



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TIAGO LÜDERS LAURITO

CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL: ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS FIBRAS
DE COLÁGENO DO AMBIENTE TUMORAL ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA
NÃO LINEAR POR GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO

CAMPINAS

2019

TIAGO LÜDERS LAURITO

CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL: ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS FIBRAS
DE COLÁGENO DO AMBIENTE TUMORAL ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA
NÃO LINEAR POR GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Anatomia Patológica.

ORIENTADOR (A): PROFESSORA DRA. MARIA LETICIA CINTRA

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Tiago Lüders
Laurito e orientada pela professora Dra. Maria Leticia Cintra.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L375c Laurito, Tiago Lüders, 1981-
Carcinoma de células de Merkel : estudo morfométrico das fibras de colágeno do ambiente tumoral através de microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico / Tiago Lüders Laurito. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Leticia Cintra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Carcinoma de células de Merkel. 2. Matriz extracelular. 3. Colágeno. 4. Microscopia. I. Cintra, Maria Leticia, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Merkel cell carcinoma : morphometric study of collagen fibers in the tumor environment through nonlinear optical microscopy by second harmonic generation

Palavras-chave em inglês:

Merkel cell carcinoma

Extracellular matrix

Collagen

Microscopy

Área de concentração: Anatomia Patológica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Maria Leticia Cintra [Orientador]

Fábio Rogerio

Tânia Cristina Benetti Soares

Data de defesa: 04-10-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-8454-1477>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2878653910475757>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
TIAGO LÜDERS LAURITO

ORIENTADORA: PROFESSORA DRA. MARIA LETICIA CINTRA

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARIA LETICIA CINTRA
2. PROF. DR. FÁBIO ROGERIO
3. PROFA. DRA. TÂNIA CRISTINA BENETTI SOARES

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no SIGA / Sistema de Fluxo de Dissertações / Teses e na Secretaria do Programa da Faculdade de Ciências Médicas.

Data: 04/10/2019

AGRADECIMENTOS

Muito obrigado Profa. Dra. Maria Leticia Cintra pela forma tão pura e generosa com que me permitiu esta oportunidade de desenvolvimento profissional.

Muito obrigado Dra. Gislaine Vieira-Damiani pelo precioso auxílio técnico que me prestou com dedicação e paciência.

A aquisição das imagens microscópicas baseadas em geração de segundo harmônico foi realizada no Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular do Instituto de Física da Universidade Estadual de Campinas (CNPq: processo nº 573913/2008-0 / FAPESP: processo nº 08/57906-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Atualmente, sabe-se que a progressão do câncer é influenciada pela interação entre as células neoplásicas e a matriz extracelular. A matriz extracelular associada a tumores sólidos geralmente contém altos níveis de colágeno fibrilar e a remodelação do colágeno no estroma tumoral pode promover a progressão neoplásica. Isto pois o colágeno ou mesmo produtos de degradação do colágeno ligam-se a receptores nas células neoplásicas e acionam múltiplas vias intracelulares envolvidas na estimulação do crescimento celular/motilidade e inibição da apoptose. Além disso, a rigidez da matriz extracelular é, em grande parte, mediada pela organização do colágeno. O aumento do *crosslinking* (ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais) das fibras colágenas eleva a rigidez da matriz extracelular. Esta propriedade mecânica pode induzir a transição epitelial-mesenquimal, a qual estimula a migração celular. Desta forma, propriedades bioquímicas e biofísicas oriundas de fibras colágenas aumentadas em número e alteradas morfológicamente podem favorecer a progressão de células neoplásicas em tumores sólidos, mas não há, até a presente data, estudos avaliando as fibras colágenas no estroma associado ao carcinoma de células de Merkel. Pelo acima exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as fibras colágenas associadas ao carcinoma de células de Merkel através de microscopia por geração de segundo harmônico. Esta técnica microscópica é única pois pode destacar fibra colágenas em tecidos biológicos. Este estudo retrospectivo incluiu 11 pacientes com tumores primários. Lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina foram submetidas a microscopia por geração de segundo harmônico e análise textural. As variáveis texturais (fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste) mostraram valores substancialmente menores ($p < 0,0001$) no estroma intratumoral em comparação com a pele normal sugerindo que a estrutura e a distribuição das fibras colágenas estavam extensamente alteradas. Estas diferenças não foram significativas entre tumores com fatores de pior e melhor prognóstico. Este estudo demonstrou pela primeira vez que a microscopia por geração de segundo harmônico e a análise textural podem detectar alterações nas fibras colágenas presentes no estroma associado ao carcinoma de células de Merkel em comparação com a pele normal, as quais podem contribuir para o comportamento agressivo deste tumor. Por outro lado, estas alterações do colágeno não parecem ser relevantes para o potencial prognóstico.

Palavras-chave: carcinoma de células de Merkel; matriz extracelular; colágeno; microscopia.

ABSTRACT

Currently, it is known that cancer progression is influenced by the interactions between cancer cells and the extracellular matrix. The extracellular matrix associated with solid tumors typically contains high levels of fibrillar collagen and collagen remodeling in the tumor stroma can promote cancer progression. This is because collagen or even collagen degradation products bind to neoplastic cell receptors and trigger multiple intracellular pathways involved in stimulation of cell growth/motility and inhibition of apoptosis. Furthermore, extracellular matrix stiffness is largely mediated by collagen organization. Increased crosslinking (connections between linear molecules producing three-dimensional polymers) of collagen fibers lead to stiffer matrix. This mechanical property can induce epithelial-mesenchymal transition stimulating migratory cell behavior. Therefore, biochemical and biophysical cues from increased and altered tumor-associated collagen fibers can favor the progression of neoplastic cells in solid tumors, however, to the best of our knowledge, there have been no studies to date evaluating collagen fibers in the stroma accompanying Merkel cell carcinoma. In light of this, the aim of this study was to evaluate collagen fibers in the stroma accompanying Merkel cell carcinoma using second harmonic generation microscopy. This microscopic technique is unique because it can highlight fibrillar collagen in biological tissues. This retrospective study included eleven patients with primary tumors. Hematoxylin and eosin stained sections were evaluated by second harmonic generation microscopy and texture analysis. Intratumoral texture features (area fraction, mean gray value, entropy and contrast) showed much lower values than normal skin ($p < 0.0001$) suggesting that the structure and distribution of intratumoral collagen fibers were extensively altered. These differences were not significant between tumors with unfavorable and favorable prognostic factors. This study has demonstrated for the first time that second harmonic generation microscopy and texture analysis can detect changes in collagen fibers present in the stroma accompanying Merkel cell carcinoma in comparison to normal skin, which may contribute to the aggressive behavior of this type of tumor. On the other hand, these collagen changes do not appear to be relevant to prognostic potential.

Keywords: Merkel cell carcinoma; extracellular matrix; collagen; microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Geração de segundo harmônico representada pelo diagrama de Jablonski.....	16
Figura 2- Observação comparada de tecido dérmico humano normal mediante microscopia óptica convencional e microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico.....	17
Figura 3- Observação comparada de tecido hipodérmico humano normal mediante microscopia óptica convencional e microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico.....	18
Figura 4- Histologia do carcinoma de células de Merkel mediante microscopia óptica convencional: exemplo ilustrativo.....	20
Figura 5- Microscópio óptico multifotônico.....	25
Figura 6- Seleção de campos de grande aumento em imagens captadas através de microscopia óptica convencional.....	26
Figura 7- Seleção de regiões de interesse em imagens captadas através de microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico.....	27
Figura 8- Transformação de imagem em 256 níveis de cinza: interface do programa ImageJ.....	28
Figura 9- Obtenção de matriz de coocorrência de níveis de cinza a partir de uma imagem hipotética transformada em níveis de cinza.....	29
Figura 10- Fórmula de normalização da matriz de coocorrência de níveis de cinza.....	30
Figura 11- Fórmula para o cálculo do descritor de entropia.....	31
Figura 12- Fórmula para o cálculo do descritor de contraste.....	31
Figura 13- Calibração da escala de imagem transformada em 256 níveis de cinza: interface do programa ImageJ.....	32
Figura 14- Cálculo da fração de área e do nível de cinza médio: interface do programa ImageJ.....	32
Figura 15- Cálculo da entropia e do contraste: interface do programa ImageJ.....	33
Figura 16- Fração de área: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica.....	45
Figura 17- Nível de cinza médio: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica.....	45
Figura 18- Entropia: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica.....	46
Figura 19- Contraste: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica.....	46

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Normas para o estadiamento do carcinoma de células de Merkel.....	21
Tabela 2- Dados clínicos dos pacientes da casuística.....	36
Tabela 3- Dados histológicos dos pacientes da casuística.....	37
Tabela 4- Dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma normal.....	38
Tabela 5- Dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma normal.....	39
Tabela 6- Dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma intratumoral em topografia dérmica.....	40
Tabela 7- Dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma intratumoral em topografia dérmica.....	41
Tabela 8- Valores de média, mediana, mínimo e máximo dos dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma normal e no estroma intratumoral em topografia dérmica.....	42
Tabela 9- Valores de média, mediana, mínimo e máximo dos dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma normal e no estroma intratumoral em topografia dérmica.....	43
Tabela 10- Pareamento estatístico entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica de todos os casos em conjunto, considerando-se os dados texturais baseados nas análises estatísticas de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) e segunda ordem (entropia e contraste).....	44
Tabela 11- Pareamento estatístico do estroma intratumoral em topografia dérmica entre fatores de pior e melhor prognóstico, considerando-se os dados texturais baseados nas análises estatísticas de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) e segunda ordem (entropia e contraste).....	48

LISTA DE SIGLAS

ANOVA- Análise de variância
CAF- *Cancer-associated fibroblast*
CGA- Campo de grande aumento
CCM- Carcinoma de células de Merkel
CD8- *Cluster of differentiation 8*
CD56- *Cluster of differentiation 56*
CK7- *Cytokeratin 7*
CK20- *Cytokeratin 20*
EEG- Equações de estimativa generalizada
FCM- Faculdade de Ciências Médicas
GLCM- *Gray level co-occurrence matrix*
HC- Hospital das Clínicas
HE- Hematoxilina e eosina
IF- Instituto de Física
INFABIC- Instituto Nacional de Fotônica Aplicada a Biologia Celular
LH - *Lysyl hydroxylase*
LOX - *Lysyl oxidase*
MCPyV - *Merkel cell polyomavirus*
MEC- Matriz extracelular
MMP – *Matrix metalloproteinase*
NLOM- *Non-linear optical microscopy*
RI- Região de interesse
SAP- Serviço de Anatomia Patológica
SHG- *Second harmonic generation*
UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
1.1- Oncogênese.....	12
1.1.1- Princípios gerais.....	12
1.1.2- Processo de metastatização.....	12
1.1.2.1- A sequência metastática.....	12
1.1.2.2- O papel do colágeno.....	13
1.2- Microscopia óptica não linear	15
1.2.1- Definição.....	15
1.2.2- Geração de segundo harmônico.....	16
1.3- Carcinoma de células de Merkel	19
1.3.1- Características clínico-patológicas.....	19
1.3.2- Fatores prognósticos.....	21
2- OBJETIVOS.....	23
3- METODOLOGIA.....	24
3.1- Seleção da casuística.....	24
3.2- Microscopia óptica convencional.....	24
3.3- Microscopia óptica não linear.....	25
3.4- Análise das imagens.....	28
3.5- Análise estatística.....	33
4- RESULTADOS.....	35
4.1- Casuística.....	35
4.2- Dados histológicos.....	36
4.3- Dados morfométricos.....	37
4.4- Dados estatísticos.....	42
5- DISCUSSÃO.....	49
6- CONCLUSÕES.....	55
7- REFERÊNCIAS.....	56
8- ANEXOS.....	61

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1- Oncogênese

1.1.1- Princípios gerais

Oncogênese é o processo pelo qual células normais transformam-se em células neoplásicas após alterações no material genético envolvido no controle do ciclo celular, com consequente proliferação celular desordenada. É conhecimento consolidado que as neoplasias malignas apresentam, de modo geral, independentemente do tecido de origem, as seguintes características em comum: instabilidade genômica, autonomia com relação à sinalização de estímulo da proliferação celular, capacidade de evasão da sinalização de inibição da proliferação celular, capacidade de inibição da sinalização pró-apoptótica, capacidade de evasão do sistema imune, capacidade de alterar o metabolismo energético celular, potencial ilimitado de proliferação celular, capacidade de induzir a angiogênese, atividade pró-inflamatória e capacidade de invasão tecidual local / geração de metástases. E, atualmente, conforme será detalhado a seguir, é crescente o conhecimento envolvendo também o papel da matriz extracelular (MEC) na progressão do câncer (1).

1.1.2- Processo de metastatização

1.1.2.1- A sequência metastática

Conforme citado anteriormente, as neoplasias malignas têm a capacidade de invasão tecidual local / geração de metástases. O processo de metastatização é complexo e no caso das neoplasias malignas epiteliais ocorre, de modo geral, a seguinte sequência de eventos: ruptura da membrana basal subjacente, infiltração do estroma do tecido local, invasão de vasos locais, transporte pelo lúmen vascular, extravasamento para o estroma do tecido distante e colonização metastática. E durante a infiltração do estroma em torno do tumor primário, as células neoplásicas sofrem múltiplas influências de elementos da MEC. A MEC, uma rede complexa de moléculas estruturais e funcionais extracelulares, é essencial para o desenvolvimento normal dos tecidos e para a homeostase. A MEC não só fornece o suporte físico para os elementos celulares como também apresenta propriedades bioquímicas que

regulamam múltiplas funções celulares, tais como proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Da mesma forma, a progressão do câncer também é influenciada por interações entre as células neoplásicas e a MEC. A MEC pode servir de reservatório para mediadores celulares ou seus elementos podem interagir diretamente com receptores de superfície das células neoplásicas influenciando seu comportamento. Além disso, o ambiente extracelular em torno dos tumores malignos é tipicamente mais denso do que o normal o que potencializa as interações citadas anteriormente (2).

Atualmente, o foco deste tema de estudo, ou seja, a interação entre a MEC e as células neoplásicas, está nos tumores malignos epiteliais. A MEC é sintetizada e secretada predominantemente por células mesenquimais, especialmente fibroblastos. As células neoplásicas epiteliais produzem mediadores celulares que recrutam e estimulam fibroblastos peritumorais, denominados de fibroblastos associados ao câncer (CAFs: do inglês *cancer-associated fibroblasts*), a produzir e secretar elementos da MEC. Algumas proteínas da MEC expressas somente durante o desenvolvimento tecidual ou cicatrização, como por exemplo a tenascina-C e a periostina, podem ser re-expressas, já outras proteínas constituintes normais do tecido, como por exemplo alguns tipos de colágeno, laminina, fibronectina, proteoglicanos e ácido hialurônico, estão frequentemente hiper-expressas no ambiente tumoral caracterizando patologicamente a desmoplasia, o que geralmente favorece a progressão do tumor através de ligação direta com receptores de superfície das células neoplásicas relacionados ao controle da proliferação, diferenciação, adesão e migração celular. A elastina, por sua vez, ao contrário do colágeno, sofre degradação no ambiente tumoral, o que libera peptídeos bioativos que também interagem diretamente com receptores de superfície das células neoplásicas com as mesmas funções citadas anteriormente e, portanto, efeito geralmente pró-tumoral. Os CAFs ainda são capazes de degradar ou reorganizar os elementos da MEC durante a progressão tumoral através da liberação de enzimas que tendem a tornar a MEC anisotrópica em comparação com o estado isotrópico encontrado nos tecidos normais. Por fim, um ambiente extracelular mais denso do que o normal pode induzir o fenômeno da transição epitélio-mesenquimal o qual torna as células neoplásicas epiteliais capazes de migrar (3, 4, 5, 6).

1.1.2.2- O papel do colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante na MEC de tecidos humanos normais, com vinte e oito diferentes tipos de peptídeos existentes (colágeno tipos I ao XXVIII). Da mesma forma, o

colágeno é também a principal proteína presente na MEC associada a tumores epiteliais, com variáveis efeitos sobre a progressão neoplásica e, por isto, é crescente o interesse pelo papel deste peptídeo na oncogênese. Conforme descrito anteriormente, a quantidade de colágeno está geralmente aumentada no ambiente de tumores epiteliais e, além disto, esta proteína frequentemente sofre degradação e alteração estrutural por enzimas secretadas tanto por CAFs quanto por células neoplásicas. O colágeno ou mesmo produtos de sua degradação enzimática, fenômeno mediado especialmente por metaloproteinases de matriz (MMPs: do inglês *matrix metalloproteinases*), interagem diretamente com receptores de superfície das células neoplásicas, especialmente integrinas e receptores do domínio da discoidina, geralmente estimulando a proliferação e a migração celular, além de estimular a angiogênese e atrair células inflamatórias para o tecido, o que também tem papel predominantemente pró-tumoral. Neste sentido, estudos *in vitro* e *ex vivo* mostraram abundância relativa de colágeno dos tipos I, III e IV na MEC associada a tumores epiteliais, com efeito estimulante sobre a progressão tumoral (7).

Finalmente, além dos efeitos bioquímicos que o colágeno exerce sobre tumores epiteliais, há também efeitos mecânicos. Quando há aumento da densidade da matriz colagênica no ambiente tumoral, o que pode ser potencializado pelo *crosslinking* enzimático (ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais) das fibras desta proteína, fenômeno mediado especialmente por lisil oxidases (LOXs: do inglês *lysyl oxidases*) e lisil hidroxilases (LHs: do inglês *lysyl hydroxylases*), a progressão tumoral é geralmente favorecida. Isto ocorre pois há maior probabilidade de interação do colágeno com receptores de superfície das células neoplásicas e o aumento da tensão mecânica tecidual com consequente ativação de mecanorreceptores, o que induz o processo de transição epitélio-mesenquimal quando, a partir de então, células neoplásicas epiteliais adquirem propriedades de progenitores mesenquimais sendo capazes de multidiferenciação e migração. A hipóxia, condição comumente presente em ambientes tumorais, também pode potencializar o *crosslinking* das fibras colágenas pois estimula a síntese de LHs. Por fim, tem sido descrito que o alinhamento perpendicular das fibras colágenas em torno de alguns tumores epiteliais também favorece a progressão tumoral por facilitar a migração das células neoplásicas entre as fibras proteicas, o que obteve respaldo em estudos *in vitro* (8).

Em resumo, sabe-se, atualmente, que a MEC associada a tumores epiteliais contém grande quantidade colágeno, principalmente dos tipos I, III e IV, sendo mais densa que o normal após intensificação da deposição e da remodelação desta proteína, o que geralmente facilita a

progressão tumoral através de efeitos bioquímicos e biomecânicos sobre as células neoplásicas. Tais conhecimentos modernizaram os princípios gerais da oncogênese e, desta forma, foi necessária a utilização de novos métodos microscópicos para estudo das fibras colágenas no ambiente de tumores sólidos em busca do melhor entendimento da progressão neoplásica. Destaca-se, para tal propósito, a utilização da microscopia óptica não linear (NLOM: do inglês *non-linear optical microscopy*).

1.2- Microscopia óptica não linear

1.2.1- Definição

A NLOM, como o próprio nome sugere, é baseada em fenômenos ópticos não lineares, ou seja, que ocorrem como consequência da modificação das propriedades ópticas do meio mediante intensidades elevadas de luz e que variam de forma não linear com relação a intensidade do feixe luminoso incidente. Esta ferramenta utiliza lasers infravermelhos em diminutos volumes focais o que aumenta o poder de penetração tecidual e reduz o espalhamento da luz. Isto permite que este método microscópico apresente menor sinal de fundo, melhor resolução espacial, potencial para análise de espécimes espessos e menor risco de fotodano, sendo este último item bastante importante no caso de estudos *in vivo*. Este conjunto de características permite a avaliação de detalhes teciduais não evidentes na microscopia óptica tradicional. Além disto, geralmente não há necessidade de fixação / coloração do tecido ou adição de fluoróforo exógeno, o que traz marcante facilidade operacional. Entretanto, trata-se de método microscópico que exige equipamentos complexos de alto custo e operadores com qualificação específica (9).

Há inúmeras técnicas de NLOM disponíveis para obtenção de imagens em pesquisas biomédicas envolvendo o câncer, inclusive com possibilidade de combinação entre tais técnicas, sendo a escolha final baseada no objeto de estudo. Estas técnicas microscópicas, que podem ser aplicadas em tecidos *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, permitem o estudo morfológico ou mesmo funcional de tumores, este último caso exemplificado através da detecção da fluorescência intrínseca de moléculas como dinucleotídeo de flavina e adenina e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina. A possibilidade de se estudar tumores *in vivo* é muito interessante uma vez que isto permite visualizar a ocorrência de fenômenos biológicos relacionados à

oncogênese em condições naturais, sem a interferência dos artefatos tipicamente presentes nos estudos com tecidos *ex vivo* (10).

Será detalhada a seguir a NLOM por geração de segundo harmônico (SHG: do inglês *second harmonic generation*), a qual foi utilizada no presente trabalho uma vez que esta técnica microscópica permite avaliar alguns tipos de fibras colágenas em tecidos biológicos.

1.2.2- Geração de segundo harmônico

A microscopia por SHG, técnica atualmente muito utilizada no estudo do câncer, é baseada no efeito óptico não linear de mesmo nome que ocorre quando dois fótons com o mesmo comprimento de onda (λ) incidem simultaneamente no mesmo ponto de uma estrutura não centro-simétrica e são combinados com emissão de um único fóton com metade do comprimento de onda dos fótons incidentes, em processo com conservação de energia, conforme figura 1. Estruturas não centro-simétricas não possuem centro de inversão (a partir do qual para cada ponto x , y e z no plano tridimensional há ponto idêntico em $-x$, $-y$ e $-z$) como elemento de simetria. Destacam-se como materiais biológicos com estrutura não centro-simétrica, passíveis de visualização por esta técnica microscópica, a miosina e alguns tipos de fibras colágenas. E além da visualização destas moléculas, a microscopia por SHG ainda permite a avaliação da organização espacial das mesmas uma vez que os sinais harmônicos apresentam polarização bem definida (11).

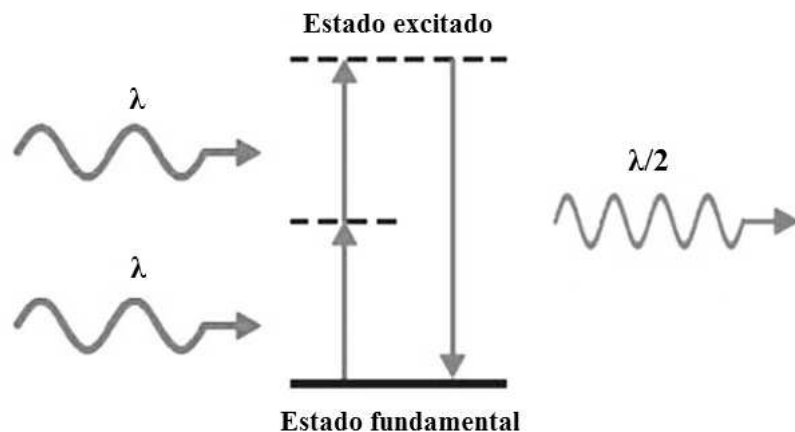


Figura 1- Geração de segundo harmônico representada pelo diagrama de Jablonski. Dois fótons com o mesmo comprimento de onda (λ) incidem simultaneamente no mesmo ponto de uma estrutura não centro-simétrica sendo absorvidos por um elétron, que irá para um estado excitado. Ao retornar para o estado fundamental, este elétron emite apenas um fóton com metade do comprimento de onda dos fótons incidentes, em processo com conservação de energia.

Desta forma, quando um tecido biológico é observado mediante tal técnica microscópica serão visualizados apenas a miosina e alguns tipos de fibras colágenas, conforme está exemplificado nas figuras 2 e 3.

Na figura 2, é observado campo dérmico humano normal corado por hematoxilina e eosina (HE, x400), mediante microscopia óptica convencional (A). O mesmo campo é observado mediante microscopia óptica não linear por SHG (B), sendo visualizados apenas alguns tipos de fibras colágenas em vermelho (cor aleatória). Neste caso, não se espera a visualização de miosina, uma vez que não há tecido muscular liso ou estriado no campo observado.

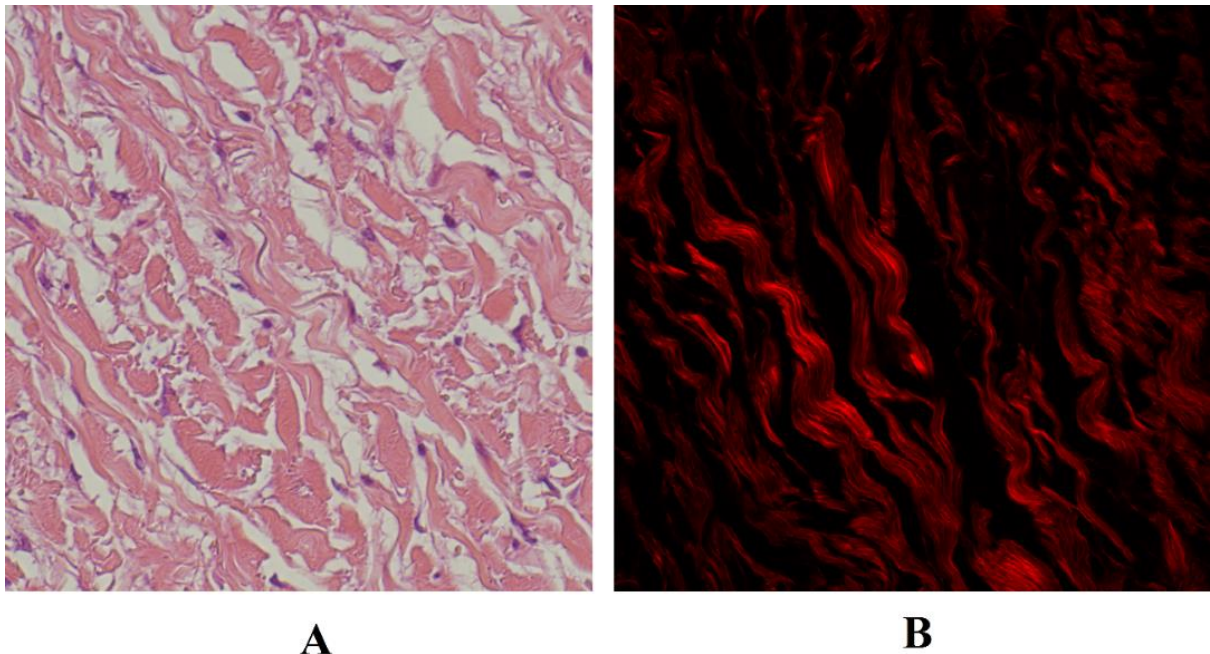


Figura 2- Observação comparada de tecido dérmico humano normal mediante microscopia óptica convencional e microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico. Em A, o tecido é observado mediante microscopia óptica convencional após coloração por HE (x400). Em B, o mesmo campo é observado mediante microscopia óptica não linear por SHG, sendo visualizadas basicamente fibras colágenas I e II em vermelho (cor aleatória).

Na figura 3, é observado campo hipodérmico humano normal corado por HE (x400), mediante microscopia óptica convencional (A). O mesmo campo é observado mediante microscopia óptica não linear por SHG (B), sendo visualizados alguns tipos de fibras colágenas em vermelho (cor aleatória). Notar que no campo inferior esquerdo (em A) há algumas arteríolas que também geram sinal de SHG (em B) por conter fibras musculares lisas e, portanto, miosina, em sua parede.

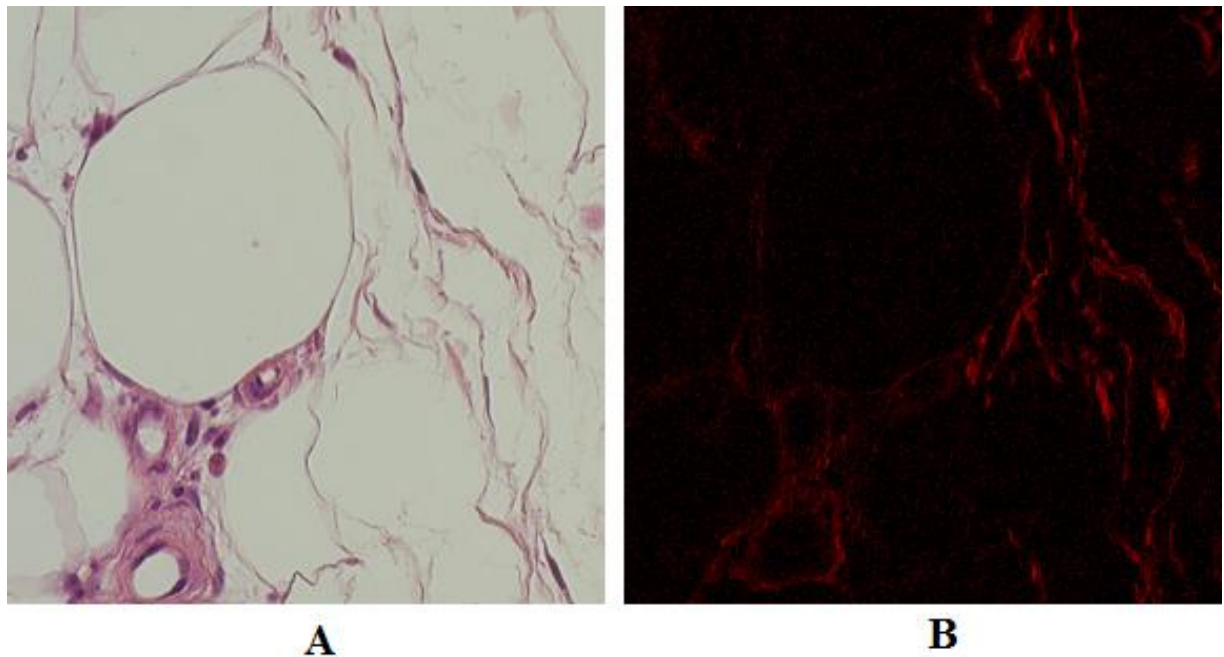


Figura 3- Observação comparada de tecido hipodérmico humano normal mediante microscopia óptica convencional e microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico. Em A, o tecido é observado mediante microscopia óptica convencional após coloração por HE (x400). Em B, o mesmo campo é observado mediante microscopia óptica não linear por SHG, sendo visualizadas basicamente fibras colágenas I e II em vermelho (cor aleatória). Notar que no campo inferior esquerdo (em A) há algumas arteríolas que também geram sinal de SHG (em B) por conter fibras musculares lisas e, portanto, miosina, em sua parede.

É importante considerar que nem todas as fibras colágenas são capazes de emitir segundo harmônico após excitação luminosa. Este sinal é obtido com boa qualidade a partir do colágeno fibrilar tipos I e II. Entretanto, não é obtido segundo harmônico significativo a partir do colágeno fibrilar tipos III e V. O colágeno IV não é fibrilar *in vivo* e, portanto, também não é passível de avaliação por esta técnica microscópica (12).

Consequentemente, a NLOM por SHG tornou-se uma ferramenta fundamental no estudo do câncer pois permite a avaliação de tipos específicos de fibras colágenas em ambiente *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Isto é importante uma vez que, conforme já detalhado, o colágeno fibrilar, principalmente dos tipos I, III e IV, é abundante e remodelado na MEC associada a carcinomas humanos e, geralmente, facilita a progressão tumoral através de efeitos bioquímicos e biomecânicos sobre as células neoplásicas. E quando utilizada *in vivo*, esta técnica microscópica ainda permite a avaliação progressiva das fibras colágenas da MEC tumoral se aplicada em momentos diferentes (13).

No presente trabalho, a NLOM por SHG foi aplicada no estudo das fibras colágenas presentes no estroma associado ao carcinoma de células de Merkel (CCM), conforme será detalhado a seguir.

1.3- Carcinoma de células de Merkel

1.3.1- Características clínico-patológicas

O CCM, ou carcinoma neuroendócrino primário da pele, tem seu nome derivado das células de Merkel, as quais estão localizadas difusamente na camada basal da epiderme e em alguns trechos da mucosa mastigatória, com características morfológicas neuroendócrinas e funções provavelmente neurosensoriais / endócrinas. Entretanto, a célula de origem do CCM ainda é incerta. Trata-se de neoplasia geralmente induzida por infecção pelo poliomavírus da célula de Merkel (MCPyV: do inglês *Merkel cell polyomavirus*) ou exposição crônica a radiação ultravioleta. O CCM é raro, com taxa de incidência de 0,3 a 1,4 casos por 100.000 habitantes por ano dependendo do país. Com relação a distribuição desta neoplasia por sexo, idade e raça, há maior incidência em pacientes do sexo masculino, idosos e de pele clara, respectivamente. Imunossupressão e neoplasias sanguíneas são também importantes fatores de risco para a ocorrência do CCM. Ao diagnóstico, cerca de 35 e 15% dos pacientes apresentam metástases loco-regionais e sistêmicas, respectivamente. A sobrevida em 5 anos é de 15 a 65% dependendo do estágio, o qual está detalhado no quadro 1 (14, 15).

Clinicamente, o CCM manifesta-se sob a forma de nodulação ou placa cutânea, geralmente solitária, indolor, avermelhada ou arroxeadas, rapidamente progressiva, com epiderme suprajacente íntegra na maioria dos casos. É mais comum em região de cabeça e pescoço. Metástases são mais frequentes em linfonodos regionais inicialmente sendo que, quando sistêmicas, são mais comuns em pele, pulmões, glândulas adrenais, fígado, sistema nervoso central e ossos, ocorrendo geralmente nos primeiros 3 anos após o diagnóstico inicial. São descritos raros casos em que a apresentação inicial da doença ocorre através de metástases, sem tumor primário cutâneo evidente por possível regressão espontânea. Histologicamente, há três tipos morfológicos de CCM: trabecular, intermediário e de pequenas células, sendo o tipo intermediário o mais comum, conforme caso ilustrado na figura 4. Raramente, podem ocorrer disseminação pagetóide (16), tumores puramente intraepidérmicos (17) ou mesmo regressão

espontânea (18). É importante ressaltar que a classificação histológica do CCM não apresenta importância clínica ou prognóstica (19).

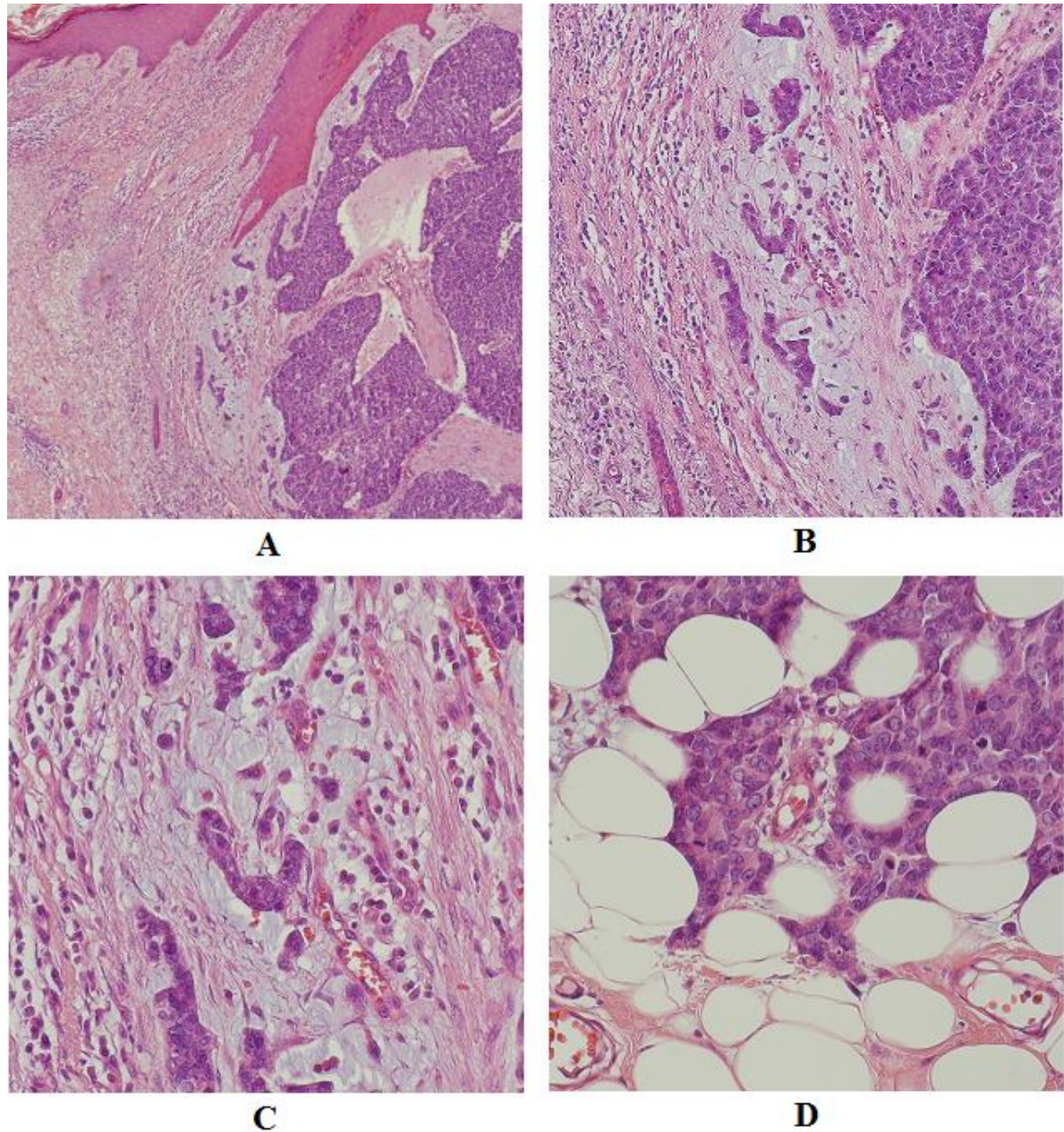


Figura 4- Histologia do carcinoma de células de Merkel mediante microscopia óptica convencional: exemplo ilustrativo. Um exemplo de CCM de tipo intermediário é observado acima mediante microscopia óptica convencional após coloração por HE. Em A (x40), nota-se a transição entre o tumor e a derme normal adjacente. O mesmo campo é observado em B (x100) e C (x400) sendo evidenciado padrão de invasão infiltrativo. Em D (x400) nota-se a transição entre este mesmo tumor e a hipoderme normal subjacente. Em C e D, podem ser observados detalhes celulares tais como citoplasma relativamente escasso e núcleos arredondados, ovalados ou mesmo irregulares, vesiculosos, amoldados, por vezes com múltiplos nucléolos evidentes, além de abundantes figuras de mitose e apoptose irregularmente distribuídas.

Quadro 1- Normas para o estadiamento do carcinoma de células de Merkel.

Estágio	TNM	Descrição
0	Tis N0 M0	Neoplasia in situ (intraepidérmica) Ausência de metástases em linfonodos locais Ausência de metástases a distância
I	T1 N0 M0	Tumor menor que 2 cm Ausência de metástases em linfonodos locais Ausência de metástases a distância
IIA	T2 T3 N0 M0	Tumor maior que 2 cm, mas menor que 5 cm Tumor maior que 5 cm Ausência de metástases em linfonodos locais Ausência de metástases a distância
IIB	T4 N0 M0	Invasão de músculo esquelético, osso ou cartilagem Ausência de metástases em linfonodos locais Ausência de metástases a distância
IIIA	T1, T2, T3 ou T4 N1a M0	Conforme descrito anteriormente Metástases em linfonodos locais histologicamente Ausência de metástases a distância
IIIA	T0 N1b M0	Tumor primário oculto Metástases em linfonodos locais clinicamente Ausência de metástases a distância
IIIB	T1, T2, T3 ou T4 N1b, N2 ou N3 M0	Conforme descrito anteriormente Metástases em trânsito (N2) ou em linfonodos locais (N3) Ausência de metástases a distância
IV	Qualquer T Qualquer N M1	Conforme descrito anteriormente Conforme descrito anteriormente Presença de metástases a distância

1.3.2- Fatores prognósticos

O prognóstico do CCM depende fundamentalmente do estágio da doença, com tumores maiores que 2 cm no maior eixo e presença de metástases loco-regionais / sistêmicas

ao diagnóstico indicando pior prognóstico. Entretanto, citam-se outros fatores prognósticos independentes. Com relação ao paciente, sexo masculino e presença de imunossupressão indicam pior prognóstico. E com relação à histologia do tumor primário, sabe-se que tumores com espessura superior a 2 cm, padrão de crescimento infiltrativo, presença de infiltrado linfóide T CD8 (do inglês *cluster of differentiation 8*) intratumoral e presença de invasão vascular linfática estão igualmente associados a pior prognóstico. Destaca-se ainda que o aumento do número de mastócitos e vasos no estroma intratumoral também parece indicar pior prognóstico. Por outro lado, pacientes com expressão de MCPyV no tumor primário (80% dos casos) parecem apresentar melhor prognóstico, o que ainda é controverso na literatura (20, 21, 22).

Não há, até o presente momento, estudos tratando das fibras colágenas presentes no estroma associado ao CCM através de NLOM por SHG. Desta forma, este foi o objetivo do presente trabalho. Isto se justifica pois, conforme já exposto anteriormente, a MEC associada a tumores sólidos contém fibras colágenas morfologicamente alteradas, o que geralmente facilita a progressão tumoral através de efeitos bioquímicos e biomecânicos destas proteínas sobre as células neoplásicas. E, atualmente, a NLOM por SHG tornou-se ferramenta fundamental para a avaliação de fibras colágenas em tecidos biológicos. Assim, seria natural a aplicação desta técnica microscópica no estroma associado ao CCM pois isto poderia evidenciar novas informações prognósticas ou até mesmo novos alvos terapêuticos para o tratamento desta neoplasia, a qual é rara, porém agressiva. Atualmente, o tratamento do CCM com acometimento loco-regional é baseado em cirurgia seguida por radioterapia. Porém, quando os pacientes têm metástases sistêmicas ao diagnóstico o tratamento é baseado em quimioterapia, geralmente com resposta de curto prazo e, portanto, benefício clínico incerto. No caso da imunoterapia, apesar dos resultados promissores, o tratamento de casos com doença avançada ainda não está padronizado (23). Neste contexto, o estudo da MEC associada ao CCM, e seus possíveis efeitos promotores sobre este tumor, poderia contribuir para ampliar o horizonte terapêutico desta neoplasia uma vez que ocorre, atualmente, o desenvolvimento de drogas que têm como alvos enzimas matricelulares como MMPs e LOXs (24).

2- OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação morfométrica das fibras colágenas intratumorais emisoras de sinal de SHG no CCM, em topografia dérmica, o que foi realizado pelo conjunto dos seguintes objetivos específicos:

- Avaliação da fração de área, do nível de cinza médio, da entropia e do contraste do sinal de SHG como medidas da textura das fibras colágenas.
- Correlação dos dados morfométricos texturais obtidos com dados clínicos e histológicos.

3- METODOLOGIA

3.1- Seleção da casuística

Pacientes com diagnóstico de CCM foram buscados retrospectivamente, de 1986 a 2016, no banco de dados do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), após aprovação do presente trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa (parecer número 2.151.989) da mesma instituição. Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, de qualquer faixa etária, com tumores primários em qualquer local corporal, com diagnóstico confirmado por exames histológico e imuno-histoquímico, submetidos a exérese tumoral. No caso do exame imuno-histoquímico, foi exigida positividade para CK7 (do inglês *cytokeratin* 7) ou CK20 (do inglês *cytokeratin* 20) e para pelo menos dois marcadores neuroendócrinos dentre cromogranina, sinaptofisina e CD56 (do inglês *cluster of differentiation* 56), tal como negatividade para marcadores associados a outras possíveis histogêneses ou metástases aplicáveis em cada caso especificamente. Os seguintes dados clínicos foram coletados mediante consulta de prontuários no Serviço de Arquivo Médico do HC: sexo, raça, idade ao diagnóstico, presença de imunossupressão, localização do tumor primário e presença de metástases ao diagnóstico. Foram excluídos pacientes com dados clínicos não confiáveis ou incompletos e pacientes com tumores não primários ou tumores primários submetidos a tratamento prévio.

3.2- Microscopia óptica convencional

Obtida a casuística, as lâminas histológicas previamente confeccionadas para diagnóstico foram analisadas por microscopia óptica convencional para coleta dos seguintes dados histológicos do tumor primário: tipo histológico, tamanho (maior eixo e espessura máxima), padrão de crescimento e presença de invasão vascular linfática. Foram então selecionados dois blocos de parafina por caso, um bloco contendo tumor e pele adjacente e outro bloco contendo apenas pele normal. Os blocos de parafina selecionados foram submetidos a cortes histológicos com 5 μ m e coloração com HE no SAP do HC da FCM - UNICAMP. Por fim, as novas lâminas histológicas confeccionadas foram submetidas a NLOM por SHG.

3.3- Microscopia óptica não linear

As imagens de NLOM por SHG foram adquiridas no Instituto Nacional de Fotônica Aplicada a Biologia Celular (INFABIC) localizado no Instituto de Física (IF) da UNICAMP. Foi utilizado um microscópio óptico invertido multifotônico modelo Axio Observer Z1 LSM 780 (Zeiss), o qual está ilustrado na figura 5. A geração de segundo harmônico foi excitada por incidência de laser de titânio-safira com 800 nm de comprimento de onda. O sinal refletido foi coletado para a construção das imagens, as quais foram adquiridas através de objetiva de grande aumento (x40), com dimensão de 212,55 x 212,55 μm e resolução de 1024 x 1024 pixels (0,21 μm /pixel).

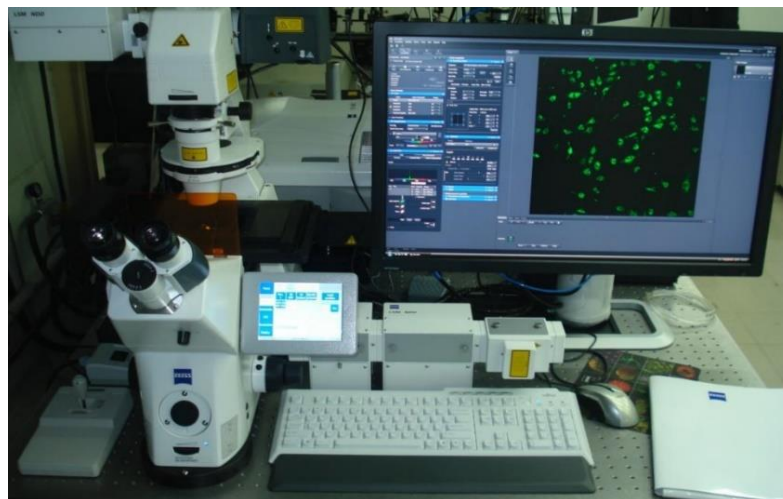


Figura 5- Microscópio óptico multifotônico. Microscópio óptico invertido multifotônico modelo Axio Observer Z1 LSM 780 (Zeiss) do INFABIC-IF-UNICAMP (fotografia gentilmente cedida pela Dra. Gislaine Vieira Damiani).

Em cada caso, foram estudadas, em topografia dérmica (reticular), duas áreas: estroma normal e estroma intratumoral. Em cada área citada, foi captado o sinal de SHG em dois campos de grande aumento (CGAs: x400) representativos distintos, conforme figura 6. Em cada CGA foram manualmente selecionadas quatro regiões de interesse (RIs) representativas distintas com dimensão de 42,5 x 42,5 μm , conforme figura 7. É importante notar que, durante a seleção das RIs, foram evitados anexos cutâneos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas), músculos eretores do pêlo, estruturas vasculares, elastose solar, blocos tumorais e áreas de necrose uma vez que apenas fibras colágenas eram objeto de estudo neste trabalho. Também não foi estudado o músculo esquelético em profundidade, nos casos em que este tecido estava presente e infiltrado pelo tumor, pois a miosina pode gerar sinal de SHG no mesmo espectro de excitação das fibras colágenas, conforme já citado anteriormente.

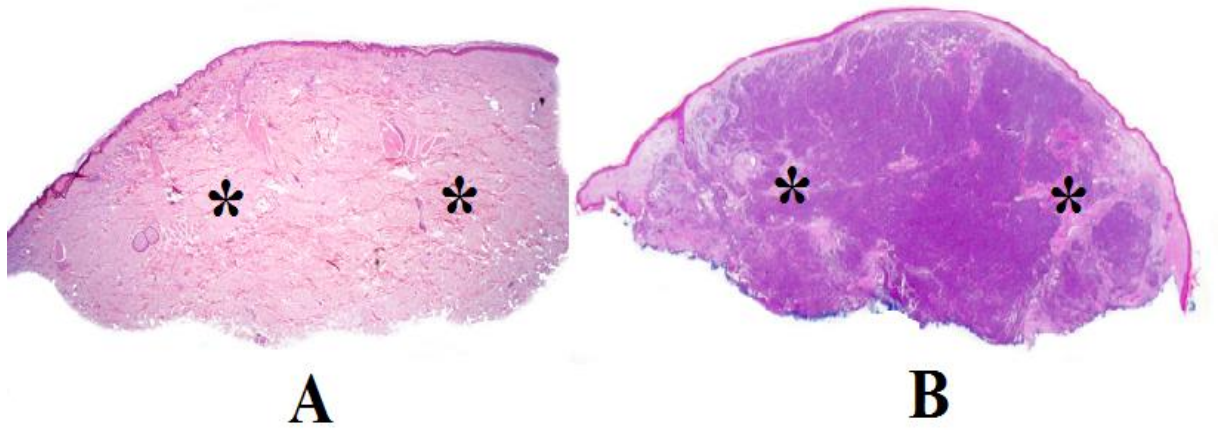


Figura 6- Seleção de campos de grande aumento em imagens captadas através de microscopia óptica convencional. Em A (x12,5), observa-se a pele normal e em B (x10) a região central do tumor do mesmo caso após coloração por HE. Os asteriscos indicam os pontos escolhidos para posterior análise microscópica em campos de grande aumento (dois CGAs em cada área: estroma normal e estroma intratumoral).

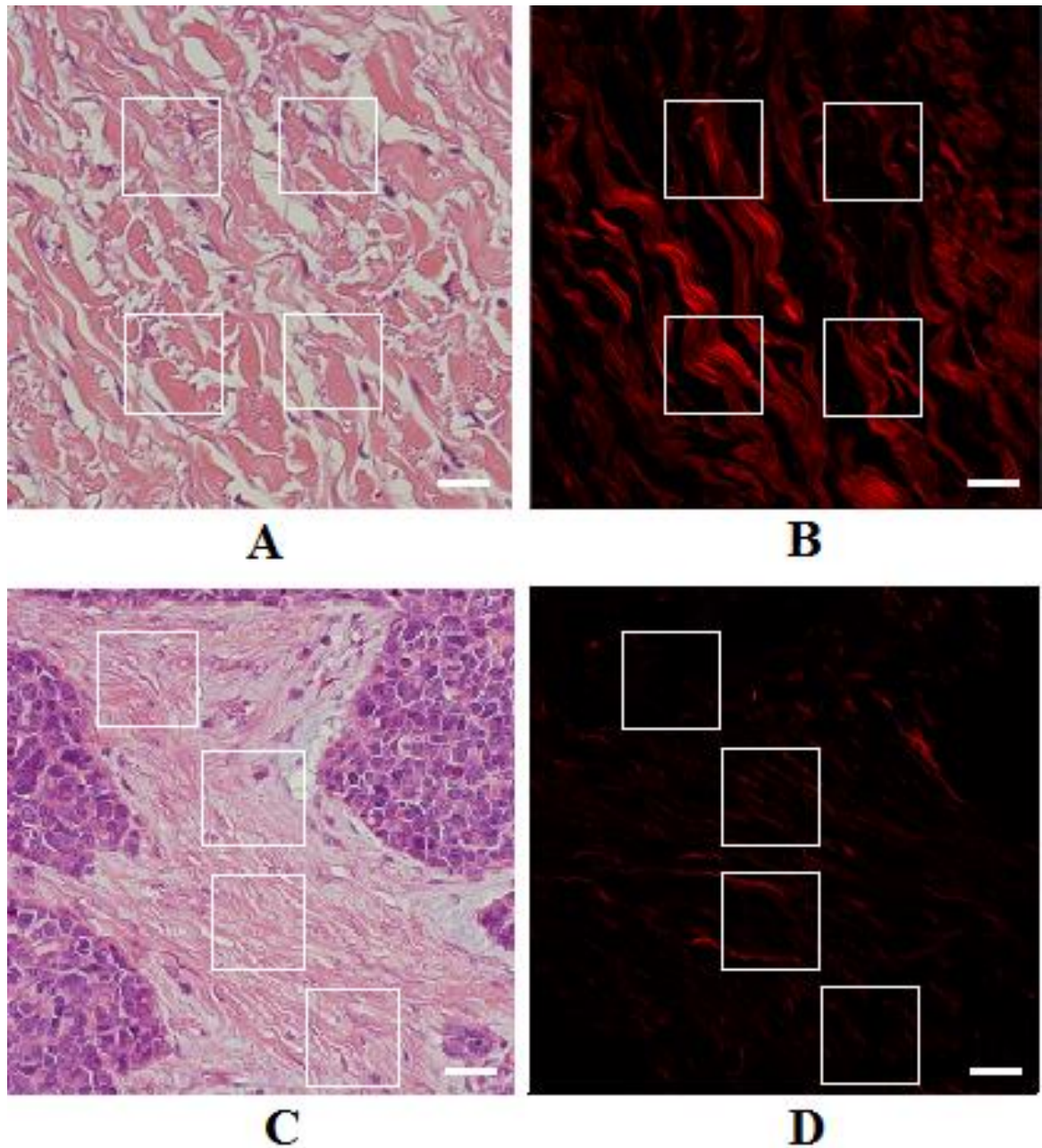


Figura 7- Seleção de regiões de interesse em imagens captadas através de microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico. Em A (x400), nota-se o estroma normal de um caso de CCM após coloração por HE. Em B, o mesmo CGA é observado mediante NLOM por SHG, sendo visualizadas basicamente fibras colágenas I e II (em vermelho: cor aleatória). Em C (x400) é observado, no mesmo caso, o estroma intratumoral em topografia dérmica após coloração por HE, com a imagem de SHG correspondente em D. Em cada imagem de SHG obtida (B e D) estão previamente selecionadas quatro RIs representativas distintas com dimensão individual de 42,5 x 42,5 μm . Barra de escala: 20 μm .

Finalmente, a partir de cada RI foram obtidos fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste, conforme será detalhado a seguir.

3.4- Análise das imagens

A análise das imagens foi realizada através do programa ImageJ (NIH). Inicialmente, as imagens de SHG foram transformadas em 256 níveis de cinza (8 bits por pixel), conforme está ilustrado na figura 8. Em imagens transformadas em 256 níveis de cinza a ausência de sinal corresponde ao nível zero e o brilho máximo corresponde ao nível 255.

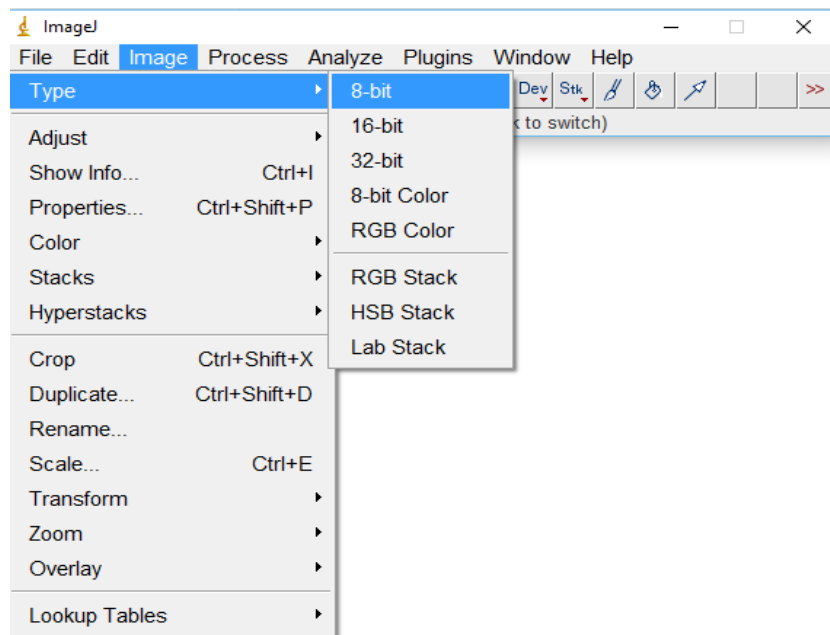


Figura 8- Transformação de imagem em 256 níveis de cinza: interface do programa ImageJ. Nota-se, no menu do programa ImageJ, a opção de transformar o tipo da imagem em análise em 256 níveis de cinza (8 bits por pixel).

A fração de área e o nível de cinza médio são descritores de textura baseados em análise estatística de primeira ordem, ou seja, não valorizam o posicionamento espacial relativo dos níveis de cinza. Entropia e contraste, por sua vez, são descritores de textura baseados em análise estatística de segunda ordem, ou seja, valorizam o posicionamento espacial relativo dos níveis de cinza (25).

A fração de área e o nível de cinza médio foram obtidos diretamente das RIs. A fração de área corresponde a porcentagem de pixels com valor de nível de cinza diferente de zero na região selecionada e o nível de cinza médio corresponde a soma do nível de cinza de todos os pixels da região selecionada dividida pelo número total de pixels da mesma. Desta forma, a fração de área forneceu a porcentagem da área da imagem em que o sinal de SHG estava presente com qualquer nível de cinza. Assim, quanto maior a fração de área, maior a área

da imagem em que havia fibras colágenas emissoras do sinal de SHG. O nível de cinza médio forneceu o valor médio dos níveis de cinza da imagem, ou seja, o brilho médio. Uma vez que a intensidade do sinal de SHG é proporcional ao diâmetro das fibras colágenas, quanto maior o nível de cinza médio, mais espessas eram as fibras colágenas.

Entropia e contraste foram calculados a partir de matrizes de coocorrência de níveis de cinza (GLCMs: do inglês *gray level co-occurrence matrices*) derivadas das RIs. A GLCM é uma matriz bidimensional quadrada cujo número de linhas e colunas é igual ao número de níveis de cinza da imagem em questão. Para obtenção desta matriz são considerados dois pixels por vez sendo que cada célula da GLCM indica o número de ocorrências de um par de níveis de cinza i, j em determinada direção (em graus: 0° , 45° , 90° ou 135°) e distância (em pixels: escolha livre). Está exemplificada na figura 9 a obtenção de uma GLCM a partir de uma imagem hipotética (em A) com 4×4 pixels e 4 níveis de cinza, os quais estão representados numericamente (de 0 a 3) em B, com o valor crescente dos números representando a sucessão de tons cada vez mais brilhantes. Em C, está ilustrada a GLCM obtida na direção de 0° com distância de 1 pixel.

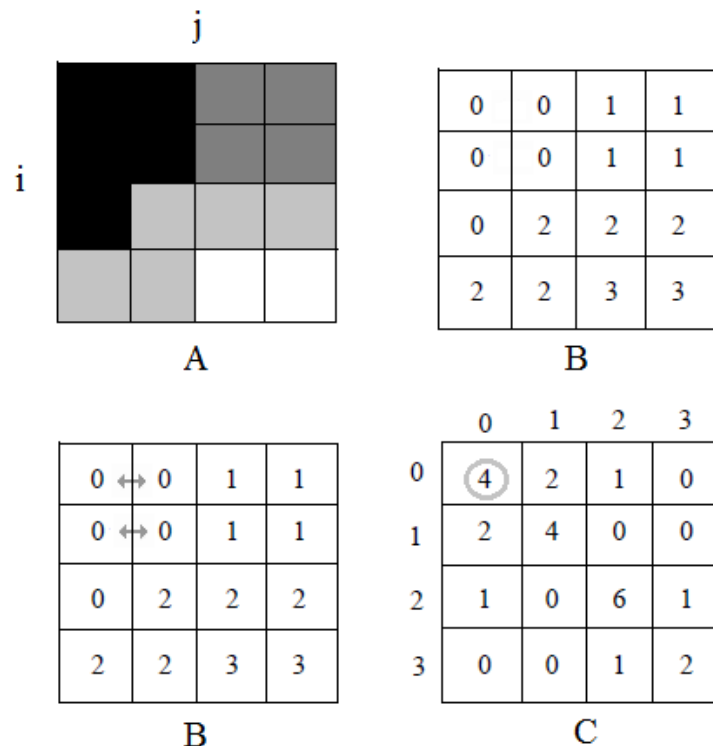


Figura 9- Obtenção de matriz de coocorrência de níveis de cinza a partir de uma imagem hipotética transformada em níveis de cinza. Em A, nota-se uma imagem hipotética com 4×4 pixels e 4 níveis de cinza, os quais estão representados numericamente (de 0 a 3) em B, com o valor crescente dos números representando a sucessão de tons cada vez mais brilhantes. Em C, está ilustrada a GLCM. O valor circulado indica o número de ocorrências do par de nível de cinza 0,0 na direção de 0° com distância de 1 pixel (setas em B).

A partir do exemplo dado, nota-se que o valor circulado na GLCM (em C) corresponde ao número de ocorrências do par de níveis de cinza 0,0 na direção de 0° com distância de 1 pixel (setas em B). Após a obtenção da GLCM em determinada direção (0°, 45°, 90° ou 135°) é feita a normalização da matriz dividindo-se o valor de cada célula pela soma dos valores de todas as células. Na matriz normalizada o valor de cada célula indica a probabilidade de ocorrência do par de níveis de cinza em questão. A figura 10 mostra a fórmula de normalização da GLCM.

$$P(i, j) = \frac{p(i, j)}{\sum_{i, j=0}^{N-1} p(i, j)}$$

Figura 10- Fórmula de normalização da matriz de coocorrência de níveis de cinza. P indica a probabilidade de ocorrência do par de níveis de cinza i, j, p indica o valor da célula i, j e N indica o número de linhas e colunas da matriz.

Entropia e contraste foram calculados a partir das GLCMs obtidas nas quatro direções (0°, 45°, 90° e 135°), com distância de 5 pixels, após normalização das matrizes. O descritor de textura final foi obtido pela média aritmética dos descritores de textura previamente calculados nos quatro direcionamentos. Estes descritores de textura de Haralick traduzem para a linguagem matemática a impressão visual gerada pela variação regular ou aleatória dos pixels de uma imagem, ou seja, fornecem informações quantitativas sobre a relação espacial entre os pixels. Desta forma, ao contrário de cor e brilho, descritores de textura baseados em análise estatística de segunda ordem não podem ser calculados a partir de um único pixel, sendo necessário um conjunto de pixels para sua obtenção. Em termos práticos, uma vez que apresentam parâmetros métricos bem definidos, os descritores de textura permitem a classificação ou comparação computacional de imagens sem a interferência da subjetividade humana e, assim, são ideais para a análise de texturas não regulares, ou seja, texturas com distribuição aleatória de seus elementos, comuns em tecidos biológicos (26).

A entropia, cuja fórmula está exposta na figura 11, expressa a medida da desordem da imagem. Valores elevados de entropia indicam textura não uniforme, ou seja, alto número de transições de níveis de cinza. A entropia está relacionada de modo inverso com o segundo momento angular (energia). Desta forma, a entropia refletiu a complexidade da imagem. Assim,

quanto maior a entropia, menos homogênea era a textura da imagem e, portanto, das fibras colágenas.

$$- \sum_i \sum_j p(i, j) \log(p(i, j))$$

Figura 11- Fórmula para o cálculo do descritor de entropia.

O contraste, cuja fórmula está exposta na figura 12, expressa a medida da variação entre os níveis de cinza da imagem. Valores elevados de contraste indicam distribuição de níveis de cinza mais distante de um valor médio. O contraste está relacionado de modo inverso com a homogeneidade (momento da diferença inversa). Desta forma, o contraste quantificou a flutuação de brilho na imagem. Portanto, quanto maior o contraste, maior era a variação do diâmetro das fibras colágenas.

$$\sum_{i,j=0}^{N-1} (i-j)^2 p(i, j)$$

Figura 12- Fórmula para o cálculo do descritor de contraste.

As figuras 13, 14 e 15 detalham sequencialmente os procedimentos realizados para o cálculo da fração de área, do nível de cinza médio e dos descritores de textura no programa ImageJ. Inicialmente, foi calibrada a escala das imagens transformadas em 256 níveis de cinza e, como já dito anteriormente e ilustrado na figura 13, os CGAs captados tinham dimensão de 212,55 x 212,55 μm e resolução de 1024 x 1024 pixels.

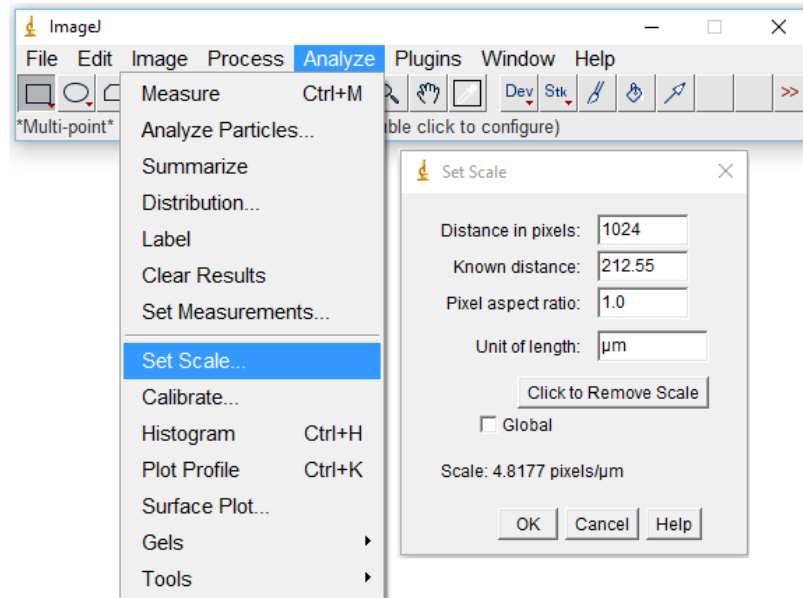


Figura 13- Calibração da escala de imagem transformada em 256 níveis de cinza: interface do programa ImageJ. Nota-se, no menu do programa ImageJ, opção de incluir a dimensão e a resolução da imagem a ser analisada.

Posteriormente, conforme figuras 14 e 15, foram selecionados fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste. Os cálculos foram realizados nas quatro direções (0°, 45°, 90° e 135°), com distância de 5 pixels. O descriptor de textura final foi obtido pela média aritmética dos descritores de textura calculados nos quatro direcionamentos.

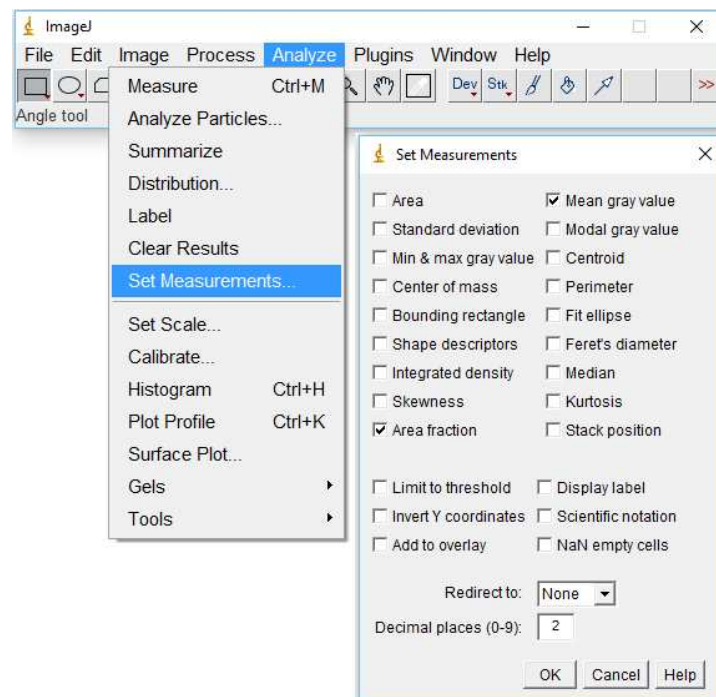


Figura 14- Cálculo da fração de área e do nível de cinza médio: interface do programa ImageJ. Nota-se, no menu do programa ImageJ, disponibilidade de múltiplos parâmetros métricos baseados em análise estatística de primeira ordem, sendo selecionados, neste caso, a fração de área e o nível de cinza médio.

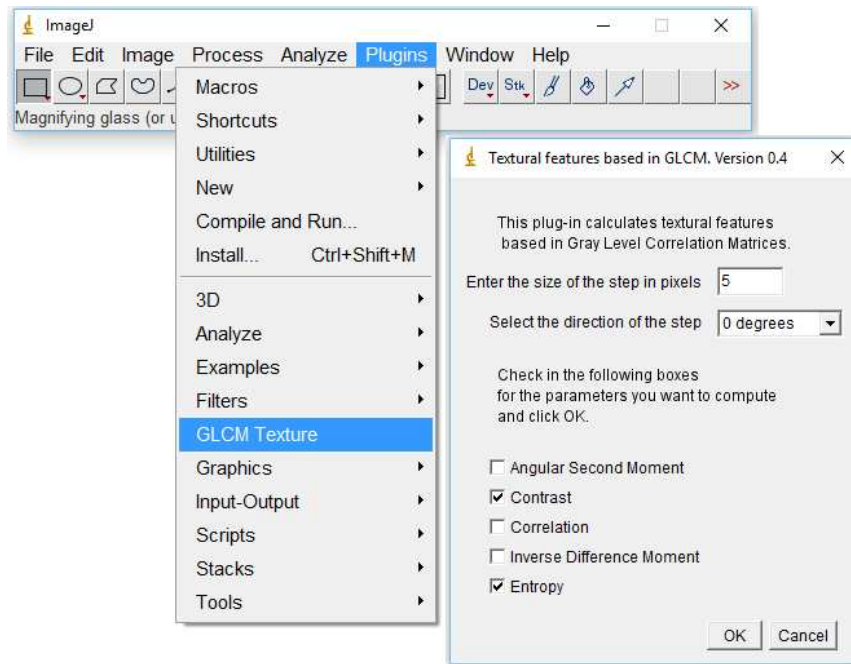


Figura 15- Cálculo da entropia e do contraste: interface do programa ImageJ. Nota-se, no menu do programa ImageJ, disponibilidade de múltiplos descritores de textura de Haralick, os quais são derivados de GLCMs e baseados em análise estatística de segunda ordem, sendo selecionados, neste caso, contraste e entropia. Os cálculos foram realizados nas quatro direções (0°, 45°, 90° e 135°), com distância de 5 pixels. O descritor de textura final foi obtido pela média aritmética dos descritores de textura previamente calculados nos quatro direcionamentos.

3.5- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software Statistical Analysis System for Windows 9.4 (SAS Institute). Todas as variáveis obtidas no presente trabalho, ou seja, fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste, foram sempre comparadas entre dois grupos, com a seguinte sequência de análises:

- Comparação entre estroma normal e estroma intratumoral considerando-se todas as localizações tumorais em conjunto através de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas com dados transformados em postos.
- Comparação do estroma intratumoral entre fatores de pior prognóstico (sexo masculino, presença de imunossupressão, tumores maiores que 2 cm no maior eixo, com padrão de crescimento infiltrativo, invasão vascular linfática ou metástases

loco-regionais / sistêmicas) e fatores de melhor prognóstico (opostos aos citados anteriormente) através de equações de estimativa generalizada (EEG).

4- RESULTADOS

4.1- Casuística

Foram encontrados 26 casos. Entretanto, 15 casos não preencheram os critérios de inclusão previamente detalhados e, portanto, foram excluídos. Isto pois em 3 destes casos não foram encontradas as lâminas histológicas ou mesmo os blocos de parafina, em 1 caso foram encontradas apenas as lâminas histológicas e em 1 caso não foi encontrado o prontuário. Em outros 3 casos os tumores primários foram previamente curetados em serviços externos com hipótese de carcinoma basocelular, sendo os pacientes encaminhados ao HC da FCM – UNICAMP após o diagnóstico inesperado de CCM. Portanto, o material da lesão primária era inadequado para o presente trabalho por estar fragmentado e sem amostragem da pele normal. Em outros 3 casos os pacientes foram encaminhados ao HC da FCM – UNICAMP com tumores primários extensos, os quais foram submetidos a biópsia incisional para planejamento terapêutico. Portanto, o material da lesão primária era inadequado para o presente trabalho por ser escasso e sem amostragem da pele normal. Em outros 2 casos os pacientes foram encaminhados ao HC da FCM – UNICAMP com múltiplas lesões no mesmo sítio topográfico (satelitose) ao diagnóstico, o que não permitiu estabelecer com segurança que foi realizada a exérese da lesão primária. Finalmente, em outros 2 casos pacientes já com diagnóstico de CCM, até então em tratamento em serviços externos, foram encaminhados ao HC da FCM – UNICAMP com recidiva loco-regional / sistêmica da doença. Porém, não houve acesso ao material do tumor primário.

Desta forma, foram selecionados 11 casos para o presente trabalho. Os principais dados clínicos dos pacientes selecionados estão expostos na tabela 2. A casuística era composta por 8 mulheres (73%) e 3 homens (27%), com apenas um paciente da raça negra e idade ao diagnóstico entre 55 e 85 anos (idade média de 73 anos). Nenhum paciente tinha diagnóstico clínico ou laboratorial de imunossupressão. A maior parte dos tumores primários estava localizada em cabeça e pescoço (5 casos: 45,5%), estando nos demais casos localizados em membros inferiores (4 casos: 36,5%) e membros superiores (2 casos: 18%). Ao diagnóstico, pouco mais da metade dos pacientes (6 casos: 54,5%) apresentava metástases loco-regionais / sistêmicas.

4.2- Dados histológicos

Os principais dados histológicos dos tumores primários estão expostos na tabela 3. Houve predominância do tipo intermediário (6 casos: 54,5%) sobre o tipo de pequenas células (5 casos: 45,5%). Não foram observados tumores do tipo trabecular. A medida do maior eixo dos tumores variou entre 2,2 cm e 13,2 cm (média de 4,9 cm). A maioria dos tumores apresentava padrão de crescimento infiltrativo (7 casos: 63,5%). Também na maioria dos tumores foi encontrada invasão vascular linfática nas lâminas histológicas avaliadas (8 casos: 72,5%). Com relação ao estágio ao diagnóstico, foi encontrada a seguinte distribuição: estágio I (1 caso: 9,5%), estágio II (4 casos: 36,5%), estágio III (3 casos: 27,0%) e estágio IV (3 casos: 27,0%).

Tabela 2- Dados clínicos dos pacientes da casuística.

Caso	Sexo	Raça	Idade	Imunossupressão prévia	Localização tumoral	Metástases ao diagnóstico
1	F	B	67	Não	Cabeça e pescoço	Sim
2	M	B	72	Não	Cabeça e pescoço	Sim
3	M	B	69	Não	Cabeça e pescoço	Sim
4	M	B	66	Não	Cabeça e pescoço	Sim
5	F	N	55	Não	Membro inferior	Sim
6	F	B	75	Não	Membro inferior	Não
7	F	B	73	Não	Membro inferior	Não
8	F	B	78	Não	Cabeça e pescoço	Não
9	F	B	84	Não	Membro superior	Não
10	F	B	78	Não	Membro superior	Sim
11	F	B	85	Não	Membro inferior	Não

Tabela 3- Dados histológicos dos pacientes da casuística.

Caso	Tipo histológico	Extensão tumoral	Espessura tumoral	Padrão de crescimento	Invasão linfática	Estágio ao diagnóstico
1	Intermediário	2,3 cm	1,2 cm	Infiltrativo	Não	IIIB
2	Intermediário	2,5 cm	1,5 cm	Nodular	Sim	IIIB
3	Intermediário	2,2 cm	1,4 cm	Infiltrativo	Sim	IV
4	Pequenas células	2,9 cm	1,2 cm	Nodular	Sim	IIIB
5	Pequenas células	13,2 cm	NA	Infiltrativo	Sim	IV
6	Intermediário	2,2 cm	0,6 cm	Infiltrativo	Sim	I
7	Pequenas células	2,7 cm	0,9 cm	Infiltrativo	Não	IIA
8	Pequenas células	4,5 cm	2,8 cm	Nodular	Sim	IIB
9	Pequenas células	10,0 cm	NA	Infiltrativo	Não	IIA
10	Intermediário	7,5 cm	1,6 cm	Infiltrativo	Sim	IV
11	Intermediário	4,2 cm	1,0 cm	Nodular	Sim	IIA

4.3- Dados morfométricos

Nas tabelas 4, 5, 6 e 7, expostas em sequência a seguir, estão expostos os dados texturais obtidos. Em todos os casos, foram avaliadas 8 RIs em cada área de análise (estroma normal e estroma intratumoral em topografia dérmica). Conforme já detalhado anteriormente, a fração de área e o nível de cinza médio foram obtidos diretamente das RIs. Entropia e contraste, por sua vez, foram calculados a partir de GLCMs derivadas das RIs.

A tabela 4 mostra os dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma normal.

Tabela 4- Dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma normal.

Caso	Variável	Estroma normal							
		(8 RIs)							
		RI 1	RI 2	RI 3	RI 4	RI 5	RI 6	RI 7	RI 8
1	Fração de área	76,28	90,73	74,12	55,57	90,80	68,07	85,77	82,98
	Nível de cinza médio	5,95	10,84	4,26	2,26	7,90	1,99	6,24	10,10
2	Fração de área	38,42	32,54	21,56	22,06	42,96	49,21	41,62	23,36
	Nível de cinza médio	1,67	1,05	0,39	0,71	2,28	1,80	4,84	0,50
3	Fração de área	45,98	12,13	24,41	22,07	48,38	34,24	21,67	45,09
	Nível de cinza médio	5,57	0,18	0,84	0,60	5,36	1,24	0,6	1,52
4	Fração de área	41,15	42,57	34,17	36,94	30,80	76,43	58,50	33,23
	Nível de cinza médio	5,20	2,50	0,95	2,08	1,65	25,24	7,57	3,67
5	Fração de área	45,53	65,22	65,16	49,38	35,72	55,52	43,32	46,89
	Nível de cinza médio	1,68	7,63	4,95	2,82	1,73	3,86	2,18	2,46
6	Fração de área	20,31	28,70	26,14	29,07	26,71	48,84	40,04	41,53
	Nível de cinza médio	0,74	0,82	0,64	0,63	0,59	1,34	1,13	1,22
7	Fração de área	61,44	42,01	59,04	30,88	55,60	56,75	49,03	58,9
	Nível de cinza médio	3,30	3,33	3,02	0,86	1,95	2,48	1,79	2,46
8	Fração de área	46,77	39,50	50,03	21,48	39,59	45,76	30,86	21,43
	Nível de cinza médio	2,22	1,57	4,21	0,62	1,40	2,49	1,21	0,42
9	Fração de área	50,17	60,62	55,97	47,99	41,45	22,70	32,64	26,94
	Nível de cinza médio	2,26	4,77	2,27	4,31	2,48	1,24	1,64	0,77
10	Fração de área	52,31	58,0	44,94	60,26	41,39	31,34	23,65	53,29
	Nível de cinza médio	9,98	4,12	3,46	6,67	3,47	1,28	0,92	5,05
11	Fração de área	72,78	77,79	62,77	70,08	28,16	53,67	68,24	67,15
	Nível de cinza médio	11,72	7,99	16,99	9,47	1,08	3,07	4,76	9,84

A tabela 5 mostra os dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma normal.

Tabela 5- Dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma normal.

Caso	Variável	Estroma normal (8 RIs)							
		RI 1	RI 2	RI 3	RI 4	RI 5	RI 6	RI 7	RI 8
1	Entropia	5,10	6,40	4,60	3,50	5,92	3,60	5,52	5,91
	Contraste	109,00	187,41	35,80	14,70	108,52	9,60	81,31	204,00
2	Entropia	2,70	2,20	1,40	1,60	3,12	3,20	3,40	1,61
	Contraste	14,70	6,11	1,30	8,30	24,50	13,12	60,30	1,81
3	Entropia	3,90	0,90	1,81	1,60	4,00	2,41	1,62	2,90
	Contraste	89,20	0,50	4,40	2,50	52,70	8,61	3,12	8,00
4	Entropia	3,70	3,32	2,30	2,91	2,40	6,50	4,70	2,90
	Contraste	98,80	33,72	5,60	34,80	17,20	345,20	137,30	49,01
5	Entropia	3,01	5,10	4,70	3,50	2,70	4,10	3,20	3,42
	Contraste	16,10	169,50	80,10	30,70	21,72	61,30	30,42	34,30
6	Entropia	1,60	2,01	1,82	1,90	1,70	2,90	2,51	2,60
	Contraste	6,20	3,21	3,10	2,41	2,30	5,00	5,30	5,21
7	Entropia	4,10	3,32	3,90	2,00	3,40	3,70	3,10	3,71
	Contraste	35,10	56,30	30,50	4,60	11,12	25,90	11,41	13,30
8	Entropia	3,30	2,80	3,90	1,70	2,70	3,31	2,32	1,50
	Contraste	21,21	10,51	47,20	3,51	9,10	29,00	8,80	1,60
9	Entropia	3,40	4,40	3,60	3,51	3,20	1,90	2,50	1,92
	Contraste	27,20	59,50	22,20	45,40	22,01	22,12	18,90	5,20
10	Entropia	4,80	4,10	3,50	4,70	3,41	2,30	1,90	4,32
	Contraste	222,80	35,02	43,60	100,20	39,71	9,70	9,40	69,10
11	Entropia	5,80	5,61	5,40	5,62	2,10	3,80	4,71	5,50
	Contraste	240,20	74,62	394,20	181,81	10,10	32,10	52,50	223,41

A tabela 6 mostra os dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma intratumoral em topografia dérmica.

Tabela 6- Dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma intratumoral em topografia dérmica.

Caso	Variável	Estroma intratumoral (8 RIs)							
		RI 1	RI 2	RI 3	RI 4	RI 5	RI 6	RI 7	RI 8
1	Fração de área	6,48	1,66	11,56	8,34	54,15	10,54	23,34	17,35
	Nível de cinza médio	0,11	0,04	0,26	0,15	1,69	0,19	0,84	0,42
2	Fração de área	2,59	3,81	4,04	10,86	5,94	4,31	14,54	10,20
	Nível de cinza médio	0,03	0,04	0,05	0,15	0,07	0,05	0,25	0,13
3	Fração de área	2,75	1,94	9,06	10,02	10,63	9,37	12,86	11,19
	Nível de cinza médio	0,04	0,04	0,24	0,18	0,22	0,16	0,34	0,25
4	Fração de área	4,62	2,98	3,27	10,15	8,60	2,16	23,09	7,80
	Nível de cinza médio	0,07	0,04	0,04	0,18	0,12	0,02	0,43	0,11
5	Fração de área	15,43	15,36	16,07	18,90	12,11	2,99	0,63	20,56
	Nível de cinza médio	3,30	0,96	0,71	1,40	0,49	0,04	0,01	0,75
6	Fração de área	5,33	3,83	1,99	0,75	4,18	1,07	3,16	1,40
	Nível de cinza médio	0,07	0,05	0,02	0,01	0,07	0,01	0,06	0,01
7	Fração de área	23,67	33,45	12,29	12,31	7,92	21,06	1,22	23,83
	Nível de cinza médio	2,33	1,28	0,26	0,35	0,16	0,81	0,07	1,33
8	Fração de área	6,37	6,21	8,65	2,85	1,65	4,71	1,50	1,07
	Nível de cinza médio	0,10	0,11	0,15	0,04	0,03	0,12	0,02	0,03
9	Fração de área	18,70	5,26	2,86	36,70	2,66	0,48	12,54	1,53
	Nível de cinza médio	0,35	0,07	0,03	1,79	0,04	0,01	0,17	0,02
10	Fração de área	7,21	2,25	0,80	4,81	3,17	4,35	6,30	4,98
	Nível de cinza médio	0,15	0,05	0,02	0,12	0,12	0,14	0,19	0,15
11	Fração de área	32,83	57,36	33,79	51,22	33,65	53,94	34,88	64,61
	Nível de cinza médio	2,00	5,12	1,42	4,63	0,79	5,82	0,80	2,19

A tabela 7 mostra os dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma intratumoral em topografia dérmica.

Tabela 7- Dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma intratumoral em topografia dérmica.

Caso	Variável	Estroma intratumoral (8 RIs)							
		RI 1	RI 2	RI 3	RI 4	RI 5	RI 6	RI 7	RI 8
1	Entropia	0,50	0,21	0,90	0,60	3,20	0,80	1,83	1,30
	Contraste	0,30	0,20	0,81	0,20	7,82	0,70	5,60	1,50
2	Entropia	0,25	0,35	0,35	0,82	0,48	0,38	1,12	0,77
	Contraste	0,06	0,09	0,08	0,30	0,13	0,10	0,76	0,28
3	Entropia	0,28	0,22	0,82	0,81	0,91	0,80	1,08	0,98
	Contraste	0,12	0,27	1,38	0,58	1,54	0,62	2,20	1,68
4	Entropia	0,43	0,30	0,31	0,84	0,67	0,22	1,56	0,64
	Contraste	0,18	0,12	0,09	0,57	0,25	0,05	1,23	0,27
5	Entropia	1,65	1,42	1,37	1,73	1,13	0,29	0,08	1,62
	Contraste	93,19	14,40	6,80	10,07	6,32	0,09	0,01	4,45
6	Entropia	0,47	0,35	0,20	0,09	0,41	0,12	0,33	0,15
	Contraste	0,14	0,11	0,05	0,01	0,22	0,02	0,25	0,03
7	Entropia	2,25	2,48	0,98	1,06	0,71	1,69	0,16	2,03
	Contraste	40,44	9,71	0,83	3,56	0,62	5,75	1,75	15,62
8	Entropia	0,57	0,56	0,72	0,29	0,18	0,49	0,17	0,14
	Contraste	0,30	0,35	0,46	0,13	0,10	0,72	0,06	0,24
9	Entropia	1,35	0,46	0,27	2,72	0,26	0,06	0,90	0,16
	Contraste	1,21	0,16	0,06	8,01	0,11	0,01	0,38	0,03
10	Entropia	0,64	0,26	0,10	0,46	0,36	0,45	0,60	0,51
	Contraste	1,07	0,27	0,06	0,67	0,95	1,10	1,11	1,07
11	Entropia	2,71	4,33	2,45	3,98	2,06	4,26	2,17	3,66
	Contraste	31,42	100,67	16,06	90,94	5,94	131,72	3,96	10,95

4.4- Dados estatísticos

A tabela 8 mostra os valores de média, mediana, mínimo e máximo dos dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma normal e no estroma intratumoral em topografia dérmica de cada paciente individualmente.

Tabela 8- Valores de média, mediana, mínimo e máximo dos dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) obtidos no estroma normal e no estroma intratumoral em topografia dérmica.

Caso	Variável	Estroma normal (8 RIs)			Estroma intratumoral (8 RIs)		
		Média	Mediana	Min - max	Média	Mediana	Min - max
1	Fração de área	78,04	79,63	55,57 – 90,80	16,67	11,05	1,66 – 54,15
	Nível de cinza médio	6,19	6,09	1,99 - 10,84	0,46	0,22	0,04 – 1,69
2	Fração de área	33,96	35,48	21,56 – 49,21	7,03	5,12	2,59 – 14,54
	Nível de cinza médio	1,65	1,36	0,39 – 4,84	0,09	0,06	0,03 – 0,25
3	Fração de área	31,74	29,32	12,13 – 48,38	8,47	9,69	1,94 – 12,86
	Nível de cinza médio	1,98	1,04	0,18 – 5,57	0,18	0,20	0,04 – 0,34
4	Fração de área	44,22	39,04	30,8 – 76,43	7,83	6,21	2,16 – 23,09
	Nível de cinza médio	6,10	3,08	0,95 – 25,24	0,12	0,09	0,02 – 0,43
5	Fração de área	50,84	48,13	35,72 – 65,22	12,75	15,39	0,63 – 20,56
	Nível de cinza médio	3,41	2,64	1,68 – 7,63	0,95	0,73	0,01 – 3,30
6	Fração de área	32,66	28,88	20,31 – 48,84	2,71	2,57	0,75 – 5,33
	Nível de cinza médio	0,88	0,78	0,59 – 1,34	0,03	0,03	0,01 – 0,07
7	Fração de área	51,70	56,17	30,88 – 61,44	16,96	16,68	1,22 – 33,45
	Nível de cinza médio	2,39	2,47	0,86 – 3,33	0,82	0,58	0,07 – 2,33
8	Fração de área	36,92	39,54	21,43 – 50,03	4,12	3,78	1,07 – 8,65
	Nível de cinza médio	1,76	1,48	0,42 – 4,21	0,07	0,07	0,02 – 0,15
9	Fração de área	42,31	44,72	22,70 – 60,62	10,09	4,06	0,48 – 36,7
	Nível de cinza médio	2,46	2,26	0,77 – 4,77	0,31	0,05	0,01 – 1,79
10	Fração de área	45,64	48,62	23,65 – 60,26	4,23	4,58	0,80 – 7,21
	Nível de cinza médio	4,36	3,79	0,92 – 9,98	0,11	0,13	0,02 – 0,19
11	Fração de área	62,58	67,69	28,16 – 77,79	45,28	43,05	32,83 – 64,61
	Nível de cinza médio	8,11	8,73	1,08 – 16,99	2,84	2,09	0,79 – 5,82

A tabela 9 mostra os valores de média, mediana, mínimo e máximo dos dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma normal e no estroma intratumoral em topografia dérmica de cada paciente individualmente.

Tabela 9- Valores de média, mediana, mínimo e máximo dos dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste) obtidos no estroma normal e no estroma intratumoral em topografia dérmica.

Caso	Variável	Estroma normal (8 RIs)			Estroma intratumoral (8 RIs)		
		Média	Mediana	Min - max	Média	Mediana	Min - max
1	Entropia	5,06	5,31	3,50 – 6,40	1,16	0,85	0,21 – 3,20
	Contraste	93,79	94,91	9,60 – 204,00	2,14	0,75	0,20 – 7,82
2	Entropia	2,40	2,45	1,40 – 3,40	0,56	0,43	0,25 – 1,12
	Contraste	16,26	10,71	1,30 – 60,30	0,22	0,11	0,06 – 0,76
3	Entropia	2,39	2,11	0,90 – 4,00	0,73	0,81	0,22 – 1,08
	Contraste	21,12	6,20	0,50 – 89,20	1,04	1,00	0,12 – 2,20
4	Entropia	3,59	3,11	2,30 – 6,50	0,62	0,53	0,22 – 1,56
	Contraste	90,20	41,90	5,60 – 345,20	0,34	0,21	0,05 – 1,23
5	Entropia	3,71	3,46	2,70 – 5,10	1,16	1,39	0,08 – 1,73
	Contraste	55,51	32,50	16,10 – 169,50	16,91	6,56	0,01 – 93,19
6	Entropia	2,13	1,95	1,60 – 2,90	0,26	0,26	0,09 – 0,47
	Contraste	4,09	4,10	2,30 – 6,20	0,10	0,08	0,01 – 0,25
7	Entropia	3,40	3,55	2,00 – 4,10	1,42	1,37	0,16 – 2,48
	Contraste	23,52	19,60	4,60 – 56,30	9,78	4,65	0,62 – 40,44
8	Entropia	2,69	2,75	1,50 – 3,90	0,39	0,39	0,14 – 0,72
	Contraste	16,36	9,80	1,60 – 47,20	0,29	0,27	0,06 – 0,72
9	Entropia	3,05	3,30	1,90 – 4,40	0,77	0,36	0,06 – 2,72
	Contraste	27,81	22,16	5,20 – 59,50	1,24	0,13	0,01 – 8,01
10	Entropia	3,62	3,80	1,90 – 4,80	0,42	0,45	0,10 – 0,64
	Contraste	66,19	41,65	9,40 – 222,80	0,78	1,01	0,06 – 1,11
11	Entropia	4,81	5,45	2,10 – 5,80	3,20	3,18	2,06 – 4,33
	Contraste	151,11	128,21	10,10 – 394,20	48,95	23,74	3,96 – 131,72

A tabela 10 mostra os resultados do pareamento estatístico entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica de todos os casos em conjunto, considerando-se os dados texturais baseados nas análises estatísticas de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) e segunda ordem (entropia e contraste). Foi utilizada ANOVA para medidas repetidas com dados transformados em postos. Após obtenção dos dados texturais de cada RI, os dados foram numerados aleatoriamente de 1 a 8 (postos), quando então cada posto do estroma normal foi comparado com seu correspondente do estroma intratumoral.

Nota-se que o estroma intratumoral mostrou valores substancialmente menores de fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste em comparação com o estroma normal. As figuras 16, 17, 18 e 19 mostram a representação gráfica por *boxplot* deste pareamento estatístico.

Tabela 10- Pareamento estatístico entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica de todos os casos em conjunto, considerando-se os dados texturais baseados nas análises estatísticas de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) e segunda ordem (entropia e contraste).

Variável	Média	Mediana	DP	Min - max	ANOVA
Fração de área					
Estroma normal (N = 11 / 88 RIs)	46,42	45,31	17,92	12,13 – 90,80	p < 0,0001
Estroma intratumoral (N = 11 / 88 RIs)	12,38	7,50	14,10	0,48 – 64,61	
Nível de cinza médio					
Estroma normal (N = 11 / 88 RIs)	3,57	2,26	3,87	0,18 – 25,24	p < 0,0001
Estroma intratumoral (N = 11 / 88 RIs)	0,54	0,14	1,07	0,01 – 5,82	
Entropia					
Estroma normal (N = 11 / 88 RIs)	3,35	3,31	1,30	0,90 – 6,50	p < 0,0001
Estroma intratumoral (N = 11 / 88 RIs)	0,97	0,62	0,98	0,06 – 4,33	
Contraste					
Estroma normal (N = 11 / 88 RIs)	51,45	23,35	74,29	0,50 – 394,20	p < 0,0001
Estroma intratumoral (N = 11 / 88 RIs)	7,44	0,57	22,38	0,01 – 131,72	

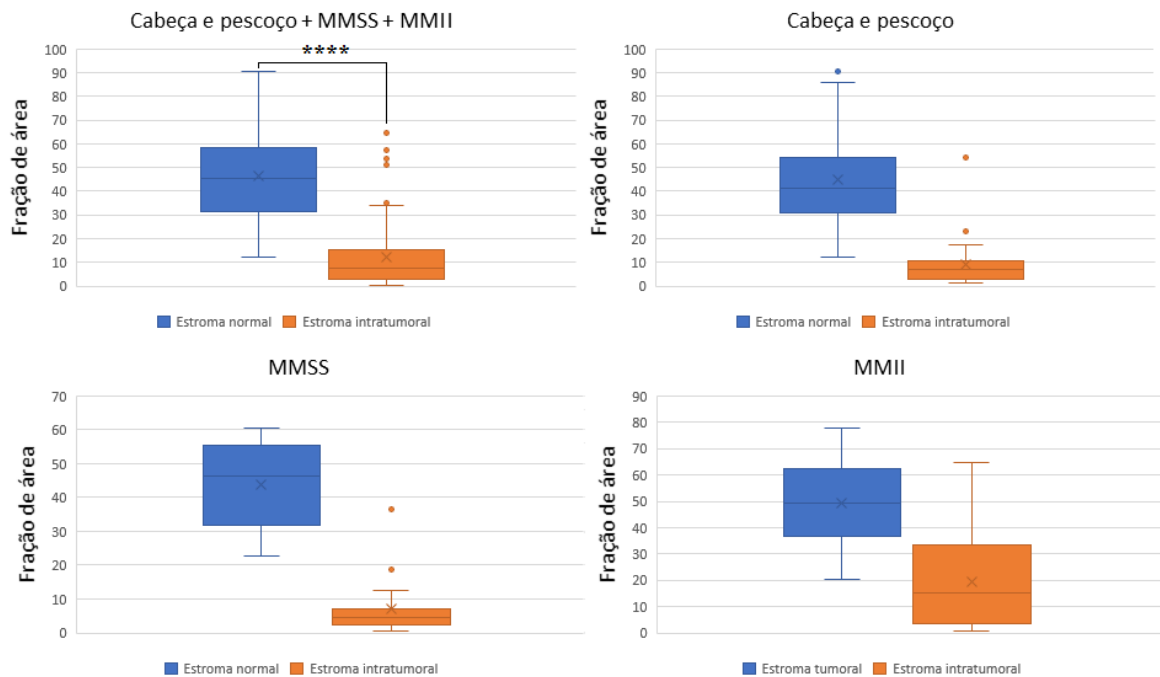


Figura 16- Fração de área: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica. São consideradas todas as localizações tumorais em conjunto (cabeça e pescoço + MMSS + MMII: N = 11 / 88 RIs) e cada localização tumoral especificamente (cabeça e pescoço: N = 5 / 40 RIs, MMSS: N = 2 / 16 RIs e MMII: N = 4 / 32 RIs). **** p < 0,0001.

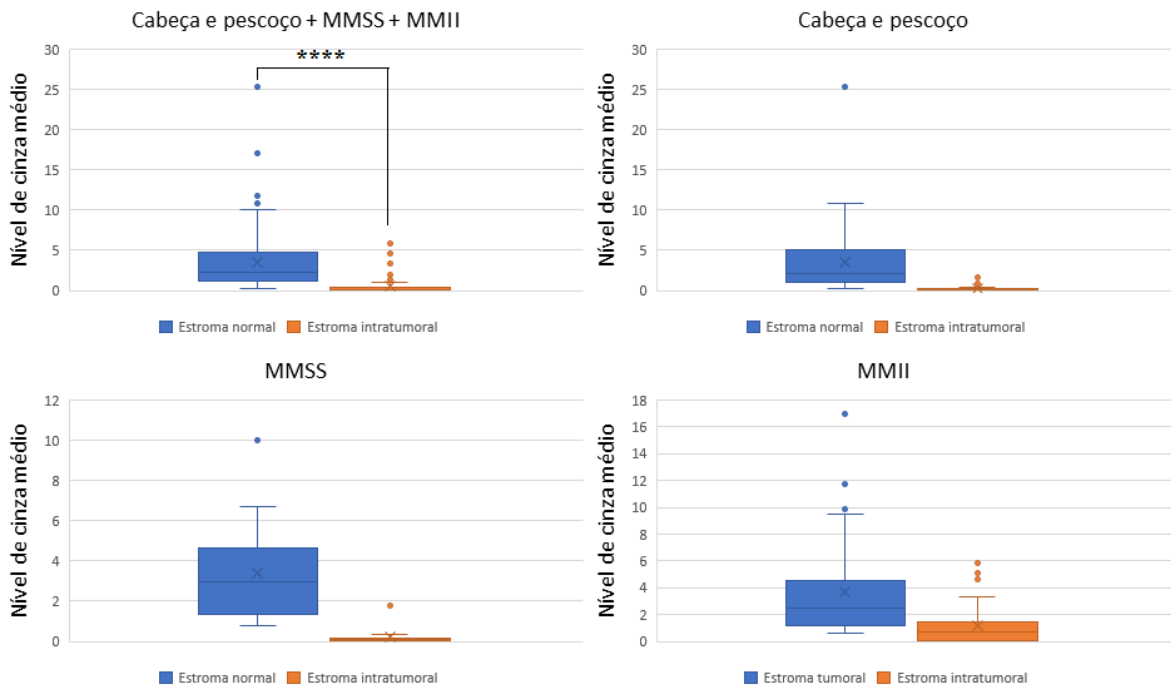


Figura 17- Nível de cinza médio: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica. São consideradas todas as localizações tumorais em conjunto (cabeça e pescoço + MMSS + MMII: N = 11 / 88 RIs) e cada localização tumoral especificamente (cabeça e pescoço: N = 5 / 40 RIs, MMSS: N = 2 / 16 RIs e MMII: N = 4 / 32 RIs). **** p < 0,0001.

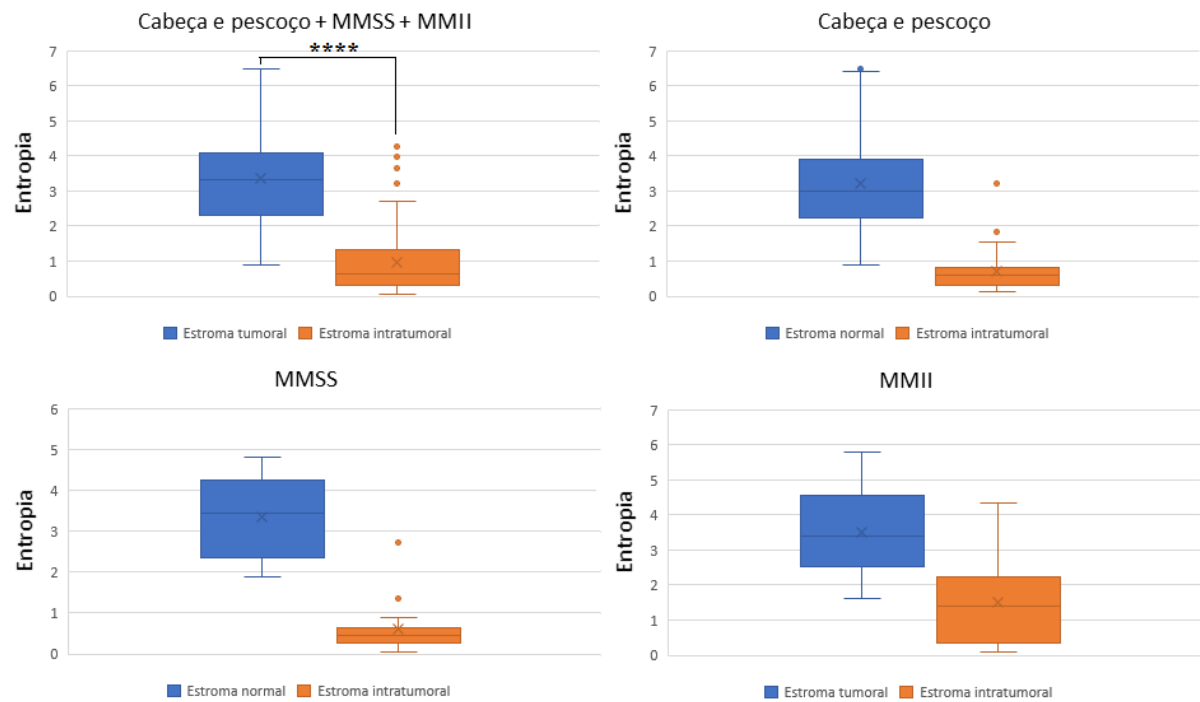


Figura 18- Entropia: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica. São consideradas todas as localizações tumorais em conjunto (cabeça e pescoço + MMSS + MMII: N = 11 / 88 RIs) e cada localização tumoral especificamente (cabeça e pescoço: N = 5 / 40 RIs, MMSS: N = 2 / 16 RIs e MMII: N = 4 / 32 RIs). **** p < 0,0001.

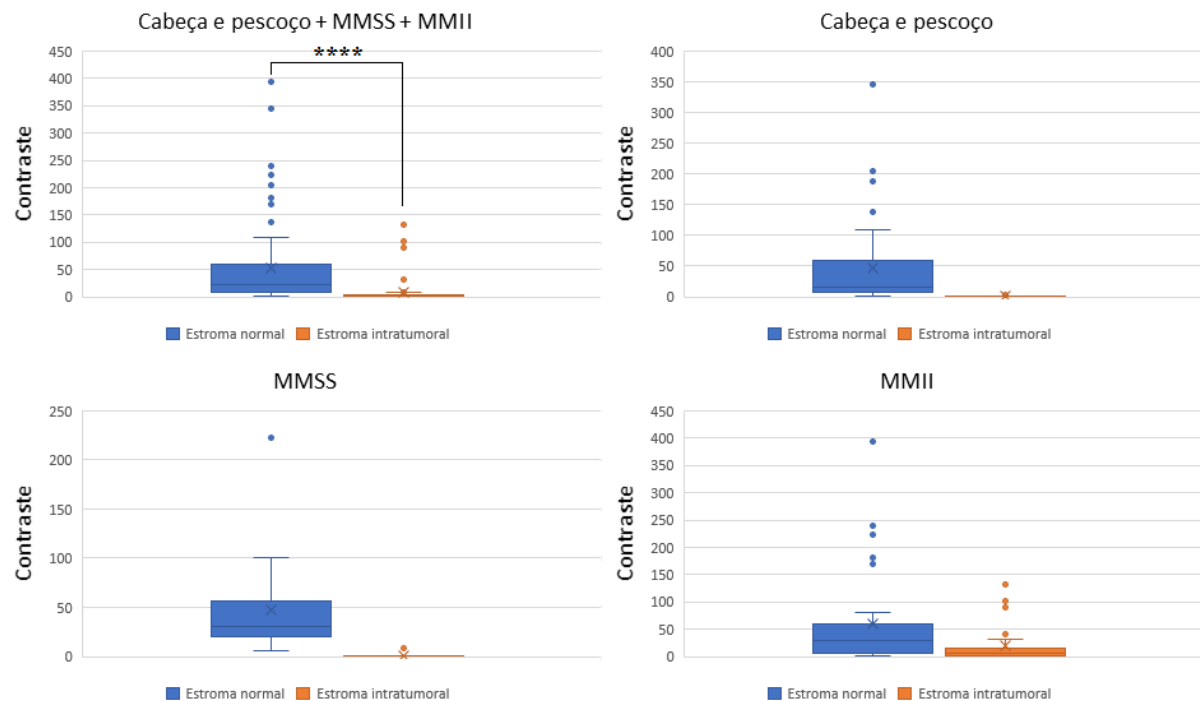


Figura 19- Contraste: representação gráfica do pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral em topografia dérmica. São consideradas todas as localizações tumorais em conjunto (cabeça e pescoço + MMSS + MMII: N = 11 / 88 RIs) e cada localização tumoral especificamente (cabeça e pescoço: N = 5 / 40 RIs, MMSS: N = 2 / 16 RIs e MMII: N = 4 / 32 RIs). **** p < 0,0001.

A tabela 11, por sua vez, mostra os resultados do pareamento estatístico do estroma intratumoral em topografia dérmica entre fatores de pior prognóstico (sexo masculino, tumores com padrão de crescimento infiltrativo, presença de invasão vascular linfática ou presença de metástases loco-regionais / sistêmicas ao diagnóstico) e fatores de melhor prognóstico (sexo feminino, tumores com padrão de crescimento nodular, ausência de invasão vascular linfática e ausência de metástases loco-regionais / sistêmicas ao diagnóstico), considerando-se os dados texturais baseados nas análises estatísticas de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) e segunda ordem (entropia e contraste). Foram utilizadas EEG. Observar que como nenhum paciente tinha diagnóstico clínico ou laboratorial de imunossupressão e todos os tumores eram maiores que 2 cm no maior eixo, estes fatores de pior prognóstico não foram avaliados. Notar ainda que não foi possível a adequada avaliação do prognóstico em si (taxa de sobrevida em 5 anos para cada estágio) devido ao baixo número de pacientes da casuística obtida para este trabalho.

Desta forma, considerando-se apenas o estroma intratumoral, quando tumores com fatores de pior prognóstico foram comparados com tumores com fatores de melhor prognóstico não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis texturais (fração de área, nível de cinza médio, entropia ou contraste).

Tabela 11- Pareamento estatístico do estroma intratumoral em topografia dérmica entre fatores de pior e melhor prognóstico, considerando-se os dados texturais baseados nas análises estatísticas de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) e segunda ordem (entropia e contraste).

Variável	Média	Mediana	DP	Min - max	EEG
Fração de área					
Sexo masculino (N = 3 / 24 RIs)	7,78	8,20	4,99	1,94 – 23,09	p = 0,5904
Sexo feminino (N = 8 / 64 RIs)	14,10	6,84	15,95	0,48 – 64,61	
Tumor infiltrativo (N = 7 / 56 RIs)	10,27	7,56	10,25	0,48 – 54,15	p = 0,7245
Tumor nodular (N = 4 / 32 RIs)	16,07	7,08	18,69	1,07 – 64,61	
Invasão linfática presente (N = 8 / 64 RIs)	11,55	6,07	14,44	0,63 – 64,50	p = 0,3295
Invasão linfática ausente (N = 3 / 24 RIs)	14,57	11,92	13,17	0,48 – 54,15	
Metástases presentes (N = 6 / 48 RIs)	9,50	8,07	8,83	0,63 – 54,15	p = 0,9019
Metástases ausentes (N = 5 / 40 RIs)	15,83	6,29	18,08	0,48 – 64,61	
Nível de cinza médio					
Sexo masculino (N = 3 / 24 RIs)	0,13	0,11	0,10	0,02 – 0,43	p = 0,3337
Sexo feminino (N = 8 / 64 RIs)	0,70	0,15	1,22	0,01 – 5,82	
Tumor infiltrativo (N = 7 / 56 RIs)	0,41	0,15	0,64	0,01 – 3,30	p = 0,9191
Tumor nodular (N = 4 / 32 RIs)	0,78	0,11	1,54	0,02 – 5,82	
Invasão linfática presente (N = 8 / 64 RIs)	0,55	0,12	1,19	0,01 – 5,82	p = 0,3894
Invasão linfática ausente (N = 3 / 24 RIs)	0,53	0,22	0,66	0,01 – 2,33	
Metástases presentes (N = 6 / 48 RIs)	0,32	0,15	0,56	0,01 – 3,30	p = 0,9921
Metástases ausentes (N = 5 / 40 RIs)	0,81	0,11	1,43	0,01 – 5,82	
Entropia					
Sexo masculino (N = 3 / 24 RIs)	0,64	0,65	0,34	0,22 – 1,56	p = 0,5762
Sexo feminino (N = 8 / 64 RIs)	1,10	0,60	1,10	0,06 – 4,33	
Tumor infiltrativo (N = 7 / 56 RIs)	0,84	0,62	0,72	0,06 – 3,20	p = 0,7589
Tumor nodular (N = 4 / 32 RIs)	1,19	0,60	1,29	0,14 – 4,33	
Invasão linfática presente (N = 8 / 64 RIs)	0,92	0,53	1,01	0,08 – 4,33	p = 0,4114
Invasão linfática ausente (N = 3 / 24 RIs)	1,12	0,90	0,89	0,06 – 3,20	
Metástases presentes (N = 6 / 48 RIs)	0,77	0,64	0,58	0,08 – 3,20	p = 0,9232
Metástases ausentes (N = 5 / 40 RIs)	1,21	0,56	1,27	0,06 – 4,33	
Contraste					
Sexo masculino (N = 3 / 24 RIs)	0,53	0,27	0,61	0,05 – 2,20	p = 0,2496
Sexo feminino (N = 8 / 64 RIs)	10,02	0,76	25,82	0,01 – 131,72	
Tumor infiltrativo (N = 7 / 56 RIs)	4,57	0,75	13,57	0,01 – 93,19	p = 0,7721
Tumor nodular (N = 4 / 32 RIs)	12,45	0,29	32,23	0,05 – 131,72	
Invasão linfática presente (N = 8 / 64 RIs)	8,58	0,32	25,68	0,01 – 131,72	p = 0,5540
Invasão linfática ausente (N = 3 / 24 RIs)	4,39	0,82	8,65	0,01 – 40,44	
Metástases presentes (N = 6 / 48 RIs)	3,57	0,60	13,52	0,01 – 93,19	p = 0,9077
Metástases ausentes (N = 5 / 40 RIs)	12,07	0,42	29,27	0,01 – 131,72	

5- DISCUSSÃO

Os dados clínicos e histológicos da casuística deste trabalho apresentaram, de modo geral, distribuição semelhante àquela relatada na literatura mundial, ou seja, predominaram pacientes de pele clara, idosos, imunocompetentes e com tumores primários em cabeça e pescoço, os quais eram, em sua maioria, do tipo intermediário, com padrão de crescimento infiltrativo, invasão vascular linfática e estadiamento avançado. Entretanto, considerando-se os dados clínicos houve exceção com relação ao sexo, com predomínio de pacientes do sexo feminino neste trabalho, ao contrário do que é comumente relatado na literatura mundial. Curiosamente, este mesmo resultado já foi previamente observado em outros trabalhos nacionais (27, 28). Uma vez que, em nosso meio, é conhecido que os homens se expõem mais ao sol do que as mulheres ao longo da vida, com menor uso de protetor solar ou vestuário adequado (29), este resultado poderia ser explicado pela maior prevalência do MCPyV, um vírus geralmente ubiquitário, entre as mulheres de nossa população, o que já foi descrito em outros países após detecção do vírus em material tumoral parafinado através de hibridização *in situ* ou reação em cadeia da polimerase (30). Entretanto, o baixo número de pacientes da casuística deste trabalho limita o poder estatístico deste resultado de prevalência de gênero em termos populacionais.

Em termos de metodologia, a NLOM por SHG pode ser aplicada em tecidos *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, conforme já detalhado anteriormente. Neste trabalho, foram utilizadas lâminas histológicas obtidas de material parafinado e coradas com HE, com sinal de SHG induzido por incidência de laser com 800 nm de comprimento de onda, o que encontra respaldo na literatura. Isto pois já foi demonstrado que em tecidos processados em parafina as fibras colágenas apresentam sinal de SHG de boa qualidade após incidência de laser com 800 nm de comprimento de onda, sem coloração (31) ou após coloração com HE (32). A opção por lâminas histológicas coradas com HE permitiu a seleção adequada de campos microscópicos representativos livres de possíveis fatores de confusão tais como anexos cutâneos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas), fibras musculares (lisas e estriadas), estruturas vasculares, elastose solar, blocos tumorais e áreas de necrose uma vez que apenas fibras colágenas eram objeto de estudo neste trabalho. Desta forma, antes da captação do sinal de SHG, a lâmina histológica em questão foi submetida a microscopia óptica convencional no próprio microscópio óptico multifotônico, sendo o laser acionado apenas após a seleção de cada campo microscópico representativo. Considerando-se o mecanismo de geração do sinal de

SHG, sabe-se que a emissão deste sinal ocorre de modo refletido e transmitido em tecidos biológicos, com intenso sinal refletido na pele humana, onde as fibras colágenas normais medem entre 0,5 e 3 μm . Amostras delgadas (menores que 1 mm) permitem a captação dos sinais refletido e transmitido com boa qualidade. Amostras espessas, por sua vez, permitem apenas a captação do sinal refletido devido ao intenso espalhamento da luz incidente, o que reduz a intensidade do sinal transmitido. Destaca-se ainda que estudos de textura envolvendo sinais de SHG originados de fibras colágenas apresentam resultados mais precisos com o uso de grandes magnificações de imagem pois há, obviamente, maior resolução (33). Portanto, optou-se, neste trabalho, pela captação do sinal de SHG refletido uma vez que há intensa emissão deste sinal na pele e, além disso, foram utilizadas amostras delgadas (cortes histológicos com 5 μm). Foi escolhida a distância de 5 pixels para a obtenção dos descritores de textura a partir das GLCMs pois as imagens de SHG foram obtidas com definição de 0,21 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e, desta forma, a distância de 5 pixels, que corresponde a 1,05 μm , é superior ao diâmetro mínimo de uma fibra colágena dérmica normal. Lembra-se, finalmente, que foi realizada a calibração do laser antes da aquisição do sinal de SHG em cada caso deste trabalho, buscando-se garantir a mesma frequência e potência da luz incidente.

Durante a última década, a NLOM por SHG tem sido frequentemente utilizada no estudo das fibras colágenas na MEC de diversos tumores sólidos com objetivo de se obter informações fisiopatológicas e prognósticas (34). Isto pois é conhecido, atualmente, que as fibras colágenas proliferadas e remodeladas associadas ao câncer, principalmente as fibras colágenas dos tipos I, III e IV, geralmente favorecem a progressão tumoral através de efeitos bioquímicos e biomecânicos sobre as células neoplásicas, conforme já detalhado anteriormente na introdução deste texto.

Uma vez obtido o sinal de SHG, a textura das fibras colágenas pode ser estudada através da análise digital da imagem deste sinal por meio de múltiplos métodos quantitativos com parâmetros métricos bem definidos. A análise textural, que foi utilizada neste trabalho, é um método simples, bem estabelecido e não subjetivo. Foram utilizados dados texturais baseados em análise estatística de primeira ordem (fração de área e nível de cinza médio) e dados texturais baseados em análise estatística de segunda ordem (entropia e contraste). Conforme já detalhado anteriormente na introdução deste texto, a fração de área forneceu a porcentagem da área da imagem em que o sinal de SHG estava presente com qualquer nível de cinza. Assim, quanto maior a fração de área, maior a área da imagem em que havia fibras colágenas emissoras do sinal de SHG. O nível de cinza médio forneceu o valor médio dos níveis

de cinza da imagem, ou seja, o brilho médio. Uma vez que a intensidade do sinal de SHG é proporcional ao diâmetro das fibras colágenas, quanto maior o nível de cinza médio, mais espessas eram as fibras colágenas (35). A entropia refletiu a complexidade da imagem. Assim, quanto maior a entropia, menos homogênea era a textura da imagem e, portanto, das fibras colágenas. O contraste quantificou a flutuação de brilho na imagem. Portanto, quanto maior o contraste, maior era a variação do diâmetro das fibras colágenas (36). Destaca-se, neste ponto, que a combinação de dados texturais baseados em análises estatísticas de primeira e segunda ordem permite maior riqueza descritiva. Neste trabalho, foram comparadas, inicialmente, as imagens de SHG do estroma normal com o estroma intratumoral, em topografia dérmica. Posteriormente, foram comparadas as imagens de SHG do estroma intratumoral entre tumores com fatores de pior e melhor prognóstico, também em topografia dérmica.

O estroma intratumoral mostrou valores substancialmente menores de fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste em comparação com o estroma normal, como exposto na tabela 10 e nas figuras 16, 17, 18 e 19. Aqui é importante ressaltar que estas figuras ilustram o pareamento entre o estroma normal e o estroma intratumoral considerando-se todas as localizações tumorais em conjunto e cada localização tumoral especificamente (cabeça e pescoço, membros superiores e membros inferiores). E, apesar de ter sido aplicada análise estatística (ANOVA para medidas repetidas com dados transformados em postos) apenas no estudo de todas as localizações tumorais em conjunto pelo pequeno número de casos deste trabalho, com resultados significativos ($p < 0,0001$) para todas as variáveis, nota-se, pelos demais gráficos referentes às localizações tumorais específicas, que a tendência de haver menores valores de fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste no estroma intratumoral se manteve. Isto sugere que as diferenças texturais entre as fibras colágenas presentes no estroma normal e no estroma intratumoral independem da localização corporal do CCM primário. Considerando-se apenas o estroma intratumoral, quando tumores com fatores de pior prognóstico foram comparados com tumores com fatores de melhor prognóstico (EEG) não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis texturais, como exposto na tabela 11. Isto sugere que, também independentemente da localização corporal, o CCM sempre induz mecanismos similares de remodelação das fibras colágenas, os quais podem ser irrelevantes na determinação de potenciais prognósticos.

Portanto, embora haja nítido aumento da deposição de colágeno no estroma intratumoral (desmoplasia), como mostrado na figura 7 C por microscopia óptica convencional, a NLOM por SHG mostrou que as fibras colágenas intratumorais estão extensamente alteradas

em comparação com a derme normal, exposta na figura 7 B, com fibras colágenas remanescentes ainda emissoras do sinal de SHG rarefeitas, mais finas e mais homogêneas, o que está exposto na figura 7 D. Quatro hipóteses (isoladamente ou combinadas entre si) podem explicar este fenômeno. Primeiro, pode ter ocorrido a redução do sinal de SHG em decorrência da degradação do colágeno fibrilar, uma vez que este sinal depende da integridade estrutural da fibra colágena (37). Aqui vale ressaltar que a degradação do colágeno fibrilar tipos I, II e III é efetuada pelas MMPs 1, 2, 8, 9 e 13 (38) e já foi documentada variável expressão de algumas destas enzimas no CCM, o que contribuiria para a agressividade local e potencial metastático desta neoplasia através da liberação de produtos de degradação do colágeno e da facilitação da migração das células neoplásicas ao longo da MEC estruturalmente degradada (39). Segundo, pode ter ocorrido a redução do sinal de SHG em decorrência do *crosslinking* maduro do colágeno fibrilar. Isto pois, na pele, o *crosslinking* imaturo entre moléculas de colágeno, baseado em hidroxilisino-leucina, é obtido por geração de um grupo alisina na região C-terminal (por ação de LOXs) em uma molécula e de um grupo hidroxilisina na posição 87 (por ação de LHs) em outra molécula. Caso seja adicionado um grupo histidina na posição 92 em uma terceira molécula de colágeno se obtém o *crosslinking* maduro, baseado em histidil-hidroxilisino-leucina, processo o qual não é controlado por ação enzimática. Algumas patologias cutâneas, como por exemplo a elastose solar, levam a redução da maturação do *crosslinking* das fibras colágenas, com aumento relativo do *crosslinking* imaturo e consequente aumento do sinal de SHG (40). Neste sentido, também seria interessante a avaliação da expressão de LOXs / LHs no CCM, o que ainda não está descrito na literatura, para estudo da relevância do *crosslinking* na patogênese desta neoplasia. Terceiro, pode ter ocorrido a redução do sinal de SHG em decorrência da dissociação do colágeno fibrilar por edema ou degeneração mixoide uma vez que já foi relatada na literatura a redução deste sinal pela injeção de glicerol na pele de modelos animais (41). No presente trabalho, conforme ilustrado na figura 7 C, pode ser observado estroma com aspecto levemente mixoide em torno de alguns blocos tumorais. E, curiosamente, o estroma mixoide de vários tumores sólidos contém grandes quantidades de glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e tenascina-C, macromoléculas as quais podem por si só estimular a proliferação de células neoplásicas (42). Quarto, pode ter ocorrido a redução do sinal de SHG em decorrência do aumento relativo da quantidade de colágeno fibrilar tipos III e / ou V, ou de outros tipos de colágeno fibrilar, uma vez que apenas o colágeno fibrilar tipos I e II gera sinal de SHG de boa qualidade, conforme já detalhado anteriormente na introdução deste texto. Neste ponto, é interessante lembrar que ocorre o aumento relativo do

colágeno fibrilar tipo III no estroma dérmico de tecidos em fase inicial de cicatrização (43) sendo clássica a analogia entre estes tecidos e o estroma de tumores sólidos (44, 45).

Desta forma, conclui-se que, em qualquer hipótese detalhada acima, ou mesmo em qualquer conjunto destas hipóteses, as alterações que ocorrem nas fibras colágenas presentes no estroma do CCM têm potencial efeito pró-tumoral. Por isto, conforme já detalhado anteriormente na introdução deste texto, o estudo da MEC associada ao CCM, e seus possíveis efeitos promotores sobre este tumor, poderia contribuir para ampliar o horizonte terapêutico desta neoplasia uma vez que ocorre, atualmente, o desenvolvimento de drogas que têm como alvos enzimas matricelulares como MMPs e LOXs.

Os achados deste trabalho encontram concordâncias e discordâncias com a literatura prévia tratando da análise do estroma de tumores sólidos através de NLOM por SHG. Como exemplos de concordâncias, são descritas fibras colágenas rarefeitas em adenocarcinomas de esôfago (46, 47) e dermatofibrossarcomas protuberans (48) em comparação com o estroma normal correspondente, sendo as fibras colágenas também mais finas neste último tumor. Por outro lado, como exemplos de discordâncias, foram descritas fibras colágenas mais abundantes em carcinomas papilíferos de tireóide (49), adenocarcinomas / carcinomas epidermóides de pulmão (50, 51) e adenocarcinomas de estômago (52) em comparação com o estroma normal correspondente, sendo as fibras colágenas também mais espessas neste último órgão. E, por fim, foi descrita quantidade variável de fibras colágenas em glioblastomas multiformes, as quais mostram-se rarefeitas ou mesmo com aspecto usual, sem diferença de diâmetro (53). Desta forma, conclui-se que são complexas as alterações das fibras colágenas que ocorrem no estroma associado a tumores sólidos, com variações quantitativas e qualitativas entre tumores de diferentes linhagens celulares (epitelial, mesenquimal, neuroectodérmica ou indeterminada) e também entre tumores de uma mesma linhagem celular. Ou seja, as alterações quantitativas e qualitativas do colágeno fibrilar nem sempre são as mesmas durante o processo de oncogênese. Isto se deve, provavelmente, a efeitos idiossincráticos destas alterações sobre cada linhagem celular ou mesmo sobre cada população celular genotipicamente distinta de um tumor de linhagem celular específica.

Com relação às limitações metodológicas deste trabalho, cita-se, fundamentalmente, o pequeno número de casos por se tratar de neoplasia rara. Desta forma, são necessários trabalhos adicionais com maior casuística para confirmação dos achados descritos ao longo deste texto e comparação entre casos com pior e melhor prognóstico. Além disto, a seleção de todas as RIs e os cálculos de cada variável textural foram realizados de forma

manual, tratando-se de trabalho complexo com alta demanda de tempo. Para contornar tal limitação, poderiam ser criados protocolos de análise automatizada através de algoritmos computacionais. Finalmente, limitações técnicas também devem ser citadas. A técnica microscópica utilizada neste trabalho não discrimina os tipos de colágeno fibrilar e, portanto, estudos adicionais são necessários para determinar a exata distribuição das fibras colágenas no estroma associado ao CCM. Destaca-se ainda que a NLOM por SHG é uma ferramenta que exige equipamentos complexos de alto custo e operadores com qualificação específica, o que limita sua aplicação em larga escala.

6- CONCLUSÕES

O estudo das fibras colágenas presentes no estroma associado ao CCM através de NLOM por SHG e análise textural mostra:

- Variáveis texturais (fração de área, nível de cinza médio, entropia e contraste) com valores substancialmente menores em comparação com o estroma normal, o que significa fibras colágenas I e II rarefeitas e / ou remodeladas, o que pode ter potencial efeito pró-tumoral.
- Tumores com fatores de pior e melhor prognóstico sem diferença em nenhuma das variáveis texturais citadas anteriormente, o que sugere que sempre ocorrem os mesmos mecanismos de remodelação das fibras colágenas dérmicas, os quais podem ser irrelevantes na determinação de potenciais prognósticos.

7- REFERÊNCIAS

- 1- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014; 15(12): 1243-53.
- 2- Hoye AM, Erler JT. Structural ECM components in the premetastatic and metastatic niche. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016; 310(11): 955-67.
- 3- Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* 2015; 33(4): 230–6.
- 4- Xiong G, Xu R. Function of cancer cell derived extracellular matrix in tumor progression. *J Cancer Metastasis Treat.* 2016; 2: 357-64.
- 5- Multhaupt HA, Leitinger B, Gullberg D, Couchman JR. Extracellular matrix component signaling in cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 97: 28-40.
- 6- Leight JL, Drain AP, Weaver VM. Extracellular matrix remodeling and stiffening modulate tumor phenotype and treatment response. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017; 1: 17-22.
- 7- Fang M, Yuan J, Peng C, Li Y. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol.* 2014; 35(4): 2871-82.
- 8- Han W, Chen S, Yuan W, Fan Q, Tian J, Wang X, et al. Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113(40): 11208-13.
- 9- Cicchi R, Pavone FS. Multimodal nonlinear microscopy: a powerful label-free method for supporting standard diagnostics on biological tissues. *J Innov Opt Health Sci.* 2014; 7(5): 1330008.
- 10- Liu J. Two photon microscopy in pre-clinical and clinical cancer research. *Front Optoelectron.* 2015; 8(2): 141-51.
- 11- Keikhosravi A, Bredfeldt JS, Sagar AK, Eliceiri KW. Second-harmonic generation imaging of cancer. *Methods Cell Biol.* 2014; 123: 531-46.
- 12- Ranjit S, Dvornikov A, Stakic M, Hong SH, Levi M, Evans RM, et al. Imaging fibrosis and separating collagens using SHG and phasor approach to fluorescence lifetime imaging. *Sci Rep.* 2015; 5: 13378.
- 13- Burke K, Brown E. The use of second harmonic generation to image the extracellular matrix during tumor progression. *Intravital.* 2015; 3(3): 984509.
- 14- Becker JC, Stang A, DeCaprio JA, Cerroni L, Lebbé C, Veness M, et al. Merkel cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2017; 3: 17077.

- 15- The American Joint Committee on Cancer. Cancer staging manual. 8th ed. Springer International Publishing. 2018.
- 16- Miraflor AP, LeBoit PE, Hirschman SA. Intraepidermal Merkel cell carcinoma with pagetoid Bowen's disease. *J Cutan Pathol*. 2016; 43(11): 921-26.
- 17- Jour G, Aung PP, Rozas-Muñoz E, Curry JL, Prieto V, Ivan D. Intraepidermal Merkel cell carcinoma: a case series of a rare entity with clinical follow up. *J Cutan Pathol*. 2017; 44(8): 684-91.
- 18- Walsh NM. Complete spontaneous regression of Merkel cell carcinoma (1986-2016): a 30-year perspective. *J Cutan Pathol*. 2016; 43(12): 1150-54.
- 19- Coggs K, Tello TL, North JP, Yu SS. Merkel cell carcinoma: an update and review. Pathogenesis, diagnosis and staging. *J Am Acad Dermatol*. 2018; 78(3): 433-42.
- 20- Tetzlaff MT, Nagarajan P. Update on Merkel cell carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2018; 12(1): 31-43.
- 21- Uchi H. Merkel cell carcinoma: an update and immunotherapy. *Front Oncol*. 2018; 8: 48.
- 22- van Veenendaal LM, van Akkooi ACJ, Verhoef C, Grünhagen DJ, Klop WMC, Valk GD, et al. Merkel cell carcinoma: clinical outcome and prognostic factors in 351 patients. *J Surg Oncol*. 2018; 117(8): 1768-75.
- 23- Villani A, Fabbrocini G, Costa C, Carmela Annunziata M, Scalvenzi M. Merkel cell carcinoma: therapeutic update and emerging therapies. *Dermatol Ther*. 2019; 9(2): 209-22.
- 24- Lampi MC, Reinhart-King CA. Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: from molecular mechanisms to clinical trials. *Sci Transl Med*. 2018; 10(422): 0475.
- 25- ImageJ. Image processing and analysis in Java. National Institutes of Health. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij>.
- 26- Mostaço-Guidolin LB, Ko AC, Wang F, Xiang B, Hewko M, Tian G, et al. Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification. *Sci Rep*. 2013; 3: 2190.
- 27- Carneiro C, Sbalchiero JC, Caiado Neto BR, Graziosi GB, Dumaresq FP. Carcinoma de células de Merkel: apresentação clínica, fatores prognósticos, tratamento e sobrevida de 32 pacientes. *Rev Bras Cir Plast*. 2013; 28(2): 196-200.
- 28- Neto CF, Oliveira WRP, Costa PVA, Cardoso MK, Barreto PG, Romano CM, et al. The first observation of the association of Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma in Brazil. *Int J Dermatol*. 2019; 58(6): 703-6.

- 29- Duquia RP, Menezes AM, Almeida HL Jr, Reichert FF, Santos Ida S, Haack RL et al. Prevalence of sun exposure and its associated factors in southern Brazil: a population-based study. *An Bras Dermatol*. 2013; 88(4): 554-61.
- 30- Wang L, Harms PW, Palanisamy N, Carskadon S, Cao X, Siddiqui J, et al. Age and gender associations of virus positivity in Merkel cell carcinoma characterized using a novel RNA in situ hybridization assay. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(18): 5622-30.
- 31- Monaghan MG, Kroll S, Brucker SY, Schenke-Layland K. Enabling multiphoton and second harmonic generation imaging in paraffin-embedded and histologically stained sections. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016; 22(6): 517–23.
- 32- Vieira-Damiani G, Lage D, Christofolletti Daldon PE, Tibúrcio Alves CR, Cintra ML, Metze K, et al. Idiopathic atrophoderma of Pasini and Pierini: a case study of collagen and elastin texture by multiphoton microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2017; 77(5): 930-7.
- 33- Cicchi R, Vogler N, Kapsokalyvas D, Dietzek B, Popp J, Pavone FS. From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy. *J Biophotonics*. 2013; 6(2): 129-42.
- 34- Burke K, Smid M, Dawes RP, Timmermans MA, Salzman P, van Deurzen CH, et al. Using second harmonic generation to predict patient outcome in solid tumors. *BMC Cancer*. 2015; 15: 929.
- 35- Raub CB, Suresh V, Krasieva T, Lyubovitsky J, Mih JD, Putnam AJ, et al. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophys J*. 2007; 92(6): 2212-22.
- 36- Adur J, Carvalho HF, Cesar CL, Casco VH. Nonlinear optical microscopy signal processing strategies in cancer. *Cancer Inform*. 2014; 13: 67-76.
- 37- Kim BM, Eichler J, Reiser KM, Rubenchik AM, Da Silva LB. Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity. *Lasers Surg Med*. 2000; 27(4): 329-35.
- 38- Van Doren SR. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol*. 2015; 44: 224-31.
- 39- Massi D, Franchi A, Ketabchi S, Paglierani M, Pimpinelli N, Santucci M. Expression and prognostic significance of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in primary neuroendocrine carcinoma of the skin. *Hum Pathol*. 2003; 34(1): 80-8.

- 40- Lutz V, Sattler M, Gallinat S, Wenck H, Poertner R, Fischer F. Impact of collagen crosslinking on the second harmonic generation signal and the fluorescence lifetime of collagen autofluorescence. *Skin Res Technol*. 2012; 18(2): 168-79.
- 41- Yeh AT, Choi B, Nelson JS, Tromberg BJ. Reversible dissociation of collagen in tissues. *J Invest Dermatol*. 2003; 121(6): 1332-35.
- 42- Willems SM, Wiweger M, van Roggen JF, Hogendoorn PC. Running GAGs: myxoid matrix in tumor pathology revisited: what's in it for the pathologist? *Virchows Arch*. 2010; 456(2): 181-92.
- 43- Xue M, Jackson CJ. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv Wound Care*. 2015; 4(3): 119-36.
- 44- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. *Redux. Cancer Immunol Res*. 2015; 3(1): 1-11.
- 45- Foster DS, Jones RE, Ransom RC, Longaker MT, Norton JA. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight*. 2018; 3(18): 99911.
- 46- Distinguishing human normal or cancerous esophagus tissue ex vivo using multiphoton microscopy. *J Opt*. 2014; 16(2): 25301.
- 47- Multiphoton microscopic imaging of human normal and cancerous oesophagus tissue. *J Microsc*. 2014; 253(1): 79-82.
- 48- Wu S, Huang Y, Li Z, Wu H, Li H. Collagen features of dermatofibrosarcoma protuberans skin base on multiphoton microscopy. *Technol Cancer Res Treat*. 2018; 17: 1-8.
- 49- Huang Z, Li Z, Chen R, Lin J, Li Y, Li C. In vitro imaging of thyroid tissues using two-photon excited fluorescence and second harmonic generation. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(suppl 1): 129-33.
- 50- Xu X, Cheng J, Thrall MJ, Liu Z, Wang X, Wong ST. Multimodal non-linear optical imaging for label-free differentiation of lung cancerous lesions from normal and desmoplastic tissues. *Biomed Opt Express*. 2013; 4(12): 2855-68.
- 51- Jain M, Narula N, Aggarwal A, Stiles B, Shevchuk MM, Sterling J, et al. Multiphoton microscopy: a potential optical biopsy tool for real-time evaluation of lung tumors without the need for exogenous contrast agents. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138(8): 1037-47.
- 52- Zhou ZH, Ji CD, Xiao HL, Zhao HB, Cui YH, Bian XW. Reorganized collagen in the tumor microenvironment of gastric cancer and its association with prognosis. *J Cancer*. 2017; 8(8): 1466-76.

53- Pointer KB, Clark PA, Schroeder AB, Salamat MS, Eliceiri KW, Kuo JS. Association of collagen architecture with glioblastoma patient survival. *J Neurosurg.* 2017; 126(6): 1812-21.

8- ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL: ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I DO AMBIENTE TUMORAL ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA NÃO LINEAR POR GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO

Pesquisador: Maria Letícia Cintra

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69375817.6.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.151.989

Apresentação do Projeto:

Sabe-se, atualmente, que elementos da matriz extra-celular, especialmente o colágeno, participam ativamente da progressão de alguns carcinomas humanos geralmente com efeitos pró-tumorais, tanto através de sinalização bioquímica, quanto através de sua densidade e organização. O aumento da densidade da matriz colagênica no ambiente tumoral favorece a interação do colágeno com integrinas presentes na superfície das células neoplásicas e aumenta a tensão mecânica tecidual, o que ativa mecanorreceptores e induz o processo de transição epitélio-mesenquimal. O alinhamento das fibras colágenas, por sua vez, facilita o trânsito interfibrilar das células neoplásicas. Recentemente, o estudo destas alterações de densidade e organização do colágeno tem sido realizado através de morfometria digital acoplada a microscopia óptica não linear uma vez que métodos morfométricos digitais tradicionais são baseados apenas na quantificação automática por contagem de pixels, sem fornecimento de informações detalhadas sobre a organização do tecido. O presente estudo fará a análise da densidade e da organização das fibras colágenas tumorais e peritumorais no carcinoma de células de Merkel. Serão buscados retrospectivamente pacientes com este diagnóstico no banco de dados do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Uma vez obtida a casuística será selecionado, em cada caso, um bloco de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.151.989

parafina representativo do tumor, do qual será elaborada uma lâmina histológica corada em hematoxilina e eosina. Esta lâmina será submetida a microscopia óptica não linear por geração de segundo harmônico para avaliação das fibras colágenas através de morfometria digital.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivo primário a avaliação das fibras colágenas no estroma tumoral e peritumoral do carcinoma de células de Merkel através de morfometria digital acoplada a microscopia óptica não linear.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

Riscos: Não há risco à integridade dos participantes deste estudo uma vez que se trata de estudo retrospectivo, que utilizará apenas material de arquivo (bloco de parafina) de tumor previamente operado. Benefícios: Justifica-se o estudo da densidade e da organização das fibras colágenas da matriz extra-celular de carcinomas humanos uma vez que isto varia entre os diversos tecidos e pode, em alguns casos, ter valor prognóstico independente. Este tema foi explorado em carcinomas cutâneos não neuroendócrinos (basocelular e epidermóide), mas não no carcinoma neuroendócrino primário da pele (carcinoma de células de Merkel). O presente estudo fornecerá informações morfométricas que poderão ser futuramente importantes para melhor entendimento da progressão desta neoplasia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de mestrado que será desenvolvido no Departamento de Anatomia Patológica. Será um estudo retrospectivo que pretende ter uma amostra de 13 pacientes, incluindo dados clínicos de prontuários e material tumoral preservado em parafina, no qual serão feitas novas análises. Solicita-se dispensa do TCLE, com justificativa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados adequadamente.

Recomendações:

Em riscos o pesquisador deve afirmar: não há riscos previsíveis, pois não há pesquisa sem nenhum risco.

Em benefícios, o pesquisador deve afirmar: não há benefícios diretos aos participantes, apenas benefícios coletivos, e então descrever os benefícios gerais do potencial conhecimento científico gerado pela pesquisa.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.151.989

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.151.989

apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_918888.pdf	04/06/2017 10:07:02		Aceito
Outros	Carteira_funcional_Maria_Leticia_Cintra.jpg	04/06/2017 10:05:13	Maria Letícia Cintra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado.pdf	21/05/2017 22:16:55	Maria Letícia Cintra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	21/05/2017 22:15:45	Maria Letícia Cintra	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_CONEP.pdf	21/05/2017 22:11:37	Maria Letícia Cintra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 03 de Julho de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL: ESTUDO MORFOMÉTRICO DAS FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I DO AMBIENTE TUMORAL ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA NÃO LINEAR POR GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO
Pesquisador Responsável: Maria Letícia Cintra
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 69375817.6.0000.5404
Submetido em: 04/06/2017
Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção:

PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_916888

LISTA DE PESQUISADORES DO PROJETO

CPF/Documento *	Nome *	Atribuição	E-mail *	Curriculo	Tipo de Análise *	Ação
007.298.058-25	Maria Letícia Cintra	Contato Científico, Contato Público, Pesquisador principal	marialet@fcm.unicamp.br	Lattes CV	PROPONENTE	
219.704.338-25	TIAGO LUDERS LAURITO	Equipe do Projeto	tiago.laurito@uol.com.br	Lattes CV	PROPONENTE	

LISTA DE COMITÊS DE ÉTICA DO PROJETO

Comitê de Ética *	Tipo de Vínculo *	Ação
5404 - UNICAMP - Campus Campinas	COORDENADOR	

LISTA DE INSTITUIÇÕES DO PROJETO

CNPJ da Instituição *	Razão Social *	Tipo de Instituição *	Comitê de Ética *	Ação
	Hospital de Clínicas da UNICAMP	PROPONENTE	5404 - UNICAMP - Campus Campinas	

LISTA DE PROJETOS RELACIONADOS

Tipo *	CAAE *	Versão *	Pesquisador Responsável *	Comitê de Ética *	Instituição *	Origem *	Última Avaliação *	Situação *	Ação
P	69375817.6.0000.5404	1	Maria Letícia Cintra	5404 - UNICAMP - Campus Campinas	Hospital de Clínicas da UNICAMP	PO	PO	Aprovado	