

ALTERAÇÕES DE COMPLEXIDADE DURANTE A EVOLUÇÃO DO ADENOMA PLEOMÓRFICO RECORRENTE PARA O CARCINOMA EX-ADENOMA PLEOMÓRFICO

Palavras-chave: Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico, Adenoma Pleomorfo, Dimensão Fractal, Biologia Sistemica.

João Pedro da Cunha Tavares, João Figueira Scarini, Reydson Alcides de Lima Souza, João Florindo, Konradin Metze, Albina Altemani, Erika Said Abu Egal e Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa

Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas

INTRODUÇÃO

O carcinoma ex- adenoma pleomórfico (CXAP) é uma neoplasia maligna da glândula salivar que apresenta importantes desafios tanto no diagnóstico quanto no tratamento. Essa entidade deriva de seu componente benigno, o adenoma pleomórfico (AP). Ainda que os critérios de distinção entre o elemento benigno e o maligno do CXAP tenham sido adequadamente descritos, a detecção da fase inicial de transformação maligna do AP para o CXAP é considerada um desafio. Os parâmetros morfológicos de interpretação utilizados como sinais de transformação maligna (atipia celular, aumento do índice mitótico e a ausência de cápsula) podem ser controversos pois se sobrepõem ao AP. Durante as mudanças do AP para o CXAP ocorrem transformações em diferentes níveis, tanto celulares quanto teciduais, dentre elas: mudanças na arquitetura geral, na sociologia celular, organização nuclear e expressão de proteínas.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Objetivos Gerais

Avaliar os descritores de complexidade que melhor descrevem a transição do AP para o CXAP.

Objetivos Específicos

Avaliar mudanças na textura nuclear na progressão do AP para CXAP através de métodos de dimensão fractal.

Avaliar parâmetros da sociologia celular aplicados à progressão do adenoma pleomórfico para carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

METODOLOGIA E RESULTADOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Número do parecer: 4.916.454). Em virtude da pandemia do novo coronavírus, nos primeiros três meses do projeto, o aluno bolsista participou de encontros virtuais com o intuito de esclarecer técnicas e procedimentos realizados no laboratório de pesquisa ao qual está vinculado (ao qual se destaca a metodologia empregada neste trabalho). Além disso, o aluno também teve a oportunidade de revisar a literatura proposta sobre o tema deste projeto. Após aprovação do CEP, foram definidos, coletados e organizados os casos de Adenoma Pleomorfo (AP) e os casos de Carcinoma Ex-Adenoma Pleomorfo (CXAP). A confirmação do diagnóstico dos AP e dos CXAP foi feita a partir de cortes histológicos de fragmentos do tumor incluídos em parafina e corados com hematoxilina e eosina (H&E) do acervo do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

Todos os casos de CXAP foram analisados para classificação histológica de acordo com Organização Mundial de Saúde e também foi realizada uma subclassificação segundo o grau de invasão capsular: não invasivo (in situ) ou intracapsular; minimamente invasivo (≤ 1.5 mm a invasão do componente maligno no tecido extracapsular) e francamente invasivo (>1.5 mm a invasão do componente maligno no tecido extracapsular). Primeiramente foram selecionados 38 casos de APs e 11 casos de CXAPs.

As **tabelas 1 e 2** resumem os dados adquiridos pelo programa PathoControl.

Tabela 1. - Parâmetros clínicos dos casos de AP.

Variável	Categoria	Total (%)
Gênero	Feminino	21 (55.3%)
	Masculino	14 (36.8%)
	Informação não avaliada	3 (7.9%)
Idade (anos)	≤ 50	31 (81.6%)
	≥ 51	4 (10.5%)
	Informação não avaliada	3 (7.9%)
	Média	33.4
Recidiva	Sim	0
	Não	35 (92.1%)
	Informação não avaliada	3 (7.9%)
Local	Parótida	22 (57.9%)
	Submandibular	5 (13.2%)
	Glândula salivar menor	8 (21.1%)
	Informação não avaliada	3 (7.9%)

Tabela 2. Parâmetros clínicos de todos os casos de casos de CXAP.

Variável	Categoria	Total (%)
Gênero	Feminino	18 (43.9%)
	Masculino	20 (48.8%)
	Informação não avaliada	3 (7.3%)
Idade (anos)	≤ 50	13 (31.7%)
	≥ 51	24 (58.5%)
	Informação não avaliada	4 (9.8%)
	Média	56.4
Histórico da Doença	Primeiro tumor	34 (82.9%)
	Recidiva de AP primário	5 (12.2%)
	Informação não avaliada	2 (4.9%)
Local	Parótida	28 (68.3%)
	Submandibular	4 (9.8%)
	Glândula salivar menor	4 (9.8%)
	Glândula lacrimal	3 (7.32%)
	Informação não avaliada	2 (4.9%)
Extensão do tumor	T1	2 (4.9%)
	T2	8 (19.5%)
	T3	11 (26.8%)
	T4	4 (9.8%)
	Informação não avaliada	16 (39%)

Após isso, as lâminas com cortes histológicos foram inspecionadas por inteiro, e áreas de interesse de acordo comum de três patologistas começaram a ser fotografadas. As regiões de necrose foram excluídas. Somente imagens de células dos ductos neoformados foram adquiridas. Para essa digitalização, utilizamos a câmara digital de alta resolução (16 megapixels), lente objetiva com aumento 100X (em óleo de imersão) para análise de textura da cromatina nuclear.

Paralelamente, iniciamos os testes de segmentação nuclear (**Figura 1**). Foram feitas uma média de 30 imagens por caso, que foram nomeadas automaticamente. Foi utilizada intensidade de luz 5 e tempo de exposição de 200,5 ms no sistema Olympus @VAiz Axil Photo e software Cellsems, versão 1.14 da Microsoft®. As imagens foram salvas, sem compactação, no formato bitmap colorido de 24 bits com tamanho 1300 x 1030 pixels.

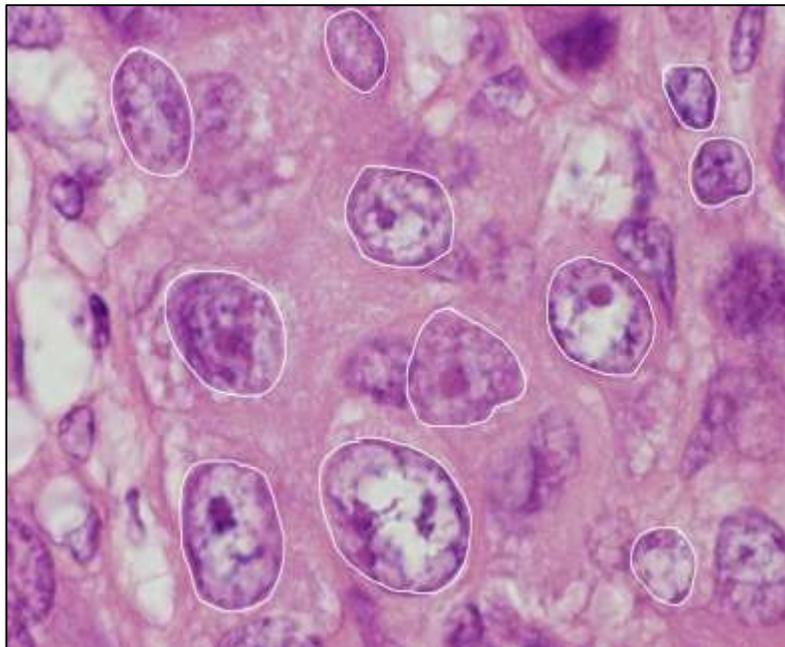


Figura 1 – Células ductais do Carcinoma Ex-adenoma Pleomórfico segmentadas (H&E 100X).

Cerca de 1.500 imagens foram adquiridas e os núcleos segmentados. O desenvolvimento do algoritmo para entropia foi realizado junto ao Instituto de matemática e Estatística da Universidade Estadual de Campinas. Após um ajuste do algoritmo desenvolvido pela equipe (um dos motivos da prorrogação deste estudo) foi possível calcular as dimensões fractais e da entropia de cerca de 11. 000 núcleos segmentados. Compilamos os dados e fazemos as primeiras avaliações estatísticas.

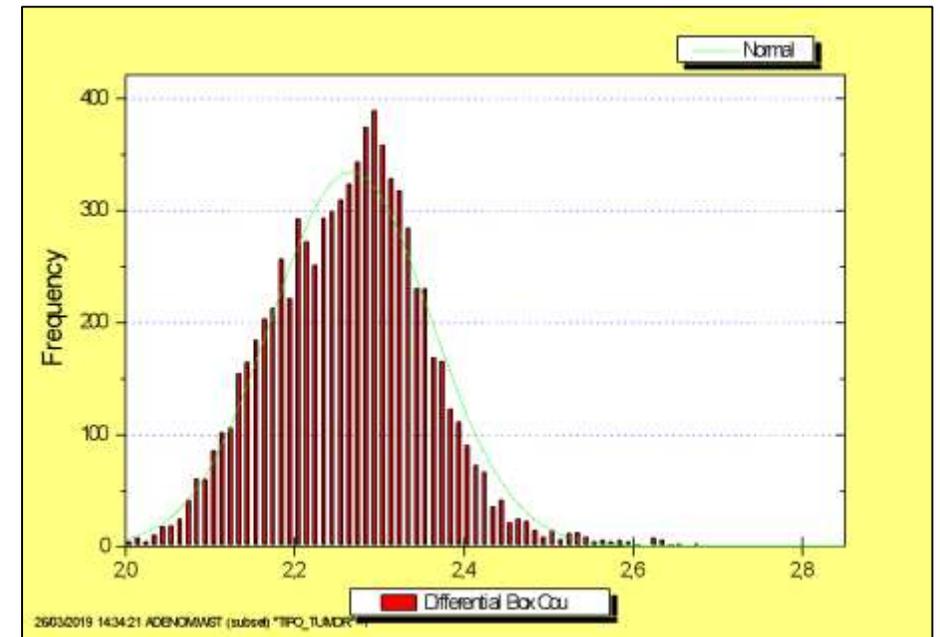


Figura 2– Resultados Estatísticos utilizando o teste de Pearson (nas dimensões acima de 2.5).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nossos resultados revelaram que ao isolar os núcleos de diferentes grupos (normais, adenomas maiores, adenomas menores e CXAPs), houve uma correlação dos núcleos com entropia maior e a maior idade do paciente. Tais casos podem representar possíveis núcleos pré-cancerosos. A fisiopatologia da carcinogênese recai em dois paradigmas, onde o paradigma mais popular mostra que a carcinogênese é normalmente acompanhada pelo acúmulo de mutações genômicas e epigenômicas de modo que a maioria das células em neoplasias malignas contém um grande número de mutações. Durante a progressão do câncer, as células tumorais sofrem várias mudanças genômicas adicionais. As mutações que melhoram a progressão do tumor são mais propensas a serem selecionadas e as células portadoras dessas mutações tendem a ser dominantes no tumor. Nesse caso, podemos verificar um aumento da entropia intracelular, o que torna necessária uma exportação permanente para manter as estruturas altamente organizadas da vida. Esse evento pode provocar uma sobrecarga energética, que poderia amplificar a instabilidade genética e, assim, induzir outras mutações.

De maneira geral, a perda da informação celular oriunda do acúmulo de alterações genéticas durante a progressão tumoral tende a ser dominante nos tumores, aumentando assim, o grau de entropia (desordem). O histograma de luminância estudado por Metze (2002) mostra a distribuição dos valores de escala de cinza em uma imagem. Em imagens monocromáticas homogêneas a entropia será zero, enquanto nas imagens com todos os valores cinza igualmente representados, a entropia alcançará seu valor máximo. Podemos citar como exemplo, um trabalho clássico realizado pelo nosso grupo. Imagens capturadas de esfregaços da medula óssea de pacientes com leucemia de células agudas de células B (corados com May-Grünwald-Giemsa) foram digitalizadas e os valores de cinza transformados em 8-bits após a segmentação nuclear. A entropia de Shannon de cada núcleo pode ser calculada através de um histograma dos tons de cinza utilizando-se a fórmula $(H = -\sum p(i) \log_2 p(i))$, com $p(i)$, com os espaços de probabilidades contidos nesses eventos.

Quando os fatores prognósticos foram analisados, a entropia de Shannon da textura nuclear foi um fator independente onde os valores maiores da entropia estavam correlacionados a um pior prognóstico (Metze, 2007). Tal associação pode ser explicada pela mudança na metilação de DNA, o que provocaria acentuada alteração na arquitetura nuclear em lâminas coradas com Giemsa, (uma vez que o padrão de coloração de Giemsa corresponde às ilhas de metilação de CPG), explicando assim, a entropia elevada e o pior prognóstico do paciente. No entanto esse resultado tem que ser comprovado por outros cálculos, utilizando outros cálculos com o intuito de corroborar esses dados com outros métodos de análise de texto como matriz de co-ocorrência.

Em contrapartida, no caso de dimensão fractal da cromatina nuclear, não foi encontrado diferenças entre os grupos analisados e outros métodos de análise de DF estão sendo desenvolvidos para a validação desses resultados.

BIBLIOGRAFIA

Metze K, Adam RL, Leite NJ. 2002. Are higher order estimates of Shannon's entropy important for image analysis? *Anal Cell Pathol* 24:192.

Metze, K., Mello, M.R.B.D., Adam, R.L., Leite, N.J., Lorand-Metze, I.G.H.: Entropy of the chromatin texture in routinely stained cytology is a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Virchows Archiv.* 451, 114 (2007).

Metze K, Adam, R. L., Kayser, G., & Kayser, K. (2010b). Pathophysiology of cancer and the entropy concept, model-based reasoning in science and technology. *Stud. Comput. Intell.*, 314, 199–206.