

BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA SETORIAL, NO ESTUDO LOGITUDINAL DE LESÕES DE MELANOMA: ESTUDO PILOTO EM CAMUNDONGOS

T. L. Nascimento, A. F. Araújo**, M. B. Grella**, B.L. Diaz** e J.C. Machado****

*Programa de Engenharia Biomédica, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

*** Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

e-mail: telisnac@gmail.com

Resumo: Este trabalho apresenta um estudo piloto para avaliar informações fornecidas pelas imagens ultrassônicas de lesões de melanoma através da Biomicroscopia Ultrassônica Setorial (BMUs) – ultrassom que utiliza altas frequências, 40 MHz. Este estudo utilizou células de melanoma B16F10 em camundongos C57Bl/6. Observou-se desde a precisão da BMUs na injeção guiada destas células na epiderme dos camundongos, até o acompanhamento longitudinal do crescimento dos tumores através desta técnica. Foi possível observar o crescimento pagetóide das células de melanoma, realizar medidas em 2D da superfície das lesões ao longo do tempo e observar o início do crescimento vertical destas lesões. Observou-se a invasão tumoral no tecido circunvizinho. Estes achados foram comparados com as histologias das lesões, posto que, a análise histopatológica, junto à dermatoscopia e regras clínicas de diagnóstico são consideradas padrão ouro para o melanoma. Com estes resultados preliminares pode-se inferir que o BMUs é uma ferramenta útil capaz de fornecer informações relevantes no acompanhamento de nevus de risco e no estadiamento do melanoma.

Palavras-chave: Ultrassom, Biomicroscopia Ultrassônica, Melanoma, Camundongo, Imagens Médicas.

Abstract: *This paper presents a pilot study to evaluate information provided by ultrasonic images of melanoma lesions by sector Ultrasonic Biomicroscopy (sUBM) – an ultrasound system which uses high-frequency, 40 MHz. This study used B16F10 melanoma cells in C57BL / 6 mice. It was observed since the accuracy of BMUs in guided injection of these cells into the mouse epidermis to the longitudinal monitoring of tumor growth through this technique. The results show the accuracy of sBMU guided inoculation; it was possible to observe the pagetoid growth of melanoma cells, to perform measurements of a 2D surface lesion over time and observe the initiation of the vertical growth of such lesions. It was observed tumoral invasion into the surrounding tissue and vasculature of tumors. These findings were compared to the histology of the lesions since the histopathological analysis, along with the*

dermoscopy and clinical diagnostic rules, are considered the gold standard for the melanoma. With these preliminary results it is possible to infer that the sBMU is a useful tool in providing relevant information in monitoring nevus risk and staging of melanoma.

Keywords: *Ultrasound, Ultrasonic Biomicroscopy, melanoma, Mouse, medical image.*

Introdução

O melanoma é a transformação maligna das células de melanócito responsáveis pela pigmentação da pele. O desenvolvimento deste câncer ocorre por ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor, exposição à radiação ultravioleta, dentre outros fatores [1, 2]. A incidência do melanoma está aumentando a cada ano, sendo que a estimativa quanto à ocorrência do melanoma no Brasil para o ano de 2014 é de 2.960 casos para homens e 2.930 casos para mulheres, com maior prevalência em alguns estados do sul do país e em todo o sudeste, tendo um número expressivo no estado de São Paulo com 1.840 casos [3].

Drogas, imunoterapias, vacinas e a combinação de terapias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas no combate ao melanoma em estágio avançado [4]. Entretanto, somente 20% dos pacientes com melanoma em estágio avançado chegam a uma curva de sobrevivência de 5 anos, já pacientes com melanoma “in situ”, descoberto precocemente, tem uma percentagem de vida em 5 anos de 98% a 100% [2]. E por esta razão o diagnóstico precoce no melanoma é muito importante.

Na rotina clínica nevus suspeitos de malignidade são fotografados através da dermatoscopia, que consiste em uma técnica não invasiva que permite a observação de lesões melanocíticas abaixo da epiderme e permite o acompanhamento de lesões em pacientes de alto risco (muitos nevus) através da dermatoscopia digital, [5, 6, 7, 8]. Junto à dermatoscopia faz-se uso das análises clínicas [9, 10] e histopatológicas das lesões biopsiadas que determinam o laudo para este tipo de câncer.

Novas técnicas têm sido desenvolvidas e/ou aplicadas para o diagnóstico do melanoma [11,12] e dentre essas técnicas destaca-se a Biomicroscopia Ultrassônica Setorial (BMUs) que é similar a um

ultrassom convencional, entretanto, utiliza altas frequências (40 – 100 MHz) e é utilizado para análises superficiais como a pele e olhos, alcançando resoluções próximas da microscópica panorâmica, porém com pouca profundidade de penetração [13, 14]. É uma técnica que fornece informações, em tempo real e de forma não invasiva, com excelente resolução. A BMUs vem sendo estudada quanto à capacidade de detectar lesões de pele, como o melanoma [15, 16]. Neste estudo utilizou-se a BMUs para acompanhar a progressão do melanoma em um estudo longitudinal *in vivo* em camundongos. O objetivo, *a priori*, foi validar a técnica da BMUs para detecção precoce do melanoma na UFRJ. *A posteriori* é avançar nos estudos de comparação da progressão tumoral com células em diferentes estágios de malignidade (com quantificação precisa da lesão em 2D e 3D avaliando a lesão conforme o índice de Breslow), fornecer maior precisão à biópsia excisional e identificar através da BMUs o comprometimento do linfonodo sentinela (primeiro sítio de metástase) com auxílio de agentes de contraste (biomarcador ultrassônico) aliados a esta técnica.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação Científica da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número LABCE08-09/13.

Cultura de Células – Cultivaram-se células de melanoma B16F10 em meio DMEM- Alta Glucose (Cultilab, São Paulo, Brasil) suplementado com soro fetal bovino (10%) (Cultilab, São Paulo, Brasil) e 150 U/ml de penicilina e 120 µg/ml de streptomina (Gibco, Invitrogen, CA).

Animais Utilizados – Utilizou-se camundongos fêmeas de 3 meses adquiridos do Laboratório de Animais Transgênicos – BioRio – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Por se tratar de um estudo piloto, utilizou-se uma amostra de 6 animais da linhagem C57Bl/6, sendo 3 experimentais (inoculação de melanoma) e 3 controles (inoculação de solução salina). Durante o estudo os animais permaneceram no Biotério do Centro Nacional de Bioimagem (CENABIO), local de aquisição das imagens de BMUs.

Injeção Guiada pelo BMUs – Os animais foram anestesiados com Isoflurano (Bioquímica, Brasil)/oxigênio (fornecido pela UFRJ), fixados na plataforma, com suas patas presas por fita adesiva. Assepsia de todo o abdômen do animal foi realizada com gaze estéril e álcool 98%. As imagens de BMUs adquiridas com o equipamento Vevo770 (VisualSonics; Canadá). As células B16F10 utilizadas neste experimento foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Injetaram-se 10⁵ células por animal em um volume de 20 µl, e nos animais controle apenas 20 µl de solução salina. No momento da injeção intradérmica, a plataforma com o animal foi inclinada, assim como, o suporte que contém a agulha de insulina até a formação de um ângulo de aproximadamente 10° da agulha em

relação à pele do animal, caracterizando uma injeção intradérmica, Figura 1.

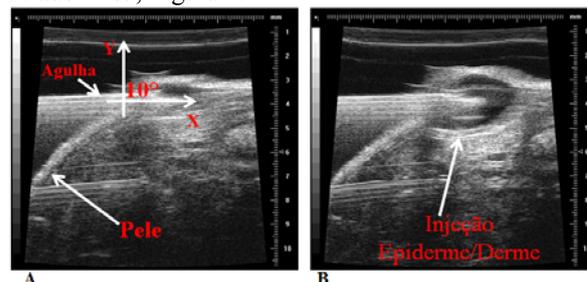


Figura 1 – Injeção Guiada pelo BMUs: (A)- Imagem ilustrando a injeção intradérmica. Agulha de insulina formando um ângulo aproximado de 10° em relação à pele do animal. (B)- Ilustra a introdução do volume de 20 µl de células ou solução salina na epiderme/derme dos animais.

Figura 2 mostra a injeção intradérmica realizada nos animais C57Bl/6. Foram injetadas células de melanoma B16F10 no grupo tratado e solução salina no grupo controle. Esforços foram feitos para realizar injeções somente na epiderme do animal. Entretanto, a epiderme do camundongo é tão fina que a espessura da agulha de insulina utilizada no estudo é maior, e, portanto, a injeção foi feita na superfície da pele do animal entre a epiderme e derme e é possível observar a protuberância do volume final injetado, demonstrando que o volume encontra-se o mais superficial possível, Figura 2B.

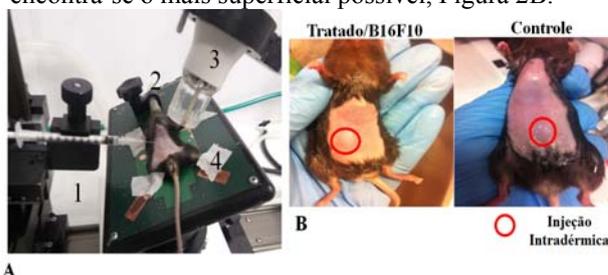


Figura 2 – A Figura 2 mostra a injeção intradérmica nos animais C57Bl/6. (A)- Inclinação da plataforma (4) e do suporte da agulha de insulina (1) formando um ângulo de ± 10° da agulha em relação à pele do animal, que se encontra fixado na plataforma e permanece anestesiado por uma cânula que libera isoflurano/oxigênio (2). A injeção até a camada da epiderme/derme foi guiada pelo BMUs (3); Figura (B) - Ao final da injeção observa-se uma protuberância formada após as injeções nos animais tratados e controles, demonstrando que o volume encontra-se na superfície da pele.

Acompanhamento da progressão tumoral – Após as injeções, todos os animais foram acompanhados nos dias 0, 5, 9, 13, 16, 19 e 20. Nestes dias os animais foram pesados, anestesiados e as lesões analisadas através da BMUs.

Volume tumoral – Foram obtidas as medidas de largura e comprimento das lesões nas próprias imagens de BMUs. Para calcular o volume da massa tumoral, utilizou-se a fórmula (1) [17]:

$$\text{Volume} = \text{largura} \times \text{comprimento}^2 \times \pi/6 \quad (1)$$

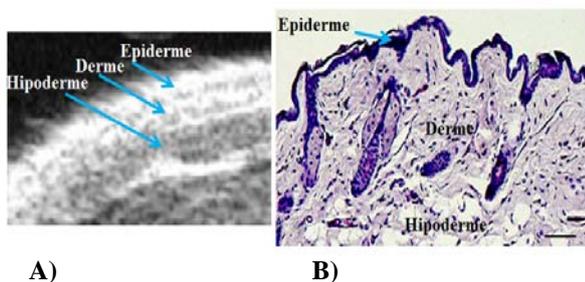
Biópsia Excisional com Auxílio da BMUs – A biópsia excisional consiste na retirada total da lesão. Através das imagens da BMUs foi possível obter uma margem precisa da profundidade da lesão e sua retirada foi realizada com precisão. Dos animais controle retirou-se uma amostra da pele saudável para histologia e comparação com as imagens da BMUs. Essas amostras foram embebidas em formaldeído tamponado a 10%.

Histologia das lesões – Tanto as lesões como amostras da pele saudável foram emblocadas em parafina e cortes de 5 μm foram retirados dos tecidos e colocados em lâminas para a coloração com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência com câmera acoplada (AxioCam HCR, Axioplan, Zeiss, Alemanha).

Resultados

As imagens de BMUs obtidas foram comparadas às imagens histológicas da pele do abdômen dos animais, coradas com H&E, nas mesmas regiões analisadas pela BMUs.

A BMUs mostrou capacidade de visualizar as 3 principais camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e a histologia confirma esse achado, (Figura 3).



A)

B)

Figura 3- Comparação entre imagens ultrassônicas da BMUs com a histologia da pele de um animal controle corada com (H&E). (A)- BMUs ilustra as camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme; (B)- micrografia histológica da pele do animal controle com as principais camadas da pele citadas na Figura (A), (escala da barra 50 μm).

Durante este estudo piloto não se observou diferença significativa entre o peso dos animais controle e tratados ($20,07 \pm 0,421$ g para grupo controle e $20,53 \pm 0,386$ g para o grupo tratado). Para análise do peso entre os dois grupos; foi utilizado o teste *t Student*. Avaliou-se o aumento do volume da massa tumoral, num intervalo de tempo de 20 dias. Observou-se que as lesões tiveram um crescimento semelhante até o 13º dia. Após este período os tumores apresentaram diferença no volume do tumor sem significância estatística ($p=0,186$, *Wilcoxon signed rank test*). Para ambas as análises estatísticas utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5*.

Os animais foram sacrificados após os 20 dias de acompanhamento exceto o animal 3, que desenvolveu uma massa tumoral bastante ulcerada e teve morte natural horas antes de finalizar os experimentos. As imagens ultrassônicas foram adquiridas ao longo do tempo. Na Figura 4 observa-se uma lesão no último dia de análise.

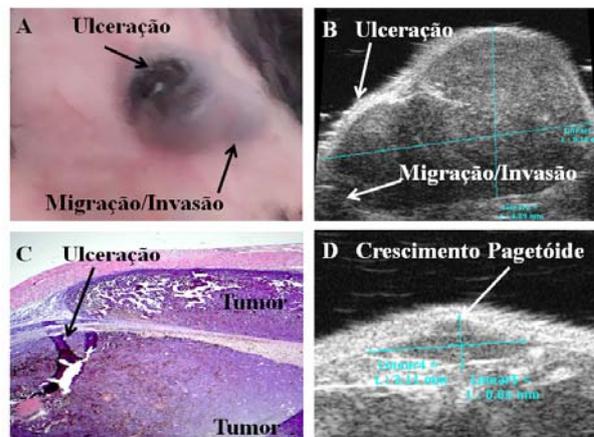


Figura 4 – (A) Fotografia da Lesão apresentando um melanoma com ulceração, irrigação de vasos ao redor da lesão e invasão do tecido circunvizinho; (B) Imagem de BMUs ilustrando a ulceração com aumento da ecogenicidade da imagem, a invasão das células no tecido circunvizinho mostrando o rompimento do encapsulamento da lesão e as células migrando, e as medidas em 2D utilizadas para cálculos de volume; (C)- Histologia da lesão mostrando imagem similar à BMUs da imagem B; (D)- Imagem da BMUs apresentando o crescimento pagetóide da lesão quando comparado com (B) com (D).

Discussão

O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele. Quando diagnosticado precocemente apresenta grande chance de cura e/ou melhor, resposta às terapias. Em estágio avançado as terapias não têm sido satisfatórias para este câncer. Daí o empenho no desenvolvimento de técnicas que possam diagnosticar o melanoma ainda em estágios iniciais.

Como mostra a Figura 1, a injeção guiada pela BMUs que forneceu maior precisão para inserir o volume de células entre a epiderme e derme papilar, pois não foi possível aplicar uma injeção atingindo somente a epiderme. A espessura da epiderme é cerca de $\pm 0,20$ mm [18] e há uma barreira entre a epiderme e derme, chamada zona de membrana basal, formada por proteínas intra e extracelulares que ligam os queratinócitos da epiderme com as proteínas da derme. Portanto, volumes introduzidos na epiderme devem também estar presentes na derme papilar por interação dessas proteínas. A injeção intradérmica, conforme previsto teoricamente, foi realizada formando um ângulo de $\pm 10^\circ$ da agulha em relação à pele do animal, ocasionando uma protuberância do volume injetado, (Figura 2). Durante o estudo longitudinal observou-se o crescimento pagetóide do melanoma (Figura 4), pois

após injeção as células migraram até a camada basal, (Figura 4D) e cresceram para cima até a superfície da pele, (Figura 4B). Com a progressão tumoral essas células adotam um crescimento vertical (Figura 4A e 4B), [19]. Já em estágio avançado do crescimento observam-se vasos ao redor da massa tumoral ulcerada, (Figura 4A). A BMUs possibilitou distinguir as três principais camadas da pele como mostra a Figura 3. Este resultado tem relevância quando se deseja avaliar qual camada da pele o melanoma já atingiu. As lesões apresentaram similaridade no crescimento da massa tumoral, até o 13º dia. Após observou-se diferenças no crescimento das lesões (não estatisticamente significativa), tendo como causa fatores diversos, tais como, imunológicos, diferenças no número de células injetadas ou maior malignidade de uma subpopulação de células em um tumor quando comparado a outro. O peso dos animais foi acompanhado ao longo do estudo, sem apresentar diferença estatisticamente significativa. Após esse estudo piloto, serão direcionados esforços para análises mais refinadas utilizando marcadores específicos envolvidos na tumorigênese e malignidade no melanoma, tal como análise prévia do linfonodo sentinela (primeiro sítio de metástase em tumores sólidos). Estes marcadores poderão ser visualizados porque estarão aliados à agentes de contraste (marcador ultrassônico que aumenta a ecogenicidade da imagem ultrassônica), inferindo positividade na expressão de determinadas proteínas.

Conclui-se que a BMUs pode fornecer em tempo real informações relevantes quanto ao estadiamento do melanoma ao longo do tempo e de forma precoce devido à sua alta resolução.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES E FAPERJ pelo apoio financeiro, os alunos Guilherme Brasil e Danúbia Santos pelo apoio no experimento inicial de injeção guiada pela BMUs e a Carolina Batista, biomédica, responsável pelo Departamento de Histologia do CCS, que nos auxiliou com as histologias.

Referências

- [1] Kubo Y, Matsudate Y, Fukui N, Nakasuka A, Sogawa M, Oshima M, Mizutani T, Otsu M, Murao K, Hashimoto I. Molecular tumorigenesis of the skin. *J Med Invest.* 2014; (4): p.7-14.
- [2] Donald W, Shenberger CDR. Cutaneous Malignant Melanoma: A Primary Care Perspective. *Am Fam Physician.* 2012; (2): p.161-168.
- [3] Instituto Nacional do Câncer. 2014. Site: www2.inca.gov.br; acessado em 30/05/2014.
- [4] Saraceni MM, Khushalani NI, Jarkowski III A. Immunotherapy in Melanoma: Recent Advances and Promising New Therapies. *J. Pharm Practice.* 2014; p.1-11. [Epub ahead of print]
- [5] Gurfinkel PC, Campos-do-Carmo G, Ishida CE, Piñeiro-Maceira J, Valiante PM, Ramos-E-Silva M. A lesion suspected of melanoma by dermoscopy: we must trust this diagnostic tool. *J Dermatol Case Rep.* 2013; (3): p.88-92.
- [6] Scott W, Menzies MBBS. Evidence-Based Dermoscopy. *Dermatol Clin.* 2013; (4): p.521-524.
- [7] Chernoff KA, Marghoob AA, Lacouture ME, Deng L, Busam KJ, Myskowski PL. Dermoscopic Finding in Cutaneous metastases. *JAMA Dermatol.* 2014; (4):p.429-433.
- [8] Kraus SL, Haenssle HA. Early detection of cutaneous melanoma by sequential digital dermatoscopy (SDD). *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013; (6): p.509-512.
- [9] Goldsmith SM, Solomon AR. A serie of melanomas smaller than 4 mm and implications for the ABCDE rule. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; (7): p. 929-934.
- [10] Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW, Polsky D. ABCDE – An involving Concept in the early detection of melanoma. *Arch Dermatol.* 2005; (8): p.1032-34.
- [11] Kardynal A, Olszewska M. Modern non-invasions diagnostic techniques in the detection of early cutaneous melanoma. *J Dermatol Case Rep.* 2014; (1): p.1-8.
- [12] Marc AL, Boone M, Norrenberg S, Jemec GBE, Marmol VD. High-definition optical coherence tomography imaging of melanocytic lesions- a pilot study. *Arch Dermatol Res.* 2014; (1): p.11-26.
- [13] Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, Liu G, Mehi J, Cherin E, Harasiewicz KA, Starkoski BG, Zan L, Knapik DA, Adamson SL. In vivo ultrasound biomicroscopy in developmental biology. *Ultrasound Med Biol.* 2002; (9): p.1165-1172.
- [14] Foster FS, Zhang MY, Zhou YQ, et al. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med Biol.* 2002; (28): p.1165-1172.
- [15] Turnbull DH, Starkoski BG, Harasiewicz KA, Semple JL, From L, Guta AK, Sauder DN, Foster FS. A 40-100 MHz B-Scan ultrasound backscatter microscope for skin imagin. *Ultrasound Med Biol.* 1995; (1): p.79-88.
- [16] Szymańska E, Nowicki A, Mlosek K, Litniewski J, Lewandowski M, Secomski W, Tymkiewicz R. Skin imaging with high frequency ultrasound-preliminary results. *Eur J Ultrasound.* 2000; (1): p.9-16.
- [17] Alison M, Cheung Y, Brown AS, Hastie LA, Cucevic V, Roy M, Lacefield JC, Fenster A, Foster FS. Three-Dimensional ultrasound biomicroscopy for xenograft growth analysis. *Ultrasound Med Biol.* 2005; (6): p.865-870.
- [18] Turnbull DH, Ramsay JA, Shivji GS, Bloomfield TS, From L, Sauder DN, Foster FS. Ultrasound Backscatter microscope analysis of mouse melanoma progression. *Ultrasound Med Biol.* 1996; (7): p.845-853.
- [19] Hurwitz RM. Atypical or typical pagetoid cell: a subtle clue to differentiate a melanoma from a melanocytic nevus. *Dermatol Pract Conc.* 2013; (2): p.3.