

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE COLÁGENO NO CÂNCER
VULVAR E LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS PELO MÉTODO
DE *SECOND HARMONIC GENERATION***

**MARIA DAS GRAÇAS DE FÁTIMA
CAVALCANTI CASTOR**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio
Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de
Pernambuco, para a obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. José Vassallo

Coorientador: Dra. Leuridan Cavalcante Torres

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

A633 Castor, Maria das Graças de Fátima Cavalcanti
Estudo da expressão de colágeno no câncer vulvar e lesões pré-neoplásicas pelo método de second harmonic generation / Maria das Graças de Fátima Cavalcanti
Castor - São Paulo; 2020.
50p.
Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. Carcinoma de Vulva/Vulvar Carcinoma. 2. Lesões pré-neoplásicas da vulva/intraepithelial vulvar neoplasia. 3. Colágeno/Collagen, 4. Matriz extracelular associada ao tumor/Tumor associated extracellular matrix. 5. Microscopia *Second Harmonic Generation*/Second harmonic generation microscopy

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.

Mahatma Gandhi (1948)

DEDICATÓRIA

A meu pai, Nemésio Castôr Falcão (in memorium), e à minha mãe muito amada Benilde Cavalcanti Castor (in memorium), cujos exemplos de vida, honradez, força, amor e amizade continuam me guiando em todos os momentos da minha vida.

À minha querida irmã Francisca Maria da Conceição Castor, de onde vem apoio, amizade e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento ao meu **Deus**, por me prover de saúde, oportunidade e sabedoria durante os anos do doutorado, e a **Nossa Senhora das Graças**, minha madrinha, por me fornecer sua proteção para conseguir chegar ao término desta jornada.

Ao meu orientador **Professor Dr. José Vassallo**, muito obrigada por suas orientações.

A minha coorientadora **Leuridan Cavalcante Torres**, minha gratidão e especial obrigado pela amizade, apoio, disponibilidade em ajudar e pelas suas preciosas orientações.

À direção-geral do **Hospital de Câncer de Pernambuco** e ao **A.C.Camargo câncer Center**, agradece por ter me fornecido a oportunidade da realização da pesquisa e do doutorado.

À **Diretoria de Pesquisa do HCP**, pela oportunidade de participar deste programa de pós-graduação.

Ao **departamento de Patologia**, o meu obrigado na pessoa do **Prof. Dr. José Roberto Vieira de Mello**, por permitir o fornecimento dos blocos histológicos para realização da pesquisa e ajudar na análise das lâminas.

Agradeço a boa vontade e o empenho de **Alzira de Melo Machado, Rosimeri Maria da Silva (Rose), Marlene Roque de Sena Oliveira, Márcia Maria Clemente, Ana Carla Bezerra dos Santos Rocha** e a todos que compõem o departamento de Patologia do Hospital de Câncer.

À **Edna Maria Leite Meirelles Paixão**, bibliotecária do Hospital de Câncer de Pernambuco, muito obrigada pela ajuda com os artigos.

Agradecimentos ao **Laboratório Multiusuários do Instituto de Física “Gleb Wataghin” (UNICAMP/São Paulo)**, por me permitir usar suas instalações.

Agradeço também aos meus **colegas da Pós-graduação**, pelo convívio enriquecedor durante essa jornada.

RESUMO

Castor MGFC. **Estudo da expressão de colágeno no câncer vulvar e lesões pré-neoplásicas pelo método de *Second Harmonic Generation***. [Tese]. São Paulo. Fundação Antônio Prudente em Parceria com Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

Introdução: A matriz extracelular (MEC) desempenha um papel importante na função celular, sendo que seu componente mais importante são as fibras de colágeno (COL). Nos últimos anos, a Microscopia de Geração Segundo Harmônico (em inglês, *second harmonic generation microscopy*; SHG) tem sido utilizada para a análise de COL em vários tipos de cânceres ginecológicos, como o da mama e ovário. Desta forma, tem-se enfatizado o valor da quantificação do colágeno por este método como meio de aprofundar o conhecimento da fisiopatologia e do prognóstico na avaliação destas neoplasias. **Objetivo:** No presente estudo caracterizamos as fibras de COL utilizando-se a microscopia de SHG objetivando avaliar diferenças entre carcinoma de células escamosas e lesões pré-neoplásicas da vulva, bem como verificar se há relação entre características dessas fibras com parâmetros clinicopatológicos associados a prognóstico. **Método:** Trata-se de um estudo de coorte horizontal e retrospectivo. Foram incluídos 52 pacientes, entre os anos de 2000 a 2010, sendo 40 com Carcinoma de Células Escamosas (CCE) Vulvar; 12 pacientes com Neoplasia Intraepitelial Vulvar (NIV); e, para o controle de comparação interna, foram considerados tecidos **distantes** ao tumor sem presença de lesão tumoral e/ou NIV. Para análises laboratoriais, foi selecionado um espécime representativo do processo patológico para revisão diagnóstica; e, posteriormente, submetido ao estudo do COL usando a microscopia de SHG. Os tecidos adjacentes normais e intratumorais foram selecionados em secções, para a avaliação do COL, e corados em Hematoxilina/Eosina (H&E) e analisados por microscopia confocal. Parâmetros relacionados ao colágeno, como quantidade, organização e uniformidade, em áreas de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas da vulva, foram comparados com áreas distantes de aspecto normal das mesmas pacientes. **Resultado/conclusão:** Foi observado um evidente decréscimo nos valores dos parâmetros do COL no estroma associado às lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da vulva. Além disto, aumentos na quantidade e uniformidade das fibras do colágeno tumorais se associaram à presença de metástases linfonodais, um reconhecido parâmetro de pior prognóstico no carcinoma de vulva.

Descritores: Câncer de vulva, Lesões pré-neoplásicas da vulva, matriz extracelular associada ao tumor, Colágeno, Microscopia por *Second Harmonic Generation*.

ABSTRACT

Castor MGFC. [Quantitative study of collagen in vulvar carcinoma and intraepithelial vulvar neoplasia using the Second Harmonic Generation microscopy]. [Tese]. São Paulo. Fundação Antônio Prudente em Parceria com Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

Background: The extracellular matrix (ECM) plays an important role in cellular function, being collagen fibers its most important component. Over the last few years, *second harmonic generation* (SHG) microscopy has been used for the analysis of collagen fibers in several types of cancers, including breast and ovarian cancer. The value of collagen parameters obtained using this technique has been advocated to gain insights on the physiopathology and on the prognostic evaluation of cancer. **Objective:** Herein, we have characterized collagen fibers using the SHG microscopy, to evaluate differences between vulvar cancer and preneoplastic lesions, and to find possible associations between characteristics of collagen fibers with clinicopathological parameters related to prognosis. **Methods:** This is a retrospective and horizontal cohort study. Were included 52 patients, between the years 2000 to 2010, 40 of whom with Vulva Squamous Cell Carcinoma (VSCC); 12 patients with Vulvar Intraepithelial Neoplasia (VIN); and, for the control of internal comparison, tissues distant to the tumor without tumor lesion and / or VIN were considered. For laboratory analysis, a specimen representative of the pathological process was selected for diagnostic review and subsequently subjected to the study of collagen using SHG microscopy. The normal and intratumoral adjacent tissues were selected in sections, for collagen evaluation, and stained in Hematoxylin/Eosin (H&E) and analyzed by confocal microscopy. Collagen parameters, quantity, organization, and uniformity, of stroma adjacent to neoplastic or preneoplastic lesions were compared with values obtained in normal appearing tissue distant from those lesions from the same patients. **Results/Conclusion:** There was an evident decrease in the values of collagen fiber parameters in the stroma associated to tumors. Increased quantity and uniformity of tumor associated collagen fibers were associated with the presence of lymph node metastases, which suggest a prognostic value of such parameters in the evaluation of vulvar cancer.

Key words: Vulvar carcinoma, intraepithelial vulvar neoplasia, tumor associated extracellular matrix, collagen, second harmonic generation microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Carcinoma de células escamosas (CCE) verrucoso da vulva.....	4
Figura 2	Histologia do líquen escleroso, neoplasia intraepitelial vulvar grau 3 e CCE de vulva.....	6
Figura 3	Fluxograma para inclusão dos pacientes.....	16
Figura 4	Esquema do sistema de raios, lentes e filtros para análise do colágeno pela microscopia de segundo harmônico (SHG).....	18

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAFs	Fibroblastos associados ao câncer (do inglês, <i>cancer-associated Fibroblasts</i>)
CCE	Carcinoma de células escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COL	Colágeno
H&E	Coloração de hematoxilina e eosina
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
HPV	Papilomavirus humano (do inglês, <i>Human Papilloma Vírus</i>)
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
LE	Líquen Escleroso
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz extracelular
NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
NS	Não significativo
SHG	Microscopia por segundo harmônico (do inglês, <i>Second Harmonic Generation</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	Tecidos organizados em matriz (do inglês, <i>Tissue Microarray</i>)
TPEF	do inglês <i>Two photons excited fluorescence</i>

APRESENTAÇÃO

Em conformidade com as orientações do Programa de Pós-Graduação em Oncologia do A.C.Camargo em relação à apresentação da tese, esta foi descrita em: resumo, abstract, introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados, considerações finais, conclusões e referências bibliográficas. Os resultados foram apresentados na forma de artigo científico publicado na revista internacional *Scientific Reports-Nature*. O trabalho foi desenvolvido no Hospital de Câncer de Pernambuco (Recife - PE) e no Laboratório do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, SP (INFABIC, UNICAMP). O estudo foi aprovado pelo o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), sob o número: CAAE50720115.9.0000.5205, seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	Câncer de vulva	2
1.1.1	Epidemiologia.....	2
1.1.2	Tipos Histológicos do Câncer de vulva	3
1.1.3	Diagnóstico histológico do carcinoma e lesões precursoras da vulva.....	6
1.1.4	Pele, Matrix extracelular e Colágeno.....	8
1.2	Second Harmonic Generation (SHG)	9
1.3	Justificativa	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Tipo de estudo.....	14
3.2	População do estudo	14
3.3	Local e período do estudo.....	14
3.4	Critérios de elegibilidade.....	14
4.4.1	Critérios de inclusão	14
3.4.2	Critérios de exclusão.....	15
3.5	Aspectos éticos	15
3.6	Captação dos pacientes e processamento dos dados clínicos	15
3.7	Análise Histológica.....	16
3.8	Análise do colágeno por <i>Second-Harmonic Generation</i> (SHG)	18
3.8.1	Avaliação das fibras do colágeno (COL).....	18
3.9	Análise estatística	19
4	RESULTADOS	21
4.1	Artigo publicado	21

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
6	CONCLUSÕES.....	42
7	REFERÊNCIAS.....	44

ANEXOS

Anexo 1 Declaração de revisão ortográfica e gramática

Anexo 2 Parecer Consubstanciado – CEP/HCP

Anexo 3 Cópia da mensagem de Aceite do artigo - Scientific Reports

Anexo 4 Licence to publish - Scientific Reports

Anexo 5 Modelo padrão para o diagnóstico histopatológico nas vulvectomias

APÊNDICE

Apêndice 1 Ficha clínica

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE VULVA

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de vulva é infrequente, sendo o quarto câncer ginecológico com maior ocorrência no mundo (Wang et al. 2008), vindo depois do câncer de corpo uterino, ovário e colo uterino. Representa em torno de 5% de todos os tumores do trato genital inferior (van de Nieuwenhof et al. 2008). Ao contrário do câncer cervical, o câncer vulvar tem sua maior incidência em mulheres caucasianas em comparação a outras etnias (Saraiya et al. 2008).

O câncer ginecológico nos Estados Unidos da América (EUA) tem uma estimativa para 2020 de 113.520 casos novos, podendo ser a causa do óbito de 33.620 mulheres (Siegel et al. 2020). Dentre estes tumores, o câncer de vulva tem uma estimativa para o ano de 2020 de 6.120 casos novos, podendo levar a 1.350 óbitos de mulheres (American Cancer Society-ACS 2020).

No Brasil, a cidade de Recife-PE, numa pesquisa realizada em 1992 pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC; Agência Internacional de Pesquisa do Câncer), demonstrou a maior incidência de câncer de vulva do mundo, sendo de 5,6 casos/100.000 mulheres por ano. Entre 2000 e 2005, a incidência se manteve elevada em comparação a outras capitais do Brasil. No entanto, São Paulo, um dos centros econômicos mais importantes do país, apresentou, neste período, uma incidência anual desta neoplasia de 1,4 casos/100.000 mulheres. No Brasil, as estimativas atuais para o câncer vulvar não são claras, apesar de ter sido observado um aumento gradativo da incidência, principalmente em mulheres mais jovens (Baandrup et al. 2011; de Melo Maia et al. 2012). No ano de 2018 a incidência do câncer vulvar na população brasileira foi estimada em 1,2 casos /100.000 mulheres, um número semelhante aos da Europa Ocidental e Central e inferior aos da América do Norte, de 1,8 (IARC 2020). A observação, nas últimas décadas, de aumento da incidência entre pacientes mais jovens, em uma neoplasia anteriormente considerada típica de mulheres idosas, foi relatada em outros estudos (Joura et al. 2000; Lanneau et al. 2009; Kang et al. 2017). Para este fato, foram sugeridas duas patogêneses distintas, uma ligada à infecção pelo papilomavírus humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*) e outra relacionada ao (LE) líquen escleroso (Insinga et al. 2008). Segundo Buttman-Shweiger et al. (2015), a incidência cresceu 6,7% em todas as faixas etárias

e, em especial, entre os 30 e 69 anos, passando de 1,7/100.000 mulheres, em 1999, para 3,6/100.000 mulheres, em 2011.

Em um estudo de 300 mulheres com carcinoma da vulva atendidas no A.C.Camargo Cancer Center (São Paulo), a mediana de idade foi de 70 anos, com intervalo entre 15 a 98 anos (de Melo Maia et al. 2012).

1.1.2 Tipos Histológicos do Câncer de Vulva

Lesões precursoras e neoplásicas da vulva ocorrem principalmente nos pequenos e grandes lábios, representando estas topografias a mais de 70% dos casos. O clitóris e o períneo estão comprometidos pelo câncer em 15 a 20% das pacientes (Eifel et al. 2011). No estudo de de Melo Maia et al. (2012), 39% dos casos estavam localizados nos lábios menores, 31% nos maiores, 23% no clitóris e 7% no períneo, sendo que a maioria, 72%, eram unilaterais.

Dentre os diferentes tipos histológicos de câncer de vulva, o carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo mais comum, correspondendo a cerca de 85-90% dos casos. Os CCE são subtipados como: *queratinizante*, o subtipo mais comum, atinge principalmente mulheres idosas e não está relacionado ao HPV; o *basalóide*, menos comum, encontrado mais frequentemente em mulheres jovens, relacionado ao HPV de alto risco (principalmente tipo 16); e o subtipo *verrucoso*, que tem um crescimento lento e um bom prognóstico (Figura 1). O carcinoma verrucoso também está associado, em parte dos casos, ao HPV, porém dos tipos de baixo risco (6 e 11). O CCE é seguido pelo *adenocarcinoma* (cerca de 8% dos carcinomas da vulva) que atinge principalmente as glândulas de Bartholine, podendo também surgir nas glândulas sudoríparas da vulva. Menos frequentes dentre as neoplasias malignas da vulva temos o *melanoma* (cerca de 6%), os *sarcomas* (menos de 2%) e, muito raramente, o *carcinoma basocelular* (ACS 2020).

O CCE de vulva, como mencionado acima, possui dois mecanismos de desenvolvimento. O primeiro relacionado à presença do HPV, atingindo uma faixa etária mais jovem (< 50 anos), e o segundo, independente do HPV, perfazendo em torno de 80% dos casos, que aparece após a menopausa (50-80 anos) e tem no líquen escleroso (LE) sua patogênese. As lesões precursoras de ambos os tipos são denominadas, respectivamente, neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) usual (ou clássica) e diferenciada (ou simples) (van de Nieuwenhof et al. 2011; Ueda et al. 2011; Alkatout et al. 2015; Chokoeva et al. 2015; Jin e Liang 2019). A histopatologia das lesões precursoras do câncer da vulva será apresentada a seguir.

O tratamento do câncer de vulva depende do seu estágio, localização, extensão e da presença ou não de comprometimento linfonodal, podendo ser indicada desde uma cirurgia, até a

radioterapia e/ou quimioterapia. A abordagem cirúrgica é a principal modalidade de tratamento utilizada para o câncer de vulva e o seu sucesso dependerá de uma ressecção ampla do tumor primário, mantendo uma margem cirúrgica de 2 cm e margem patológica de no mínimo 1 cm. No caso de lesões multifocais, a vulvectomy total deve ser considerada. Tumores que apresentem comprometimento dos linfonodos inguinais, o que ocorre em torno de 25 a 30% dos casos, devem ser submetidos adicionalmente à linfadenectomia inguinofemural. A radioterapia e/ou quimioterapia neoadjuvantes são indicadas para pacientes com tumores primários localmente avançados, com intuito de evitar cirurgias mais extensas e debilitantes. O prognóstico para o câncer vulvar é bom nos casos em que o diagnóstico é feito mais precocemente e sem comprometimento dos linfonodos.

Deve-se considerar, ainda, que a modalidade e extensão do tratamento podem afetar decisivamente a sexualidade da paciente. O diagnóstico precoce favorece um tratamento mais conservador, preservando tanto a estética e funcionalidade da vulva, quanto a sobrevivência da paciente, com menor trauma físico e psicológico (van de Nieuwenhof et al. 2011; Ueda et al. 2011; Baiocchi e Rocha 2014; Alkatout et al. 2015; Chokoeva et al. 2015).



Figura 1 - Carcinoma de células escamosas verrucoso da vulva

1.1.3 Diagnóstico histológico do carcinoma e lesões precursoras da vulva

O LE vulvar é uma doença inflamatória crônica não neoplásica que atinge mulheres acima de 50 anos. Sua etiologia não é muito clara, mas grande parte dos pesquisadores sugere desordem autoimune, hormonal, genética, psicológica ou fatores infecciosos. Geralmente, surge no período peri ou pós-menopausa, com sintomatologia de prurido, que, por vezes, se torna intenso. Sua relação com o CCE é mais frequente e parece ter evolução mais rápida, com prognóstico pior, quando comparado ao carcinoma vulvar HPV-dependente. À histologia, o epitélio apresenta perda de sua estrutura normal, com remodelação do COL subjacente (van de Nieuwenhof et al 2009; Murphy 2010; Trietsch et al. 2015).

A NIV diferenciada (ou simples), desenvolvida a partir do LE, é caracteristicamente unifocal, unicêntrica, não estando relacionada ao HPV (Firenzy 2002). É mais prevalente em pacientes pós-menopausa. Segundo van de Nieuwenhof et al. (2009), a NIV diferenciada tem um tempo médio para transformação para o câncer invasor de 22,8 meses, um tempo mais curto do que a NIV usual, ligada ao HPV, cujo tempo médio de evolução é de 41,4 meses.

A NIV usual (ou clássica, ou ainda basaloide) está relacionada ao HPV, mais frequentemente do tipo 16, e atinge principalmente mulheres jovens, sendo as lesões, em sua maioria (60%), multifocais e/ou multicêntricas (Preti et al. 2015). Está também relacionado ao tabagismo e a lesões intraepiteliais de alto grau. À histologia, apresenta atípias celulares inerentes ao tipo de NIV e alterações típicas promovidas pelo HPV, tais como a presença de coilocitose, pleomorfismo celular e ceratose. Em um estudo, a NIV usual teve evolução para câncer vulvar invasor no geral em 5,7% dos casos, sendo 2,7% em pacientes na faixa etária de 15-29 anos e 8,5% em pacientes acima dos 75 anos. Na NIV diferenciada a porcentagem de pacientes com diagnóstico de carcinoma foi de 32,8% (van de Nieuwenhof et al. 2009).

A NIV tem sua graduação similar à do colo uterino, em três graus: NIV1, NIV2 e NIV3. A NIV1 mostra um comprometimento de células atípicas que se limita ao terço inferior do epitélio escamoso vulvar; na NIV2, as células atípicas acometem dois terços do epitélio; e, na NIV3, as células atípicas atingem todo o epitélio escamoso, mas mantendo a membrana basal (MB) íntegra, não sendo, dessa maneira, lesões invasoras. A NIV1, atualmente, não é considerada uma precursora do câncer vulvar, porque tem um baixo potencial de malignidade e menor probabilidade para evoluir para as NIV2 e NIV3, que são consideradas lesões neoplásicas intraepiteliais de alto grau, com real risco de malignidade (Firenzy 2002; Sideri et al. 2006).

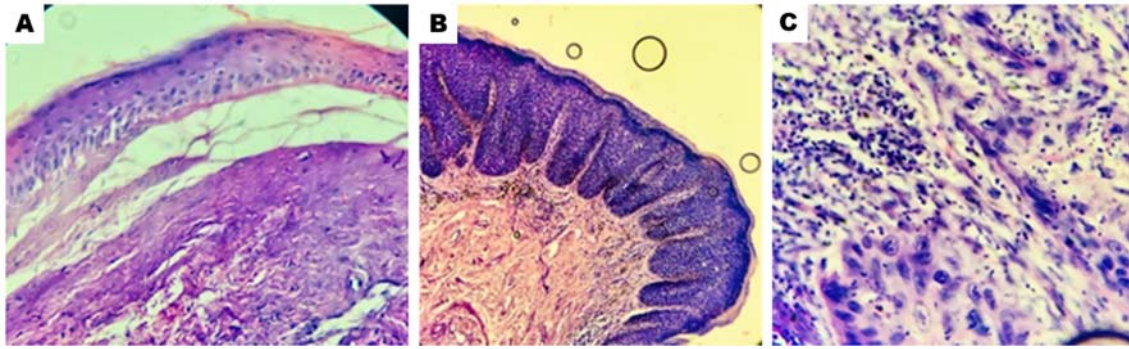


Figura 2 - Histologia de líquen escleroso (A: atrofia do epitélio, vacuolização da camada basal e homogeneização da derme); neoplasia intraepitelial vulvar grau 3 (B: espessamento e perda da arquitetura da epiderme, com aspecto basaloide); e carcinoma de células escamosas (C: blocos irregulares de células escamosas atípicas de permeio a fibrose e infiltrado inflamatório crônico).

1.1.4 Pele, matriz extracelular e colágeno

A pele exerce, dentre outras, função protetora contra agentes agressores mecânicos, principalmente pela ação adaptável das fibras do colágeno (COL), elásticas, e da camada adiposa da hipoderme, que respondem com resistência e flexibilidade (Sodré et al. 2006). O intervalo entre a epiderme e derme é chamado de *junção dermo-epidérmica*, onde a MB separa e sustenta o epitélio do mesênquima.

A pele, assim como outros órgãos do corpo feminino, no período de pós-menopausa, passa por um processo progressivo de atrofia com presença de áreas ressecadas, perda de elasticidade e fragilização. Em decorrência da diminuição da produção do COL e elastina, a matriz extracelular (MEC) reduz sua espessura e elasticidade, resultando numa pele mais susceptível a traumas (Raine-Fenning et al. 2013). Observou-se que a espessura da pele sofre uma redução anual em torno de 1,13% por ano após a menopausa, e o conteúdo do COL reduz 2,1%. A pele humana contém em torno de 40% de todo COL presente em nosso corpo, sendo o COL do tipo I o mais frequente nesse órgão, seguido pelo COL tipo III. Estes, juntamente com outras proteínas da MEC, promovem uma estrutura fibrilar que confere à pele força e resistência (Calleja-Agius et al. 2013).

A MEC é uma estrutura que contorna as células dos tecidos, preenchendo os espaços entre elas e fornecendo sustentabilidade estrutural. Assim, possibilita a realização de processos biológicos, como a migração, proliferação e a diferenciação das células adjacentes, que são de grande importância para a sobrevivência celular. Sua presença promove a coesão e formação de agrupamentos celulares, possibilitando o desempenho, nos tecidos e órgãos, de suas funções. Sendo uma estrutura constantemente submetida à remodelação controlada, as mudanças em seu conteúdo são mediadas pelas metaloproteínas. O descontrole deste sistema promove alterações

estruturais que contribuem para o desenvolvimento de patologias. Os principais componentes da MEC são as proteínas fibrosas (COL e elastina), proteoglicanos e glicoproteínas estruturais, como a fibronectina e a laminina (Muiznieks e Keely 2013; Bonnans et al. 2014).

Nos últimos anos, as pesquisas desenvolvidas para o melhor entendimento do desenvolvimento do câncer tiveram como um de seus focos a remodelação da MEC, mais especificamente nas fibras do COL. As fibras do COL são o principal e mais numeroso componente da MEC, cuja importância se reflete na manutenção estrutural de tecidos e órgãos (Levental et al. 2009; Malik et al. 2015). Devido à importância do COL, vários métodos são usados para avaliação das suas fibras, como colorações histopatológicas (trícromo de Masson, vermelho de Picrossirius), imunistoquímica e, mais recentemente, destaca-se o método de microscopia por *Second Harmonic Generation* (SHG).

O COL é uma proteína fibrosa, presente em maior quantidade no corpo dos animais vertebrados (30%). Promove alta resistência do tecido à deformidade e ruptura, estando envolvido na formação de redes supramoleculares. Secretado pelos fibroblastos da MEC, faz parte de uma grande família, composta, até o momento, por 28 tipos de COLs, nem todos encontrados na MEC (Ricard-Blum 2011; Grässel e Bauer 2013).

Grande parte da estrutura do COL (96% do tipo I e menos de 10% do tipo XII) é composta por três cadeias polipeptídicas formadas por aminoácidos em forma de hélice, característica da família do COL. Levando em conta a sua estrutura molecular e supramolecular, a família do COL é caracterizada por três subgrupos: COL fibrilar, COL não fibrilar e COL fibrilar associado. O COL *fibrilar* tem uma maior presença na MEC e o *não fibrilar* é encontrado na MB; o associado apresenta interrupções na formação da tripla hélice. A MB tem na sua composição o predomínio do COL tipo IV (não fibrilar), que promove importante função de adesão celular, migração e crescimento (Tanjore e Kalluri 2006; Raglow e Thomas 2015).

Os COLs que contribuem na formação e manutenção da integridade da MB dos tecidos são alvos de interesse dos pesquisadores, visto que, na presença de um câncer invasor, a barreira fornecida pela MB é rompida, liberando as células neoplásicas para o tecido conjuntivo, favorecendo as metástases. No LE, foi observada uma homogeneização e, em geral, redução do COL tipos I, III e V, quando comparado com uma pele vulvar normal (Farrell et al. 2001; Godoy et al. 2015). Já o COL VII teve sua presença detectada com predominância no câncer escamoso invasor do pulmão, cabeça e pescoço, vulva e vagina, onde seu aumento associou-se à progressão da doença (Wetzels et al. 1991). O COL IV tem sua expressão diminuída no câncer colorretal (Tanjore e Kalluri 2006).

O COL é um componente de grande importância no microambiente tumoral. À medida que o câncer progride, a quantidade e organização COL é modificada, promovendo a sinalização para as células tumorais e modulando suas funções. As mutações genéticas são a principal causa da interferência promovida pelas células do câncer nos componentes da MEC. Os principais genes que sofre mutações são os supressores de tumores e os proto-oncogenes que agem na MEC alterando o COL. Dentro do microambiente tumoral vamos encontrar, além das células do câncer, células imunes, vasculares e os fibroblastos associados ao câncer (em inglês, *cancer-associated fibroblasts*; CAFs) que foram modificados na MEC, em grande parte por ocitocinas provenientes do câncer (Eble e Niland 2019; Xu et al. 2019).

Em condições de normalidade, a resposta do corpo a uma injúria estimula uma reação de reparação, com cicatrização e fibrose, orquestrada por uma “matrix provisória”. Com o surgimento do câncer a “matrix provisória” pode fornecer instruções para células residentes e invasoras do estroma a promover, através dos fibroblastos, aumento de matriz colágena, semelhante à resposta a uma injúria, ativando um estado de reparo. Após a agressão é formado o trombo hemostático com a rede de fibrina, as plaquetas liberam fatores de crescimento que ativam os CAFs substituindo a matriz de fibrina por uma matriz de COL. Dentro do microambiente tumoral os fibroblastos (CAFs) deliberam a reação de fibrose e desmoplasia. (Yamauchi et al. 2018; Eble e Niland 2019).

O termo desmoplasia tem sido utilizado por patologista para descrever crescimento excessivo de tecido fibroso encontrado no câncer, decorrente de aumento da produção de proteína e do colágeno na MEC. Esse tecido fibroso pode apresentar modificações no estroma tumoral, desde uma MEC exuberante, pobre em células, mas rica em colágeno a uma MEC com pouca matriz, mas com muitas células (Declerck 2012; Yamauchi et al. 2018).

Os patologistas reconhecem há tempos a importância da fibrose nas adjacências dos tumores e determinam o grau de fibrose, através de avaliações principalmente subjetivas, para indicar o prognóstico do tumor, ao lado de parâmetros como a diferenciação histológica, citológica, presença de metástases vasculares, invasão perineural etc.

As células do câncer interagem através de sinalizações com a MEC, principalmente com o COL, modulando a adesão intercelular, promovendo o crescimento, a migração e a metástase (Yamauchi et al. 2018; Eble e Niland 2019).

Akgül et al. (2005), em trabalhos com cultura celular de fibroblastos da derme humana e queratócitos estimulados pela proteína E7-HPV8, observaram aumento de proliferação e diferenciação celular, adquirindo a capacidade de migrar e invadir a MB íntegra, na presença

dos COLs IV e VII, através do aumento da presença das metaloproteinases, o que sugere o potencial de invasão das células modificadas pelo HPV.

No estudo do COL, a microscopia por SHG surge como um método de escolha pela sua alta sensibilidade e especificidade, em relação às colorações tradicionais citadas anteriormente. É um método de microscopia óptica não linear que capta imagens em tecidos biológicos com estruturas anisotrópicas polarizadas, como o COL ((Franken et al. 1961; Cox e Kable 2006).

1.2 **SECOND HARMONIC GENERATION (SHG)**

A construção pioneira do laser de rubi pulsado, produtor da luz vermelha profunda, realizada por Theodore Harold Maiman no ano de 1960, possibilitou a produção de intensos pulsos ultravioletas identificados como harmônicos ópticos, ou seja, o segundo harmônico. O SHG é resultado da projeção de um intenso feixe de luz através de um quartzo cristalino, que, atingindo uma molécula não centrossimétrica, resulta em um campo elétrico oscilante com o dobro da frequência inicial e metade do comprimento de onda (Franken et al. 1961; Cox e Kable 2006). A microscopia usando o SHG foi utilizada pela primeira vez, em 1974, por Hellwarth e Christiansen, e aprimorada por Gannaway e Sheppard em 1978, que utilizaram o microscópio óptico harmônico de varredura. Neste aparelho, o objeto de estudo é digitalizado através de um ponto focalizado por laser; no entanto, ele promovia danos às amostras biológicas. Foi, então, necessária a construção de *lasers* pulsados para viabilizar a técnica da microscopia de SHG (Cox e Kable 2006).

Todo material biológico que tenha moléculas não centrossimétricas e uma MEC cristalina estará apto para ser analisado através da microscopia por SHG. O COL, por ter uma estrutura molecular incomum, com sua assimetria, e por se encontrar numa matriz altamente cristalina, é a molécula ideal para o estudo no SHG, principalmente quando se refere ao COL tipo I (Cox e Kable 2006). A SHG é um processo óptico não linear, cujos fótons que têm a mesma frequência interagem com um material não linear, gerando novos fótons, agora, com o dobro da energia inicial e metade do comprimento de onda dos fótons iniciais. A microscopia por SHG é um método não invasivo e tem alta resolução e especificidade para o estudo das fibras do COL (Franken et al. 1961; Cox e Kable 2003).

No estudo das fibras do COL, na rotina do laboratório de histologia, alguns métodos podem ser utilizados, como os corantes tricromo de Masson, pentacromio de Movat, vermelho picrossirius, além da detecção com anticorpos (métodos imuno- histoquímicos), polarização em campo largo e o SHG (Drifka et al. 2016).

Outros métodos de imagens apresentam limitações, seja devido à dificuldade para avaliar a organização do COL, como na Tomografia de Coerência Óptica (OCT, do inglês *optical coherence tomography*), ou devido à visão limitada do campo visual, como observado na Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura e na Microscopia de Força Atômica. Dos métodos de imagem, o SHG é atualmente o mais específico para avaliação do COL (Drifka et al. 2016). No decorrer dos últimos anos, pudemos constatar a importância do uso da microscopia de SHG para avaliação do COL em vários estudos, principalmente nos ligados ao câncer de várias origens (Keikhosravi et al. 2014; Natal et al. 2019).

1.3 JUSTIFICATIVA

O câncer vulvar é infrequente e, por isso, relativamente pouco estudado. Nos últimos anos foi observado um aumento da incidência por faixa etária, principalmente entre as mulheres mais jovens. O reconhecimento da existência de duas vias distintas na etiopatogênese do câncer vulvar (a do HPV e a do líquen escleroso) e a importância da matriz extracelular na fisiopatologia do câncer produziu um novo estímulo para os pesquisadores.

A microscopia SHG é um método relativamente novo, que tem sido utilizado no estudo do COL em vários tipos de neoplasias, mas não foi aplicado em câncer de vulva. Este método é não invasivo, rápido para aquisição da imagem (60 segundos), não implica em nenhuma nova intervenção com o paciente, tem alta resolução e especificidade para o estudo das fibras do COL, e utiliza o mesmo bloco de parafina com tecido fixado em formalina tamponada que serve para o diagnóstico histopatológico.

A maior incidência do câncer vulvar em regiões economicamente menos favorecidas de nosso país justifica o empenho em desenvolver estudos direcionados a adquirir um melhor conhecimento do processo oncogênico do câncer vulvar, com a finalidade de avaliar novos biomarcadores destinados à sua prevenção ou para, no futuro, obter novas opções de tratamento.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente o comportamento dos parâmetros de quantidade, organização e uniformidade do COL em áreas intratumorais do CCE de vulva com os de suas lesões precursoras e de áreas morfológicamente sadias, usando o método de microscopia de SHG, bem como verificar se há impacto destes parâmetros com dados clinicopatológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a quantidade, organização e uniformidade do COL na MEC tumoral entre as áreas com CCE de vulva e as áreas histologicamente livres de neoplasia das mesmas pacientes;
- Comparar a quantidade, organização e uniformidade do COL na MEC tumoral entre as áreas com NIV e as áreas mais distantes, próximo à borda do corte cirurgico, sem alterações histológicas das mesmas pacientes;
- Comparar os valores obtidos nos parâmetros do COL entre os casos de CCE de vulva e NIV;
- Avaliar o impacto desses parâmetros do COL com achados clinicopatológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo longitudinal e retrospectivo.

3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes: foram incluídas 52 pacientes, com idade acima dos 18 anos, sendo 40 pacientes com CCE de vulva e 12 com lesões precursoras (dois pacientes com NIV2 e 10 com NIV3).

Controle de comparação: foram utilizados para comparação os mesmos espécimes de tecido onde se avaliou o COL adjacente às lesões pré-neoplásicas e carcinoma, tomando-se áreas de derme onde não houvesse alterações histológicas no epitélio (áreas histologicamente livres de NIV ou CCE).

3.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório Multiusuários do Instituto de Física “Gleb Wataghin” (UNICAMP, Campinas, SP) entre outubro de 2016 e agosto de 2019. Foi realizado o levantamento dos prontuários e dos blocos parafinados das biópsias ou peças cirúrgicas das pacientes diagnosticadas com CCE de vulva e NIV atendidas no HCP entre 2000 a 2010. As análises dos parâmetros das fibras do COL, como quantificação, uniformidade e organização, foram realizadas no Laboratório de Física da Unicamp.

3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.4.1 Critérios de inclusão

Para inclusão no estudo, foram selecionados indivíduos na faixa etária acima dos 18 anos, com diagnóstico de CCE de vulva e de NIV atendidas no HCP entre 2000 e 2010.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas mulheres cujas amostras biológicas não foram encontradas ou eram inadequadas para as análises.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) do HCP, sob número de CAAE: 50720115.9.0000.5205, seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. A aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) individualizada foi dispensada pelo CEP do HCP, por se tratar de estudo retrospectivo no período de 2000 a 2010, o qual não implicaria em nenhuma nova intervenção com o paciente, nem dano aos seus direitos de privacidade, tratamento e acesso ao seu material biológico (blocos de parafina).

3.6 CAPTAÇÃO DOS TECIDOS DAS PACIENTES E PROCESSAMENTO DOS DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos obtidos dos prontuários das pacientes com CCE de vulva e NIV incluíram: idade, topografia da neoplasia e presença de metástases. As metástases foram avaliadas em peças cirúrgicas em sete casos, todas em linfonodos e destas, três pacientes foram submetidas à terapia adjuvante de radioterapia. Amostras obtidas por biopsia foram 33 e de peças cirúrgicas 19. A maioria dos tumores tinha uma grande extensão (ao redor de 9,5 cm).

Os blocos de tecido fixados em formalina e incluídos em parafina das pacientes foram submetidos à corte e coloração com H&E para caracterização do COL no microscópio por SHG. A seguir, apresentamos o fluxograma para inclusão dos pacientes (Figura 3).

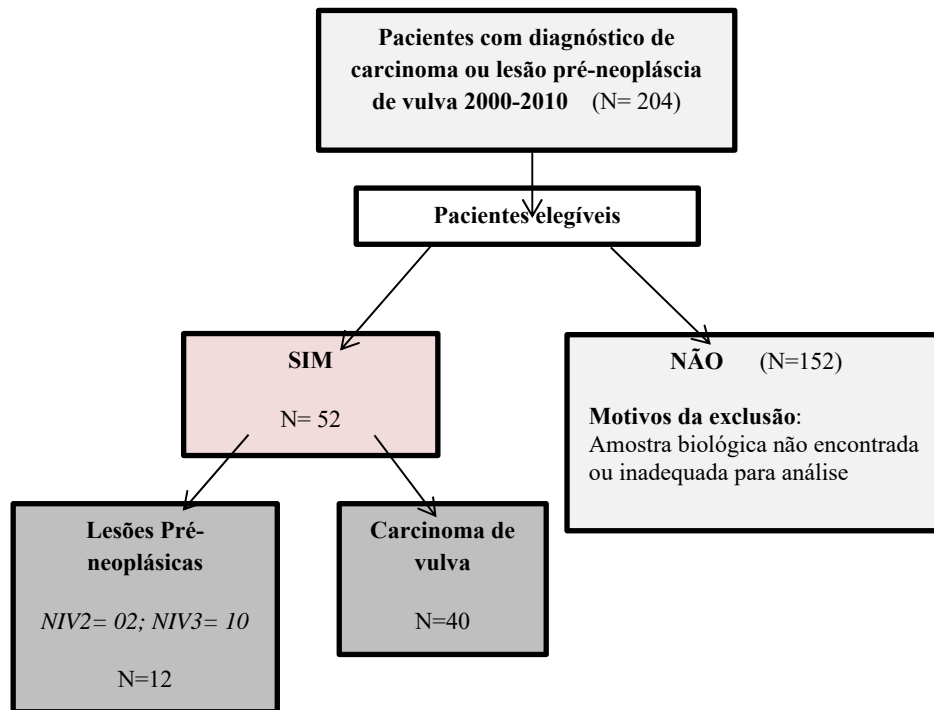


Figura 3 - Fluxograma para inclusão dos pacientes.

3.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Foram realizadas lâminas de 4 micrômetros de espessura, coradas com H&E. O patologista procedeu à confirmação diagnóstica, seguindo o modelo padrão para diagnóstico em vulvectomias do HCP (Anexo 5), e realizou as marcações das regiões onde seriam feitas as análises das fibras do COL nos tecidos diagnosticados como NIV e CCE da vulva.

As áreas de interesse para análise do COL correspondiam ao estroma interno ao carcinoma, com agregados de células neoplásicas incluindo o tecido fibroso a ser analisado (áreas intratumorais). As áreas avaliadas para NIV correspondiam ao estroma adjacentes ao epitélio com atipias celulares. As áreas avaliadas como controle correspondiam ao estroma adjacente ao epitélio histologicamente normal, sem atipias ou indícios de neoplasia. De cada uma dessas áreas foram obtidas três imagens coradas com H&E, que foram submetidas à análise por microscopia SHG. Um único caso correspondente a biopsia de vulva, na qual o diagnóstico havia sido de lesão reativa, sem indícios de atipias foi utilizado para servir de controle normal (caso não computado entre os 52 descritos acima).

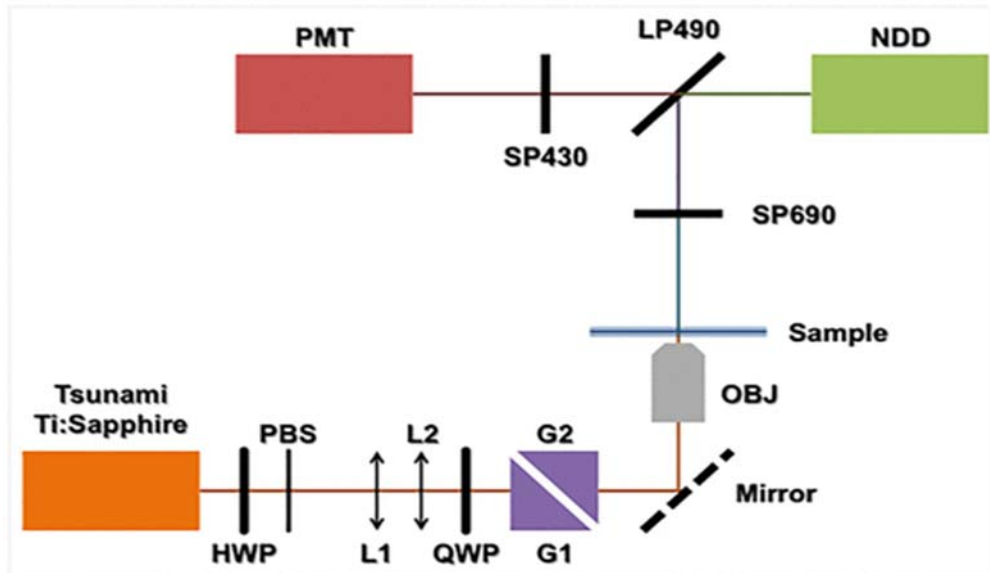
3.8 ANÁLISES DO COLÁGENO POR *SECOND-HARMONIC GENERATION* (SHG)

As áreas selecionadas para avaliação do COL foram examinadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, SP (INFABIC, Unicamp). A microscopia SHG foi realizada em um sistema confocal Zeiss LSM 780-NLO (Carl Zeiss AG, Göttingen, Alemanha), usando uma objetiva com óleo de imersão 40x/1.3 Na EC Plan-Neofluar. A abertura numérica mais alta (1.3) foi necessária para permitir uma resolução espacial adequada para observação das fibrilas. O comprimento de onda de excitação de 780nm, com pulso de aproximadamente 100-fs, em uma taxa de repetição de 80-MHz, foi fornecido por um Tsunami Ti:Sapphire laser (Spectra-Physics, Irvine, CA, USA). O poder do laser nas lentes objetivas incidentes sobre o tecido foi de aproximadamente 80 mW, com polarização circular. O tempo de aquisição de cada imagem foi de cerca de 60 segundos.

Apenas foi coletado o sinal transmitido aproximadamente em 390 nm, com lente condensadora 0.55 NA – WD 26 mm. Um filtro *short-pass* SP690 (Omega Filters, Brattleboro, VT, USA) foi usado para filtrar o sinal excitação a 780 nm (Chen et al. 2009); este foi seguido por um filtro cúbico com *long-pass* LP490, a 45°, para evitar TPEF (*two photons excited fluorescence*), e um *short-pass* SP430, a 90°, para filtrar apenas o sinal SHG. Dois detectores foram usados para capturar os sinais TPEF e SHG: o detector PMT (*photomultiply tube detector*) e o NDD (*non-descanned detector*), respectivamente. Destes, apenas o sinal SHG foi considerado para o presente estudo. O esquema do sistema de raios, lentes e filtros aqui descrito está sumarizado na Figura 3 abaixo. A análise espectral de emissão entre 350-430 nm mostrou que apenas um estreito pico a 390 nm, consistente com sinal SHG, foi visto. O sinal *two photons excited fluorescence* (TPEF), dado predominantemente pela eosina, também pode ser detectado, mas na faixa de 530nm (Figura 3).

Foi usado o mesmo procedimento descrito por Burke et al. (2013), levando em consideração alinhamentos ópticos diários, realizados através da obtenção de um fator de normalização, que consistiu na imagem SHG de um espécime-padrão (corte histológico de aorta humana) no início de cada experimento. O campo de visão desta objetiva foi de 212 x 212 µm, mas, para evitar as margens da figura nas quais a intensidade do SHG é mais fraca, usamos um zoom para selecionar a área central de 177 x 177 µm, que se mostrava mais homogênea. Para eliminar sinais de fundo, um observador “cego” ao projeto, formado em física, sem treinamento

médico, aplicou um limiar comum a todas as imagens, comparando-as todas com a amostra-controle de aorta humana. Depois deste procedimento, todos os sinais de fundo não relacionados ao COL foram eliminados.



Fonte: Natal et al. 2018.

Figura 4 - Esquema do sistema de raios, lentes e filtros para análise do colágeno no microscópio *Second Harmonic Generation* (SHG): Emissão de raio laser titanium: sapphire de 80-MHz é defletido por um espelho colocado a 45°; o raio atravessa o corte de tecido nas regiões de interesse específicas (ROI, regions of interest) escolhidas pelos patologistas; uma pequena quantidade de laser (L) mais o SHG e o TPEF (*two photons excited fluorescence*) são direcionados para um filtro *short pass* 690nm (SP690), eliminando os sinais L. Sinais TPEF+SHG atravessam por um segundo filtro, *long pass* 490nm (LP490), para separar a TPEF para um tubo detector fotomultiplicador (PMD, *photomultiplied tube detector*); um terceiro filtro, *short pass* 430 (SP430), purifica o sinal SHG, que é detectado em um detector NDD (*non-descanned detector*). Outras siglas no esquema: HWP: *half-wave plate*; PBS: *polarizing beam splitter*; L1 e L2: lentes convergentes; QWP: *quarter-wave plate*; G1 e G2: lentes de Gauss; OBJ: lentes objetivas.

3.8.1 Avaliação das fibras de colágeno (COL)

Os sinais SHG foram estratificados em relação à organização e estrutura do COL no estroma, usando métodos de análise de padrões de imagem. A análise quantitativa de parâmetros do COL foi feita sobre as imagens SHG usando-se os programas ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) e OrientationJ plug-in (Rezakhaniha et al. 2012). Nove áreas representativas (150x150 pixels) foram selecionadas aleatoriamente de cada imagem para avaliação, como se segue, em relação à quantidade, uniformidade e organização do COL.

A quantidade foi determinada pela soma total das intensidades de sinais SHG dos 1024x1024 pixels, que foi diretamente associada à quantidade de moléculas de COL. Estes valores foram obtidos usando-se a densidade integrada do programa Image J. Usando o Orientation J plug-in, de acordo com o descrito previamente (Rezakhaniha et al. 2012), calculamos a uniformidade (energia) e organização (coerência). A uniformidade (energia) reflete a densidade de fibras de COL, isto é, o quanto as fibras estão mais distantes entre si (valores mais baixos) ou mais próximas (valores mais altos). A organização (coerência) reflete a direção espacial das fibras de COL, sendo que os valores vão de 0 (áreas completamente isotrópicas, com zero direcionalidade) até 1 (fibras altamente orientadas). Do ponto de vista das definições matemáticas, estes parâmetros devem ter correlação entre si. A relação entre os parâmetros do COL em áreas intratumorais vulvares, no tecido adjacente normal e na NIV, foi adicionada ao cálculo.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (mediana). Por se tratar de uma grandeza quadrática, os valores de quantidade e uniformidade foram log-transformados na base; e, quanto à organização, esse processo não se faz necessário, uma vez que é um valor independente de intensidade do sinal (Rezakhaniha et al. 2012). O teste Shapiro Wilk foi utilizado para avaliação de normalidade. Foi utilizado teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras de distribuição não normal. A análise dos dados foi realizada pelo programa *GraphPad Prism v 6.0* (GraphPad Software, San Diego, CA). Para todas as análises, foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados da tese foram apresentados na forma de artigo publicado on line em 27/03/2020 (Anexos 3 e 4). A formatação do texto do artigo foi realizada conforme orientações da revista.

4.1 ARTIGO PUBLICADO

Tipo: Original paper

Título: Study on collagen parameters in vulvar cancer and preneoplastic lesions by Second Harmonic Generation microscopy

Autores: Maria das Graças de Fátima Cavalcanti Castor, Leuridan Cavalcante Torres, Roberto José Vieira de Mello, Rodrigo de Andrade Natal, José Vassallo

Revista: *Scientific Reports-Nature* (ISSN: 2045-2322)

Fator de impacto: 4.122 (2018)

Qualis (Medicina I): A1

Study on collagen parameters in vulvar cancer and preneoplastic lesions by Second Harmonic Generation microscopy.

Maria das Graças de Fátima Cavalcanti Castor¹⁺, Leuridan Cavalcante Torres^{1,2*}, Roberto José Vieira de Mello³, Rodrigo de Andrade Natal⁴⁺, José Vassallo^{4,5}

+ These authors contributed equally to this work.

¹Division of Pelvis, Hospital de Cancer de Pernambuco, Recife, Brazil

²Translational Research Laboratory C. A. Hart, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, PE, Brazil;

³Division of Anatomic Pathology, Hospital de Cancer de Pernambuco, Recife, Brazil

⁴Laboratory of Investigative Pathology, CIPED, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

⁵Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:**

Leuridan Cavalcante Torres

Hospital de Cancer de Pernambuco, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Research Department, Recife (PE), ZIP Code 50070-550 Brazil. E-mail: *leuridan.torres@gmail.com; *leuridan.torres@imip.org.br

ABSTRACT

The extracellular matrix (ECM) plays an important role in cellular balance, and collagen fibers are its most important component. Over the last few years, second harmonic generation (SHG) microscopy has been used for the analysis of collagen fibers in several types of gynaecological cancers, such as breast and ovarian cancer. The value of collagen parameters obtained with this technique to gain insights on the physiopathology and on the prognostic evaluation of cancer has been advocated. Herein, we have characterized the collagen fibers in vulvar cancer and preneoplastic lesions using the SHG microscopy. Collagen parameters, quantity, organization, and uniformity, of stroma adjacent to neoplastic or preneoplastic lesions were compared with values obtained in normal appearing tissue distant from those lesions from the same patients. There was an evident decrease in the values of collagen fiber parameters in the stroma associated to tumors. Increased quantity and uniformity of tumor associated collagen fibers were associated with the presence of lymph node metastases, which suggest a prognostic value of such parameters in the evaluation of vulvar cancer.

Key words: Vulvar carcinoma; intraepithelial vulvar neoplasia, tumor associated extracellular matrix, collagen, second harmonic generation microscopy.

1 INTRODUCTION

Vulvar cancer is the fourth leading gynaecological cancer worldwide¹, following uterine corpus, ovarian, and cervical cancer. It represents only about 5% of all tumors of the lower genital tract^{1,2} and is thus considered a rare cancer. Among the different histological types of vulvar cancer, squamous cell carcinoma (VSCC) is the most common type (95%), followed by melanoma (<5%), sarcoma (1–2%), and basal-cell carcinoma (2%). VSCC has two mechanisms of development, which arise via preneoplastic lesions called vulvar intraepithelial neoplasia (VIN): 1) infection with the human papillomavirus (HPV), which affects younger women (<50 years), and 2) HPV-independent development (approximately 80%), which appears after menopause (50–80 years) and originates from lichen sclerosis^{3–6}.

VIN is graded in a similar way as cervical intraepithelial neoplasia (CIN): VIN 1, VIN 2, or VIN 3. In VIN 1, atypical cells are limited to the lower third of the vulvar squamous epithelium; in VIN 2, atypical cells compromise the deeper two thirds of the epithelium; and in VIN 3, atypical cells affect the entire squamous epithelium. In all three grades, the basal membrane remains intact, i. e., the lesions are not invasive. VIN 1 is not considered a precursor of vulvar cancer, as it has low malignant potential and low probability of evolving into VIN 2 and VIN 3. These last two grades instead are considered high-grade lesions with real risk to transform into malignancy^{7,8}.

Over the last few years, studies on cancer development have focused on the role of remodeling of the extracellular matrix (ECM), more specifically on collagen fibers (COL), to tumor progression. COL are major components of the ECM and are important for the maintenance of tissue and organ structure and integrity^{9, 10}. However, its role surpasses the structural aspect, and it is considered to influence tumor invasiveness and metastasizing^{9,10}.

The study of COL in histology laboratories goes from the traditional stains, such as Masson's trichrome, Movat pentachrome, and picrosirius red staining, to the more specific detection methods, as immunohistochemistry, the wide-field-of-view polarization, and the second harmonic generation (SHG) imaging. The SHG has been increasingly being used to study COL, due to its high sensitivity and specificity. It is a quantitative nonlinear optical microscopy technique that captures images from biological tissues having polarized anisotropic structures, such as COL^{11, 12}.

The association of increased COL expression in vulvar carcinoma and higher tumor aggressiveness has been recently reported, but the evaluation of COL was made using the picrosirius staining¹³. In the present study, SHG images were used to determine the quantity, uniformity, and organization of COL in vulvar cancer and its preneoplastic lesions. It is intended to determine the clinical value of COL evaluation by this method, not previously reported in vulvar neoplasia.

2 RESULTS

2.1 COLLAGEN FIBER PARAMETERS IN VSCC

We made the OrientationJ plug-in and an ImageJ for angle analysis the orientation, energy, and coherency maps, hue-saturation-brightness (HSB) color-coded map and orientation histogram in normal tissue of healthy control (individual without VSCC or VIN), VIN grade 3 adjacent skin of VSCC and VSCC. Images show the number of collagen fibers arranged at

different angles and tissues. It is observed that normal tissue of healthy control presents the better organization of collagen fibers, demonstrated by the peak between angles 60° and 90° (Figure 1). In vulvar squamous cell carcinoma shows peaks in the number of collagen fibers at various angles (Figure 2). Adjacent skin of VSCC is the one with the highest amount of collagen fibers (Figure 3). It is observed peaks in the number of collagen fibers at various angles in VSCC, showing that the region presents an absence of collagen fibers organization (Figure 4).

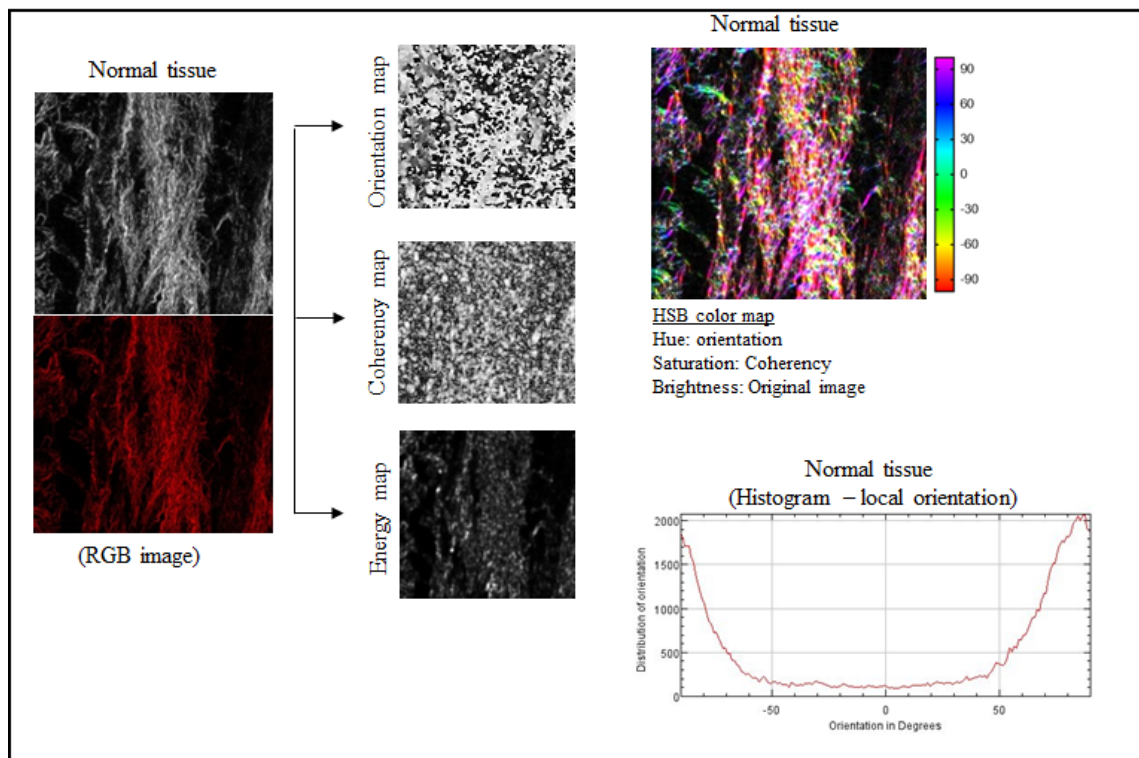


Figure 1. Results of the OrientationJ, the imageJ plug-in developed to get the histogram of local angles, the orientation, energy and coherency maps of an image and the HSB color-coded map of Normal tissue of healthy control.

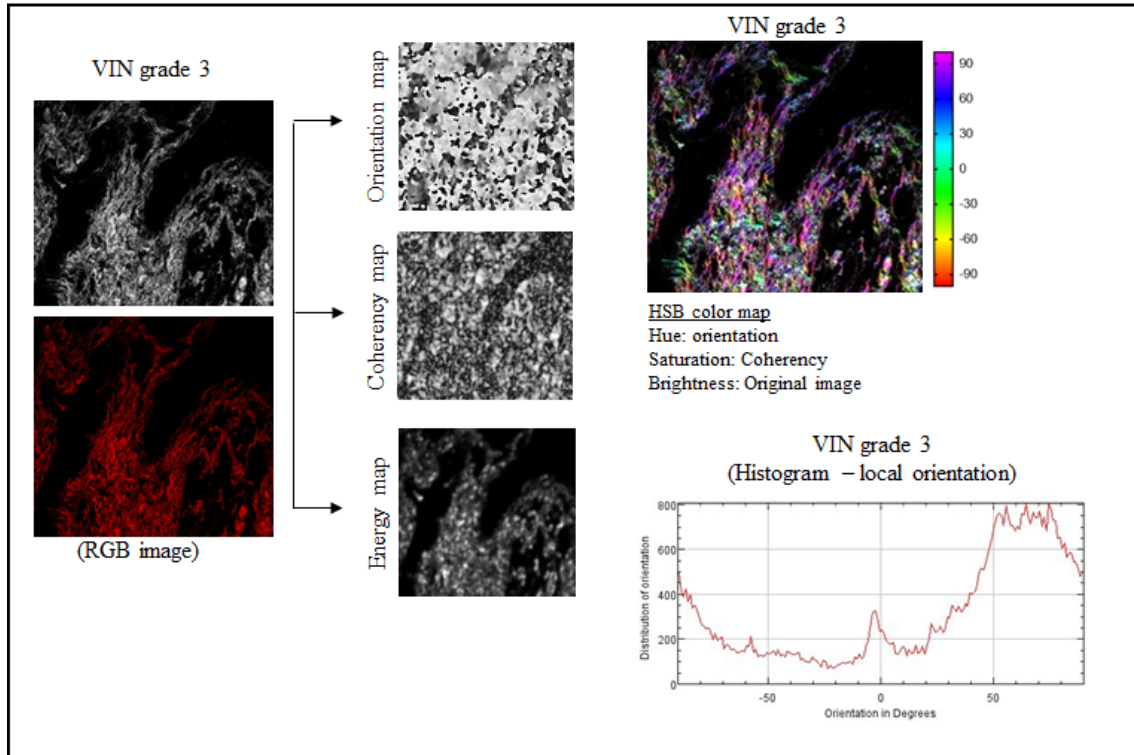


Figure 2. Results of the OrientationJ, the imageJ plug-in developed to get the histogram of local angles, the orientation, energy and coherency maps of an image and the HSB color-coded map of VIN grade 3.

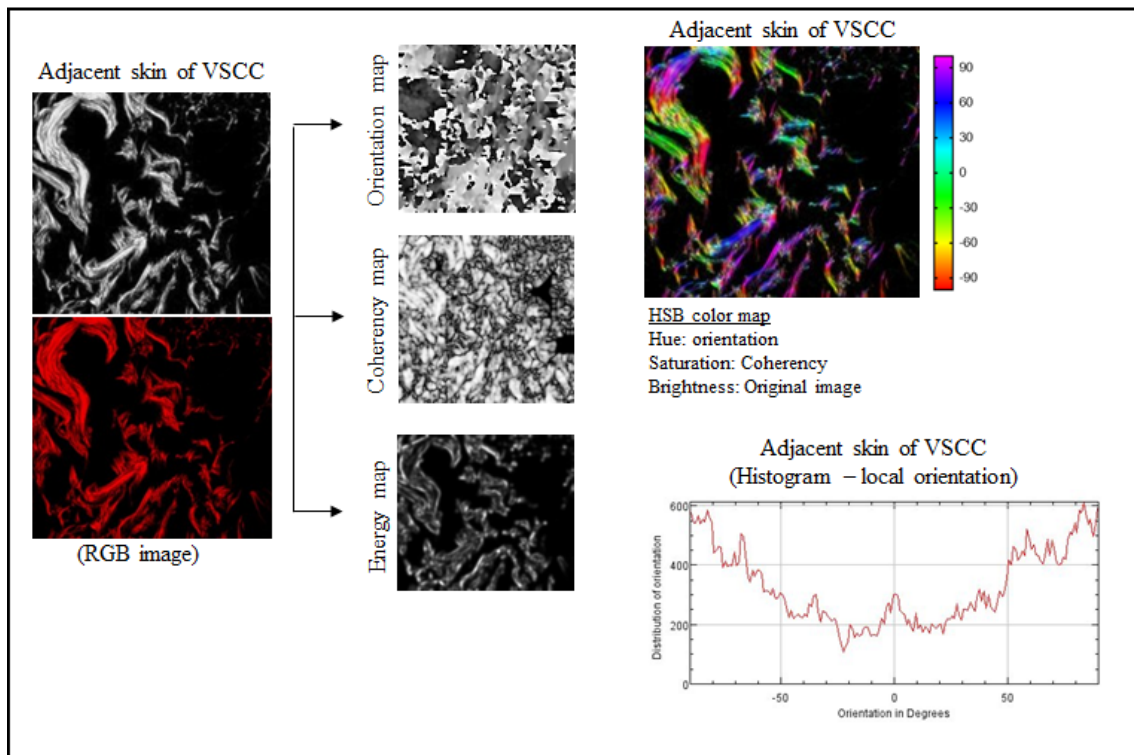


Figure 3. Results of the OrientationJ, the imageJ plug-in developed to get the histogram of local angles, the orientation, energy and coherency maps of an image and the HSB color-coded map of adjacent skin of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC).

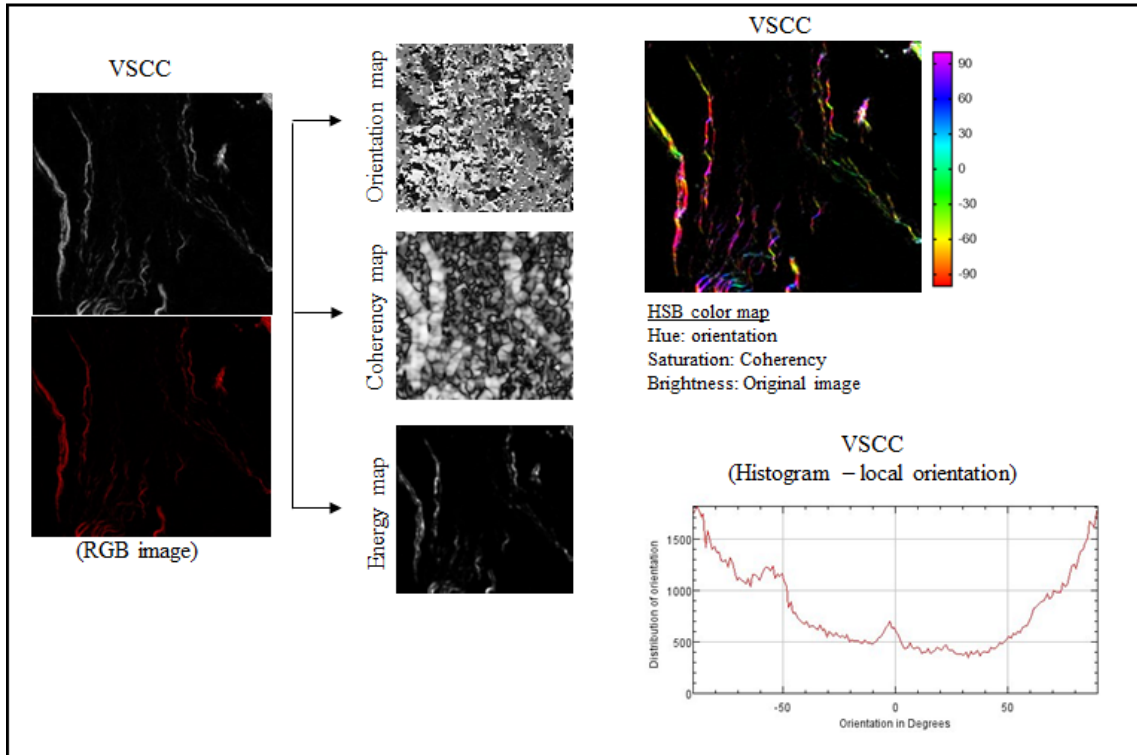


Figure 4. Results of the OrientationJ, the imageJ plug-in developed to get the histogram of local angles, the orientation, energy and coherency maps of an image and the HSB color-coded map of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC).

Collagen parameters were significantly higher in patients with distant metastatic ($p < 0.05$) (Figure 5). Analysis of the collagen revealed decreased quantity, uniformity, and organization of COL in intratumoral area than compared to and adjacent skin of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC; $p < 0.05$; Table 1).

According to the tumoral topography (labia minora, labia majora, and both), quantity, uniformity, and organization of collagen parameters of labia minora were decrease when compared labia majora ($p = 0.008$, $p = 0.01$, and $p = 0.005$, respectively) (Table 1). Collagen expression was increased in intratumoral of labia minora and majora when compared to adjacent skin of VSCC ($p < 0.05$; Table 2).

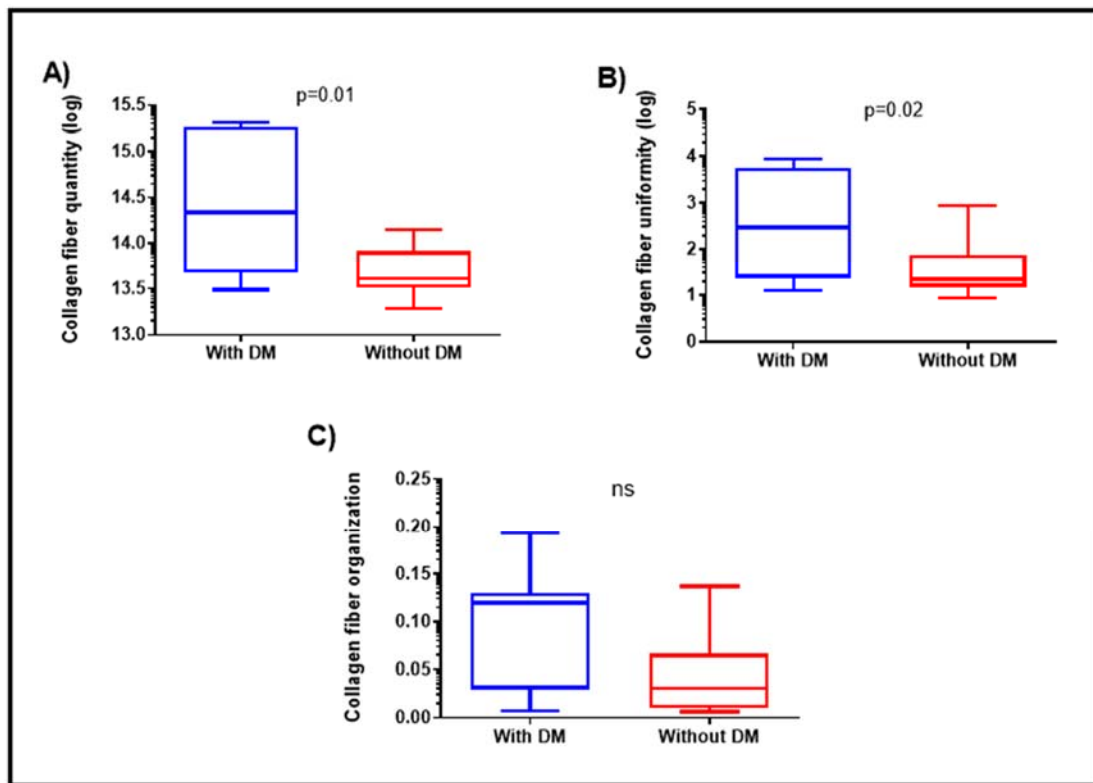


Figure 5: Comparative analysis of collagen parameters in vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) in patients with distant metastatic (DM) and without DM: A) Collagen Fiber quantity, B) Collagen Fiber uniformity and C) Collagen Fiber organization. NS: non-significant

Table 1: Collagen fibers parameters of intratumoral area and adjacent skin of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC), and according to the tumoral topography

Parameters	VSCC			Topography			P-value**
	Intratumoral	adjacent skin	P-value*	Labia minora	Labia majora	Both labia	
	Median (IQR)	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
Quantity	13.90 (13.55-15.10)	16.10 (15.73-16.48)	<0.0001	13.53 (13.4-13.8)	14.43 (13.7-15.3)	14.13 (13.6-15.9)	0.008
Uniformity	1.90 (1.25-3.60)	4.61 (4.01-5.28)	<0.0001	1.22 (1.09-1.70)	2.55 (1.42-3.68)	2.32 (1.30-4.21)	0.011
Organization	0.064 (0.014-0.17)	0.21 (0.11- 0.24)	0.03	0.02 (0.003-0.06)	0.10 (0.02-0.19)	0.05 (0.02-0.10)	0.005

IQR: interquartile; *Mann Whitney test; **Kruskal-Wallis test

Table 2: Collagen fibers parameters of intratumoral area and adjacent skin of vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) according to the tumoral topography

Parameters	VSCC		P-value*	VSCC		P-value*
	Labia minora			Labia majora		
	Intratumoral	adjacent skin		Intratumoral	adjacent skin	
	Median (IQR)	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	
Quantity	13.54 (13.4-14.02)	15.73 (15.6-17.1)	0.001	14.43 (13.6-15.3)	16.7 (16.1-16.4)	<0.0001
Uniformity	1.25 (1.09-1.90)	4.06 (3.94-5.89)	0.0003	2.55 (1.42-3.68)	4.68 (4.55-5.22)	0.0005
Organization	0.033 (0.006-0.054)	0.17 (0.14-0.29)	0.001	0.10 (0.02-0.19)	0.21 (0.20-0.24)	0.004

IQR: interquartile; *Mann Whitney test;

3 DISCUSSION

COL parameters are reduced in VSCC and VIN in comparison to dermis adjacent to neoplasia. However, no significant difference was observed comparing COL parameters between VSCC and VIN patients. Additionally, patients with metastatic VSCC presented higher COL parameters than those without metastases. These findings agree with our previous study on luminal breast cancer, in which intratumoral COL parameters were reduced in comparison to peritumoral areas¹⁴. Similarly, patients with parameters associated with more aggressive disease, presented higher intratumoral COL values¹⁴. Using another method to evaluate COL expression, it was recently found that higher values in VSCC were associated to superior aggressiveness¹².

SHG microscopy has been used over the last few years to analyze COL in several types of cancer, due to its high sensitivity and specificity^{11,12,15}. In our study, we used SHG to study COL in vulvar cancer, which, although considered a rare cancer of elderly women, has been increasing in incidence in younger women over the last few decades¹⁶⁻¹⁸. Studies on breast, head and neck, esophageal, and colorectal cancer using SHG reported that longer and denser COL in the tumor microenvironment was associated with tumor invasion^{9,10}. Others have shown that the presence of tumor invasion was associated with higher COL quantity and uniformity, but lower organization^{19,20}.

When comparing lesions according to the anatomical site, the labia minora showed a decreased quantity, uniformity, and organization of intratumor COL in relation to the labia majora. This difference might be due to the heterogeneous composition of both tissues, one more akin to the mucosa and the other, to the skin.

The incidence of vulvar cancer is highest in elderly, post-menopausal women, in whom decreased estrogen production may be associated with a negative effect on cutaneous turgor, loss of skin elasticity²¹ and reduced immune defences²². It could be hypothesized that the recurrent inflammation due to these predisposing factors might play a role in the development of vulvar cancer. Although the tissues adjacent to our patient's tumors by histological examination were considered tumor-free margins, it was observed that on visualization of images obtained by SHG microscopy, these tissues showed small changes in COL parameters when compared to normal tissue in healthy women. Normal tissue was used for comparative analysis of the normal tissue image adjacent to the tumor by microscopy. We know that the free margin of the tumor is very important for locoregional control of the vulvar tumor, because when compromised, it is usually indicative for performing a re-excision²³. This suggests that

SHG microscopy may be an important methodology for safely distinguishing areas that are tumor-free margins from those with very early precursor lesions.

The present study has some limitations. The number of cases is relatively small, due to the uni-institutional design. However, it represents an infrequent cancer, and encouraging data were obtained on COL quantification in this setting. Another limitation is represented by the fact that the controls used were areas in the same samples, without microscopically detectable neoplasia. There is a potential that finer alterations at the molecular level could have interfered with the results, but a significant difference has been achieved between most parameters from tumor versus non-tumor areas. The use of SHG can be considered a drawback, because of the costs of the equipment and difficulty in managing it. However, it should be acknowledged that this cost has been decreasing over the last few years, what may allow SHG to become included in the diagnostic practice in the near future^{11,12}.

Our findings on vulvar neoplasia add information on COL quantification by SHG microscopy in vulvar carcinoma and corroborate the general results with other tumors studied. They reinforce the notion that COL quantity and distribution play an important role in tumor progression. Further, it is shown herein that alterations in COL are precocious in vulvar carcinogenesis, as the same alterations were found already in VIN.

4 METHODS

4.1 EXPERIMENTAL DESIGN AND PARTICIPANTS

An analytical and retrospective study was performed between 2000 and 2010, after approval by the Human Research Ethics Committee of HCP – Number of Certificate of Presentation for Ethical Appreciation is 50720115.9.0000.5205. The guidelines followed the resolution number 466/12 of the National Health Council of Brazil for involving human participants. **The informed consent was obtained from all subjects.** The study was executed at the Cancer Hospital of Pernambuco (HCP, Pernambuco), and the Multiuser Laboratory of the “Gleb Wataghin” Physics Institute (INFABiC - State University of Campinas - Unicamp, São Paulo). A survey was undertaken on patient records with the diagnoses of VSCC and VIN, between 2000 and 2010. The formalin fixed paraffin embedded tissue blocks from the patients with both diagnoses were retrieved from the archives of the Pathology Department of Hospital de Cancer de Pernambuco, Recife, Brazil.

The study included a total of 52 Brazilian patients older than 18 years, of which 40 patients had been diagnosed with VSCC and 12 with potential precursor lesions (VIN 2 and

VIN 3). Adjacent tissues to the tumor with no neoplastic and/or preneoplastic morphological features were used as controls (17 patients). The metastases considered in the study were all to the lymph nodes, confirmed by histopathology of the surgical specimens (Seven patients). The clinicopathological data were obtained from the patients' files and from the pathological reports, and included age, topography, and presence of metastases (Table. 3). All H&E stained slides were reviewed by the pathologists and the areas of interest were selected for studies using the second harmonic generation microscopy (SHG).

Table 3: Clinical characteristics of patients with vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) and vulvar intraepithelial neoplasia (VIN)

PARAMETERS	VSCC	VIN 2 - 3
	N=40	N=12
	N (%)	N (%)
AGE (years)		
< 60	9 (22.5)	7 (58.3)
≥ 60	31 (77.5)	5 (41.7)
DISTANT METASTASIS (lymph node +)		
Yes	7 (17.5)	0
No	33 (82.5)	12 (100)
LESION LOCATION		
Labia Minora	10 (25)	3 (25.1)
Labia Majora	17 (42.5)	2 (17.7)
Labia Minora/Labia Majora	12 (30.0)	5 (41.7)
Clitoris and pubis	1 (2.5)	2 (16.7)

4.2 SECOND HARMONIC GENERATION (SHG)

Slides stained with H&E were submitted to the identification and selection of collagen (COL) in the stromal areas adjacent to VIN, in intratumoral stroma, and in normal adjacent tissues. In each case, three areas were selected, and these areas were submitted to SHG analyses at the INFABiC – Unicamp¹⁴.

SHG is a nonlinear optical process, in which two photons with the same frequency interact with a nonlinear material and generate a new photon with twice the energy and half the wavelength of the initial photons. Fibrillar collagen has high nonlinear susceptibility, with SHG being the ideal method to evaluate its structure^{12,13}. SHG microscopy was performed on a

confocal microscope Zeiss LSM 780-NLO (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) using a lens with an objective of 40×/1.3 EC Plan-Neofluar with immersion oil. The highest numerical aperture (1.3) was necessary to allow an adequate spatial resolution to observe the fibrils. The excitation wavelength was 780 nm, with a pulse of approximately 100 fs at a repetition frequency of 80 MHz, supplied by a Tsunami Ti:Sapphire laser (Spectra-Physics, Irvine, CA, USA). The objective lens laser power was approximately 80 mW, with circular polarization. The acquisition time for each image was approximately 60s.

Only the SHG forward signal at 390 nm was collected using a condenser lens 0.55 NA – WD 26 mm. A short-pass SP690 (Omega Filters, Brattleboro, VT, USA) was used to filter the excitation wavelength at 780 nm²⁵; this was followed by filtering with long-pass filters LP490 at 45° to avoid two-photon excited fluorescence (TPEF), and SP430 at 90° to filter only the SHG signal. Two detectors were used to capture the TPEF and SHG signals, namely a photomultiplier tube detector (PMT) and non-descanned detector (NDD), respectively. Of these, only the SHG signal was considered for the present study. The emission spectrum analysis between 350 and 430 nm showed only a narrow peak at 390 nm consistent with the SHG signal. The TPEF signal given by eosin could also be detected at 530 nm.

The procedure described by Burke et al²⁵ was used, with daily optical alignments performed by obtaining a normalization factor, which consisted of the SHG image of a standard specimen (i.e., a histological section of human aorta), at the beginning of each experiment. The vision field of this objective was 212 × 212 cm, but to avoid the figure margins in which the SHG intensity was weaker, we used a zoom to select a more homogeneous area of 177 × 177 cm. To eliminate background signals, a “blind” observer, with a degree in physics and without medical training, applied a common threshold to all images, comparing them with the control sample of human aorta. After this, all background signals unrelated to COL were eliminated.

SHG signals were stratified according to COL organization and structure in the stroma, using image-pattern analysis methods. Quantitative analysis of COL parameters was performed on SHG images using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) and the OrientationJ plug-in software²⁶. Nine representative areas (150 × 150 pixels) were randomly selected from each image to evaluate COL quantity, uniformity, and organization, as described below.

COL quantity was determined as the sum of SHG signal intensities in 1024 × 1024 pixel images, which was directly related to the quantity of collagen molecules. These values were obtained using the integrated density function of ImageJ software. Using the OrientationJ plug-in, as previously described²⁶, we calculated COL uniformity (energy) and organization (coherence). Uniformity (energy) reflects the density of COL, i.e., whether fibers are farther

from (lower values) or closer to (higher values) each other. Organization (coherence) reflects the spatial direction of COL, with values between 0 (completely isotropic areas, with zero directionality) to 1 (highly oriented fibers). From the perspective of mathematical definitions, these parameters should be correlated. The relationship between COL parameters for vulvar lesions, normal adjacent tissues, and VIN was added to the calculation.

4.3 STATISTICAL ANALYSES

Descriptive statistics for categorical variables are presented in tables as the distribution of absolute and relative frequencies, whereas continuous variables are presented as measures of central tendency (i.e., median). Normality was tested using the D'Agostino-Pearson test. The variables quantity and uniformity of collagen fibers were log-transformed, because they depend upon the square of the SHG signals. Continuous values were plotted as the median and interquartile range (25th – 75th). The Mann-Whitney nonparametric test was used to analyze numerical variables between two groups. The Kruskal-Wallis test was used to analyze numerical variables between three groups. Data analysis was performed using GraphPad Prism v 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). All comparisons were considered statistically significant at $p < 0.05$.

DATA AVAILABILITY

Data sharing, evidence of data sharing and peer review of data required

5 REFERENCES

1. Wang Z, Tropè C, Suo Z, Troen G, Yang G, Nesland J et al. The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 2008;8(1).
2. Van de Nieuwenhof H, van der Avoort I, de Hullu J. Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008; 68(2):131-156.
3. Van de Nieuwenhof H, Bulten J, Hollema H, Dommerholt R, Massuger L, van der Zee A et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Modern Pathology*. 2011;24(2):297-305.

4. Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Kimura T. Two Distinct Pathways to Development of Squamous Cell Carcinoma of the Vulva. *Journal of Skin Cancer*. 2011;2011:1-7.
5. Alkatout I, Günther V, Schubert M, Weigel M, Garbrecht N, Jonat W, et al. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. *International Journal of Women's Health*. 2015;7:305-13.
6. Chokoeva A, Tchernev G, Castelli E, Orlando E, Verma S, Grebe M et al. Vulvar cancer: a review for dermatologists. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2015;165(7-8):164-177.
7. Firenzy A. Vulvar intraepithelial neoplasia. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M, editors. *Colposcopy: principle sand practice*. Philadelphia: WB Saunders; 2002. p.1-22.
8. Sideri M, Jones R, Wilkinson E, Preti M, Heller D, Scurry J et al. Squamous Vulvar Intraepithelial Neoplasia: 2004 Modified Terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2006;61(3):174-175.
9. Hanley C, Noble F, Ward M, Bullock M, Drifka C, Mellone M et al. A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers. *Oncotarget*. 2015;7(5):6159-6174.
10. Brooks M, Mo Q, Krasnow R, Ho P, Lee Y, Xiao J et al. Positive association of collagen type I with non-muscle invasive bladder cancer progression. *Oncotarget*. 2016; 7(50).
11. Drifka C R, Loeffler A G, Mathewson K, Mehta G, Keikhosravi A, Liu Y et al. Comparison of picosirius red staining with second harmonic generation imaging for the quantification of clinically relevant collagen fiber features in histopathology samples. *J Histochem Cytochem*. 2016;64(9):519-29.
12. Mostaço-Guidolin L, Rosin N, Hackett T. Imaging Collagen in Scar Tissue: Developments in Second Harmonic Generation Microscopy for Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(12):1772.
13. Holthoff ER, Byrum SD, Mackintosh SG, Kelly T, Tackett AJ, Quick CM, Post SR. Vulvar squamous cell carcinoma aggressiveness is associated with differential expression of collagen and STAT1. *Clin Proteomics*. 2017 Dec 6;14:40.
14. Natal RA, Vassallo J, Paiva GR, Pelegati VB, Barbosa GO, Mendonça GR, Bondarik C, Derchain SF, Carvalho HF, Lima CS, Cesar CL, Sarian LO. Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast cancer. *Tumour Biol*. 2018 Apr;40(4):1010428318770953.
15. Calleja-Agius J, Brincat M, Borg M. Skin connective tissue and ageing. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2013;27(5):727-40.

16. Adur J, Pelegati VB, Costa LFL, Pietro L, de Thomaz AA, Almeida B, et al. Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy. *J Biomed Opt.* 2011; 16(9): 096017.
17. Joura E, Lösch A, Haider-Angeler M, Breitenecker G, Leodolter S. Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *J Reprod Med.* 2000;45(8):613-615.
18. Saraiya M, Watson M, Wu X, King J, Chen V, Smith J et al. Incidence of in situ and invasive vulvar cancer in the US, 1998-2003. *Cancer.* 2008;113(10 Suppl):2865-72.
19. Weiskopf D, Weinberger B, Gubeck-Loebenstein B. The aging of immune system. *Transpl. Int.* 2009;22:1041-50.
20. Pointer B P, Clark P A, Schroeder A B, Salamat M S, Eliceiri K Wet all. Association of collagen architecture with glioblastoma patient survival. *J Neurosurg .* 2017; 126(6): 1812–1821.
21. Lanneau G, Argenta P, Lanneau M, Riffenburgh R, Gold M, McMeekin D et al. Vulvar cancer in young women: demographic features and outcome evaluation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2009;200 (6):645.e1-645.e5.
22. Raine-Fenning N J, Brincat M P, Muscat-Baron Y. Skin aging and menopause: implications for treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4(6):371-378.
23. Gasimli K, Straussner M, Schmeil I, Karn T, Winkelmann R, Becker S, El-Balat A. Impact of re-excision of residual adjacent vulvar intraepithelial neoplasia (VIN III) and histological tumour-free margin (hTFM) on survival in primary squamous cell carcinoma of vulva. *Arch Gynecol Obstet.* 2018 Nov;298(5):945-950.
24. Chen W-L, Chou C-K, Lin M-G, Chen Y-F, Jee S-H, Tan H-Y, et al. Single-wavelength reflected confocal and multiphoton microscopy for tissue imaging. *J Biomed Opt.* 2009;14:054026.
25. Burke K, Tang P, Brown E. Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression. *J. Biomed. Opt.* 2013;18:31106.
26. Rezakhaniha R, Aghianniotis A, Schrauwen JTC, Griffa A, Sage D, Bouten CVC, et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol.* 2012;11(3-4):461-73.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Maria das Graças de Fátima Cavalcanti Castor and Rodrigo de Andrade Natal contributed equally in all steps of this article. MGFC and LCT participated in the planning of the study, searched the data and the archival blocks of all patients, analyzed the results and wrote the paper. RJVM, RAN and JV reviewed the pathological slides, and selected the areas for SHG analysis; RAN performed the evaluation at the SHG microscope; All authors critically read the paper and accepted the final version.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The authors thank the National Institute of Science and Technology on Photonics Applied to Cell Biology (INFABiC) at the State University of Campinas – Unicamp, São Paulo, Brazil, for access to equipment and assistance; INFABiC is co-funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant no 08/57906-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant no 573913/2008-0).

_____CONSIDERAÇÕES FINAIS_____

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da microscopia de SHG vem sendo adotado nos últimos anos para análise das fibras do COL em vários tipos de cânceres, devido a sua alta sensibilidade e especificidade (Adur et al. 2011; Zeitoune et al. 2017; Mostaço-Guidolin et al. 2017). No nosso trabalho, utilizamos o SHG para o estudo do COL no câncer vulvar, que, apesar de ser considerado um câncer raro e de mulheres idosas, nas últimas décadas vem aumentando sua incidência em mulheres jovens (Moutinho 2008).

Nas imagens obtidas pela microscopia SHG no CCE de vulva, as fibras do COL apresentaram claras alterações na conformação, quando comparadas ao tecido adjacente normal, como a redução da quantidade de fibras, seu direcionamento desordenado e a organização atípica; essas alterações também se estenderam às lesões pré-neoplásicas na vulvar, porém, em menor intensidade. Essa observação visual é reforçada pela análise dos gráficos, e o mesmo comportamento foi observado quando foram analisadas amostras pareadas do CCE de vulva (amostras do mesmo paciente).

Quando comparamos a localização do CCE na vulva, constatamos que, quando comprometidos pelo desenvolvimento do câncer, os pequenos lábios apresentaram uma redução da quantidade e uniformidade das fibras do COL em relação aos grandes lábios; esta diferença pode dever-se à composição heterogênea de ambos os tecidos, um mais parecido com a mucosa e o outro com a pele.

O estudo do grupo de mulheres idosas, pós-menopausadas, nos faz imaginar se a presença da atrofia e suas repercussões poderia ter um papel de relevância no desenvolvimento do câncer vulvar, já que os eventos decorrentes da redução do estrógeno levam a uma fragilização da derme vulvar e possível suscetibilidade a traumas e desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos que podem resultar no CCE de vulva. No entanto, no nosso trabalho, a avaliação das alterações das fibras do COL por faixa etária não mostrou significância.

Quando comparamos os gráficos de quantificação, uniformidade e organização do CCE de vulva e NIV, não houve diferença significativa; um resultado parecido, mas não igual, foi percebido quando comparamos suas imagens. Nas imagens do SHG, observamos que as NIVs apresentavam alterações atípicas nas fibras do COL, mas em menor intensidade, quando comparadas as imagens do CCE de vulva. Temos o conhecimento de que as lesões por NIVs

têm um potencial de cura ou de progressão para o câncer, que dependerá do grau de atipias celulares encontradas (Scurry e Wilkinson 2006) - e identificar essas lesões é importante para bloquear o processo de progressão.

Atualmente, a NIV 1 não é considerada precursora do câncer vulvar, por ter um baixo potencial de malignidade (Sideri et al. 2006), mas, como prever qual NIV1 irá evoluir para NIV2 ou NIV3, que tem um alto potencial de malignidade? Ou, mesmo, qual dessas lesões com certeza irá evoluir para câncer? Talvez o estudo das imagens das fibras do COL seja a resposta a essa pergunta. Essas imagens poderão nos revelar alterações incipientes sugestivas de atipias com potencial de progressão para o câncer.

As alterações encontradas ao analisar as fibras do COL pelo método de SHG poderão futuramente nos fornecer subsídios para graduar alterações encontradas no COL com mais propriedade e correlacionar com seu potencial de progressão para o câncer.

Alguns trabalhos mais recentes em câncer de mama, cabeça e pescoço, esôfago e colo retal relatam alterações no microambiente tumoral da MEC, principalmente relacionadas às fibras do COL e sua importância para a integridade da MB. Autores mencionam que em suas pesquisas utilizando o método de SHG associado a outros métodos, encontraram fibras do COL que se apresentavam mais alongadas e densas, e que estas favoreceram a metástase destes tumores (Hanley et al. 2015; Brooks et al. 2016). Porém, não foi avaliado, no presente trabalho, o comprimento da fibra do COL pelo método utilizado (SHG). No entanto, conseguimos associar o aumento da quantidade e uniformidade das fibras do COL no tumor à presença de metástases de linfonodos, o que sugere um valor prognóstico de tais parâmetros na avaliação do câncer vulvar.

Embora os tecidos adjacentes ao tumor tenham sido revisados, e nos laudos histológicos constarem como tecidos livres de tumor, na visualização das imagens obtidas na microscopia de SHG esses tecidos mostraram pequenas alterações na quantidade, uniformidade e organização do COL, quando comparados ao tecido de uma lâmina normal. Sabemos que a margem livre do tumor é muito importante para o controle locorregional do tumor vulvar, já que quando comprometida geralmente é indicada uma re-excisão (Gasimli et al. 2018; Raimond et al. 2019), e este achado nos faz reavaliar o uso da microscopia óptica convencional como método de diagnóstico de margens cirúrgicas livres de câncer ou lesões precursoras, que é uma prática usada no cotidiano dos laboratórios de diagnóstico, mas que tem suas limitações.

Nos últimos anos, observamos uma melhoria desse método, com o surgimento da varredura a laser confocal da SHG, que não danifica o tecido e permite uma análise das lâminas corada em H&E, mesmo após anos de montagem, possibilitando estudos retrospectivos de boa

qualidade (Adur et al. 2011), o que nos leva a considerar a possibilidade do uso da microscopia de SHG como uma técnica de triagem pós-cirúrgica para avaliar a extensão da lesão tumoral ou precursora e definir com mais segurança as margens cirúrgicas livres de malignidade.

Apesar de alguns trabalhos reconhecerem a microscopia de SHG como um importante método na análise do material biológico, refere-se como uma limitação para o seu uso na rotina laboratorial o alto custo operacional, por utilizar o laser como fonte de energia, mas, ao mesmo tempo, é reconhecido que nos últimos anos seu custo vem sendo reduzido (Zeitoune et al. 2017; Mostaço-Guidolin et al. 2017). Essa constatação abre a possibilidade de que em um futuro próximo o método de SHG possa entrar na prática rotineira do laboratório de diagnóstico.

Com o conhecimento da importância das alterações das fibras do COL presentes na MEC de pacientes portadores de CCE de vulva e NIV, um melhor conhecimento do seu comportamento se faz necessário. A microscopia de SHG, portanto, surge como uma importante ferramenta de ajuda para o desenvolvimento desses estudos.

Por ser o CCE de vulva um câncer raro e a pesquisa ter sido realizada em um único centro hospitalar, deparamo-nos com a dificuldade de uma amostra biológica reduzida. Ademais, por questões inerentes aos trabalhos retrospectivos em nosso meio, a perda de amostras do arquivo de Patologia é muito expressiva. Outra limitação é representada pelo fato de os controles utilizados serem áreas nas mesmas amostras, sem neoplasia microscopicamente detectável e a definição de área livre de lesão patológica ser próxima ao corte cirúrgico. Existe o potencial de que alterações mais refinadas no nível molecular possam ter interferido nos resultados, mas uma diferença significativa foi alcançada entre a maioria dos parâmetros das áreas tumorais e não-tumorais. A presença de uma única paciente com amostra histológica negativa, sem atipias, impossibilitou definir este grupo como grupo controle. Apesar das limitações, obtivemos informações importantes que nos motivam a aprofundar os estudos do COL no câncer vulvar.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo permitiu acrescentar novas informações sobre as diferenças nos parâmetros quantitativos do COL por microscopia de SHG entre o tecido adjacente normal, o de lesões precursoras e o intratumoral no CCE de vulva, bem como relacionar alterações nesses parâmetros com dados clinicopatológicos:

- As fibras do colágeno apresentaram redução dos seus parâmetros (quantidade, organização e uniformidade) no CCE de vulva em relação ao tecido distante normal das mesmas pacientes;
- As fibras do colágeno apresentaram redução dos seus parâmetros (apenas quantidade e uniformidade) na NIV em relação ao tecido distante normal das mesmas pacientes, porém com menor intensidade que a observada nos casos de CCE de vulva;
- Quando comparamos os parâmetros do COL entre NIV e lesão intratumoral do CCE de vulva, não houve alterações significativas;
- Observou-se uma associação entre o aumento da quantidade e uniformidade do COL com a presença de metástases ganglionares em pacientes com CCE de vulva, sendo este um parâmetro de reconhecido valor de prognóstico adverso.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Alkatout I, Günther V, Schubert M, Weigel M, Garbrecht N, Jonat W, et al. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. *Int J Women's Health*. 2015;7:305-13.

American Cancer Society-ACS. Vulvar cancer 2020. Atlanta, Ga: American Cancer Society. 2020. Disponível em: <https://bit.ly/3dxdcXy>. [2020 mar 15]

Adur J, Pelegati VB, Costa LFL, Pietro L, de Thomaz AA, Almeida B, et al. Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy. *J Biomed Opt*. 2011;16(9):096017.

Akgül B, García-Escudero R, Ghali L, Pfister H, Fuchs P, Navsaria H et al. The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res*. 2005;65(6):2216-23.

Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer S. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978–2007: a nationwide population-based study. *Gynecol Oncol*. 2011;122(1):45-9.

Baiocchi G, Rocha RM. Vulvar cancer surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014;26(1):9-17.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801.

Brooks M, Mo Q, Krasnow R, Ho P, Lee Y, Xiao J, et al. Positive association of collagen type I with non-muscle invasive bladder cancer progression. *Oncotarget*. 2016;7(50):82609-19.

Burke K, Tang P, Brown E. Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression. *J Biomed Opt*. 2012;18(3):031106.

Buttmann-Schweiger N, Klug SJ, Luyten A, Holleczeck B, Heitz F, du Bois A, et al. Incidence patterns and temporal trends of invasive nonmelanotic vulvar tumors in germany 1999-2011. a population-based cancer registry analysis. *PLoS ONE* 2015;10(5):e0128073.

Calleja-Agius J, Brincat M, Borg M. Skin connective tissue and ageing. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2013;27(5):727-40.

Chokoeva A, Tchernev G, Castelli E, Orlando E, Verma S, Grebe M, et al. Vulvar cancer: a review for dermatologists. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2015;165(7-8):164-77.

Chen W-L, Chou C-K, Lin M-G, Chen Y-F, Jee S-H, Tan H-Y, et al. Single-wavelength reflected confocal and multiphoton microscopy for tissue imaging. *J Biomed Opt.* 2009;14(5):054026.

Cox G, Kable E. Second-harmonic imaging of collagen. *Methods Mol Biol.* 2006;319:15-35.

Drifka CR, Loeffler AG, Mathewson K, Mehta G, Keikhosravi A, Liu Y, et al. Comparison of picosirius red staining with second harmonic generation imaging for the quantification of clinically relevant collagen fiber features in histopathology samples. *J Histochem Cytochem.* 2016;64(9):519-29.

de Melo Maia B, Munhoz Cestari F, Lavorato-Rocha A, Sant'Ana Rodrigues I, Baiocchi G, Cardoso Guimarães G, et al. Characterization of sociodemographic and clinicopathological features in brazilian patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Obstetric Invest.* 2012;75(1):53-60.

DeClerck YA. Desmoplasia: a response or niche? *Cancer Discov.* 2012;2(9):772-4.

Eifel P, Berek J, Markman M. Cancer of the cervix, vagina, and vulva. In: De Vita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principle sand practice of oncology.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2011. p.1311-44.

Eble AJ, Nilando S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2019;36(3):171-98.

Farrell A, Dean D, Millard P, Charnock F, Wojnarowska F. Alterations in fibrillin as well as collagens I and III and elastin occur in vulval lichen sclerosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2001;15(3):212-7.

Firenzy A. Vulvar intraepithelial neoplasia. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M, editors. *Colposcopy: principle sand practice.* Philadelphia: W.B. Saunders; 2002. p.1-22.

Franken PA, Hill AE, Peters CW, Weinreich G. Generation of optical harmonics. *Phys Rev Lett.* 1961;7(4):118-20.

Gasimli K, Straussner M, Schmeil I, Karn T, Winkelmann R, Becker S, et al. Impact of re-excision of residual adjacent vulvar intraepithelial neoplasia (VIN III) and histological tumour-free margin (hTFM) on survival in primary squamous cell carcinoma of vulva. *Arch Gynecol Obstet.* 2018; 298(5):945-50.

Godoy C, Teodoro W, Velosa A, Garippo A, Eher E, Parra E, et al. Unusual remodeling of the hyalinization band in vulval lichen sclerosus by type V collagen and ECM 1 protein. *Clinics.* 2015;70(5):356-362.

Grässel S, Bauer R. Collagen XVI in health and disease. *Matrix Biol.* 2013;32(2):64-73.

Hanley C, Noble F, Ward M, Bullock M, Drifka C, Mellone M, et al. A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers. *Oncotarget.* 2015;7(5):6159-74.

Insinga R, Liaw K, Johnson L, Madeleine M. A Systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.* 2008;17(7):1611-22.

International Agency for Research on Cancer-IARC. International association of cancer registries: cancer incidence in five continents, vol. VI, Lyon, IARC Scientific Publications, 1992.

International Agency for Research on Cancer-IARC. Cancer today (Maps), 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. [2020 jan 12]

Jin C, Liang S. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia: a brief review of clinicopathologic features. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(6):768-71.

Joura E, Lösch A, Haider-Angeler M, Breitenecker G, Leodolter S. Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *J Reprod Med*. 2000;45(8):613-15.

Kang Y-J, Smith M, Barlow E, Coffey K, Hacker N, Canfell K. Vulvar cancer in high-income countries: Increasing burden of disease. *Int J Cancer*. 2017;141(11):2174-86.

Keikhosravi A, Bredfeldt JS, Sagar AK, Eliceiri KW. Second-harmonic generation imaging of cancer. *Methods Cell Biol*. 2014;123:531-46.

Lanneau G, Argenta P, Lanneau M, Riffenburgh R, Gold M, McMeekin D, et al. Vulvar cancer in young women: demographic features and outcome evaluation. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(6):645.e1-645.e5.

Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.

Malik R, Lelkes P, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol*. 2015;33(4):230-6.

Mostaço-Guidolin L, Rosin N, Hackett T. Imaging collagen in scar tissue: developments in second harmonic generation microscopy for biomedical applications. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):1772.

Moutinho JAF. Neoplasia intraepitelial vulvar: um problema atual *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(8):420-6.

Muiznieks L, Keeley F. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: a fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):866-75.

Murphy R. Lichen Sclerosus. *Dermatol Clin*. 2010;28(4):707-15.

Natal RA, Vassallo J, Paiva GR. Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast cancer. *Tumor Biol*. 2018;40(4):1010428318770953.

Natal RA, Paiva GR, Pelegati VB, Marengo L, Alvarenga CA, Vargas RF. Exploring collagen parameters in pure special types of invasive breast cancer. *Sc Rep*. 2019;9(1):7715.

Preti M, Igidbashian S, Costa S, Cristoforoni P, Mariani L, Origoni M, et al. VIN usual type- from the past to the future. *Ecancermedicalsecience*. 2015;9:531.

Raglow Z, Thomas S. Tumor matrix protein collagen XI α 1 in cancer. *Cancer Lett*. 2015;357(2):448-53.

Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:a004978.

Raine-Fenning NJ, Brincat MP, Muscat-Baron Y. Skin aging and menopause: implications for treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(6):371-8.

Raimond E, Delorme C, Ouldamer L, Carcopino X, Bendifallah S, Touboul C, et al. Surgical treatment of vulvar cancer: Impact of tumor-free margin distance on recurrence and survival. A multicentre cohort analysis from the francogyn study group. *Eur J Surg Oncol*. 2019;45(11):2109-14.

Rezakhaniha R, Agianniotis A, Schrauwen JTC, Griffa A, Sage D, Bouten CVC, et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol*. 2012;11(3-4):461-73.

Saraiya M, Watson M, Wu X, King J, Chen V, Smith J, et al. Incidence of in situ and invasive vulvar cancer in the US, 1998-2003. *Cancer*. 2008;113(10 Suppl):2865-72.

Scurry J, Wilkinson EJ. J Review of terminology of precursors of vulvar squamous cell carcinoma. *Low Genit Tract Dis.* 2006;10(3):161-9.

Sideri M, Jones R, Wilkinson E, Preti M, Heller D, Scurry J, et al. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, issvd vulvar oncology subcommittee. *J Reprod Med.* 2005;50(11):807-10.

Siegel RL, Naishadham DM, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7-30.

Sodré CT, Azulay R, Azulay RD. *Dermatologia Azulay e Azulay.* 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. A pele: estrutura, fisiologia e embriologia; p.1-10.

Tanjore H, Kalluri R. The Role of Type IV Collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol.* 2006;168(3):715-717.

Trietsch MD, Nooij LS, Gaarenstroom KN, van Poelgeest MI. Genetic and epigenetic changes in vulvar squamous cell carcinoma and its precursor lesions: a review of the current literature. *Gynecol Oncol.* 2015;136(1):143-57.

Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Kimura T. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva. *J Skin Cancer.* 2011;2011:1-7.

van de Nieuwenhof HP, van der Avoort I, de Hullu J. Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Crit Rev Oncol/Hematol.* 2008;68(2):131-56.

van de Nieuwenhof HP, Massuger L, van der Avoort I, Bekkers R, Casparie M, Abma W et al. Vulvar squamous cell carcinoma development after diagnosis of VIN increases with age. *Eur J Cancer.* 2009;45(5):851-6.

van de Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LF, van der Zee A et al. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2011;24(2):297-305.

Wang Z, Tropè C, Suo Z, Trøen G, Yang G, Nesland J, et al. The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 2008;8(1):308.

Wetzels R, Robben H, Leigh I, Schaafsma H, Vooijs G, Ramaekers F. Distribution patterns of type VII collagenin normal and malignant human tissues. *Am J Pathol*. 1991;139(2):451-9.

Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Trans Med*. 2019;17(1):309.

Yamauchi M, Barker TH, Gibbons DL, Kurie JM. The fibrotic tumor stroma. *J Clin Invest*. 2018;128(1):16-25.

Zeitoune A, Luna J, Sanchez SK, Erbes L, Cesar C, Andrade L, et al. Epithelial ovarian cancer diagnosis of second-harmonic generation images: a semiautomatic collagen fibers quantification protocol. *Cancer Inform*. 2017;16: 16:1176935117690162.

ANEXOS

Anexo 1 - Declaração de revisão ortográfica e gramática

**DECLARAÇÃO
DE
REVISÃO ORTOGRÁFICA E GRAMATICAL**

Declaro que a tese "Estudo da Expressão de Colágeno no Câncer Vulvar e Lesões Pré-Neoplásicas pelo Método de Second Harmonic Generation", de autoria de **Maria das Graças de Fátima Cavalcanti Castor**, foi devidamente revisada, considerando-se as exigências e padrões da norma culta da Língua Portuguesa.

Belo Horizonte, 08 de março de 2020.

Mariana Clark Peres Rabello

Revisor: Mariana Clark Peres Rabello
Titulação: Mestre em Literaturas de Língua Portuguesa

Anexo 2 - Parecer consubstanciado – CEP/HCP

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA EXPRESSÃO DE COLÁGENO E DO PAPILOMAVIRUS HUMANO NO CÂNCER VULVAR

Pesquisador: MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI CASTOR

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 50720115.9.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.326.437

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO: o câncer ginecológico nos Estados Unidos tem seu diagnóstico em mais de 91.700 casos novos, levando a perda da vida a mais de 28.000. O câncer de vulva tem uma estimativa para o ano 2015 de 5.150 casos novos e causa de 1.080 óbitos de mulheres. A vulva se situa numa área externa a vagina sendo composta do monte de Vênus, grandes e pequenos lábios, clitóris, bulbo vestibular, glândula vestibular maior (glândula de Bartholine), vestibulo vaginal e períneo. O grande e pequeno lábio vulvar é o local mais comum para o desenvolvimento do câncer de vulva e representam 70% dos casos, sendo sua frequência maior no grande lábio. O clitóris e o períneo estão comprometidos pelo câncer em 15 a 20%. Existem vários tipos histológicos de câncer vulvar como o carcinoma de células escamosas (carcinoma escamoso vulvar), tipo mais comum (95%) seguido por melanoma (<5%), sarcoma (1-2%) e o carcinoma basocelular (2%). O carcinoma escamoso vulvar (CEV) tem dois mecanismos de desenvolvimento, através das lesões pré-malignas neoplasia intra-epitelial vulvar (NIV); o primeiro por infecção pelo papillomavirus humano (HPV), atingido uma faixa etária mais jovem (<50 anos) e o segundo, HPV-independente (em torno de 80%) que aparece após menopausa (50-80 anos) e tem no líquen escleroso sua origem. **OBJETIVO:** estudar a expressão de colágeno e do HPV em pacientes com câncer de vulva, lesões precursoras e líquen escleroso. **MÉTODOS:** Será realizado um estudo de coorte retrospectivo

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

Continuação do Parecer: 1.326.437

e analítico. Serão incluídos um total de 80 casos na faixa etária de 40 a 80 anos, sendo 50 com carcinoma epidermóide da vulva - CEV (grupo 1), 15 pacientes com lesões potencialmente precursoras do CEV (grupo 2) e 15 casos de líquen escleroso e sem lesões epiteliais (grupo 3). Serão 15 indivíduos controles saudáveis (faixa etária de 40 a 80 anos), sem história de câncer e/ou lesões precursoras. Para análises laboratoriais, será selecionado um espécime representativo do processo patológico para revisão diagnóstica e dos parâmetros histopatológicos: diagnóstico da lesão, grau histológico, presença e semiquantificação de reação inflamatória crônica ou aguda (ausente, leve, moderada, intensa). Para avaliar a presença ou ausência do HPV nos casos de CEV, será utilizado um método substituto à pesquisa molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, polymerase chain reaction). Esta avaliação inclui a pesquisa de três marcadores: proteína p16, proteína p53 e marcador de proliferação celular Ki67. Para estudo do colágeno será realizado utilizando a microscopia de second-harmonic generation. As áreas peri e intratumorais selecionados para a avaliação do colágeno em secções de tecido serão coradas em Hematoxilina/Eosina e serão analisadas por microscopia confocal no equipamento Zeiss LSM-780 NLO (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha), utilizando uma objetiva de 40x / 1.3 com óleo imersão. Para análises estatísticas, o teste Shapiro-Wilk será utilizado para análise da distribuição de dados dos parâmetros de colágeno. Os parâmetros de colágeno médios por idade dos pacientes, estágio patológico do tumor, subtipo imuno-histoquímica e grau histológico serão comparados por teste t ou análise de variância (ANOVA). Os protocolos estabelecidos serão submetidos à Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HCP e do AC CAMARGO, bem como a declaração do Termo de dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido do Protocolo de Pesquisa, respeitando os aspectos éticos e legais vigentes, de acordo com a Resolução 466/12.

Objetivo da Pesquisa:

4. OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão de colágeno e do HPV em pacientes com câncer de vulva, lesões precursoras e líquen escleroso.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão do colágeno na matriz extracelular;
- Realizar a genotipagem do vírus HPV no tecido vulvar;
- Determinar a expressão proteica de p16 e p53;
- Realizar ensaios de linfoproliferação através da incorporação de Ki67;
- Comparar os achados clínicos e laboratoriais entre os grupos estudados e relacionar ao

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8197 Fax: (81)3217-8197 E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 1.326.437

desfecho clínico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

O constrangimento de exposição de dados.

BENEFÍCIOS

Conhecer o comportamento do colágeno para tentar selecionar um melhor tratamento para o câncer de vulva

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta é uma pesquisa relevante pois irá estudar o comportamento do Câncer de Vulva e trará contribuição para o tratamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Carta de anuência do HCP;
2. Folha de rosto;
3. Termo de confidencialidade;
4. Informação de dispensa de TCLE;
5. Autorização do SAME/HCP;
6. Autorização da Patologia/HCP

Todos os documentos obrigatórios estavam datados e assinados.

Recomendações:

Recomenda-se adequar a amostra apresentada no resumo com a do corpo do projeto. colocar a quantidade total de participantes (os 80 pacientes dos 3 grupos mais os 15 de controle saudável, totalizando 95 participantes).

Acrescentar o patrocinador principal no projeto detalhado.

Acrescer a Carta de Anuência do A.C. Camargo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi aprovado, mas com a ressalva de entregar a este comitê as seguintes recomendações:

Recomenda-se adequar a amostra apresentada no resumo com a do corpo do projeto. colocar a quantidade total de participantes (os 80 pacientes dos 3 grupos mais os 15 de controle saudável, totalizando 95 participantes).

Acrescentar o patrocinador principal no projeto detalhado.

Acrescer a Carta de Anuência do A.C. Camargo.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 1.326.437

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_620993.pdf	05/11/2015 13:51:24		Aceito
Outros	orcamento.docx	05/11/2015 13:50:45	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	05/11/2015 13:34:16	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Outros	FICHA.docx	05/11/2015 13:12:17	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Outros	TABELA.pdf	05/11/2015 13:03:52	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	05/11/2015 13:02:22	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Outros	TERMO2.docx	04/11/2015 19:10:26	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Outros	TERMO1.docx	04/11/2015 19:07:14	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMODECONFIDENCIALIDADE.pdf	04/11/2015 18:48:30	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTEANUENCIA.pdf	04/11/2015 18:48:13	MARIA DAS GRAÇAS DE FATIMA CAVALCANTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	DISPENSADOTCLE.pdf	04/11/2015 18:47:51	MARIA DAS GRAÇAS DE	Aceito

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 1.326.437

Justificativa de Ausência	DISPENSADOTCLE.pdf	04/11/2015 18:47:51	CAVALCANTI CASTOR	Aceito
---------------------------	--------------------	------------------------	----------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 17 de Novembro de 2015

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1507

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8197

Fax: (81)3217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

Anexo 3 - Cópia da mensagem de aceite do artigo - *Scientific Reports*

12/03/2020

Gmail - Decision on your manuscript



Leuridan Torres <leuridan.torres@gmail.com>

Decision on your manuscript

6 mensagens

Scientific Reports <srep@nature.com>

24 de fevereiro de 2020 07:23

Para: leuridan.torres@gmail.com

Ref: Submission ID 15fdce58-378a-48c6-9d6d-ba9d3dd13298

Dear Dr Torres,

We're delighted to accept your manuscript, "Study on collagen parameters in vulvar cancer and preneoplastic lesions by Second Harmonic Generation microscopy", for publication in *Scientific Reports*. Thank you for choosing to publish with us.

Editorial Board Member comments

Congratulations, your manuscript has been accepted for publication.

Licence to Publish

As the corresponding author of an accepted manuscript, you must complete an Open Access Licence to publish on behalf of all authors. To do this, you'll need a [nature.com](https://www.nature.com) account based on your leuridan.torres@gmail.com email. If you already have such an account, please complete the statement here:

<https://rights.nature.com/publication-agreements/13243a85-3104-4ee0-8a89-fb17574c4dce>

If you don't yet have a [nature.com](https://www.nature.com) account linked to leuridan.torres@gmail.com, you can create one here:

https://idp.nature.com/unified/register/stoa?redirect_uri=https%3A%2F%2Frights.nature.com%2Fpublication-agreements%2F13243a85-3104-4ee0-8a89-fb17574c4dce

Article-Processing Charge

If applicable, you will also receive a billing email so you can pay your article processing charge (APC) via credit card or by requesting an invoice. To find out more about APCs, see our FAQs:

<https://support.nature.com/en/support/solutions/6000138386>

Please note that your paper cannot be sent for typesetting until we have received your payment.

Checking the proofs

Once we've prepared your paper for publication, you will receive a PDF proof. At this stage, please check that the author list and affiliations are correct. For the main text, only errors that have been introduced during the production process or those that directly compromise the scientific integrity of the paper may be corrected.

Please make sure that only one author communicates with us and that only one set of corrections is returned. As the corresponding (or nominated) author, you are responsible for the accuracy of all content, including spelling of names and current affiliations.

To ensure prompt publication, your proofs should be returned within two working days. Please contact SciRep.Production@nature.com immediately if you wish to nominate a contributing author to receive the proofs on your behalf.

Publication policies

Acceptance of your manuscript is conditional on all authors agreeing to our publication policies at: <https://www.nature.com/srep/journal-policies/editorial-policies>.

In particular, your manuscript must not be published elsewhere and there must be no announcement of this work to any media outlet until the publication date is confirmed. We will email you as soon as your manuscript is scheduled for publication, which will be after we have received and approved your proof corrections. You can get advice about media relations from the Nature Research press office at: press@nature.com.

12/03/2020

Gmail - Decision on your manuscript

Your article will be open for online commenting on the Scientific Reports website. Please use the report facility if you see any inappropriate comments, and of course, you can contribute to discussions yourself. If you wish to track comments on your article, please register by visiting the 'Comments' section in the full text (HTML) version of your paper.

** A form to order reprints of your article is available at <https://www.nature.com/reprints/author-reprints.html>. To obtain the special author reprint rate, orders must be made within a month of the publication date. After that, reprints are charged at the normal (commercial) rate.

We look forward to publishing your article.

Kind regards,

Triantafyllos Stylianopoulos
Editorial Board Member
Scientific Reports

P.S. If appropriate, you may also consider uploading any protocols used in this manuscript to the protocol exchange, part of our online web resource, <https://protocolexchange.researchsquare.com>. By participating, you are enabling researchers to reproduce or adapt your methodology. The protocol exchange is fully searchable, providing your protocols and paper with increased utility and visibility. Protocols can also be easily updated via versioning. Please submit your protocol to <https://protocolexchange.researchsquare.com/submission>. You may need to create a new Research Square account. Please provide details of this article in the associated publications section. You'll find more information at: <https://protocolexchange.researchsquare.com>

** Visit the Springer Nature Editorial and Publishing website at www.springernature.com/editorial-and-publishing-jobs for more information about our career opportunities. If you have any questions, please email Editorial.Publishing.Jobs@springernature.com. **

This includes interactive and multimedia use as well as posting the Article in full or in part on social media, and the right to alter the Article to the extent necessary for such use. Author(s) grant to Licensee the right to re-license Article metadata without restriction, including but not limited to author name, title, abstract, citation, references, keywords and any additional information as determined by Licensee.

Copyright

Ownership of copyright in the Article shall vest in the Author(s). When reproducing the Article or extracts from it, the Author(s) acknowledge and reference first publication in the Journal.

Self-Archiving

The rights and licensing terms applicable to the version of the Article as published by the Licensee are set out in the Grant of Rights and Copyright sections above. The following applies to versions of the article preceding publication by the Licensee and/or copyediting and typesetting by the Licensee. Author(s) are permitted to self-archive a pre-print and an Author's accepted manuscript version of their Article.

- a. A pre-print is the Author's version of the Article before peer-review has taken place ("Pre-Print"). Prior to acceptance for publication, Author(s) retain the right to make a Pre-Print of their Article available on any of the following: their own personal, self-maintained website; a legally compliant pre-print server such as but not limited to arXiv and bioRxiv. Once the Article has been published, the Author(s) should update the acknowledgement and provide a link to the definitive version on the publisher's website: "This is a pre-print of an article published in [insert journal title]. The final authenticated version is available online at: [https://doi.org/\[insert DOI\]](https://doi.org/[insert DOI])".
- b. An Author's Accepted Manuscript (AAM) is the version accepted for publication in a journal following peer review but prior to copyediting and typesetting. Author(s) retain the right to make an AAM of their Article available on any of the following, provided that they are not made publicly available until after first publication: their own personal, self-maintained website; their employer's internal website; their institutional and/or funder repositories. AAMs may be deposited in such repositories on acceptance, provided that they are not made publicly available until after first publication. An acknowledgement in the following form should be included, together with a link to the published version on the publisher's website: "This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in [insert journal title]. The final authenticated version is available online at: [http://dx.doi.org/\[insert DOI\]](http://dx.doi.org/[insert DOI])".

Warranties

The Author(s) warrant and represent that:

- a. (i) the Author(s) are the sole copyright owners or have been authorised by any additional copyright owner to make the Grant of Rights defined above, (ii) the Article does not infringe any intellectual property rights (including without limitation copyright, database rights or trade mark rights) or other third party rights and no licence from or payments to a third party are required to publish the Article, (iii) the Article has not been previously published or licensed, (iv) if the Article contains materials from other sources (e.g. illustrations, tables, text quotations) Author(s) have obtained written permissions to the extent necessary from the copyright holder(s), to license to the Licensee the same rights as set out above and have cited any such materials correctly;
- b. all of the facts contained in the Article are according to the current body of science true and accurate;
- c. nothing in the Article is obscene, defamatory, violates any right of privacy or publicity, infringes any other human, personal or other rights of any person or entity or is otherwise unlawful and that informed consent to publish has been obtained for all research participants;
- d. nothing in the Article infringes any duty of confidentiality which any of the Author(s) might owe to anyone else or violates any contract, express or implied, of any of the Author(s). All of the institutions in which work recorded in the Article was created or carried out have authorised and approved such research and publication; and
- e. the signatory (the Author or the employer) who has signed this agreement has full right, power and authority to enter into this agreement on behalf of all of the Author(s).

Cooperation

- a. The Author(s) shall cooperate fully with the Licensee in relation to any legal action that might arise from the publication of the Article and the Author(s) shall give the Licensee access at reasonable times to any relevant accounts, documents and records within the power or control of the Author(s). The Author(s) agree that the distributing entity is intended to have the benefit of and shall have the right to enforce the terms of this agreement.
 - b. The Author(s) authorise the Licensee to take such steps as it considers necessary at its own expense in the name of the Licensee as licence holder, if the Licensee believes that a third party is infringing or is likely to infringe copyright in the Article including but not limited to initiating legal proceedings.
-

Author List

After submission of the agreement signed by the corresponding author, changes of authorship or the order of the authors listed will not be accepted unless formally approved in writing by the Licensee.

Edits & Corrections

The Author(s) agree(s) that the Licensee may retract the Article or publish a correction or other notice in relation to the Article if the Licensee considers in its reasonable opinion that such actions are appropriate from a legal, editorial or research integrity perspective.

Governing Law

This agreement shall be governed by, and shall be construed in accordance with, the laws of England and Wales. The courts of London, UK shall have the exclusive jurisdiction.

Springer Nature Limited. Registered office: The Campus, 4 Crinan Street, London, N1 9XW, UK. Company number 785998.

SPRINGER NATURE

Anexo 4 - Comprovante licence to publish - *Scientific Reports*

nature.com

Licence to publish

Manuscript id:	15fdce58-378a-48c6-9d6d-ba9d3dd13298
Proposed Title:	Study on collagen parameters in vulvar cancer and preneoplastic lesions by Second Harmonic Generation microscopy
The "Author(s)":	Maria das Graças Castor, Leuridan Torres, Roberto José de Mello, Rodrigo Natal, José Vassallo
The "Journal":	Scientific Reports
The "Licensee":	Springer Nature Limited

Licence applicable to the Article: CC BY

The CC BY licence allows readers to copy, distribute and transmit the Article as long as it is attributed back to the author. Readers are permitted to alter, transform or build upon the Article, and to use the Article for commercial purposes. Please read the full licence for further details at - <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

The Licensee will consider publishing this article including any supplementary information and graphic elements therein (e.g. illustrations, charts, moving images) (the 'Article'), including granting readers rights to use the Article on an open access basis under the terms of the stated Creative Commons licence. Headings are for convenience only.

Grant of Rights

Subject to editorial acceptance of the Article, it will be published under the Creative Commons licence shown above. In consideration of the Licensee evaluating the Article for publication, the Author(s) grant the Licensee a non-exclusive, irrevocable and sub-licensable right, unlimited in time and territory, to copy-edit, reproduce, publish, distribute, transmit, make available and store the Article, including abstracts thereof, in all forms of media of expression now known or developed in the future, including pre- and reprints, translations, photographic reproductions and extensions. Furthermore, to enable additional publishing services, such as promotion of the Article, the Author(s) grant the Licensee the right to use the Article (including any graphic elements on a stand-alone basis) in whole or in part in electronic form, such as for display in databases or data networks (e.g. the Internet), or for print or download to stationary or portable devices.

Anexo 5 - Modelo Padrão para o Diagnóstico Histopatológico nas Vulvectomias

Modelo padrão para o diagnóstico histopatológico utilizado para peças cirúrgicas de vulvectomia total ou parcial, pelo laboratório de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco.

VULVA

- Diagnóstico histológico:
- Subtipo histológico:
- Grau histológico (GOG)*
- Grau histológico (Broders)**
- Diâmetro*:
- Espessura*:
- Extensão horizontal da lesão:
- Profundidade da invasão:
- Necrose:
- Invasão vascular:
- Invasão perineural:
- Outros achados microscópicos:
- Margens cirúrgicas:

DISSECÇÃO LINFONODAL

- Linfonodos isolados***:
- Linfonodos acometidos por metástase:
- Tamanho da (maior) metástase:
- Extravasamento capsular:
- Coalescência linfonodal:
-

TNM****

FIGO*****

*NOTA 1 - Graduação histológica de acordo com as diretrizes do Gynecology Oncology Group (GOG);

***NOTA 2 - Graduação histológica baseada nos critérios de Broder: 2011 - Broder Histological Classification. In: Schwab M. (eds) Encyclopedia of Cancer. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011;*

****NOTA 3 - Informação definitiva, após o exame microscópico;*

*****NOTA 4 - Estadiamento patológico de acordo com o American Joint Committee on Cancer - AJCC, 8ª Edição;*

******NOTA 5 - Estadiamento patológico de acordo com as diretrizes da International Federation of Gynecology and Obstetrics - FIGO, 2018.*

Patologista Responsável: Dr. Sérgio R. S. de Moura

+ 55 81 99829 1111

Apêndice 1 - Ficha Clínica

Nome:

Idade:

Registro:

Número do bloco de parafina:

Data do início da doença:

Topografia da lesão:

Diagnóstico histopatológico inicial e data:

Presença de metástase ao diagnóstico: Sim() Não ()

Status linfonodal:

Tratamentos:

Revisão de diagnóstico histopatológico: