence then increased to 90%. Conclusions: The usefulness of this method was shown by the application of the canonical functions equations to 12 cases outside the training set. The possibility of obtaining quick morphometric results represents a definite advance in pathologic diagnosis, and may be a decisive factor in cases which are difficult to classify. Rev Esp Patol 1997; 30(3): 193-199.

Key words: Morphometry - Image analysis - Breast cancer - Nuclear grade

RESUMEN

Planteamiento: La alta variación interobservador afecta la confiabilidad del grado nuclear determinado a partir de extendidos citológicos. Este trabajo explora una solución para disminuir los elementos subjetivos en la gradación nuclear empleando el análisis de imágenes computarizado junto con el método Bayesiano de estadística multivariada. Materiales y métodos: Diez láminas de cada grado (3 grados), diagnosticadas de acuerdo con criterios tradicionales (diagnóstico visual) sirvieron de entrenamiento para determinar descriptores de clase (diagnóstico computarizado). Resultados: La baja coincidencia entre estos diagnósticos (66,7%) motivó una nueva clasificación de las láminas considerando sólo dos grados (alto y bajo), obteniéndose entonces un 90% de coincidencia. Conclusiones: La utilidad del método se demostró aplicando las ecuaciones de las funciones canónicas a 12 casos ajenos a la serie de entrenamiento. La posibilidad de obtener resultados morfométricos rápidos representa un salto de calidad en el diagnóstico anatomopatológico, y puede ser un factor decisivo para casos difíciles de clasificar. Rev Esp Patol 1997; 30(3): 193-199.

Palabras clave: Morfometría - Análisis de imágenes - Cáncer de mama - Grado nuclear

INTRODUCCIÓN

En el cáncer de mama, el grado tumoral, determinado por el grado nuclear, tiene un alto valor pronóstico y predictivo en cuanto a supervivencia (1). El auge del estudio de extendidos citológicos a partir de las biopsias por aspiración con aguja fina (BAAF) ha favorecido la incorporación del grado nuclear en el diagnóstico preoperatorio de las enfermedades de la mama (2-4). Sin embargo, la gran variación interobservador ha limitado el uso del grado nuclear a partir de extendidos citológicos, además de que la confiabilidad del diagnóstico depende de la experiencia del especialista (5).

Ante estas dificultades, la incorporación de las nuevas técnicas de análisis de imágenes computarizado (AIC) constituye una vía para buscar soluciones que proporcionen objetividad y complementen el diagnóstico visual. El AIC es un instrumento de ayuda al patólogo, sobre todo cuando se trata de diagnósticos diferenciales difíciles (6).

En el presente trabajo, partiendo de un diagnóstico tradicional (diagnóstico visual) del grado nuclear según los criterios de Fisher y cols. (7), se empleó un sistema computarizado para morfometría de imágenes, combinado con el método Bayesiano de análisis estadístico multivariado, con vistas a obtener una nueva clasificación (diagnóstico computarizado). Con un conjunto de láminas de entrenamiento se obtuvieron ecuaciones para calcular la pertenencia de cada caso a un grupo determinado, y se analizó el grado de coincidencia de los dos métodos diagnósticos (visual y computarizado). Por último, las ecuaciones obtenidas se aplicaron a casos ajenos a la serie de entrenamiento.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 30 casos de pacientes femeninas de carcinoma ductal infiltrante de la mama (10 de cada grado). Las láminas procedían de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras (Ciudad de La Habana, Cuba). Se seleccionaron los casos en que había correspondencia entre el diagnóstico citológico y el diagnóstico histológico. El promedio de edad de las 30 pacientes fue de 63 años (límites: 28-86 años). Las muestras de citología se obtuvieron por el método de BAAF (8).

Criterios diagnósticos del patólogo

El grado nuclear de estas preparaciones se determinó según los criterios de clasificación de Fisher y cols. (7), que consideran tres grados. Los datos se reprocessaron en una segunda clasificación que agrupó los grados I y II como bajos y el grado III como alto.

Morfometría computarizada

Se trabajó con la versión 3.3 para Windows del sistema computarizado para morfometría de imágenes DIGIPAT (Eicisoft, Cuba, 1994) (9). El *software* está soportado sobre Windows 3.1 y emplea los siguientes componentes de *hardware*: CPU de 486 Mhz con 640 Kb de memoria operativa, tarjeta digitalizadora Video Blaster, microscopio Olympus BH-2, cámara Sony de TV en colores, videoimpresora Sony UP-860, monitor auxiliar de vídeo en blanco y negro, Sony SSM-121, e impresora Citizen 200GX.

De cada paciente se estudiaron 100 núcleos de células epiteliales cancerosas, excluyendo las células inflamatorias y del estroma. Para cada núcleo se definieron las siguientes variables morfométricas:

Variables proporcionadas por el sistema DIGIPAT

- Área = $\sum y \cdot dx$,
donde y = valor de la ordenada en los puntos de la frontera, y dx = incrementos de abscisas al pasar de un punto a otro.
- Perímetro = $\sum \sqrt{(dx^2 + dy^2)}$,
donde: dx y dy = incrementos de coordenadas al pasar de un punto de frontera a otro.
- Circularidad = $(1 - \text{Mín}(R\sigma(Rm)) / Rm) \cdot 100$,
donde $\text{Mín}(a, b)$ = función mínima entre los valores a y b , Rm = radio medio, y (R) = dispersión media cuadrática del valor Rm .
- Factor de forma = $(4\pi \cdot \text{área}) / \text{perímetro}^2$.
- Radio máximo = $\text{Máx}(\sqrt{(X - X_{cg})^2 + (Y - Y_{cg})^2})$,
donde x y y = coordenadas de los puntos de la frontera, y X_{cg} e Y_{cg} = coordenadas del centro geométrico.
- Radio mínimo = $\text{Mín}(\sqrt{(X - X_{cg})^2 + (Y - Y_{cg})^2})$.
- Radio equivalente = $\sqrt{(\text{área} / \pi)}$.
- Dispersión del radio = $\sqrt{((1/n) \cdot (R_i - Rm))}$,
donde n = número de puntos de la frontera, R_i = radio del objeto en el punto i , y Rm = valor del radio medio.

Expresiones confeccionadas a partir de variables proporcionadas por el sistema DIGIPAT

- Factor de circularidad = $(12,57 * \text{área})/\text{perímetro}$ (10).
- Compacidad = $\text{perímetro}^2/\text{área}^3$ (11).
- Índice del contorno = $(0,785 * 2 * R_{\text{máx}} * 2 * R_{\text{mín}})/\text{área}$, donde $R_{\text{máx}}$ = radio máximo y $R_{\text{mín}}$ = radio mínimo (10).

Ficheros de datos

Se obtuvo un fichero de mediciones para cada imagen; cada uno de ellos se exportó al paquete estadístico, procediéndose de la siguiente manera:

- Confección de un fichero SUMA para todas las imágenes de un paciente que contenía 100 mediciones de cada variable.
- A cada fichero SUMA se le determinó la media, la desviación estándar, los mínimos y máximos para cada una de las variables analizadas.
- Confección de un fichero que incluyó los valores de las medias de cada variable por paciente.
- Confección de un fichero que incluyó los valores de cada variable por núcleo (matriz de 3000 filas por 12 columnas).

Método estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 6.0 para Windows.

Estadística descriptiva

Se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) para cada una de las variables, considerando todas las mediciones (3000 valores por variable).

Estadística univariada

Una vez establecida la normalidad de todas las variables, se utilizaron las siguientes pruebas paramétricas:

- Comparación de medias de dos poblaciones: t de Student.
- Comparación global de medias de varios grupos: análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA resultó estadísticamente significativo, la comparación entre cada uno de los grupos se llevó a cabo mediante la prueba de rangos múltiples de DUNCAN.

Análisis multivariado

Se analizaron todas las variables de forma conjunta aplicando el análisis discriminante por el método "paso a paso" (*stepwise*). Se obtuvieron las ecuaciones para cada una de las funciones canónicas, analizando primero tres grados y luego dos.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los valores de las medias y desviaciones estándar para cada variable en cada uno de los tres grupos. La mayor desviación estándar en los tres grados la presenta la variable compacidad (P^2/A^3).

Se realizó un ANOVA para cada variable para ver si los tres grados se diferenciaban entre sí. Las variables que no arrojaron diferencia significativa entre los tres grados fueron el índice de irregularidad del contorno, la compacidad y la circularidad. El resto de las variables presentó una diferencia significativa entre los tres grados (Tabla 2).

Se aplicó la prueba de rangos múltiples de DUNCAN para determinar entre qué grados estaban las diferencias. Los resultados fueron los siguientes:

- Diferencias no significativas entre los tres grados: compacidad, índice de irregularidad del contorno y circularidad.

Tabla 1. Variables morfométricas por grado (tres grados) ($\bar{x} \pm DE$).

Grado	Compacidad	Área	Perímetro	Factor de forma	Circularidad	Radio máximo	Radio equivalente	Radio mínimo	Dispersión del radio	Índice de irregularidad del contorno	Factor de circularidad
1	816,36±937,23	55,74±24,13	28,17±5,93	84,24±5,58	86,90±5,44	5,00±1,03	4,12±0,87	3,10±0,85	0,51±0,22	0,90±0,08	0,85±0,06
2	765,85±1279,6	66,72±31,37	30,68±7,57	84,28±6,45	86,42±6,42	5,47±1,36	4,48±1,08	3,34±0,99	0,58±0,31	0,90±0,09	0,85±0,06
3	467,03±2504,6	121,01±337,14	37,76±20,70	81,93±7,59	85,28±6,95	6,77±3,78	5,43±3,00	3,98±2,47	0,77±0,57	0,89±0,10	0,82±0,08

Tabla 2. Resultados de la estadística univariada (tres grados).

Variable	ANOVA (p)	DUNCAN
Área	<0.05	(1=2)≠3
Perímetro	<0.01	(1=2)≠3
Factor de forma	<0.01	(1=2)≠3
Factor de circularidad	<0.01	(1=2)≠3
Dispersión del radio	<0.01	(1=2)≠3
Radio máximo	<0.01	(1=2)≠3
Radio mínimo	<0.01	(1=2)≠3
Radio equivalente	<0.01	(1=2)≠3
Circularidad	>0.05	1=2=3
Compacidad	>0.05	1=2=3
Índice del contorno	>0.05	1=2=3

- Grados I y II estadísticamente iguales, pero diferentes con respecto al grado III: área, perímetro, radio máximo, radio mínimo, radio equivalente, dispersión del radio, factor de forma, factor de circularidad (Tabla 2).

Se aplicó el análisis discriminante para tres grados por el método paso a paso. Este método parte del cálculo de los valores del estadígrafo λ de Wilks, que lleva asociado un valor de significación univariado (F) para cada variable (Tabla 3).

La aplicación del análisis discriminante canónico sirvió para obtener el mapa territorial que delimita las zonas correspondientes a cada uno de los tres grados en un plano bidimensional (Fig. 1), y los coeficientes y las constantes de las dos ecuaciones de las funciones discriminantes canónicas:

$$Df_1 = (28,35) + (-0,58)(FF) + (17,86)(IIC) + (0,66)(R_{\text{máx}})$$

$$Df_2 = (-1,95) + (0,99)(FF) + (-97,57)(IIC) + (1,09)(R_{\text{máx}})$$

Como resultado de la aplicación de estas dos ecuaciones, cada uno de los casos tendrá un valor para cada una de las funciones canónicas, es decir, una coordenada X para la función 1 y una coordenada Y para la función 2. Como se observa en la Fig. 1, hay casos en que el diagnóstico visual no coincide con la clasificación obtenida mediante el análisis discriminante. Sustituyendo valores en estas ecuaciones se pueden calcular las coordenadas X e Y de cualquier paciente perteneciente o no a esta serie de entrenamiento.

En la Tabla 4 se muestra la cantidad de casos que coinciden con la clasificación inicial (diagnóstico tradicional) y los que pasan a otros grupos. Se obtuvo un 66,7% de coincidencia entre el diagnóstico visual y el computarizado. Dada esa coincidencia total relativamente baja y teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de DUNCAN, en los cuales la mayoría de las variables (ocho) diferencian significativamente a los grupos I y II con respecto al III, se procedió a un reprocesamiento de los datos considerando dos grupos (de bajo y alto grados) en busca de una mayor coincidencia entre los dos tipos de diagnóstico.

Reprocesamiento de los datos considerando dos grados

El patólogo realizó una nueva clasificación de las muestras basándose en el mismo criterio de clasificación del grado nuclear (Fisher) pero diagnosticando solamente dos grados: grado nuclear bajo (I) y grado nuclear alto (II). Este último incluye sólo los grados III de la clasificación en tres grados.

Tabla 3. Resultados obtenidos al aplicar el análisis discriminante paso a paso (tres grados).

Variable	λ de Wilks	F	Significación	p<0.05
Área	0,79316	3,5205	0,0438	Sí
Circularidad	0,85479	2,2934	0,1203	No
Compacidad	0,89915	1,5141	0,2381	No
Dispersión del radio	0,58659	9,5144	0,0007	Sí
Factor de circularidad	0,64909	7,2983	0,0029	Sí
Factor de forma	0,63972	7,6029	0,0024	Sí
Índice de irregularidad del contorno	0,94332	0,8112	0,4549	No
Perímetro	0,59980	9,0075	0,0010	Sí
Radio equivalente	0,63162	7,8737	0,0020	Sí
Radio mínimo	0,71581	5,3599	0,0110	Sí
Radio máximo	0,56980	10,1927	0,0005	Sí

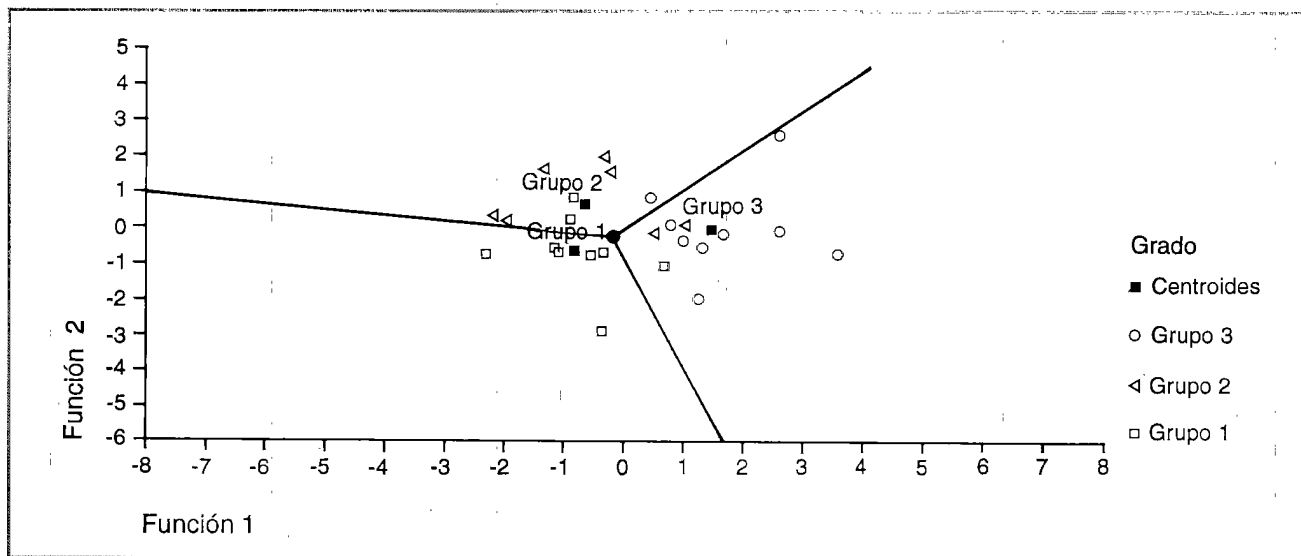


Figura 1. Funciones discriminantes canónicas. Cada uno de los 30 casos se ubican en el plano bidimensional. El mapa territorial delimita las zonas correspondientes a cada grado.

Es de señalar que la segunda clasificación no coincidió exactamente con la primera, a pesar de haberla hecho el mismo especialista: 17 casos quedaron como de bajo grado y 13 como altos grados. Este hecho pone de manifiesto la variación intraobservador, y justifica más el empleo de métodos que reduzcan los factores subjetivos.

Los resultados de la estadística descriptiva para dos grados (Tabla 5) demuestran que la mayor desviación estándar la presenta la variable compacidad, lo que coincide con el análisis de los tres grados.

A cada variable se le realizó una prueba t de Student para ver qué variables diferenciaban los dos grados. Las únicas variables que no arrojaron diferencia significativa entre los dos grupos fueron el índice de irregularidad del contorno y la circularidad (Tabla 6).

Se aplicó de nuevo el análisis discriminante con el objeto de comparar estos resultados con los obtenidos anteriormente para los tres grados. De las 11 variables, la disper-

sión del radio es la que discrimina en estos dos grupos de pacientes. Se construyó la siguiente ecuación:

$$Df = -5,908 + (9560) * (\text{Dispersión del radio}).$$

En la Tabla 7 se observa que solamente 3 de los 30 casos analizados no se correspondieron con el diagnóstico inicial, para un 90% de coincidencia entre la clasificación dada por el patólogo y la que arrojó el método computarizado. Con esto quedó demostrada la suposición de que, al clasificar en dos grados, el porcentaje de coincidencia aumentaría.

El patólogo revisó los casos no coincidentes (dos grados), y concluyó que en 2 de los 3 casos le era sumamente difícil establecer una clasificación debido al predominio de la superposición de los núcleos. En el otro diagnóstico no coincidente coexistían núcleos grandes con núcleos pequeños, dando la impresión visual de alto grado, que no coincide con la clasificación computarizada. Éste es otro caso típico de dificultad, donde resulta particularmente conveniente llevar a cabo el estudio morfométrico.

Tabla 4. Resultados de la estadística multivariada (tres grados).

Grado inicial	Diferencia de casos	Grado nuevo (análisis discriminante)		
		1 (%)	2 (%)	3 (%)
1	10	7 (70)	2 (20)	1 (10)
2	10	3 (30)	5 (50)	2 (20)
3	10	1 (10)	1 (10)	8 (80)

Coincidencia = 66,7%.

Tabla 5. Variables morfométricas por grado (dos grados).

Grado	Compacidad	Área	Perímetro	Factor de forma	Circularidad	Radio máximo	Radio equivalente	Radio mínimo	Dispersión del radio	Índice de irregularidad del contorno	Factor de circularidad
1 (n=17)	839,42±588,18	57,37±17,91	28,54±4,30	84,25±1,50	86,65±2,06	5,07±0,71	4,17±0,65	3,12±0,56	0,52±0,08	0,90±0,02	0,85±0,02
2 (n=13)	485,72±229,89	112,27±86,97	36,99±5,87	82,54±1,77	85,61±1,28	6,63±1,05	5,34±0,83	3,93±0,65	0,74±0,13	0,90±0,01	0,83±0,02

Tabla 6. Resultados de la estadística univariada (dos grados).

Variable	t de Student	p
Área	6,48	<0.01
Perímetro	28,72	<0.00
Factor de forma	8,24	<0.00
Factor de circularidad	7,37	<0.01
Dispersión del radio	31,63	<0.00
Radio máximo	23,39	<0.00
Radio equivalente	18,88	<0.00
Radio mínimo	13,56	<0.00
Compacidad	4,18	<0.05
Circularidad	2,54	>0.05
Índice de irregularidad	0,01	>0.05

Aplicación de las ecuaciones de las funciones canónicas a casos ajenos a la serie

Una vez concluidos los estudios clasificando en tres y dos grados, se tomaron 12 casos nuevos a los cuales se midió cada una de las variables que resultaron discriminantes: índice de irregularidad del contorno, factor de forma y radio máximo, para tres grados, y dispersión del radio para dos grados. Los valores obtenidos se sustituyeron en las ecuaciones canónicas y se determinaron las coordenadas a cada uno de estos 12 nuevos pacientes.

Al ubicar los puntos obtenidos en los respectivos mapas territoriales, se determinó el grado nuclear de cada uno de estos 12 casos. Estos grados nucleares obtenidos por el método computarizado coincidieron en un 100% con los dados por el patólogo, tanto para la clasificación en dos grados como para la de tres grados.

De esta manera quedó demostrada la factibilidad de usar el AIC como un medio objetivo de gradación nuclear.

DISCUSIÓN

Si bien es cierto que la opinión del patólogo sobre un examen al microscopio óptico sigue siendo válida en la mayoría de los casos, tampoco se puede negar que existen patologías en que se hace muy necesaria la cuantificación objetiva de las características morfológicas con vistas a llegar a diagnósticos más precisos y reproducibles, o caracterizar morfológicamente una entidad patológica (9, 12).

En esta serie, la variable compacidad (con dos y tres grados) es la de mayor desviación estándar. Eso se explica debido a que el área y el perímetro son las dos variables de mayor varianza. La variabilidad del área es muy grande dentro de los grados, e inclusive dentro de un mismo extendido. Esto se corresponde con la impresión visual *a priori* de un extendido citológico, pues en una muestra donde abundan núcleos pequeños, que apuntan hacia un diagnóstico de bajo grado, también aparecen núcleos grandes y muy grandes.

Tabla 7. Resultados de la estadística multivariada (dos grados).

Grado inicial	Diferencia de casos	Grado nuevo (análisis discriminante)	
		1 (Bajo; %)	2 (Alto; %)
1	17	16 (94,1)	1 (5,9)
2	13	2 (15,4)	11 (84,6)

Coincidencia = 90,0%.

Como el área es la variable morfométrica más intuitiva, y es una de las que más se toma en consideración para diagnosticar, el hecho de que presente tanta variabilidad dentro de una misma muestra apoya la importancia que tiene la aplicación de la morfometría en estos casos como complementación al diagnóstico visual.

El hecho de que las diferencias sean significativas al comparar las variables una a una no quiere decir que al considerarlas todas de forma conjunta (análisis multivariado) sigan siendo significativamente diferentes. Prueba de ello es que como resultado de la aplicación del análisis discriminante (tres grados) sólo tres variables formaron parte de la función discriminante: el radio máximo, el factor de forma y el índice de irregularidad del contorno. Lo anterior indica que la evaluación de una variable es difícil cuando se juzga sólo sobre el valor de *p* en el ANOVA, sin ninguna información concerniente a la relación intervariables.

Los hallazgos morfométricos de este trabajo en cuanto a proponer una clasificación en dos grados coinciden con los resultados de un estudio (13) que tiene como objetivo relacionar el grado nuclear citológico con el histológico. En ese estudio se encontró una correspondencia total entre esos diagnósticos, y se señala que se pueden separar fácilmente dos grupos de pacientes en extremos opuestos: aquellos que tienen un grado citológico nuclear bajo (grados I y II) y los que tienen una morfología nuclear agresiva (grado III).

En la bibliografía (14, 15) se ha comunicado la aplicación del método Bayesiano de análisis multivariado en extendidos citológicos. El empleo de dicho método sobre un conjunto de láminas de entrenamiento con vistas a encontrar los descriptores de clase para luego aplicar las ecuaciones de clasificación a casos ajenos a dicha serie —lo que se ha hecho en este trabajo—, representa un salto de calidad en el diagnóstico anatomopatológico, que incorpora a la práctica los resultados de una investigación básica fundamentada en el rigor de un modelo matemático.

La inclusión de la morfometría computarizada en el análisis de extendidos citológicos puede servir de apoyo al diagnóstico visual emitido por el patólogo de acuerdo con los criterios tradicionales. La posibilidad de que el patólogo acuda al especialista en AIC y de que en breve tiempo pueda contar con el resultado del estudio morfométrico (medición de 100 núcleos y aplicación de las ecuaciones), sobre todo en los casos que resultan difíciles de graduar, puede constituir un argumento decisivo para la clasificación como un elemento de ayuda al diagnóstico, y nunca con la idea de reemplazar la labor del patólogo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bloom, H.I.G., Richardson, W.W. *Histological grading and prognosis in breast cancer*. Br J Cancer 1957; 11: 359-377.
2. Dabbs, D.J., Silverman, J.F. *Prognostic factors from the fine needle aspirate. Breast carcinoma nuclear grade*. Diag Cytopathol 1993; 10: 203-208.
3. Elledge, R.M., Mc Guire, W.L., Osborne, C.K. *Prognostic factors in breast cancer*. Seminars in Oncology 1992; 19: 224-253.
4. Sunderland, M.C., Mc Guire, W.L. *Indicadores pronóstico del cáncer mamario invasor*. 1994; 16: 58-62.
5. Delides, G.S., Garas, G., Georgoull, G. y cols. *Intralaboratory variations in the grading of breast carcinoma*. Arch Pathol Lab Med 1982; 106: 126-128 (citado por Dawson y cols. 191).
6. Watchel, M.S., Zahniser, D.J., Rogers, A.K., Hutchinson, M.L. *Automated analysis of rat tumors. Comparison of four methods*. Anal Quant Cytol Hystol 1991; 13: 69-73.
7. Fisher, E.R., Palekar, A., Rockette, H., Redmod, C., Fisher, B. *Pathologic findings from the national surgical adjuvant project for breast cancer*. Cancer 1978; 42: 2032-2038.
8. Oertel, Y.C. *Fine needle aspiration of the breast*. Butterworth Publishers 1997; 203.
9. Coro Antich, R.M., Borrajero Martínez, I. *Digipat: Un sistema cubano para morfometría de imágenes*. Revista Latinoamericana de Patología 1996; 34: 9-10.
10. Fazaa, B., Fanchimont-Piérard, C., Zghal, M., Kamoun, M.R., Piérard, G.E. *Nuclear morphometry in xeroderma pigmentosum associated malignant melanomas*. Amer J Dermatopathol 1994; 16: 611-614.
11. Wolberg, W.H., Street, N.W., Mangasarian, O.L. *Breast cytology diagnosis with digital image analysis*. Anal Quant Cytol Hystol 1993; 15: 396-401.
12. Borrajero, I., Pérez, J.L., Domínguez, C., Chong, A., Coro, R.M., Rodríguez, H., Gómez, N., Román, G.C., Navarro-Román, L. *Epidemic neuropathy in Cuba. Morphologic characterization of peripheral nerve lesions in sural nerve biopsies*. J Neurol Sci 1994; 127: 68-76.
13. González, A.V., Caballero, C. *Correlación del grado histológico del carcinoma mamario con el grado citológico en biopsia aspirativa con aguja fina. Tesis para diploma de Licenciatura en Tecnología de la Salud*. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Ciudad de La Habana, 1995.
14. Dawson, A.K., Austin, R.E., Weinberg, D.S. *Nuclear grading of breast carcinoma by image analysis*. Cancer 1991; 95: 1-4.
15. Van der Poel, H.G., Boon, M.E., Kok, L.P., Van der Meulen, E.A., Caubergh, R.D., Bruijn, W.C., Debruyne, F.M.J. *Morphometry, densitometry, and pattern analysis of plastic embedded histologic material from urothelial cell carcinoma of the bladder*. Anal Quant Cytol Hystol 1991; 13: 307-313.