



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

IDENTIDADE NÉVICA: ESTUDO COMPARATIVO DA TEXTURA DO COLÁGENO, POR MEIO DO SHG (*SECOND HARMONIC GENERATION*), EM NEVOS MELANOCÍTICOS DISPLÁSICOS, DE UM MESMO INDIVÍDUO E DE INDIVÍDUOS DIFERENTES.

Paula Regina Martins da Costa

Aluna de Iniciação Científica

Leonardo Ávila Ferreira

Pesquisador colaborador

Gislaine Vieira Damiani

Pesquisador colaborador

Maria Letícia Cintra

Orientadora e pesquisadora responsável

INTRODUÇÃO

Indivíduos com nevos displásicos (NDs) são mais propensos a desenvolver melanoma cutâneo¹. Os NDs apresentam algumas das características do melanoma e a distinção entre eles, portanto, faz-se necessária. Pacientes com muitos NDs devem ser examinados periodicamente e toda lesão que muda suas características deve ser removida para afastar a possibilidade de se tratar de um melanoma que, a princípio, havia sido considerado como ND. Para essa distinção, utiliza-se a regra do ABCDE (A- assimetria, B- bordas irregulares, C- coloração variada, D- diâmetro maior que 5 mm e E- evolução mais rápida), além do conceito de Identidade Névica, na qual estudos mostram que nevos de um mesmo paciente tendem a parecer uns com os outros, e apresentam maiores diferenças entre nevos de diferentes pacientes, seja ao exame por ectoscopia ou dermatoscopia². A partir dessa perspectiva, utiliza-se o termo “sinal do patinho feio” para referir-se ao nevo com morfologia clínica contrastante aos demais NDs do paciente e suspeitos de melanoma em fase inicial (F- “funny looking”). Dentre as características histológicas dos NDs observa-se desordem arquitetural, atipia citológica dos melanocitos, hiperplasia da epiderme, fusão apical dos cones epiteliais, derme papilar subjacente com maior número de fibroblastos e de fibras colágenas delgadas, arrançadas de forma concêntrica e compacta ao redor das cristas epidérmicas, infiltrado linfocitário perivascular, melanófagos e

hipervascularização³. Assim, nota-se que os NDs compartilham, com o melanoma, algumas das características morfológicas, e a distinção entre ND e melanoma pode ser desafiadora, especialmente naqueles NDs que exibem morfologia não-clássica, com maior grau de alterações citoarquiteturais. Atualmente, o exame histopatológico é considerado o padrão ouro no diagnóstico de tumores melanocíticos. Porém, os estudos mostram baixas precisão e reprodutibilidade intra- e interobservador nos diagnósticos diferenciais entre NDs e melanomas, dos patologistas⁴.

OBJETIVO

Estudar a densidade e textura do tecido conjuntivo subepidérmico de nevos displásicos, de pacientes com várias destas lesões segundo as seguintes variáveis: tipo de nevo displásico (clássico ou não clássico), idade, sexo, histórico pessoal e familiar de melanoma, localização anatômica e dimensões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas 56 amostras de NDs de 15 pacientes diferentes. Dos prontuários dos pacientes incluídos no estudo, foram analisados o sexo, cor da pele, idade do paciente no momento da coleta da primeira biópsia, histórico pessoal e familiar de melanoma, histórico pessoal de outros cânceres de pele, histórico pessoal de outras doenças e comportamento biológico das lesões, posteriormente à sua excisão. Os espécimes histopatológicos foram revisados quanto ao diagnóstico e os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (H&E) e pelo sirius red [kit *Picrosirius Red* (PSR), Erviegas]⁵. Às colorações de rotina, os NDs foram subdivididos em 2 grupos de tipo histológico, de forma cega, em: 1-achados histológicos clássicos; 2-atípicas citoarquiteturais variáveis e mais intensas (Fig. 1). Sob luz polarizada, às colorações pelo PSR é possível avaliar o colágeno, qualitativa- e quantitativamente^{6,7}. É aceito que o PSR é excelente método para este estudo, devido à sua disponibilidade comercial e porque permite que se isole especificamente o contraste de colágeno com polarizadores lineares, em um microscópio de campo claro. Por meio do método do PSR sob luz polarizada é possível gerar imagens quantificáveis, empregando *softwares* existentes, comparáveis ao SHG (*Second Harmonic Generation*), que é atualmente considerado o padrão-ouro para avaliação do colágeno⁸. A escolha da análise do colágeno por meio de luz polarizada com PSR foi uma adaptação do projeto inicial, uma vez que o microscópio SHG (*Second Harmonic Generation*) das dependências do Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABiC) estava indisponível para uso por tempo indeterminado. Às colorações pelo *Sirius red* sob polarização (Axiophot 2 Photomicroscope Carl Zeiss; Oberkochen, Germany, em imagens digitalizadas com a câmera Olympus modelo DP72, 16 mega pixel), (Fig. 2) foram estudados a densidade óptica, segundo momento angular,

contraste, entropia e anisotropia, por meio do programa ImageJ (disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Para comparar os parâmetros em relação às variáveis de interesse usou-se o método das Equações de Estimção Generalizadas-EEG (Generalized Estimating Equations-GEE). As estimativas foram feitas por máxima verossimilhança, ponderando a diferença do número de nevos de cada paciente. O nível de significância usado para os testes estatísticos foi de 5%⁹.

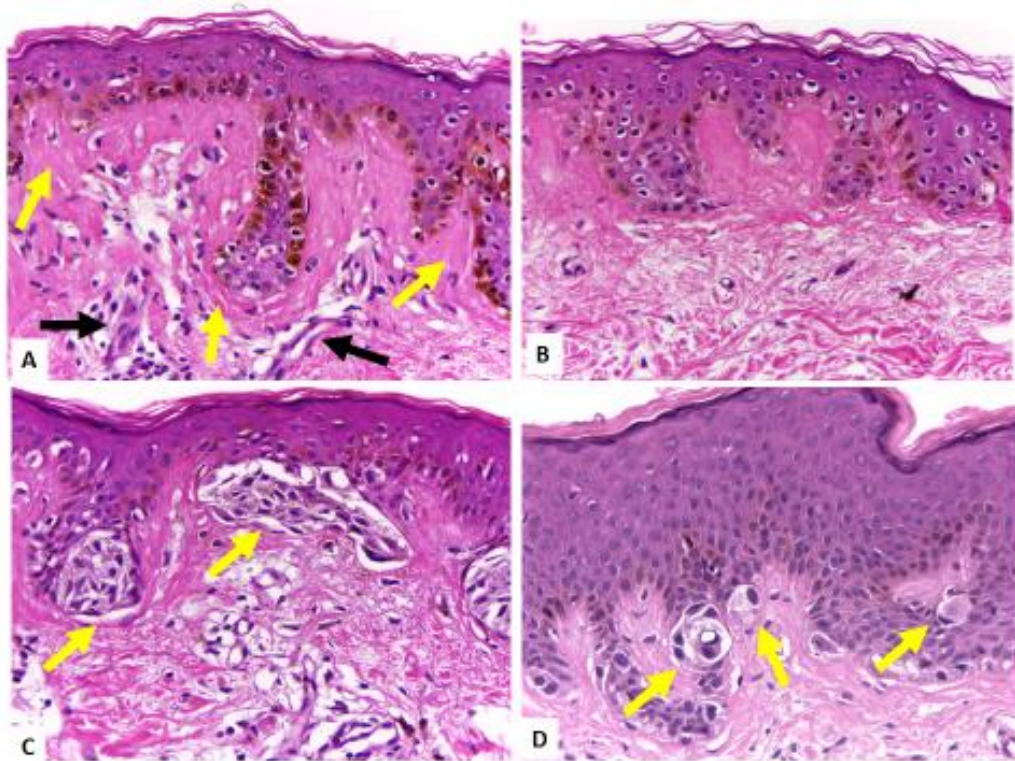


Figura 1: **Nevo melanocítico displásico intraepidérmico clássico (A)** e pele sã adjacente **(B)**. Hiperplasia da epiderme, com alongamento dos cones epiteliais, fibroplasia da derme papilar sob o nevo (setas amarelas) e aumento do número de vasos, com infiltrado linfóide (setas pretas) sob a lesão. **Nevo melanocítico displásico intraepidérmico de tipo não clássico (C e D): maior irregularidade arquitetural e maior atipia citológica.** H&E, aumento original x 400 (A a D).

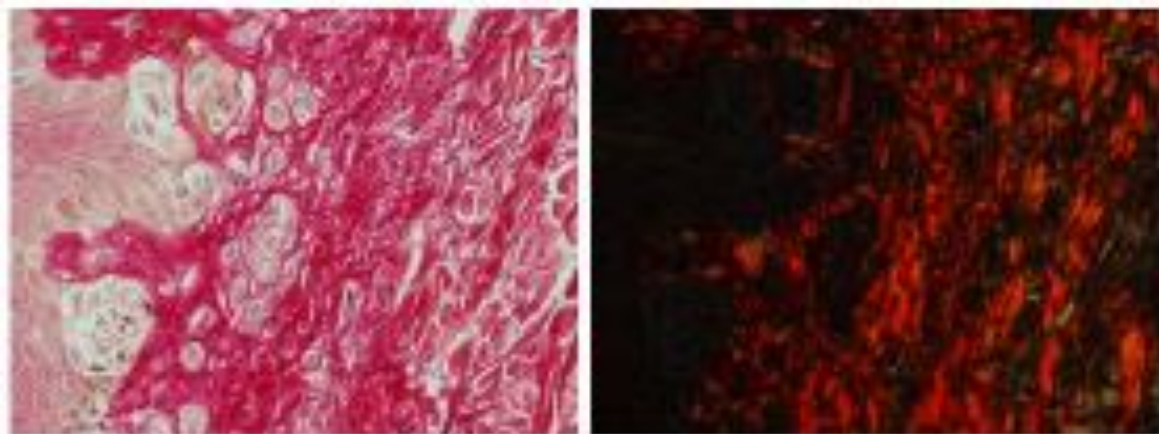


Figura 2: Nevo melanocítico displásico intraepidérmico clássico. À esquerda, sem o filtro polarizador; à direita, mesmo campos sob filtro polarizador. Picrosirius red, aumento original x400.

RESULTADOS

A amostra incluiu 9 pacientes do sexo feminino e 6 do masculino; 8 pacientes (53%) apresentaram melanoma cutâneo em algum período da vida e 51 dos 56 NDs estudados foram diagnosticados até os 40 anos de idade dos pacientes. No seguimento, nenhuma das lesões estudadas recidivou. Os NDs dos pacientes com histórico pessoal de melanoma apresentavam valores significativamente maiores de densidade óptica ($P=0,0259$), comparativamente com aqueles sem este histórico. Trinta e seis lesões eram axiais e 20 se desenvolveram nos membros. Por meio da análise histológica dos nevos, às colorações de rotina, 32 lesões foram classificadas como do grupo 1 (morfologia clássica de nevo displásico) e 24 como do grupo 2 (morfologia não clássica de nevo displásico). Os ND de subtipo 2 ($N=24$) apresentaram valores significativamente menores de contraste ($P=0,0140$) e entropia ($P=0,0353$), comparativamente com os demais NDs. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos de nevos (clássicos ou não) e a idade, sexo, histórico pessoal e familiar de melanoma e outros tipos de câncer cutâneo dos pacientes, localização anatômica e dimensões dos nevos.

DISCUSSÃO

A amostra estudada reflete a maior prevalência dos ND em jovens de pele clara, localizados em áreas fotoexpostas, especialmente no tronco, padrão populacional este similar ao descrito na literatura¹⁰. Cinquenta e um de 56 NDs foram diagnosticados em pacientes com idade até 40 anos e 36 de 56 NDs surgiram no pescoço e/ou tronco. Mais da metade dos pacientes (53%) apresentava histórico pessoal de melanoma, confirmando a maior predisposição de pacientes com vários NDs a desenvolverem melanomas. Nos pacientes com este histórico, o colágeno subepidérmico era significativamente mais compacto (maior densidade óptica). À análise histológica, os 56 NDs da amostra deste trabalho foram divididos, pelas colorações de rotina, em: grupo 1- aqueles com achados clássicos de ND, já descritos anteriormente 2- aqueles com maior grau de atipias citoarquiteturais (não clássicos). Oito, dos 15 pacientes, apresentavam ao menos um ND do grupo 2, sendo que 4 NDs de tipo 2 eram de pacientes com os maiores números de nevos. Esta forma (não clássica) de ND representaria, na verdade, melanomas incipientes ressecados em fase tratável? Esta é uma indagação que cabe ser formulada, haja vista estes nevos representariam o “patinho feio” dentre as lesões de 3 pacientes. O conhecimento sobre o “sinal do patinho feio” e identidade névica é de grande importância para a eficácia no diagnóstico de melanoma, mas espera-se que, associá-los à sistemas

diagnósticos auxiliados por computadores ajude no desempenho¹¹, uma vez que trabalhos mostram que não existem critérios clínicos, histopatológicos ou moleculares que permitam distinguir NDs de melanomas precoces de forma acurada¹² e os erros diagnósticos referentes a isso contribuem com cerca de 10% das mortes de pacientes¹³. Sob a análise por meio do PSR, observamos que as lesões do grupo 2 exibiam, significativamente, menor desorganização do colágeno que os de padrão clássico. Em suma, NDs de indivíduos com histórico pessoal de melanoma e NDs de tipo não-clássico apresentam diferenças de textura do colágeno, o que pode ser reflexo de diferenças biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friedman RJ, Farber MJ, Warycha MA, Papathasis N, Miller MK, Heilman ER. The "dysplastic" nevus. *Clin Dermatol*. 2009 Jan-Feb;27(1):103-15.
2. Melanoma Foundation. Available in: <http://www.melanomafoundation.org/prevention/abcd.htm> Accessed September 2012.
3. Mooi WJ. The dysplastic naevus. *J Clin Pathol*. 1997 Sep;50(9):711-5.
4. Elmore JG, Barnhill RL, Elder DE, Longton GM, Pepe MS, Reisch LM, Carney PA, Titus LJ, Nelson HD, Onega T, Tosteson ANA, Weinstock MA, Knezevich SR, Piepkorn MW. Pathologists' diagnosis of invasive melanoma and melanocytic proliferations: observer accuracy and reproducibility study. *BMJ*. 2017 Jun 28;357:j2813.
5. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979 Jul;11(4):447-55.
6. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996 Jan;20(1):15-27.
7. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol*. 1964 Jul;78: 69-72.
8. Durgam S, Singh B, Cole SL, Brokken MT, Stewart M. Quantitative Assessment of Tendon Hierarchical Structure by Combined Second Harmonic Generation and Immunofluorescence Microscopy. *Tissue Eng Part C Methods*. 2020 May;26(5):253-262.
9. Brown H, Prescott R: *Applied Mixed Models in Medicine* 2^a ed. London, UK: John Wiley & Sons Ltda; 2006.
10. Nicholls EM. Development and elimination of pigmented moles, and the anatomical distribution of primary malignant melanoma. *Cancer*. 1973 Jul;32(1):191-5.
11. Goldstein AM, Tucker MA. Dysplastic nevi and melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Apr;22(4):528-32.
12. Nobre AB, Piñeiro-Maceira J, Luiz RR. Analysis of interobserver reproducibility in grading histological patterns of dysplastic nevi. *An Bras Dermatol*. 2013 Jan-Feb;88(1):23
13. Roesch A, Burgdorf W, Stolz W, Landthaler M, Vogt T. Dermatoscopy of "dysplastic nevi": a beacon in diagnostic darkness. *Eur J Dermatol*. 2006 Sep-Oct;16(5):479-93.