

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

INGRID MICHELLE FONSECA DE SOUZA

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PELE FETAL AO NASCIMENTO COMO
MARCADOR DA CRONOLOGIA GESTACIONAL**

Belo Horizonte – Minas Gerais

2020

INGRID MICHELLE FONSECA DE SOUZA

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PELE FETAL AO NASCIMENTO COMO
MARCADOR DA CRONOLOGIA GESTACIONAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Perinatologia

Linha de pesquisa: Tecnologia aplicada a saúde da mulher

Orientadora: Profa. Dra. Zilma Silveira Nogueira Reis

Coorientador: Prof. Marcelo Vidigal Caliari

Belo Horizonte – Minas Gerais

2020

Souza, Ingrid Michelle Fonseca de.
SO729a Análise Morfométrica da pele fetal ao nascimento como marcador da
cronologia gestacional [manuscrito]. / Ingrid Michelle Fonseca de Souza. --
Belo Horizonte: 2020.
161f.: il.
Orientador (a): Zilma Silveira Nogueira Reis.
Coorientador (a): Marcelo Vidigal Caliari.
Área de concentração: Perinatologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Pele. 2. Idade Gestacional. 3. Nascimento Prematuro. 4. Derme. 5.
Análise Estatística. 6. Dissertação Acadêmica. I. Reis, Zilma Silveira
Nogueira. II. Caliari, Marcelo Vidigal. III. Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WA 950

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

FOLHA DE APROVAÇÃO

VIA DO ALUNO ENTREGAR SOMENTE SE O ALUNO FOR APROVADO	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER	UFMG
---	---	-------------

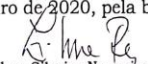
FOLHA DE APROVAÇÃO

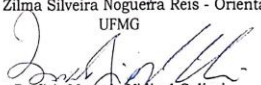
ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA PELE FETAL AO NASCIMENTO COMO MARCADOR DA CRONOLOGIA GESTACIONAL

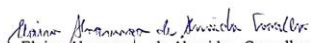
INGRID MICHELLE FONSECA DE SOUZA

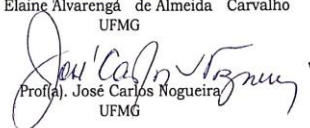
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PERINATOLOGIA.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Zilma Silveira Nogueira Reis - Orientador
UFMG


Prof(a). Marcelo Vidigal Caliani
UFMG


Prof(a). Elaine Alvarenga de Almeida Carvalho
UFMG


Prof(a). José Carlos Nogueira
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.



Scanned with
CamScanner

AGRADECIMENTO

A Deus por me mostrar sempre quais caminhos devo seguir. Por me fortalecer e ensinar o dom da resiliência, por me sustentar e estar sempre ao meu lado. A a ele toda honra e glória.

A minha mãe, meu infinito agradecimento. É por você!!

A minhas amigas, pelo companheirismo, amizade, apoio e compreensão. Obrigada por estarem a meu lado.

A professora Zilma Reis, minha orientadora, amiga, segunda mãe, por sempre estar disponível e disposta a me ajudar. Obrigada por estar ao meu lado e acreditar em mim.

Ao professor Marcelo, meu coorientador obrigada por estar sempre disponível e disposto a me ajudar. Obrigada por acreditar em meu potencial.

Ao Juliano, meu amigo, companheiro nesses anos todos, meu infinito agradecimento.

Ao Marcus profissional do necrotério, pela paciência e apoio profissional.

Agradeço também a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ninguém vence sozinho!

Obrigada a todos!

**“Quando se sonha sozinho é apenas
um sonho. Quando se sonha juntos, é
o começo da realidade.”**

Miguel de Cervantes

RESUMO

Introdução: A maturação funcional e estrutural da pele é um potencial marcador para a datação da cronologia da gravidez. Ela é o resultado de um processo dinâmico, que começa durante a embriogênese e termina no primeiro ano de vida. Já é de conhecimento que existe uma associação entre o desenvolvimento da barreira protetora epidérmica e a sobrevivência neonatal. Apesar da importância da análise morfométrica da pele para aplicações clínicas em neonatologia, pouco são os estudos a respeito da evolução cronológica destas medidas ao longo da gestação, principalmente pelas limitações na obtenção do espécime.

Objetivo: Avaliar a relação entre a espessura e a quantidade de tecido conjuntivo fibroso da derme, áreas de glândulas, em pele de recém-nascido com a cronologia da gravidez.

Metodologia: Estudo observacional transversal, no qual medidas da espessura da pele foram obtidas por meio de biopsias em 35 conceitos com idade gestacional entre 20 e 42 semanas gestacionais. Os critérios de inclusão foram: existência de ultrassonografia obstétrica precoce na gravidez antes de 14 semanas de idade gestacional (IG) e um intervalo máximo de 48 horas entre a morte e a biopsia de amostra de pele. As regiões biopsiadas foram: a pele do dorso da mão, sola do pé e periumbilical. As lâminas histológicas foram coradas por tricrômico de Gomori. As dimensões das camadas da pele foram mensuradas com o apoio do *software* de análise de imagens KS300. A análise estatística determinou dimensões das camadas da pele e a sua variabilidade, comparação entre regiões do corpo e calculou a correlação entre as características morfométricas da pele com a IG.

Resultados: A espessura da pele foi semelhante no dorso da mão e na sola do pé: estrato córneo ($p = 0,707$), epiderme ($p = 0,618$) e derme ($0,977$). No entanto, a pele estava mais fina no abdômen quando comparada à mão ($p = 0,002$; $p < 0,001$; $p = 0,002$) e sola do pé ($p = 0,002$; $p < 0,001$; $p = 0,002$), respectivamente para cada camada. A melhor correlação entre a IG e as características morfométricas da pele foi com a camada epidérmica sob a palma da mão ($r = 0,867$, $p < 0,001$). A quantidade de tecido conjuntivo fibroso apresentou correlação fraca com a IG: $r = 0,518$ $p = 0,014$ na mão, $r = 0,538$ $p = 0,071$ no abdômen $r = -0,266$ $p = 0,189$ na sola do pé. Foi observada alta correlação entre a espessura da epiderme, da derme e a área das glândulas sebáceas na pele do abdômen com a IG ($r = 0,99$, $p < 0,001$).

Conclusão: O estudo sinaliza uma nova oportunidade para correlacionar a idade gestacional com as camadas da pele neonatal ao nascimento. E essa relação poderá se constituir em uma importante ferramenta para auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias para determinar a IG com elevada acurácia, revelando o momento do óbito no ciclo gestacional, especialmente quando a cronologia da gravidez é desconhecida.

Palavras-chaves: Pele; Morfometria; Maturação da pele; Estrutura da pele; Idade gestacional; Nascimento prematuro

ABSTRACT

Introduction: *Functional and structural maturation of the skin is a potential marker for dating the chronology of pregnancy. It is the result of a dynamic process, which begins during embryogenesis and ends in the first year of life. It is already known that there is an association between the development of the epidermal protective barrier and neonatal survival. Despite the importance of morphometric analysis of the skin for clinical applications in neonatology, there are few studies regarding the chronological evolution of these measures during pregnancy, mainly due to the limitations in obtaining the specimen.*

Objective: *To evaluate the relationship between the thickness and the amount of fibrous connective tissue, areas of the newborn's skin glands with the pregnancy chronology.*

Methodology: *cross-sectional observational study, in which skin thickness measurements were obtained by means of biopsies in 35 dead bodies with gestational age between 20 and 42 gestational weeks. Inclusion criteria were: existence of early obstetric ultrasound in pregnancy before 14 weeks of gestational age (GA) and a maximum interval of 48 hours between death and skin sample biopsy. The biopsied regions were: the skin on the hand, sole of the foot and abdômen. The dimensions of the skin layers were measured with the support of the KS300 image analysis software. The histological slides were stained by Gomori's trichrome. The statistical analysis determined the dimensions of the skin layers and their variability, comparison between regions of the body and calculated the correlation between the morphometric characteristics of the skin and the GA.*

Results: *The thickness of the skin was similar on the hand and on the sole of the foot: stratum corneum ($p = 0.707$), epidermis ($p = 0.618$) and dermis (0.977). However, the skin was thinner on the abdomen when compared to the hand ($p = 0.002$; $p < 0.001$; $p = 0.002$) and sole of the foot ($p = 0.002$; $p < 0.001$; $p = 0.002$), respectively for each layer. The best correlation between GI and skin histomorphometric characteristics was with the epidermal layer on the palm ($r = 0.867$, $p < 0.001$). The amount of fibrous connective tissue showed a weak correlation with GA: $r = 0.518$ $p = 0.014$ in the hand, $r = 0.538$ $p = 0.071$ in the abdomen $r = -0.266$ $p = 0.189$ for the sole. A strong correlation was observed between the thickness of the epidermis, the dermis and the area of the sebaceous glands in the skin of the abdomen with GA ($r = 0.99$, $p < 0.001$).*

Conclusion: *The study signals a new opportunity to correlate gestational age with the layers of neonatal skin at birth. And this relationship could be an important tool to assist in the development of new technologies to determine GA with high accuracy, revealing the moment of death in the gestational cycle, especially when the chronology of pregnancy is unknown.*

Keywords: *Pele; Histological techniques; Skin maturation; Skin structure; Gestational age; Premature birth*

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura	1	-	Desenvolvimento	epidérmico	
					24
Figura 2	-	Imagem histológica da pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais.....			29
Figura 3	-	Espessura das camadas da pele no decorrer da idade gestacional.....			32
Figura 4	-	Etapas do processo para determinação da idade gestacional por meio de um modelo de predição ajustado a partir de variáveis extraídas da histomorfometria da pele.....			40
Figura 5	-	Demarcação dos locais preferenciais para realização da biópsia de pele.....			42
Figura 6	-	Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.....			43
Figura 7	-	Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.....			44

Figura 8 - Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.....45

Figura 9 - Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.....45

ARTIGO CIENTÍFICO I

Figure 1 - Flow diagram of systematic review
.....55

ARTIGO CIENTÍFICO II

Figura 1 - Pele neonatal com medidas da camada dérmica de um neomorto de 40 semanas gestacionais sob a superfície plantar do pé.....78

Figura 2 - Diagrama do fluxograma com o detalhamento das imagens analisadas, de acordo com as partes do corpo biopsiadas.....81

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Elementos essenciais da Tecnologia NI 110/2019.....	106
---	-----

ARTIGO CIENTÍFICO I

Table 1 - Study characteristics and histological methods of sample preparation and the skin thickness measurement	56
--	----

Table 2 - Skin thickness variation of skin of newborns analyzed in the articles	59
--	----

ARTIGO CIENTÍFICO II

Tabela 1 - Características clínicas dos natimortos e neomortos avaliados.....	82
--	----

Tabela 2 - Dimensões das camadas da pele de recém-nascidos mortos, segundo locais avaliados.....	83
---	----

Tabela 3 - Concentração de tecido fibroso e glândulas na pele de neonatos, por local
avaliado.....85

Tabela 4 - Análise da correlação entre a morfometria da pele e a idade
gestacional.....87

LISTA DE QUADROS

DISSERTAÇÃO

Quadro 1 - Embriologia da pele humana em semanas
gestacionais.....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DISSERTAÇÃO

IG	Idade gestacional
DUM	Data da Última Menstruação
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
SISMater®	Sistema de Informação sobre Saúde Materno-Neonatal
IQR	Intervalo Interquartil
IC	Intervalo de Confiança
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
µm	Micrômetro

ARTIGO CIENTÍFICO I

BVS	<i>Virtual Health Library</i> - Biblioteca virtual em Saúde
µm	<i>Micrometer</i> - micrômetro
HE	<i>Hematoxylin and Eosin</i> - Hematoxina e Eosina
PAS	<i>Periodic acid–Schiff</i> - Ácido periódico – Schif

ARTIGO CIENTÍFICO II

IG Idade gestacional

IQR Intervalo Interquartil

IC Intervalo de Confiança

DP Desvio Padrão

µm Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Desenvolvimento da pele.....	22
2.2. Pele	27
2.2.1. Epiderme.....	28
2.2.2. Derme	29
2.2.3. Hipoderme	30
2.3. Pele do neonato.....	30
2.4. Espessura da pele do recém-nascido.....	31
2.5. Métodos de avaliação da espessura da pele.....	32
2.5.1. A espessura das camadas da pele.....	32
2.5.2. A quantificação do tecido conjuntivo fibroso da pele	33
2.6. A datação da gravidez pela histologia da pele.....	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo principal	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. METODOLOGIA.....	37
4.1. Delineamento do estudo e aspectos éticos.....	37
4.2. Critérios de elegibilidade.....	37
4.3. Coleta de dados clínicos	38
4.4. Coleta e preparação das amostras de pele fetal e neonatal	39

4.4.1. Escaneamento digital e análise das imagens.....	40
4.5. Medida da espessura da pele.....	40
4.5.1. Medida área de tecido conjuntivo fibroso dérmico e glândulas.....	42
4.6. Cálculo estatístico.....	44
4.7. Instalações, equipamentos e fontes de financiamento	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Artigo científico I	46
5.2. Artigo científico II.....	70
6. DISCUSSÃO	106
7. CONCLUSÕES.....	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
9. APÊNDICES E ANEXOS.....	119
9.1. Parecer de aprovação do Comitê de ética em pesquisa	119
9.2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	120
9.3. Base de Dados para coleta das biopsias.....	123
9.4. Processamento das amostras.....	130
9.5. Método de Coloração de Tricrômico de Gomori.....	131
9.6. Protocolo de Medidas	133
9.7. Mensuração da área do tecido Conjuntivo Fibroso	137
9.8. Mensuração das Glândulas Sudoríparas	143
9.9. Mensuração das Glândulas Sebáceas.....	147
9.10. Mensuração da área da derme e Hipoderme	151

9.11. Memória do Cálculo Amostral	154
9.12. Análise Parcial De Viabilidade De Proteção Patentária	155

1. INTRODUÇÃO

A cronologia gestacional é o principal marcador de sobrevivência do recém-nascido¹. O conhecimento da idade gestacional (IG) confiável permite que a gravidez seja conduzida de maneira adequada, além de auxiliar nas intervenções apropriadas para prover o melhor cuidado neonatal^{2,3}. Além disso, é a base para o cálculo da incidência de prematuridade, orientando diretamente as políticas públicas para saúde materno-infantil em todo mundo⁴. Incertezas na cronologia da gestação são situações de risco potencial para o sucesso da gravidez⁵ e constituem-se num desafio para os atuais métodos de estimativa da IG, por suas limitações de acesso, custo e acurácia^{6,7}.

A indeterminação na cronologia da gravidez inicia-se com a ausência de um referencial clínico ou mesmo bioquímico para a fecundação. Além disto, a duração da fase folicular do ciclo menstrual varia entre as mulheres⁸ que muitas vezes desconhecem a data da sua última menstruação (DUM)⁹. A IG determinada por ultrassonografia, realizada no primeiro trimestre gestacional, é o referencial mais preciso para cronologia da gestação ao nascimento¹⁰, mas nem sempre está disponível¹¹. Os métodos atuais de datação pós-nascimento que utilizam a avaliação neurológica neonatal são subjetivos e dependentes da experiência do profissional de saúde¹². Essas incertezas constituem um obstáculo para os atuais métodos de avaliação da IG, mas também estimulam o desenvolvimento de novas tecnologias, mais acessíveis para datação da gravidez¹³.

Modificações visíveis ao exame clínico da pele do recém-nascido e também em estudo histológico desse órgão v demonstram que a maturação funcional e estrutural da pele é um marcador potencial da cronologia da gravidez¹⁴. A maturação da pele é o resultado de um processo dinâmico, que começa durante a embriogênese e termina no primeiro ano de vida^{14,15}. É fato que a medida da espessura da pele é um parâmetro importante que reflete indiretamente o seu estado de maturidade e o quanto o recém nascido estará preparado para adaptar-se ao ambiente externo¹⁶. Estudos invasivos da pele são indispensáveis em situações onde a histologia é o padrão-ouro para validação, como em exames de imagem e diagnóstico de doenças cutâneas¹⁷. Apesar da importância do conhecimento da espessura da pele para neonatologia e suas aplicações clínicas, poucos são os estudos a respeito das relações entre a morfometria da pele humana durante a gestação ou no período do nascimento, pelas limitações na obtenção do espécime e domínio técnico necessário¹⁸.

Esta dissertação se insere na linha de pesquisa Tecnologia Aplicada a Saúde da Mulher na área de concentração Perinatologia do Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da UFMG. Faz parte de um projeto de pesquisa chamado *Light Scan Skin Age*, que foi contemplado com financiamento da Fundação Bill e Melinda Gates, vencedor da 14ª rodada do *Grand Challenges Exploration*, em 2015. O projeto como um todo vem sendo desenvolvido desde então por um grupo interdisciplinar de pesquisadores envolvendo a ciência da saúde e as ciências básicas no estudo das características fisiológicas, biofísicas e óticas da pele humana, no período neonatal. O objetivo é desenvolver um novo método de estimativa da IG ao nascimento que afere as modificações cronológicas do tecido através de um dispositivo optoeletrônico de baixo custo. Para isso, um fotômetro que avalia a reflexão da pele do neonato à luz foi desenvolvido e está na fase de teste no Brasil e África.

Para que esse dispositivo tenha a precisão pretendida na determinação da IG outros estudos complementares sobre a pele neonatal estão em andamento sob a responsabilidade desse grupo, sendo a presente dissertação uma contribuição para o aprimoramento desta tecnologia. Sou biomédica com habilitação em Análises Clínicas pelo Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix e Pesquisadora do Núcleo de Pesquisa de Informática em Saúde pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Aceitei o desafio de participar deste projeto de pesquisa em 2015. Desde então dedico-me a entender, conhecer e explorar vivências como pesquisadora. Ao longo desses anos trabalhando no projeto, deparei-me com situações que nunca imaginaria passar, experiências reais e incríveis. Hoje, vejo que o mais importante para ser uma pesquisadora é ter sensibilidade às causas que desafiam a meta da saúde para todos, trazendo como leme o benefício que se pode trazer através da ciência, para quem realmente precisa de soluções efetivas para o cuidado à saúde. Trabalho com uma equipe multidisciplinar de grandes e experientes pesquisadores. Pessoas que me inspiram todos os dias. Hoje mais do que nunca acredito que terei um bom futuro seguindo carreira acadêmica. Acredito fielmente que este projeto preencheu lacunas da minha formação e espero conseguir enfrentar todos os desafios que a ele me comprometi.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento da pele

A pele constitui-se da justaposição de dois folhetos embrionários principais: a epiderme, originada da área superficial da gástrula precoce, e o mesoderma, que é situado em contato com a superfície interna da epiderme durante a gastrulação. O mesoderma não só origina a derme, mas também é essencial para induzir a diferenciação das estruturas epidérmicas, como folículos pilosos e glândulas¹⁹. A proliferação e diferenciação do ectoderma embrionário em camadas, é o que irá resultar nas propriedades e funcionalidades da pele adulta²⁰.

As queratinas são uma família de proteínas insolúveis em água que constituem filamentos intermediários de tamanho médio (IFs or 10-nm) em células epiteliais ²¹. Esses remontam de subunidades desnaturadas em IFs aparentemente autênticos. Os Filamentos são composto por vários subconjuntos de uma família de cerca de 20 polipeptídeos variando em peso molecular de 40 a 70 kDa e com valores de pH isoelétricos de 5 a 8 ²¹.

A expressão das queratinas na epiderme é potencialmente capaz de inferir fases evolutivas do desenvolvimento intrauterino da pele humana. Características estruturais da epiderme permitem identificar períodos com graus de maturidade progressivos²² que estão resumidos na Figura 1.

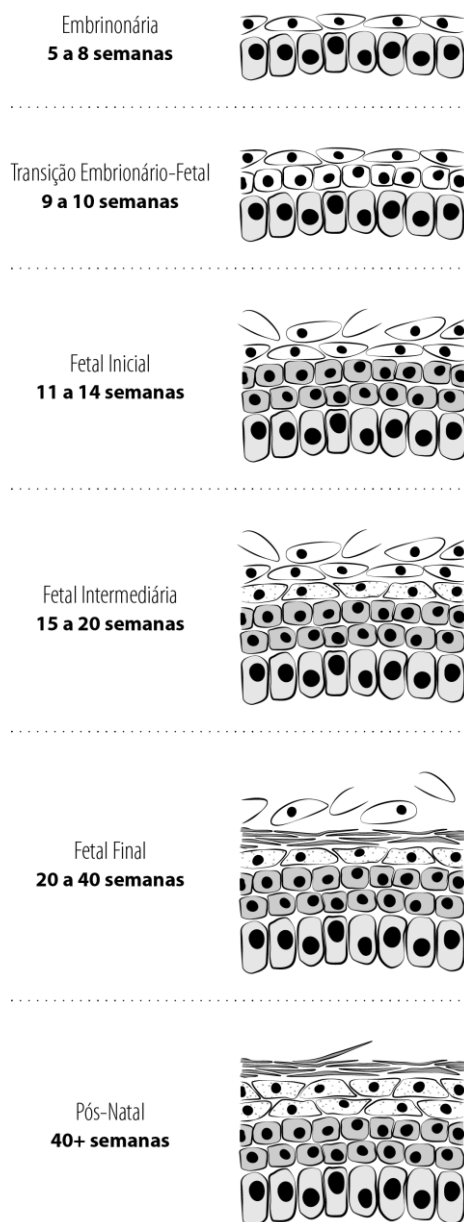


Figura 1 - Desenvolvimento epidérmico: 5ª 8 semanas: Presença da periderme e estrato basal; 9 a 10 semanas: Aparecimento de uma nova camada intermediária entre a periderme e o estrato basal; 11 a 14 semanas: Formação de uma ou mais camadas intermediárias; 15 a 20 semanas: Formação de mais uma camada intermediária da epiderme; 20 a 40 semanas:

A periderme se perde e surge o estrato córneo; 40 + semana: A estratificação da epiderme esta completa. Fonte: Imagens da coleção do Projeto Skinage.

A partir de 24 semanas, a epiderme interfolicular de quase todas as regiões do corpo já é queratinizada. Além disto, a expressão de queratinas de 50 a 58kD precedem a estratificação, enquanto que a expressão das queratinas de 56,5 a 67kD precedem a queratinização²².

Estudos experimentais sugerem que após 24 semanas gestacionais a pele quando lesada se recupera sem cicatrizes, mas não é capaz de reconstituir os apêndices dérmicos²³. Outra constatação importante para estudos futuros é que não existem queratinas exclusivas da vida fetal, uma vez que as várias queratinas encontradas em tecidos adultos são também identificadas no feto²².

O desenvolvimento das camadas da pele é um processo contínuo que começa no início da gestação e está diretamente relacionado à IG²³. A sequência evolutiva das camadas da pele durante a cronologia da gestação é resumida no quadro 1.

Quadro 1: Embriologia da pele humana em semanas gestacionais

1º semana	Fertilização ²⁴ .
2º semana	Formação do disco bilaminar (epiblasto e hipoblasto) ^{24,25} .
3º semana	Aparecimento da epiderme primitiva apresenta uma única camada de células epiteliais achatadas ²⁶ . Surgimento do disco embrionário trilaminar (ectoderma, endoderma e mesoderma) ^{24,25} .
4º semana	Presença de células basais ou germinativas ^{23,26} . Aparecimento da periderme ²³ . A derme e o tecido subcutâneo não são distinguíveis ¹⁹ .
6º semana	Duas camadas de células são distinguidas, a periderme e o estrato basal ²⁶ .

7º semana	Tecido subepidérmico é organizado em uma rede celular aberta, desprovida de matriz fibrosa ²⁷ .
8º semana	Surgimento da membrana basal que separa a epiderme da derme ²⁶ .
9º semana	Início da queratinização ²³ .
10º semana	Aparecimento das proteínas hemidesmossomais e desmossomos nos queratinócitos basais ¹⁹ . Formação inicial da glândula sudorípara merocrina, apenas na região plamar e plantar ^{19,26} .
11ª semana	Aparecimento de uma nova camada intermediária ¹⁹ entre a camada basal e a periderme ^{26,28} . Aparecimento da derme ^{26,27} .
12º semana	Presença de uma ou mais camadas intermediárias ¹⁹ . Fibroblastos produzem feixes de colágeno ^{26,29} .
13º semana	Formação de uma nova camada intermediária ²³ . Formação inicial das glândulas sebáceas ^{19,26} . Formação inicial das glândulas sudoríparas apócrinas ²⁶ . Início da organização do tecido subcutâneo ²⁷ .
14º semana	Brotamento das células da camada basal ³⁰ . Início da queratinização folicular ²² . Formação dos folículos capilares ²³ .
15º semana	Aparecimento da proteína filagrina ¹⁹ .
16º semana	As células mesenquimais são vistas associadas à gema da epiderme ^{23,30} . As camadas papilar e reticular da derme começam a se distinguir ²⁶ .
17º semana	Alongamento dos folículos pilosos ^{23,30} . Aparecimento da camada adiposa ²⁷ .
18º semana	Alongamento do folículo piloso (Fios capilares visíveis) ^{23,30} .
20º semana	Formação das glândulas sudoríparas écrinas, no restante do corpo ²³ .
21º semana	Surgimento de grânulos de querato-hialina na camada intermediária ^{19,26} .
22º semana	As papilas tornam-se reconhecíveis na superfície dos dedos ²⁶ . Pêlos expostos à superfície da pele ²⁸ .
24º semana	Início da queratinização interfolicular ²² . As células da periderme são descartadas no líquido amniótico junto com lanugo, sebo e outros materiais ^{19,26} . Fibroblastos produzem fibras elásticas ²⁶ .
28º semana	Formação da unidade do pelo ²⁶ .
30º semana	As glândulas sudoríparas écrinas continuam a se alongar e enrolar ²³ .
34º semana	A maturação epidérmica está completa ¹⁴ .

35° Amadurecimento das fibras elásticas³¹.
semana:

Fonte: Adaptada pelo autor, a partir de revisão da literatura

A estrutura altamente organizada e complexa do revestimento epitelial e sua funcionalidade são gradativamente adquiridas na vida extrauterina²². A barreira inicial da pele embrionária, a periderme se forma a partir do contato da camada primitiva de pele com o líquido amniótico, estimulando sua estratificação. A periderme é perdida antes do nascimento, ao mesmo tempo em que se forma o estrato córneo³². A funcionalidade da barreira córnea, entretanto, só será atingida após a completa diferenciação da epiderme. Excluindo-se a periderme, a análise comparativa da expressão de queratinas em adultos e durante o desenvolvimento fetal sugere que as camadas da epiderme são similares neste aspecto²⁵. Interações entre o mesênquima e o ectoderma controlam a formação e localização de anexos como pelos, glândulas, unhas²⁰.

A filagrina é uma proteína responsável pela fixação da queratina nas camadas superiores da pele, junto a outras proteínas, formando a camada córnea, sendo considerada de grande importância na regulação da barreira epidérmica³³. Na vida intrauterina associa-se à estruturação e maturação funcional da pele. Em adultos, está associada ao processo de envelhecimento e enrugamento da pele³³.

O queratinócito, é o principal tipo de célula epidérmica que se envolve em um processo estritamente regulado de diferenciação terminal, essencial para a barreira protetora da pele e refletido in vivo pela estrutura subcamadas da epiderme³⁴. O estrato basal, camada mais interna que esta conectada á derme, compreende queratinócitos indiferenciados com alto

potencial proliferativo. As células comprometidas com a diferenciação terminal migram para o exterior para as camadas suprabasais não-divisórias e sofrem alterações morfológicas e estruturais distintas³⁴.

2.2. Pele

A pele é um órgão complexo e dinâmico¹⁴, sendo considerado o maior órgão do corpo humano^{26,35,36}, que desempenha varias funções vitais¹⁴. Quando bem diferenciada, provê uma barreira física e imunológica essencial à sobrevivência. Graças à queratina, ela protege o organismo contra dessecação, agressões diversas e atrito. Possui também funções sensoriais, reguladoras da temperatura e biossintéticas²⁰. É composta pela epiderme, derme²⁶ e o tecido subcutâneo²⁹ como mostra a figura 2.

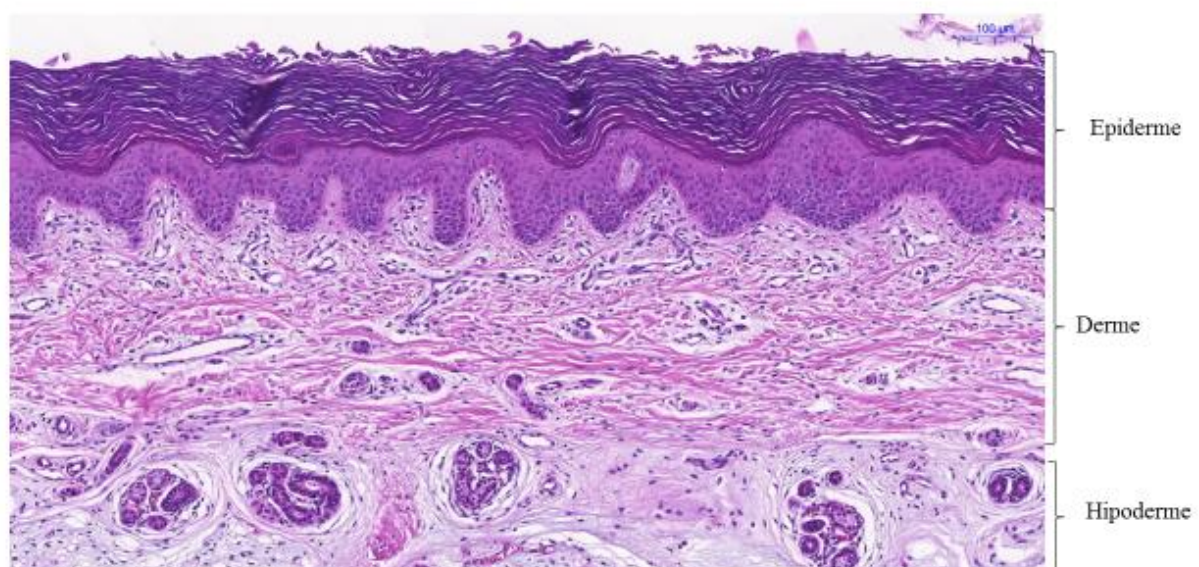


Figura 2 – Fotomicrografia de pele plantar de um natimorto com 40 semanas gestacionais.

Hematoxilina e Eosina (H&E). Escala = 100 μ m. Fonte: imagem da coleção do Projeto Skinage

2.2.1. Epiderme

É a camada mais superficial da pele, de origem embrionária ectodérmica, composta por epitélio escamoso queratinizado³⁷, sendo a principal célula denominada queratinócito. no qual há renovação celular constante²⁹. Possui cinco subcamadas, a camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, vista da derme para a superfície^{26,36}. Além disto, possui as seguintes características:

- Estrato basal: também conhecida como camada germinativa, apresenta queratinócitos que ligam a membrana basal á derme. Elas formam uma única camada que se aderem as outras camadas. Possui intensa atividade mitótica sendo responsável pela renovação da pele^{29,36}.
- Estrato espinhoso: localizado acima da camada basal. Contém feixes de queratina²⁹. É responsável pela manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito³⁶.
- Estrato granuloso: é composto por células achatadas contendo os grânulos de querato-hialina e os grânulos lamelares que tornam a pele semi-impermeável²⁹.
- Estrato lúcida: evidente somente na pele espessa, é constituída por células repletas de queratina³⁶.

- Estrato córneo: camada mais superficial, que se apresenta com espessura variável em diferentes regiões do corpo²⁹. Constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo, cujo citoplasma é repleto de queratina^{36,38}.

2.2.2. Derme

Camada intermediária da pele, separada da epiderme por uma zona de membrana basal³⁹. É constituída por tecido conjuntivo fibroso, filamentosos, amorfo, vascularizado²⁹, fibras colágenas, elásticas e reticulares entrelaçadas com elementos celulares e fibras musculares lisas²⁶. Sua superfície externa é irregular apresentando saliências, as papilas dérmicas³⁶. A derme compreende a parte mais espessa da pele, sendo responsável por fornecer flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Também protege o corpo contra ferimentos mecânicos, atua na regulação térmica e possui receptores de estímulos sensoriais²⁹. Duas regiões na derme são histologicamente descritas:

- Derme papilar: camada superficial e delgada constituída por tecido conjuntivo frouxo²⁶, que forma as papilas dérmicas, apoiando a epiderme. Contém pequenos feixes de fibrilas de colágeno que se inserem na membrana basal e penetram na derme³⁶. Possui intensa vascularização e é submetida a altas tensões mecânicas⁴⁰. Observa-se a presença de vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição e oxigenação da derme e da epiderme³⁶.
- Derme reticular: camada mais profunda e espessa³⁶ constituída de tecido conjuntivo denso não-modelado²⁶. Contém fibras do sistema elástico, responsáveis pela

elasticidade da pele. Recebe vasos de distribuição, nervos e vasos linfáticos²⁷. Contém feixes de fibras entrelaçadas, grandes e compactadas, compostas de colágeno tipos I e III⁴⁰. A matriz fornece resistência a tração, resiste a deformação e promove o recuo elástico da pele quando esticado⁴⁰.

2.2.3. Hipoderme

Formada por tecido conjuntivo frouxo, rica em tecido adiposo unilocular e fibras musculares lisas. Responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia³⁶.

2.3. Pele do neonato

A pele é anatomicamente madura ao nascer, constituída pelas mesmas cinco camadas identificadas no adulto. No entanto, sua capacidade funcional continuará a ser assumida ao longo do primeiro ano de vida^{14,23}. A análise histológica, relatada em estudos prévios, sugere que o desenvolvimento da epiderme é completo no útero em aproximadamente 34 semanas de IG³⁶. Prematuros com IG inferior a 32 semanas possuem as camadas epidérmicas mais finas e uma barreira funcional ainda não completamente desenvolvida²³, como apresentado na Figura 3, onde evidencia-se a estratificação e queratinização das camadas no decorrer da cronologia gestacional. Isso explica, em parte, a dificuldade em manter a homeostase devido à perda excessiva de fluidos, resultando em desidratação e desequilíbrio eletrolítico, além da má regulação térmica⁴¹.

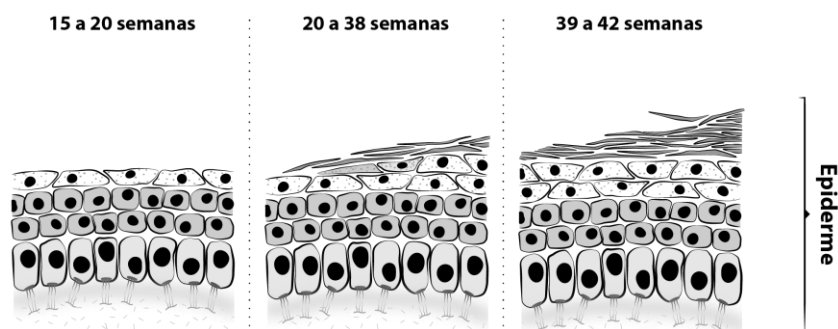


Figura 3 – Desenho esquemático da espessura das camadas da pele no decorrer da idade gestacional; Fonte: Imagem da coleção do Projeto Skinage.

2.4. Espessura da pele do recém-nascido

A mensuração da espessura das camadas da pele é uma abordagem importante, pois reflete indiretamente o seu grau de maturidade em função da IG⁴². Seu conhecimento possibilita a quantificação de perda de água transepidérmica, hidratação da camada córnea, do pH, além de avaliar a perda de calor transcutânea^{14,43}. A estruturação e espessura das camadas da pele variam com o local estudado²⁹, sendo mais espessa e complexa no dorso da mão, sola dos pés e junto a algumas articulações³⁶, conhecida como pele glabra¹⁶. Nos demais locais, a pele humana é fina, em sua maior parte, e a epiderme é constituída por epitélio estratificado, predominando os queratinócitos. Nas regiões onde a pele é mais fina, a epiderme é mais simples, faltando frequentemente as camadas granulosa e lúcida, e com camada córnea muito reduzida²³.

De fato, a variabilidade histológica da espessura da pele é um tema conhecido. As maiores variações são documentadas com a idade^{22,32} e local do corpo^{22,23}. Outras influências como o índice de massa corpórea, fototipo, sexo e a origem étnica são questionáveis^{22,32}. Na literatura, entretanto, poucos são os relatos sobre a mensuração da espessura da pele em recém-nascidos através da histologia.

2.5. Métodos de avaliação da espessura da pele

2.5.1. A espessura das camadas da pele

A mensuração da espessura da pele humana tem sido objeto de estudos invasivos e não invasivos. Ela pode ser indiretamente estimada por imagens capturadas por ultrassom, tomografia óptica de coerência, pelo rastreamento microscópico a laser, esse último com maior resolução e o mais preciso. Além destes, a morfologia da pele pode ser observada *in vivo* e sua microestrutura visualizada em três camadas com equipamento de ultrassom bidimensional ou tridimensional de alta frequência⁴⁴. Os métodos ópticos são eficazes para avaliação de camadas superficiais da epiderme, utilizando-se comprimento de onda e intensidade do feixe de luz específicos para ajustar a penetração do sinal luminoso⁴⁵.

É fato que os estudos invasivos da pele são indispensáveis em situações onde a histologia é o padrão-ouro, como um referencial para validação de exames de imagens⁴⁶. Contudo, os procedimentos de preparação das lâminas podem resultar em artefatos, necessitando-se de múltiplas amostras de material para que possam representar sua condição *in loco*^{17,47}.

Mudanças nas características da pele humana são facilmente visíveis no decorrer da idade⁴⁸. Exames histológicos da pele, a partir de amostras obtidas por biopsia documentam importantes alterações estruturais na epiderme, junção epidermo-dérmica, derme e anexos

epidérmicos⁴⁹. Com o intuito de investigar essas alterações, podem-se utilizar diversos métodos microscópicos, a partir de procedimentos de coloração para delinear os componentes, técnicas de imunomarcção e morfometria, possibilitando, assim, retratar modificações teciduais ao longo da vida^{27,49}.

Geralmente, as lâminas histopatológicas são examinadas ao microscópio por patologistas e o seu diagnóstico é baseado em critérios bem definidos, combinados com a experiência do profissional⁴⁶. Contudo, os resultados são subjetivos e na maioria das vezes, levam à variabilidade intra e interobservadores⁴⁶. Com a ajuda de escaneamento digital de cortes histológicos de tecidos, as lâminas preparadas com técnicas convencionais podem ser digitalizadas em alta resolução e ampliadas. Todavia, a análise quantitativa é difícil e demorada. Para resolver essa limitação, diversas técnicas computadorizadas têm sido empregadas para padronizar e facilitar a análise destas imagens⁴⁶.

A análise morfométrica digital de cortes histológicos representa hoje uma ferramenta importante na pesquisa biomédica, provendo mais objetividade das medidas, alto nível de reprodutibilidade, possibilidade de análise qualitativa e quantitativa das variáveis, independência da subjetividade e parcialidade humana⁵⁰. A estimativa da espessura epidérmica, do volume das glândulas, da quantidade de fibras elásticas são algumas das aplicações diretas da morfometria para cortes cutâneos microscópicos⁵⁰.

2.5.2. A quantificação do tecido conjuntivo fibroso da pele

O tecido conjuntivo da pele é composto principalmente de colágeno e elastina. Este compõe de 70 a 80 % do peso seco da pele, além de manter a integridade mecânica e estrutural da derme. Já a elastina tem por função, elasticidade da pele⁵¹.

Uma biópsia de pele, ao ser analisada, irá abranger todas as macromoléculas que estão presentes na maioria dos tecidos conjuntivos: vários tipos de colágenos, fibras elásticas, glicoproteínas e proteoglicanos. Esses, reunidos em combinações específicas em diferentes regiões da pele, são definidos pela maneira como os elementos do tecido conjuntivo interagem e são organizados com as células, os anexos epidérmicos e outras estruturas⁴⁰. Os componentes do tecido conjuntivo são interativos e interdependentes e a modificação de um deles, por fatores extrínsecos ou intrínsecos como envelhecimento, agressões ambientais e estados patológicos podem ter consequências no tecido como um todo⁵².

É fato que a arquitetura e estrutura da derme sofrem alterações quantitativas de colágenos e fibras elásticas em relação a idade, sexo, região do corpo e fatores ambientais⁵². Essas variações na quantidade de colágeno e elastina ocorrem em muitas doenças dos tecidos conjuntivos e geralmente, são os únicos achados morfológicos que estão associados à presença de defeitos bioquímicos e de sintomas clínicos. As modificações quantitativas dos componentes da matriz extracelular são responsáveis por algumas das alterações das propriedades funcionais que a pele sofre com o envelhecimento⁵². Análises morfométricas têm sido aplicadas em vários estudos de fibras colágenas e elásticas para investigar tais alterações. Diversos são os meios de preparação, coloração e técnicas microscópicas utilizadas para identificação dessas fibras ^{27,49}.

Segundo o estudo do Knight et al. 1993, realizado em pele de fetos de cordeiros, cujo período de gestação se assemelha mais ao do ser humano, a medida que o feto amadurece, tem-se um aumento constante e progressivo de colágeno para atingir um nível semelhante ao da pele adulta no momento do nascimento⁵³. Embora existam inúmeros relatos sobre as modificações

morfológicas e quantitativas da estrutura da derme em diferentes condições fisiológicas e patológicas, ainda não há relatos de que isso foi estudado em fetos humanos, o que torna o presente estudo inédito.

2.6. A datação da gravidez pela histologia da pele

A datação da gravidez em conceitos, a partir da análise histológica da pele e de outros órgãos, é prática recomendada durante necropsias. A morte precoce de um recém-nascido na primeira semana de vida ou de um feto, especialmente próximo de sua viabilidade, é um fenômeno que demanda investigação na busca pelas causas. Tal evento compõe a mortalidade perinatal, um indicador de saúde capaz de refletir as condições de vida da população, por sua relação direta com a qualidade do cuidado materno e neonatal ⁵⁴. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2018, pelo menos a metade dos natimortos tiveram óbito no período intraparto e a maioria ocorreu nos países em desenvolvimento⁵⁴. Quando a necropsia é consentida pelos pais, a estimativa da cronologia da gravidez por métodos invasivos, como a análise histológica da pele, elucida o momento em que o óbito ocorreu. A IG ao nascimento não é uma informação trivial, em face às inúmeras incertezas acerca do dia da concepção⁵⁵. Assim, a sua estimativa pela análise automatizada da pele, aqui apresentada, tem o potencial de aferir com acurácia a cronologia da gravidez, especialmente, nos casos em que ela é desconhecida através de referenciais clínicos clássicos, como a data da última menstruação e informações obtidas pelo exame de ultrassom obstétrico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Avaliar a relação entre as espessuras das camadas córnea, epiderme, derme, hipoderme e as áreas do tecido conjuntivo fibroso da derme, glândulas sebáceas e sudoríparas com a idade gestacional de recém-nascidos.

3.2. Objetivos específicos

Na pele de recém-nascidos com diferentes idades gestacionais:

- Avaliar a espessura das camadas córnea, epiderme e derme;
- Avaliar a área de derme+hipoderme, tecido conjuntivo fibroso da derme, glândulas sebáceas e sudoríparas;
- Avaliar a provável correlação entre os marcadores histológicos acima mencionados e a idade gestacional.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento do estudo e aspectos éticos

Estudo observacional transversal, no qual medidas invasivas da espessura da pele foram avaliadas segundo metodologia convencional na preparação do tecido humano com coloração de Gomori. Esta pesquisa foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Projeto: CAAE 44834915.3.0000.5149), cujo documento de aprovação encontra-se no Anexo 1. A coleta de dados foi realizada no período de janeiro de 2016 a janeiro de 2019. O termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais foi previamente discutido com os pais e devidamente assinado. O modelo encontra-se no Anexo 2.

4.2. Critérios de elegibilidade

Foram selecionados 35 casos conceptos natimortos (nasceram mortos) e neomortos, que faleceram a seguir do nascimento, nas maternidades do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e do Hospital Sofia Feldman em Belo Horizonte - MG.

Foram incluídos natimortos e neomortos de ambos os sexos, com IG entre 20 a 42 semanas, que tiveram a cronologia gestacional estimada por ultrassonografia precoce, ou seja, realizado durante o cuidado pré-natal, até 13 semanas e 6 dias de gestação. No caso de natimortos, o feto teve um período estimado entre o nascimento e o óbito menor do que três dias e não apresentou achados ecográficos ou clínicos de macerações ou hidropisia. No caso de neomortos, o tempo de vida extra-uterina não ultrapassou 48 horas.

Foram critérios de exclusão, os casos que tiveram sinais de infecção fetal ou neonatal afetando a integridade da pele, mesmo quando avaliados já na etapa da histologia. Doenças

fetais que possam interferir no desenvolvimento da pele intrauterina, como a hidropisia e anidrânio também foram critérios de exclusão.

O processo de predição da IG de um feto natimorto ou neomorto, compreendeu a realização de biópsia de pele em determinadas regiões do corpo, a análise morfométrica de lâminas histológicas e o processamento estatístico das medidas obtidas. A Figura 4 apresenta as etapas.

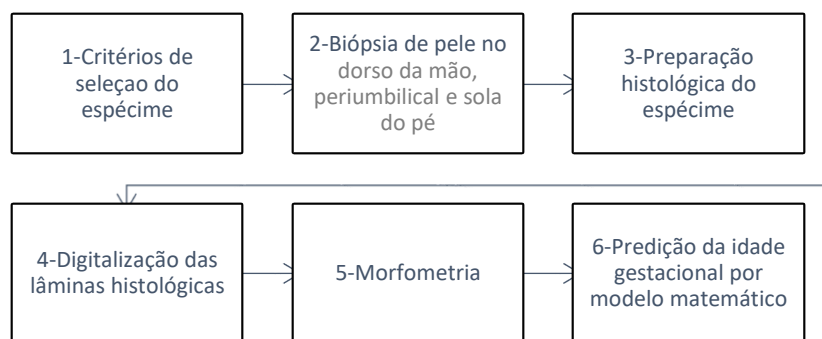


Figura 4 - Etapas do processo para determinação da idade gestacional por meio de um modelo de predição ajustado a partir de variáveis extraídas da histomorfometria da pele

4.3. Coleta de dados clínicos

Dados maternos sobre a gravidez foram obtidos através da consulta em prontuário clínico no momento do recrutamento do caso e confirmados em breve entrevista com a mulher. Dúvidas foram resolvidas por consulta em base de dados hospitalar do Hospital das Clínicas - UFMG, Sofia Feldman e pelo SISMater® (Sistema de Informação sobre Saúde Materno-Neonatal)⁵⁶. Os dados foram coletados em um formulário criado pelos pesquisadores para cada recém-

nascido morto avaliado, que posteriormente, foi transferido para base de dados digital. O formulário de coleta de dados encontra-se no Anexo 3.

Dados Coletados:

- Dados maternos: nome da gestante, número do prontuário materno, doença materna e/ou perinatal, DUM, cor de pele utilizando a Escala de Fitzpatrick⁵⁷, altura e peso da gestante, índice de massa corporal, data e IG verificada no primeiro ultrassom obstétrico.
- Dados do parto: data e hora do nascimento e morte neonatal, IG estimada no dia da morte e causa primária da morte.
- Dados do recém-nascido: sexo, peso ao nascer
- Dados de identificação da biópsia: dia e hora da coleta e locais biopsiados.

4.4. Coleta e preparação das amostras de pele fetal e neonatal

Um fragmento de pele com cerca de 1cm² foi retirado da região abdominal, palmar e plantar, através de procedimento cirúrgico com bisturi e pinça anatômica. Os fragmentos foram fixados em solução de formol 10% tamponado pH 7,2 a 70°C por no mínimo 48 horas, até ser processado para rotina de histologia. As regiões do corpo do cadáver foram reconstituídas com sutura por meio de pontos simples. Os fragmentos foram identificados com as letras M (mão), U (umbigo), P (pé). Após o período de fixação todos os fragmentos foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e absoluto), diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. A partir dos blocos de parafina foi feita a microtomia, obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura e realizada a coloração de Tricrômico de Gomori (Anexo 4).

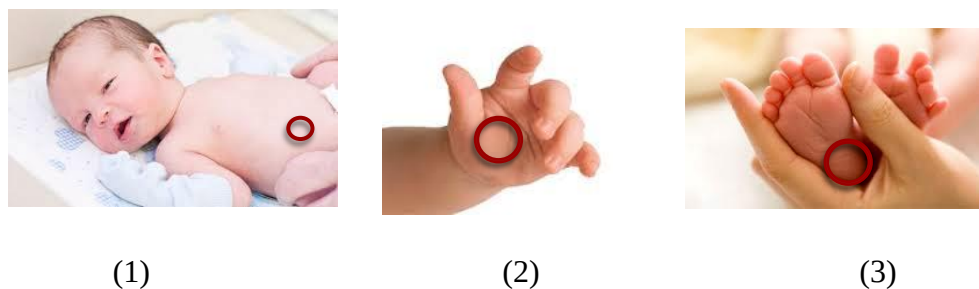


Figura 5 – Demarcação dos locais preferenciais para realização da biopsia de pele; 1 - Região periumbilical; 2 - Região dorso da mão 3 – Sola do pé; Fonte: Imagens da coleção do Projeto Skinage.

4.4.1. Escaneamento digital e análise das imagens

Todos os cortes histológicos corados pelo tricrômico de Gômori foram digitalizados utilizando o scanner de lâminas 3DHISTECH Panoramic MIDI (Budapest, Hungary) e, através do programa Panoramic Viewer, foram selecionados frames e obtidas imagens em uma escala de 200 μm com aumento de dez vezes para a obtenção das medidas.

4.5. Medida da espessura da pele

Para o cálculo das medidas foi utilizado o programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). A espessura da camada córnea foi medida interativamente por meio da média de dez mensurações, divididas em dois grupos de cinco medidas cada, tomando como ponto de orientação, ora o ápice da crista papilar, ora o ápice da crista epidérmica. Procedimento semelhante foi utilizado para o cálculo da espessura da epiderme. A média de dez mensurações também foi obtida através de cinco medidas de espessura do ápice da epiderme até o ápice da crista papilar e de outras cinco medidas do ápice da epiderme até o ápice da crista epidérmica, figura 6.

Para se obter a espessura da derme foi adotada metodologia similar. Foram feitas dez mensurações de espessura, cinco do ápice da crista papilar até o início da hipoderme e outras cinco do ápice da crista epidérmica até também o início da hipoderme. Em seguida foi obtida a média de todas estas medidas. Todas as medidas de espessura foram baseadas na metodologia descrita por Caliari (1997)⁵⁸. O Protocolo de medidas encontra-se no Anexo 6.

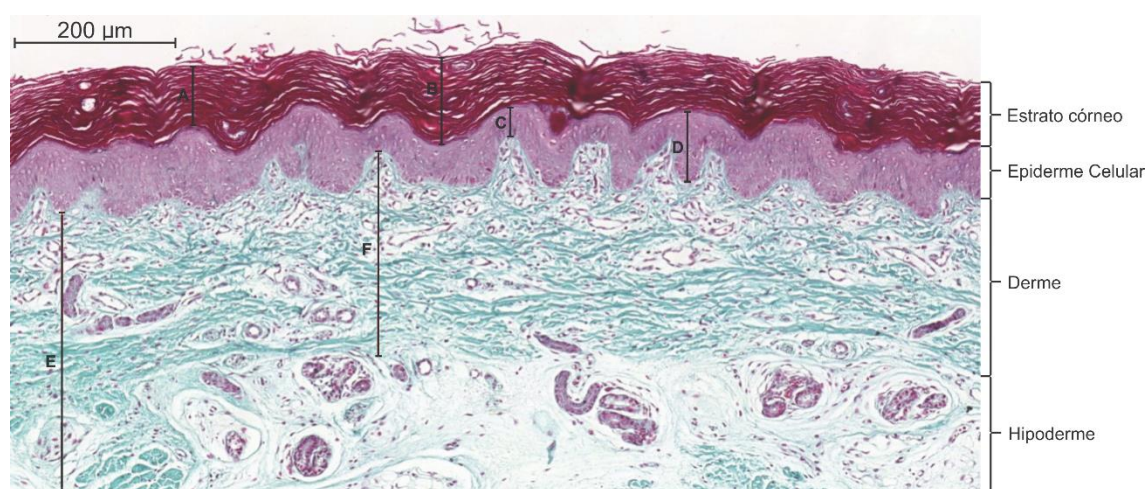


Figura 6 - Fotomicrografia de pele da sola do pé de natimorto de 40 semanas gestacionais.

A) representa a medida do estrato córneo com limite inferior correspondente ao ápice da crista epidérmica; B) representa a medida do estrato córneo com limite inferior correspondente ao vale da papila epidérmica; C) representa a medida da epiderme celular com limite inferior correspondente ao ápice da dermica; D) representa a medida da epiderme com limite inferior correspondente ao vale da papila epidérmica; E) representa a medida da derme com limite superior correspondente ao vale da papila epidérmica; F) representa a medida da derme com limite superior correspondente a crista da papila dérmica; Tricrômico de Gomori. Escala = 200 micrômetros.

4.5.1. Medida área de tecido conjuntivo fibroso dérmico e glândulas

Para o cálculo da área de tecido conjuntivo fibroso dérmico foram construídos algoritmos no programa KS300. Em cada corte de pele foram analisados $7,7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de derme para a obtenção da área, através da seleção de pixels com tons de verde, criação de uma imagem binária e processamento digital, figura 7. A metodologia utilizada foi semelhante à descrita por Prata et al. (2017) ⁵⁹. O Protocolo de medidas encontra-se no Anexo 7.

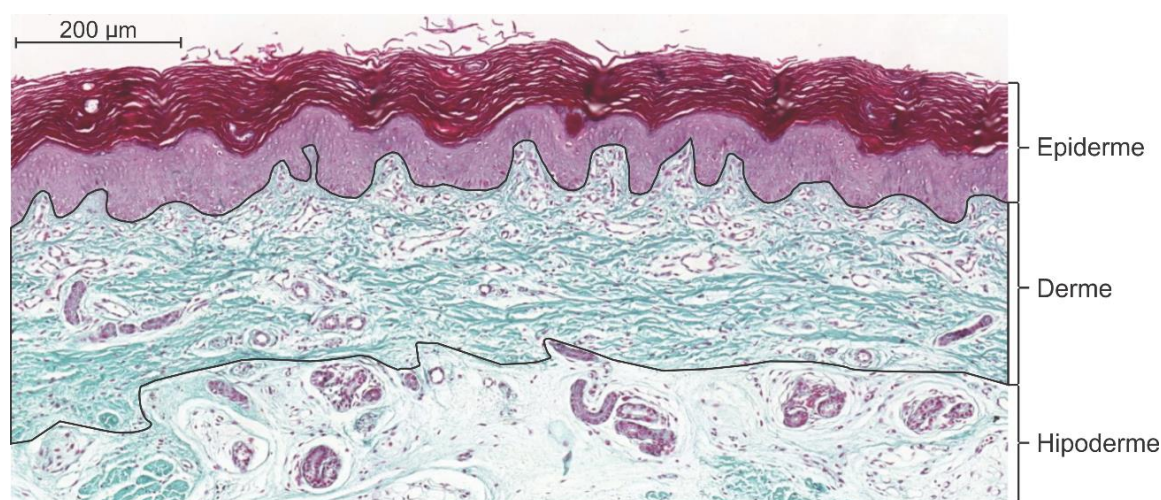


Figura 7- Fotomicrografia de pele da sola do pé de natimorto de 40 semanas gestacionais. Os contornos desenhados representam a delimitação da derme para o cálculo da área em μm^2 . Tricrômico de Gomori. Escala = 200 micrômetros.

A área ocupada por glândulas sudoríparas e sebáceas foi obtida através de medidas interativas onde todas as glândulas foram mensuradas separadamente, em uma área total de $7,27 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de derme e hipoderme, utilizando metodologia semelhante à descrita por Costa et al. (2007) ⁶⁰, figura 8 e 9. O Protocolo de medidas encontra-se nos Anexos 8, 9 e 10.

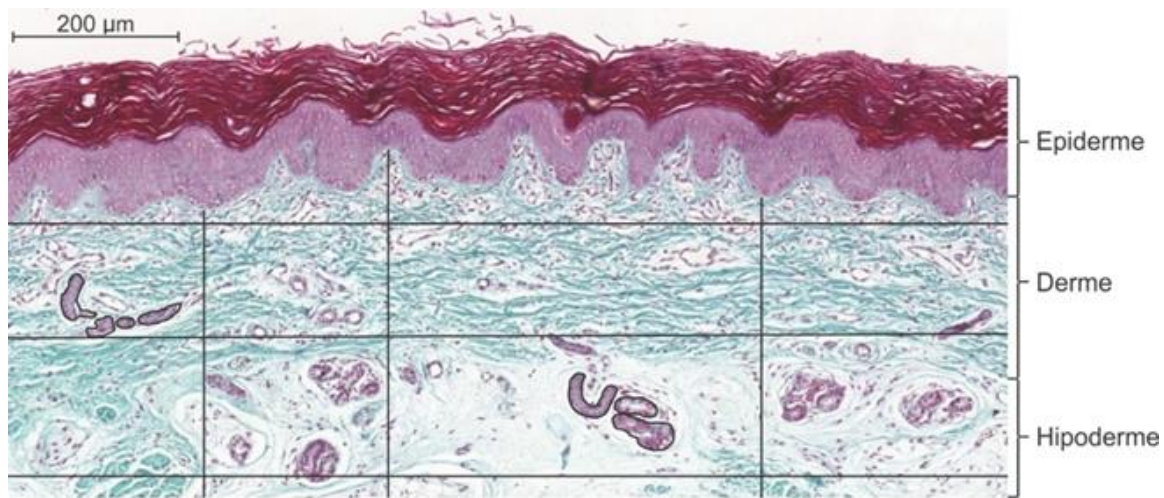


Figura 8 - Fotomicrografia de pele da sola do pé de natimorto de 40 semanas gestacionais. Os contornos desenhados representam a delimitação das glândulas sudoríparas para o cálculo da área em μm^2 . Tricrômico de Gomori. Escala = 200 micrômetros.

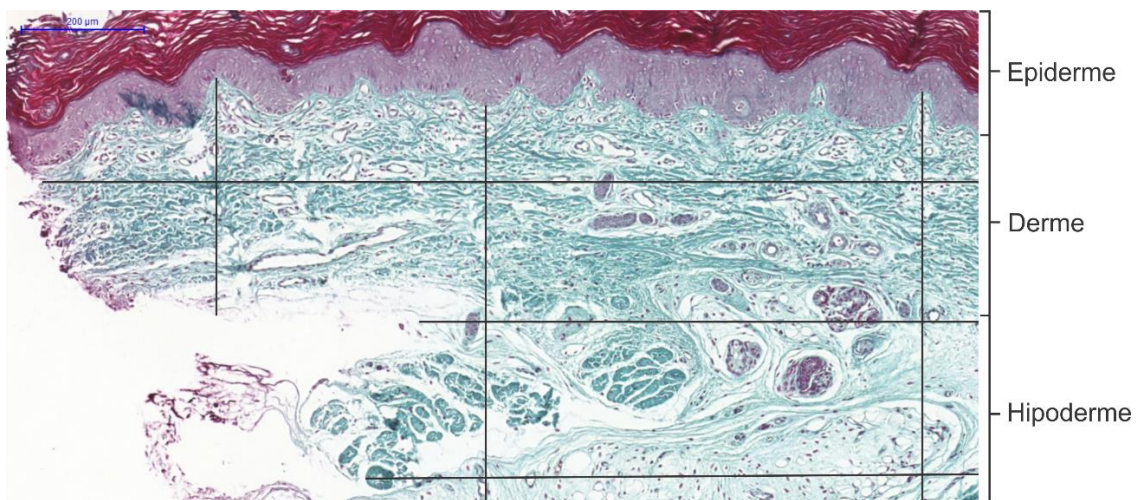


Figura 9 - Fotomicrografia de pele da sola do pé de natimorto de 40 semanas gestacionais. As 3 linhas horizontais e 3 verticais aleatórias representam 3 extensões de derme e hipoderme utilizadas para o cálculo da área de derme + hipoderme em μm^2 . Tricrômico de Gomori. Barra = 200 micrômetros.

4.6. Cálculo estatístico

A síntese estatística descritiva foi utilizada para obter valores médios, medianos e medidas de variabilidade como o desvio padrão, amplitude, intervalo interquartil (IQR), dependendo da natureza da distribuição dos conjuntos de medidas obtidos. O coeficiente de variação e o intervalo de confiança (IC) de 95% estimado por bootstrap para os valores centrais da morfometria da pele, espessura e área, foram calculados de modo a permitir inferência sobre os dados amostrais. As variáveis categóricas como sexo e causa de morte foram apresentadas em termos de frequência absoluta e relativa.

A análise de regressão, univariada e multivariada, foi utilizada para determinar a correlação entre a IG e a morfometria da pele, para cada local do corpo onde a biopsia de pele foi realizada. O ajuste dos modelos, calibração e análise de resíduos de Durbin Watson foram empregados usando-se a metodologia de inserção de variáveis, que se mostraram significativas na etapa univariada. O programa estatístico SPSS ® 23.0 foi utilizado para a análise. O nível de significância, ajustado para o teste de hipótese foi estabelecido em 5% com IC de 95%.

Para o cálculo de amostra representativa dos sujeitos da pesquisa, a correlação já descrita por Vitral et al.⁶¹ entre a IG e a espessura da pele, aferida in vivo por ultrassonografia, foi considerada: $r=0,60^{61}$. Com base na expectativa de um comportamento linear do espessamento epidérmico em função da IG, uma amostra mínima de 17 corpos foi calculada para se detectar uma correlação positiva e moderada entre a espessura da pele e a IG, assumindo um erro alfa de 5% e um erro beta de 20%, em um teste de hipóteses bicaudal.

Empregou-se o *software* GPower, na função regressão linear bivariável, teste a priori. A memória de cálculo encontra-se no Anexo 11. Entretanto, prevendo-se uma perda de 30% devido a baixa qualidade no prepare das lâminas ou degradação de material post-mortem, o número de recrutamentos foi planejado para o mínimo de 30 corpos, em IG variadas.

4.7. Instalações, equipamentos e fontes de financiamento

Os custos deste estudo foram financiados com os seguintes recursos:

- 1. Bill & Melinda Gates Foundation, USA.** Grand Challenges Explorations – Round 14, 2015, número OPP1128907.
- 2. FAPEMIG** - Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, Brazil, número AUC-00032-15
- 3. Bolsa da FAPEMIG** - Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, Brazil.

A preparação das lâminas histológicas, assim como a histomorfometria foi realizada no Laboratório de apoio didático e no Laboratório de Protozooses do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A digitalização das lâminas histológicas em imagens foi realizada no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com 3DHISTECH Pannoramic MIDI (Budapest, Hungary).

5. RESULTADOS

Os resultados encontrados são apresentados em formato de dois artigos científicos e uma notificação de invenção para fins de depósito de patente. Um dos artigos foi publicado em 22/05/2019, na revista *Skin Research and Technology* (2018 Impact Factor:1.657). O segundo artigo, intitulado “Análise das características morfométricas da pele ao nascimento na busca pela associação com a cronologia da gravidez”, ainda não foi submetido, pois está protegido por sigilo, até que o registro de patente seja finalizado pela Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica da UFMG.

5.1. Artigo científico I

Skin thickness dimensions in histological sections measurement, during late-fetal and neonatal period of development: a systematic review

de-Souza, Ingrid Michelle Fonseca¹, Vitral, Gabriela Luiza Nogueira², Reis, Zilma Silveira

Nogueira^{1*}

¹Postgraduate Program of Women's Health, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Postgraduate Program of Pediatrician and Adolescence, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Current Address: Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena, 190, sala 601, CEP 30.130.100 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author: Zilma Silveira Nogueira Reis.

Avenida Professor Alfredo Balena, 190, sala 601. Zip Code 30.130.100 Belo Horizonte, Brazil. Phone: +55 0 31 3409-9467.

E-mail: zilma.medicina@gmail.com

Orcid.org/0000-0001-6374-9295 ResearcherID:H-8105-2013

Abstract

Background: The development and maturation of the skin is a process that occurs during the gestation and neonatal period. Histological skin biopsy studies are relevant to improve knowledge on the skin protective barrier during the perinatal period. The thin skin of preterm newborns is unable to maintain homeostasis, termal regulation through the skin, and is susceptible to infections. This study systematically reviewed the evidence regarding histological thickness dimensions of the skin and its layers during the late-fetal and neonatal period.

Methods: PubMed, Scopus, BVS, and e SciELO library databases, with no limits in the period of analysis or idiom. Eligibility criteria were as follows: studies describing the thickness of the entire skin or its layers during late-fetal life or the neonatal period; human

being; skin biopsy analysis; and any scientific report. Two independent reviewers screened the search and extracted the following standard data: fetal or neonatal age of assessment, biopsy site, technique used for preparation and staining of histological slides, measurement techniques, and values of skin thickness.

Results: Fifty-nine studies were screened, and eleven were identified from other sources. We recognized six studies that met the criteria for inclusion for proper extraction. Expressive differences between sites for sampling, methods of slide preparation, and number of layers measured made the thicknesses values summarization difficult. There were no reliable dimensions reported on this tissue.

Conclusion: Despite the importance of studying the human skin barrier, these findings confirmed limited evidence on skin thickness dimensions obtained by histology.

K E YWORDS

Barrier function, gestational age, histological techniques, review, skin, skin maturation, skin Structure, systematic

1 INTRODUCTION

The skin is considered the largest organ of the human body, having several vital functions¹ and acting as a defensive physical barrier between the organism and the environment.² The skin collaborates with other organs, providing consonant functioning of the organism, as well as control of body temperature and metabolic synthesis. Such relevance explains why the structural development of the human skin has been intensely studied and documented at the electron microscopy level.³ This tissue consists of dermis and epidermis, acting

harmonically and cooperatively. The epidermal layer has a barrier function where the stratum corneum is positioned as having the outermost exposure to the environment.

There are critical clinical relations between the skin barrier competence and the neonatal survival due to hypothermia and neonatal infections, besides risk factors for newborn deaths.⁴

The functional and structural development of the skin is a dynamic process, which begins during embryogenesis and ends in the first year of life.^{1,5} Even the barrier maturation has particular importance during the late gestation and early neonatal period, histological studies are limited due to its invasive acquisition of materials from the human being, for ethical issues.³ Microscopy analysis of the tissue suggests that the skin structure is complete at 34 weeks of pregnancy. Thus, term newborns already have a competent barrier, comparable to adults.⁶ In contrast, preterm neonates are poorly prepared to face the extrauterine environment, as they lack development in the epidermal skin layer.⁶ Such weakness on the immature stratum corneum increases susceptibility to infections and percutaneous uptake of harmful toxins, and also leading to inability to maintain homeostasis, poor thermoregulation, and more risk of death.^{7,8}

The measurement of skin thickness is an important parameter that indirectly reflects the state of neonatal maturity and how prepared the newborn will be in the period of adaptation to the external environment.⁹ The depth of this tissue and the structure of epidermal and dermal layers differ according to the body site analyzed.¹⁰ Over the palm, sole and along joints, the epidermal layer is thicker than other parts, whereas between scapulae, the dermal layer is thicker than others sites.¹⁰ In other sites of the fetal body, especially the eyelids and near the genitals, the skin is typically thin, since there is no lucidum sub-layer in the epidermis and the stratum corneum is reduced.^{10,11} A considerable part of the knowledge on skin

morphophysiology relies on the mouse model for skin maturation analysis, experimental culture models, and recently noninvasive approaches, due to restrictions on access to human fetal tissue.³ However, invasive biopsies of skin are still indispensable in situations where histology is the gold standard as a reference for the validation of imaging exams, as well as the potential to diagnose cutaneous pathologies.¹² This study seeks to systematically review the published evidence in order to establish the magnitude of the dimension of human skin thickness and its layers during late-fetal development and the neonatal period, assessed by biopsies and histological analysis.

2 METHODS

This systematic review was conducted in accordance with the PRISMA Statement.¹³ The authors previously prepared the review protocol using the application software StArt (Systematic Review System).¹⁴ The research question that guided the study was: What is the thickness of the human skin at birth, directly measured by histology? The main outcome was the value of skin thickness.

2.1 Search strategy and selection criteria

The search strategy was performed using the following keyword combination for the composition of PICO query:((((measurement[Title/Abstract] OR thickness[Title/Abstract]OR mophometry[Title/Abstract])) AND (biopsy[Title/Abstract] OR microscopy[Title/Abstract] OR slice[Title/Abstract] OR histolo-gy[Title/Abstract])) AND (dermis[Title/Abstract] OR epidermis[Ti-tle/Abstract] OR skin[Title/Abstract] OR “stratum corneum”[Title/Abstract] OR corium[Title/Abstract])) AND (child[Title/Abstract]

OR fetus[Title/Abstract] OR infant*[Title/Abstract] OR neonate[Title/Abstract] OR newborn[Title/Abstract] OR stillbirth[Title/Abstract]))AND human*[Title/Abstract].The authors conducted a comprehensive search for published evidence in the PubMed, Scopus, Virtual Health Library (BVS), and SciELO databases, with no date or language limits. There were no restrictions on the design of the studies. Additionally, other sources of evidence were consulted, such as the bibliography present in specialized books, dissertations, and theses.

2.2 Study selection

Two reviewers independently screened the search output to identify potentially relevant studies, analyzing only titles and abstracts using the following predetermined eligibility criteria:

1. Fetal or neonatal specimen;
2. Skin biopsy analysis;
3. Human being;
4. Measure the thickness of the skin or its layers;

We excluded studies reporting only noninvasive techniques for human skin thickness. Duplicates were discarded. Disagreements were resolved by consensus.

2.3 Data analysis

The selected publications were fully and independently read for extraction. A standard data extraction supported by software¹⁴ gathered the following variables: authors, year of publication, fetal or neonatal age, body site of biopsy, skin layer, technique used for preparation and staining of histological slides, methods of measurement, and mean, median,

or range values of total skin thickness or the layers: stratum corneum, epidermis, and derm. When data were missing or unclear, the original authors were contacted by electronic mail to clarify critical points before the aggregation of skin thickness dimensions.

The summary of the primary outcome with values of skin thickness was organized by body site where biopsies occurred, whether it was measured during late-fetal or neonatal period, and the skin layers measured in the primary studies. For standardization, in the case of multiple sites, the following data were extracted: sole, palm, abdomen, back, and capillitium. The original descriptive values in terms of mean, maximum, minimum, and standard deviation, when present, were recovered from the primary source. To facilitate the comparability of the measured values, the unit of measure was micrometer (μm). We performed transformation when necessary. When skin thickness was indirectly described, as using a linear regression equation along timing, the birth value was obtained by assuming age zero days in the prediction equation. For studies that evaluated the thickness of the fetal skin at different moments of fetal life, only the measurements assessed near the gestational term were extracted.

3 RESULTS

Figure 1 illustrates the flow of identification, selection, and inclusion of studies, according to PRISMA¹³ diagram recommendation. Bibliographic searching retrieved a total of 59 articles. We manually added eleven studies retrieved from specialized books, and articles cited therein. Among 70 selected, 25 duplicates were removed, resulting in 45 articles. Only eight primary sources met eligibility criteria, and six reached the extraction step. Table S1 presents excluded articles as supplementary data to this article. Reasons for excluding

potentially relevant studies was an approach of fetal or neonatal skin analysis without reporting skin thickness measurements.

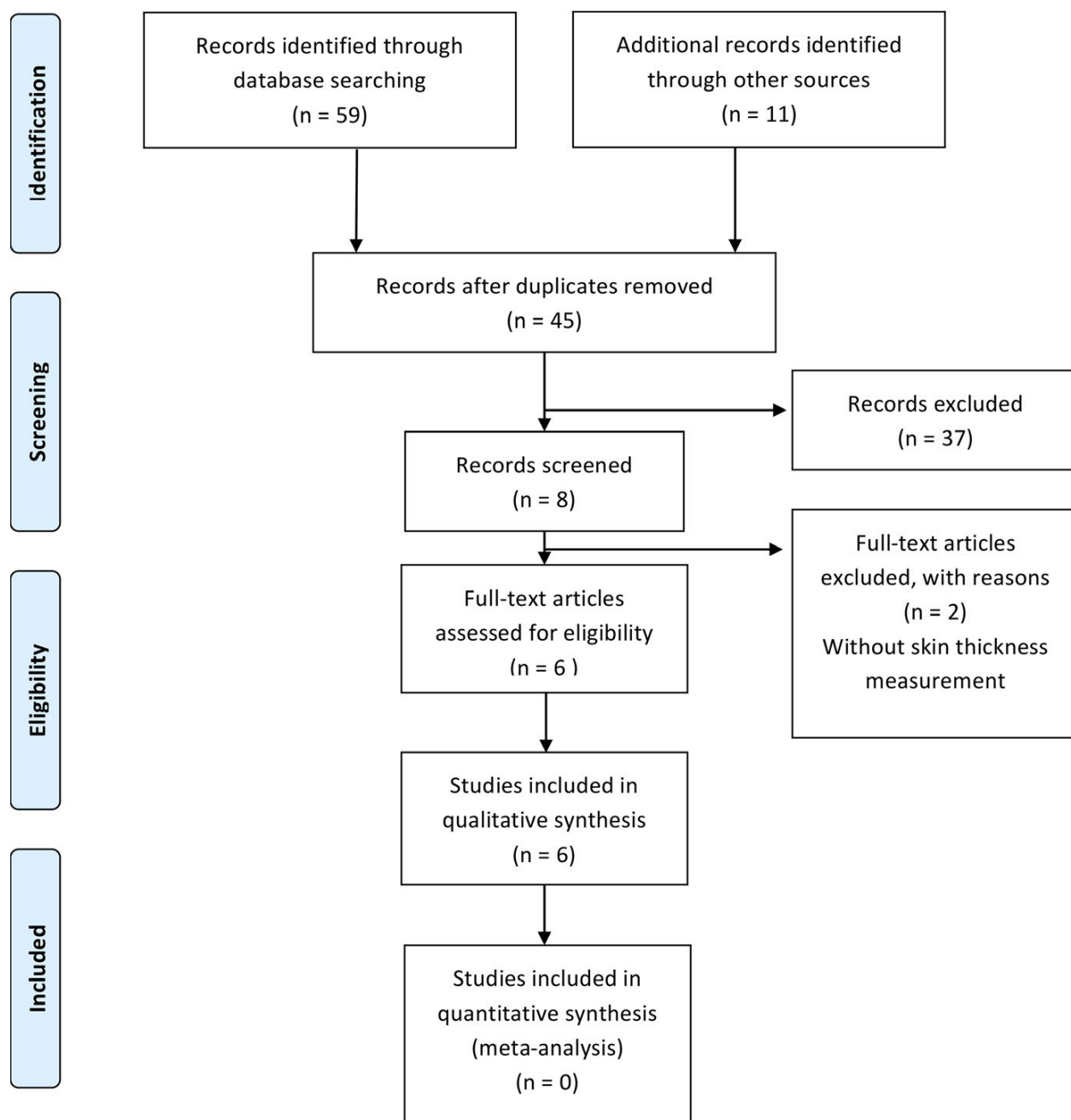


FIGURE 1 - Flow diagram of systematic review

The articles differed with dates of publication ranging from 1982 to 2018. Regarding quality of evidence, in coherence with our research question, only descriptive observational studies were assessed. Table 1 summarizes sample and histological techniques reported for the preparation of the slides from skin biopsies.

There was high variability between studies with respect to the sites of the body where the skin biopsy occurred, as well as methods for preparation and staining of slides. In addition, we observed an expressive diversity of techniques of measurement of skin thickness, microscopy equipment, and dedicated software for metering. Despite differing techniques of histological techniques of preparation, five of the six articles reported measurement supported by software. We contacted Khalfa et al¹⁰ to clarify the magnitude of skin thickness. The authors informed a mistake in their report regarding the unit of measure and sent us the corrected values, which we considered in our review.

Table 1: Study characteristics and histological methods of sample preparation and the skin thickness measurement

N	Authors	Sample of newborns	Methods of preparation	Layers analyzed	Method of measurements
1	Smith et al ²⁷	Unspecified number of fetuses	Biopsy dimensions: not reported. Fixation: immersed in 1/2 strength Karnovsky's fixative buffered in 0.1 mol/L cacodylate buffer and fixed for 2-4 h.	Dermis	Electron microscope and Philips 201 transmission

			Samples were washed in buffer, and subsequently fixed in 1% OS04. Paraffin sections: 1 μm Coloration: Richardson, Jarrett, and Finke.		electron microscope. Descriptive statistics of the values were not reported.
2.	Fairley et al ⁶²	10 infants <3 months of age (autopsy)	Biopsy dimensions: Not reported. Fixation: 10% buffered formalin. Paraffin sections: Not reported. Coloration: HE	Stratum corneum	Microcoscope with filar micrometer eyepiece calibrated for x10. Five measurements were made on each sample. Average with ranges values.
3.	De Viragh et al ⁶³	7 alive newborns after 2 weeks of age, under anaesthesia	Biopsy dimensions: Not reported. Fixation: immediately after excision in Teller Nitzky solution (2% formaldehyde, 5% acetic acid, 65% ethanol) for exactly 24 hours at room temperature. Paraffin sections: Not reported	Epiderm (without stratum corneum) Derm (without	Microcoscope with ocular micrometer. Minimum and maximum thicknesses for dermis and

			Coloration: HE	advential layer)	epidermis were determined. Average values with standard error, using regression analysis.
4.	Kakasheva-Mazhenkovska et al ⁶⁴	Unspecified number of subjects. At least 10 samples of stillbirths at term gestation	Biopsy dimensions: 0.5 to 1 cm Fixation: 10% neutral formalin. Parafin sections: 3 to 5 µm Coloration: HE, Azan – Mallory, PAS, Floranten, Linder technique of impregnation with silver.	Total epidermis Total skin Dermis	Computer system: Lucia M, Version 3, System for Image Processing and Analysis. Average without ranges values.
5.	Kakasheva-Mazhenkovska et al ⁶⁵	Unspecified number of subjects. At least 12 samples of stillbirths at term gestation	Biopsy dimensions: 0.5 cm Fixation: Not reported. Sections: Not reported. Coloration: HE, Azan – Mallory, PAS, Floranten.	Total epiderme Total dermis	Computer system: Lucia M, Version 3, System for Image Processing and Analysis. Average without ranges values.

6.	Khalifa et al ¹⁶	5 fetuses with 6 mo of age. 15 stillbirths	Biopsy dimensions: Not reported. Fixation: optimum cutting temperature Freezing cryostat sections: 5µm in - 24°C. Coloration: H.E. Scanning electron microscopy: Fixation: Fresh tissues were embedded in glutaraldehyde then processed with osmium tetroxide. Coloration: coated with gold	Epidermis	Computer system: Image J Software Average with ranges values.
----	-----------------------------	--	---	-----------	---

The skin thickness over the back was the body site most frequently measured, as well as five in six studies assessed the skin during the neonatal phase (Table 2).

Table 2: Skin thickness variation of skin of newborns analyzed in the articles

	Study 1	Study 2	Study 3	Study 4	Study 5	Study 6	Study 6
	Smith et al, 1982 ²⁷	Fairley et al, 1983 ⁶²	De Viragh et al, 1995 ⁶³	Kakash et al, 2011 ^{64a}	Kakash et al, 2011 ^{65b}	Khalifa et al., 2018 ^{16**}	Khalifa et al., 2018 ^{16*}
Fetal	x					x	

Neonatal			x	x	x	x		x
skin palm								
Stratum corneum	-	-			-	-	-	-
(μm)								
Total epidermis	-	-			142	-	-	-
(μm)								
Dermis (μm)	-	-			873	-	-	-
Total skin (μm)	-	-			1015	-	-	-
Skin sole								
Stratum corneum	-	-			-	-		-
(μm)								
Entire epidermis	-	-			193.2	-	470 $\pm$ 121	680 $\pm$ 31
(μm)								5
Dermis (μm)	-	-			719.9	-	-	-
Total skin (μm)	-	-			913.1	-	-	-
skin abdomen								
Stratum corneum	-	35.4 $\pm$ 11.			-	-		-
(μm)		3						
Entire epidermis	-	-			161.6	-	530 $\pm$ 111	650 $\pm$ 33
(μm)								1
Dermis (μm)	-	-			1297	-	-	-
Total skin (μm)	-	-			1458.7	-	-	-

Skin capillitium							
Stratum corneum	-	-	-	120.7	-		
(μm)							
Entire epidermis	-	-	24.7 $\pm$ 7.4 to	160.8	160.8	-	-
(μm)			80.5 $\pm$ 3.0*				
Dermis (μm)	-	-	777.5 $\pm$ 32.9	1553.8	1714.6	-	-
			to				
			1143.1 $\pm$ 34.				
			2*				
Total skin (μm)	-	-		1714.6	1875.4	-	-
Skin Back							
Stratum corneum	-	-	-	-	-	-	-
(μm)							
Entire epidermis	-	-		150.3	-	480 $\pm$ 53	650 $\pm$ 32
(μm)							4
Dermis (μm)	4000***	-		1330.6	-	-	-
Total skin (μm)	-	-		1431.3	-	-	-

*Minimum to maximum values Mean $\pm$ SE;

**Data corrected by the authors after publication.

***Thickest value.

Complete skin thickness measurement was found in studies 4 and 5: The thinnest skin value was 913.1 μm in the sole, whereas the thickest skin value was 1875.4 μm in the capillitium.

Although these articles were from different publications, the main author and methods were the same in both studies.

Only studies 2 and 5 measured the thickness of the stratum corneum sub-layer: Their values were $35.4 \pm 11.03 \mu\text{m}$ in the abdomen region and $120.7 \mu\text{m}$ in the capillitium region. Total epidermis thickness presented a wide variation between studies 3, 4, and 5, even the biopsy site occurred in the same area of the body. Dimensions in the epidermis of capillitium ranged from $24.7 \pm 7.4 \mu\text{m}$ in study 3- $160.8 \mu\text{m}$ in studies 4 and 5. In the sole, values ranged from 193.2 to $680 \pm 315 \mu\text{m}$ in the reports 4 and 6 (newborns), respectively. As for the abdomen, the total epidermis thickness found was $161.6 \mu\text{m}$ in study 4, whereas in study 6, it was $650 \pm 331 \mu\text{m}$ (newborns). On the skin over the back, total epidermis thickness was $150.3 \mu\text{m}$ in study 4 and $650 \pm 324 \mu\text{m}$ (newborns) in study 6. Study 6 was the only one that evaluated the thickness of the fetal epidermis, where the sole measured $470 \pm 121 \mu\text{m}$, the abdomen $530 \pm 111 \mu\text{m}$, and the back $480 \pm 153 \mu\text{m}$.

Study 4 reported the thickness of the dermal layer as $719.9 \mu\text{m}$ in the sole. In the back region, studies 4 and 1 measured 1330.6 and $4000 \mu\text{m}$, respectively. The dermal thickness of capillitium ranged from $777.5 \pm 32.9 \mu\text{m}$ to $1714.6 \mu\text{m}$, as reported by studies 3 and 5, respectively. The thickness of the dermal layer in the abdomen was $1297 \mu\text{m}$, as reported by study 4.

4 DISCUSSION

The results of this review revealed lack of reliable evidence on histological sizes of skin thickness in newborns, supposedly golden-standard values. The limited number of studies that met the eligibility criteria included the heterogeneity of methods of histological

techniques of preparation and the different descriptions of layers/sub-layers measures made difficult the summarization. Most articles analyzed morphometric and structural aspects of the skin using a qualitative approach. Among them, thickness measurement was the only one quantitative result, not always well described.

Smith et al¹⁵ provided an overview on the human dermal embryogenesis. In this study, more than one method of biopsy preparation and microscopy was used to describe skin development, as well as structural and biochemical properties. Fairley et al¹⁶ focused their analysis on the stratum corneum thickness of children with less than three months of age. In both studies, sizing process was performed with standard approaches of fixation, coloration, and metering with microscope. The authors described sampling collected during autopsy fixed in 10% buffered paraffin, and serially sectioned and stained with hematoxylin and eosin (HE), with measurements using microscope micrometric ocular filament, taking five measurements of each skin slide. De Viragh et al¹⁷ analyzed the parietal scalp thickness of seven newborns after two weeks of age. In this study, the sample preparation was different from the others, analyzing the depths perpendicular to the skin surface of five follicular segments, even with the same HE method of staining. In their morphometric analysis, the thickness of the epidermis and dermis was presented using a regression model along with aging, in years. For this, dataset considered mean skin depths from five follicular segments. Since both the epidermis and the dermis layers have a wave format, their minimum and maximum thicknesses were determined. We included in our review both boundary values, taking the expected numbers for zero days of life. The group Kakasheva - Mazhenkovska et al^{18, 19} published two articles that included neonatal skin samples in 2011. The first analyzed skin samples from 15 distinct regions of the body,¹⁸ and the latter evaluated only structural

components of the surface over capillitium.¹⁹ At least 12 skin biopsies per subject with 0.5 cm of size were included with total skin and part of the subcutaneous adipose tissue. They were histologically elaborated according to the standard paraffin technique. Morphometric analysis was done through the computational system for image processing and analysis (Lucia M, Version 3). Khalfa et al¹⁰ reported histological and cytological changes during fetal, embryonic, and neonatal development. For such, skin biopsies of 30 embryos and fetuses aged 2-6 months and 15 newborns were used in this study. We extracted only sixth month fetuses and newborn data. The samples were fixed at optimum shear temperature and sectioned using a freezing cryostat at 5 μm and -24°C . In addition to histology, analyses were made by electron microscopy scanning and morphometry supported by the software ImageJ.

We did not perform a meta-analysis since the studies reported different statistical descriptions for measurements on diverse anatomic sites of the body, layers, and sub-layers. Therefore, the process of skin measurement did not allow comparability. Only three publications presented average with variability values of skin thickness dimensions and without statistical analysis of similarities and differences. Even so, there were no confidence interval values for measurements in any article. With incomplete descriptive or analytic statistics, comparisons taking mean measurements and variability were impossible. After data extraction, taking only size descriptions and average values without ranges or statistical rigor, the studies reported variations between thickness dimensions even in the same region of biopsy sampling. For instance, entire epidermis thickness in abdomen of neonates ranged from 150.3 μm (without range values) to $650 \pm 324 \mu\text{m}$, according to Kakasheva-Mazhenkovska et al¹⁸ and Khalfa et al,¹⁰ respectively.

Five of the six studies provided neonatal skin data for reviewing and only two of the six reported fetal skin data. Considering that 5% - 18% of births occurred before 37 weeks of gestation,²⁰ the evaluation of late-fetal period in this review has clinical relevance. However, it was impossible to compare fetal and neonatal skin thickness. Skin is a dynamic tissue, engaged in a continuous process of keratinization of the epidermis and desquamation on the surface.⁵ Skin thickness has the potential to be a marker of the skin maturation as well as the structural architecture reported by Ersch et al²¹ Despite this, most scientific literature on the development of human skin has been derived from specialized books, which reported studies with a focus on morphological evolutionary description of the tissue. Little attention has been given to the thickness values of their layers or of the entire skin. A frequently cited study from 1980 by Holbrook et al²² affirmed that there is no regional variation in the epidermal layer during the first trimester of fetal life, with the exception of the foot, which was more advanced both in thickness and differentiation stages. During the second trimester, final keratinization over the epidermis occurred earlier in the head, foot, and hands according to Wolf.²³

Such classical histological values, proportions, of layers and differences between the body sites of newborns did not corroborate with the characteristics obtained with in vivo, using noninvasive imaging approaches. Evaluating 436 skin ultrasonography images of 222 alive newborns with gestational age ranging from 24 to 41 weeks of gestation, Vitral et al⁹ reported mean epidermal thickness at the sole with similar dimension to the forearm. In addition, the median dermal thickness had a higher dimension at the sole than at the forearm and a negative correlation between the dermal layer thickness and gestational age. Noninvasive measurements have occupied space in tissue morphometry, making them closer to clinical

practice challenges. Petersen et al²⁴ associated the skinfold thickness of newborns with prematurity, analyzing ultrasonography echograms. Optical coherence tomography also proved to be a precise technique in terms of repeatability and reproducibility to measure skin layers.¹² This is in part because they provide a view of in vivo tissue at real time, and also due to the dimensions being reliable and results more accurate than histological preparations. Another advantage over histological techniques is keeping the original tissue morphology.^{9,}²⁵ However, invasive methods are still essential in situations such as diagnosis of skin-related conditions,^{26, 27} as well as prenatal diagnosis of hereditary skin disease.²²

The major limitation of this review was the low reproducibility of the findings extracted from primary articles, mostly without focus on the quantitative analysis of neonatal skin thickness. In addition, descriptions of techniques for metering were incomplete, which did not allow a proper comparison between studies and a mathematic summarization of results. In evidence-based medicine, both measurement and standardization of measurement techniques are relevant in biomedical research.¹ Without variability values or confidence intervals regarding layers and sub-layers thickness dimensions being reported, there is no statistical evidence to confirm skin thickness variations between regions of the body as well as layers proportions of dermis and epidermis thickness, frequently reported in specialized text-book reports regarding newborns' skin.²⁸

To date, a reliable histological thickness of newborns' skin is unknown and there are only a few studies addressing this topic. This comprehensive review summarized evidence on skin thickness during birth obtained by invasive biopsy sampling of fetuses and newborns. Taking into consideration the importance of the skin barrier maturation in preterm neonates, for further investigations, analysis with better methodological quality will still be relevant to

better sizing skin at birth, as well as correlating them to clinical challenges, such as maintaining temperature, infections, and other prognosis indicators.

Keywords

barrier function, gestational age, histological techniques, review, skin, skin maturation, skin structure, systematic

Funding Information

Grand Challenges Exploration from the Bill & Melinda Gates Foundation. Grant Number: OPP1128907

Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

ACKNOWLEDGEMENTS

Brazilian Ministry of Health, Program of Development of the Industrial Health Complex (PROCIS), project 23072.052747/2017-51, and CAPES-Brazil (PVE 88881.172810/2018-01).

CONFLICTS OF INTEREST

Author ZSNR declares a patent deposit BR1020170235688 (CTIT-PN862) approach to analyze newborn skin reflection and assess gestational age, on behalf of the Universidade Federal de Minas Gerais and Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, Brazil, <http://www.fapemig.br/en/>.

AUTHORS CONTRIBUTION

IMFS and GLNV searched, interpreted, and analyzed the data, and wrote and revised the study. ZSNR designed this systematic review, interpreted and analyzed the data, and wrote and revised the study.

REFERENCES

- 1 Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, et al. Métodos não invasivos in vivo para investigação das propriedades físicas da pele. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 72 (2): 295 - 303.
- 2 Iaranjas t, Dini V, Romanelli M. Fisiologia da pele do recém-nascido e do bebê: implicações clínicas. *Adv Tratamento de Feridas.* 2015; 4 (10): 587 - 595.
- 3 Hoath SB, Maibach HI. *Pele Neonatal: Estrutura e Função.* Boca Raton: CRC Press; 2003.
- 4 Howson CP, Kinney MV, McDougall L, Lawn JE . Nascido muito cedo: o nascimento prematuro é importante. *Reprod Health.* 2013; 10 (supl 1): S1.
- 5 Stamatas GN, Nikolovski J, Mack MC, Kollias N. Fisiologia e desenvolvimento da pele infantil durante os primeiros anos de vida: uma revisão de descobertas recentes baseadas em estudos in vivo. *Int J Cosmet. Sci.* 2011; 33 (1): 17 - 24.
- 6 Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Desenvolvimento da função de barreira cutânea em prematuros. *J Invest Dermatol.* 1998; 111 (2): 320 – 326
- 7 Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, et al. Aquisição padronizada da função de barreira da pele durante o desenvolvimento. *Desenvolvimento.* 1998; 125 (8): 1541 - 1552.
- 8 Visscher H, Narendran V. Pele neonatal infantil: desenvolvimento, estrutura e função. *Enfermeira recém-nascida /.* 2014; 14 (4): 135 - 141.
- 9 Vitral L, Aguiar R, de Souza I, Rego H, Guimarães RN, Reis Z. A espessura da pele como potencial marcador da idade gestacional ao nascer, apesar dos diferentes perfis de crescimento fetal: um estudo de viabilidade. *PLoS ONE.* 2018; 13 (4): e0196542.

- 10 Khalfa HM, Albideri A, Jaffat HS. Medidas histológicas e citoarquiteturais da epiderme humana em diferentes locais anatômicos de indivíduos iraquianos embrionários, fetais e neonatais no Hospital Maternidade Al - Hilla / Iraque. J Pharm Sci Res. 2018; 10 (4): 812 - 818.
- 11 Rei A, Balaji S, Keswani SG. Biologia e função da pele fetal e pediátrica. Plastico facial Surg Clin North Am. 2013; 21 (1): 1 - 6.
- 12 Gambichler t, Matip R, Moussa L, Altmeyer P, Hoffmann K. Dados in vivo de espessura epidérmica avaliados por tomografia de coerência óptica: efeitos da idade, sexo, tipo de pele e localização anatômica. J. Dermatol Sei. 2006; 44 (3): 145 - 152.
- 13 Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. A declaração PRISMA para relatar revisões sistemáticas e meta-análises de estudos que avaliam intervenções em saúde: explicação e elaboração. BMJ. 2009; 339: b2700.
- 14 Whitlock EP, Lin JS, Chou R, Shekelle P, Robinson KA. Usando revisões sistemáticas existentes em revisões sistemáticas complexas. Ann Intern Med. 2008; 148 (10): 776 - 782.
- 15 Smith LT, Holbrook KA, PH Byers. Estrutura da matriz dérmica durante o desenvolvimento e no adulto. J Invest Dermatol. 1982; 79 (1): 93 - 104.
- 16 Fairley JA, Rasmussen JE. Comparação da espessura do estrato córneo em crianças e adultos. J Am Acad Dermatol. 1983; 8 (5): 652 - 654.
- 17 De Viragh P, Meuli M. Desenvolvimento do folículo piloso no couro cabeludo humano desde o nascimento até a idade adulta: estudo estatístico com especial atenção às células-tronco putativas no bojo e células proliferativas na matriz. Arch Dermatol Res. 1995; 287 (3-4): 279 – 284.

- 18 Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Gjokik G, et al. Variações das características histomorfológicas da pele humana de diferentes regiões do corpo em indivíduos de diferentes faixas etárias. *Pril.* 2011; 32 (2): 119 - 128.
- 19 Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Kostovska N, et al. Características histomorfométricas da pele humana de capillitium em indivíduos de diferentes faixas etárias. *Pril.* 2011; 32 (2): 105 - 118.
- 20 Organização Mundial da Saúde. Estatísticas mundiais de saúde 2015. Luxemburgo: dados da Catalogação na Publicação da Biblioteca da OMS; 2015.
- 21 Ersch J, Stallmach T. Avaliação da idade gestacional a partir da histologia da pele fetal: um estudo de autópsia de 379 fetos. *Obstet Gynecol.* 1999; 94 (5, parte 1): 753 - 757.
- 22 Holbrook KA, Odland GF. Desenvolvimento regional da epiderme humana no embrião do primeiro trimestre e no feto do segundo trimestre (idades relacionadas ao tempo da amniocentese e biópsia fetal). *J Invest Dermatol.* 1980; 74 (3): 161 - 168.
- 23 Ilo J. A substituição da periderme por epiderme. *Folia Morphol.* 1968; 16 (1): 24 - 35.
- 24 Petersen JR, Petersen S, Serup J. Medição por ultrassom de alta frequência da derme e gordura subcutânea no recém-nascido. *Skin Res Technol.* 1995; 1 (2): 86 - 89.
- 25 Sattler CE, Kastle R, Welzel J. Tomografia de coerência óptica em dermatologia. *J Biomed Opt.* 2013; 18 (6): 061224.
- 26 Vyas S, Meyerle J, Burlina P. Estimativa não invasiva da espessura da pele a partir de imagens hiperespectrais e validação usando ecografia. *Comput Biol Med.* 2015; 57: 173 - 181.

27 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Biopsia. c2017.

<http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/procedimentos/biopsia/1/>. Publicado em 2019.

Google Scholar

28 McGrath JA, Uitto J, et al. Anatomia e organização da pele humana. In: T Burns, S Nreathnach, N Cox, eds. Livro de Dermatologia de Rook. Hoboken: Blackwell Publishing; 2008.

5.2. Artigo científico II

Association between the chronology of gestation and the morphometrical skin characteristics at childbirth, a predictive mathematical model

Short title: Gestational age prediction based on histology

Ingrid Michelle Fonseca de Souza^{1&#}, Gabriela Luiza Nogueira Vitral^{1&#}, Marcelo Vidigal Caliar^{2&#} Zilma Silveira Nogueira Reis^{1,3#}

¹Postgraduation Program of Women's Health, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Department of general Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

[#]Current Address: Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena, 190, sala 601, CEP 30.130.100 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author

E-mail: zilma@medicina.ufmg.br

&These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Background

The structural maturation of the skin is considered a potential marker of pregnancy dating. Neonatal survival is directly related to the development of the protective epidermal barrier. This study investigated the correlation between the thickness of layers, the area of the glands, and the fibrous connective tissue of the newborn skin with the pregnancy chronology to propose models for predicting gestational age based on morphometry values.

Methods

A cross-sectional analysis of 35 corpses of newborns evaluated the association between gestational age and skin histology. The biopsy was performed up to 48 hours after death in periumbilical abdomen, palm, and sole regions. Pregnancy chronology was based on the obstetric ultrasound before 14 weeks. The histological slides were stained by Gomori's trichrome. The dimensions of the skin layers, area of glands, and connective fibrous tissue were measured with imaging software support. Univariate and multivariate regression models on morphometric values were used to predict gestational age.

Findings

Gestational age at birth ranged from 20.3 to 41.2 weeks of gestation. Seventy-one skin specimens resulted in the analysis of 1183 digital histological images. The correlation between skin thickness and the gestational age was positive and strong in both regions of the body. The highest univariate correlation between gestational age and skin thickness was using the epidermal layer dimensions, in palm ($r = 0.867$, $p < 0.001$). The multivariate modeling with the thickness of the abdominal epidermis, the dermis, and the area of the

sebaceous glands adjusted had the highest correlation with gestational age ($r = 0.99$, $p < 0.001$).

Conclusion

The thickness of the protective epidermal barrier is, in itself, a potential marker of pregnancy dating. However, sets of values obtained from skin morphometry can improve the estimation of the gestational age than univariate models. Such findings may support noninvasive approaches to skin imaging to estimate the dating of pregnancy with various clinical applications.

Keywords

Skin; Histological Techniques; Skin maturation; Skin structure; Gestational age; Preterm birth

INTRODUCTION

The anatomy of the human skin shows a clear relationship between its structure and function[1]. When well differentiated, the skin provides a physical and immune barrier essential to newborn survival[2]. The barrier function of the skin is mainly due to the stratum corneum which is a layer composed of flattened and differentiated corneocytes terminally separated by layers of densely compacted lipides[1,3]. Studies using skin biopsy are relevant to improve knowledge about the protective barrier during the perinatal period[4,5]. However, the specimen is difficult to obtain[6] and the preparation of slides can result in artifacts and require multiple tissue samples[6,7]. Even so, microscopic methods together with staining procedures allow to outline specific components and measure them in order to portray tissue modifications over time [8,9].

It is not surprising that the chronology of pregnancy is considered the main indicator of newborn survival[10]. There are critical clinical relationships between epidermal barrier competence and neonatal survival, faced with the risk of hypothermia and infections[4]. Histological analysis suggests that epidermal development becomes complete in utero at approximately 34 gestational weeks, but will only become functional in the first week of life [11]. Premature newborns with gestational age < 37 weeks have the thinnest epidermis and a less developed functional barrier than full - term newborns[12], being thus poorly prepared to face the extra-utero environment[11]. These have high rates of water loss and transcutaneous heat loss, in addition to the difficulty in maintaining homeostasis and having a deficient impermeable barrier[13].

Visible changes in the clinical examination of the skin of the newborn and also in a histological study of this tissue demonstrate that the functional and structural maturation of

the skin is a potential marker of the chronology of pregnancy[14,15]. A non-invasive imaging study ultrasound indicates the thickness of the newborn's skin as one of the evolutionary indicators that can be objectively measurable to estimate the gestational chronology[7]. In fact, the determination of gestational age with greater accuracy can positively affect perinatal results [10,16], as it will direct the most appropriate interventions in neonatal care[17]. The chronology of gestation is the basis for the statistics of prematurity and nutritional status of the newborn, guiding public policies, which includes the analysis of perinatal mortality [18]. Nonetheless, the determination of gestational age at birth is not a trivial task, since it is directly affected by access to high-cost technology, such as obstetric ultrasound and by the imprecision of postnatal maturity clinical scores [19]. New approaches have been proposed, among them the analysis of skin maturity through its optical properties [20].

This study investigated the correlation between the thickness of the skin layers, area of glands and fibrous connective tissue of the skin in corpses of newborns with the chronology of pregnancy.

METHODS AND MATERIALS

Environment and subjects

Feasibility study evaluated 35 corpses of newborns, stillbirths or dead after birth, prospectively selected in accordance with the eligibility criteria, from January 2016 to September 2019. They met inclusion criteria as follows: childbirth with gestational age between 20 and 42 weeks of gestation, calculated using an early-ultrasonography-based reference, performed before 14 weeks of gestation [10]. In the case of stillbirths, the

estimated interval between the fetal death and childbirth was up to three days. For alive newborns selected after decease, the extra uterine life after birth did not exceed 48 hours of age and biopsy was possible within 24 hours after neonatal death. Exclusion criteria were structural skin alterations or conditions that modify the skin, such as anhydramnios, hydrops, congenital skin diseases, and clinical evidence of chorioamnionitis as maternal fever or foul-smelling amniotic fluid; Tissue maceration assessed at the visual inspection of the corpses; Edema or autolysis, verified during histological analysis.

The Research Council of Universidade Federal de Minas Gerais, Hospital das Clínicas, and Hospital Sofia Feldman, Brazil reviewed and independently approved the study protocol. The ethical approval number is CAAE 44834915.3.0000.5149. Parents were enlightened regarding this scientific investigation and signed an informed consent form on behalf of their newborns.

The skin biopsy and tissue processing

Human skin specimens were withdrawn from three regions of the body: over the thenar eminence of palm (palm), over the periumbilical abdominal area, and over the calcaneus area (sole of the foot). Punch biopsies cut a circle of 1cm² of diameter with sufficient depth to reach the full skin thickness and partial hypodermis. The conventional histological preparation included a 10% neutral formalin fixation, and 5 µm tissue sections of blocks embedded in paraffin. The histological slides were stained by Gomori's trichrome.

Morphometric analysis of the skin

The thickness of the epidermis, dermis, area of the sebaceous and sweat glands were measured, as well as the area of fibrous tissue. A3DHISTECH Pannoramic MIDI (Budapest, Hungary) scanner and Pannoramic Viewer software captured images of the slides from each

slide, 2 to 5 frames with an objective magnification of $\times 10$ were selected according to image quality criteria, tissue integrity, and presence of all skin layers and part of hypodermis. To semi-automatically explore the image, we set algorithms in the KS300 software of analysis contained in the Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany), based on Caliri procedures [21]. Epidermal measurements included the thickness of the epidermal layer and the corneum stratum, with boundary in the image delineated by the observer. The epidermis was identified by its darker color and stratified keratinocytes, Fig 1. Dermal layer thickness corresponded to the measurement from the epidermal–dermal junction to the dermal–hypodermal limits. The average of five smaller measures and five larger measures were obtained interactively to average represents the thickness and within variance.

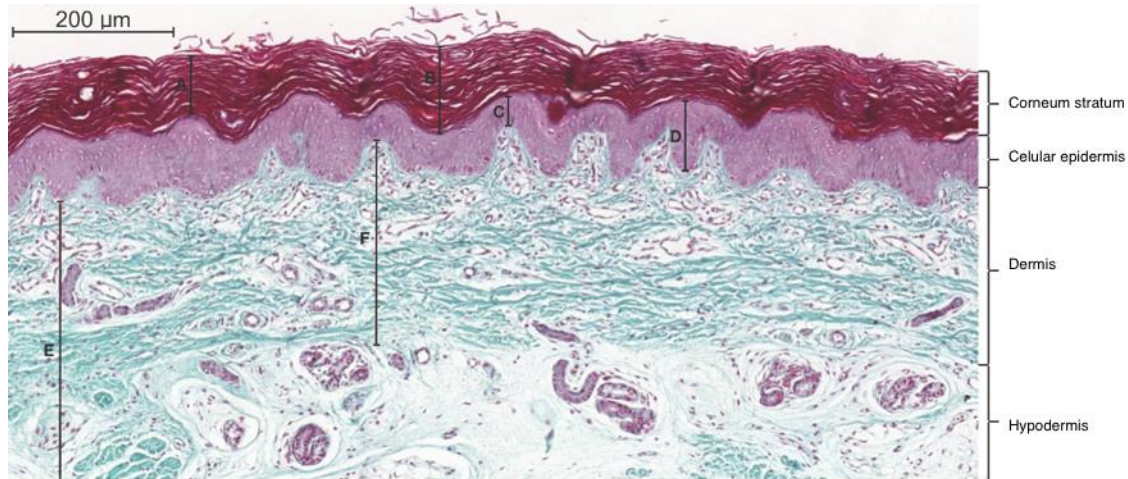


Fig 1. Photomicrograph of the skin on the bottom of the foot of stillbirth at 40 gestational weeks. Fig legend (A) represents the measurement of the stratum corneum with a lower limit corresponding to the apex of the epidermal crest; B represents the measurement of the stratum corneum with a lower limit corresponding to the valley of the epidermal

papillae; C represents the measurement of the cellular epidermis with a lower limit corresponding to the apex of the dermis; D represents the measurement of the epidermis with a lower limit corresponding to the valley of the epidermal papillae; E represents the measurement of the hypodermis with an upper limit corresponding to the valley of the epidermal papillae; F represents the measure of the upper limit dermis corresponding to the crest of the dermal papilla; Gomori trichrome. Bar = 200 μm .

To calculate the dermal fibrous connective tissue area, a dermal sector with $7,7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ was obtained by selecting pixels with shades of green, creating a binary image, and using digital processing. We set algorithms in the KS300 software of analysis, based on Prata et al. [22]. Interactive measurements of each sweat or sebaceous glands were obtained separately, within a dermal and hypodermal sector with $7,27 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, based on procedures described by Costa et al.[23].

Statistical analyses

Descriptive statistics assessed the clinical characteristics of the newborns, and skin morphometry variables. Depending on the data distribution, quantitative variables were presented as average, standard deviations (SDs), medians (minimum and maximum), or interquartile ranges (IQRs). The coefficient of variation (CV), and the 95% confidence interval (CI) were calculated by bootstrap to allow inference based on the skin morphometry sample data. Qualitative variables were presented as absolute values and percentages. Univariate and multivariate regression analysis assessed the correlation between gestational age and skin morphometry, for each area on the body where skin biopsy was performed. Multiple regression analysis included significant ($P < 0.05$) predictor variables from the

univariate models, using the stepwise approach. Durbin-Watson test of residuals evaluated the fit of the models. Coefficient of determination (adjusted R^2) were carried based on the hypothesis that it was zero. The SPSS ® 22.0 was used for the analysis. P values of less than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS

From 35 enlisted corpses, seven did not meet the quality criteria of the skin tissues during histological analysis. Twenty-eight selected newborns gathered 12 (57.14%) after birth, and 16 (42.86%) stillbirths. Fig 2 presents details from the enrollment of the newborns to the imagery, according to the assessed segment of the body.

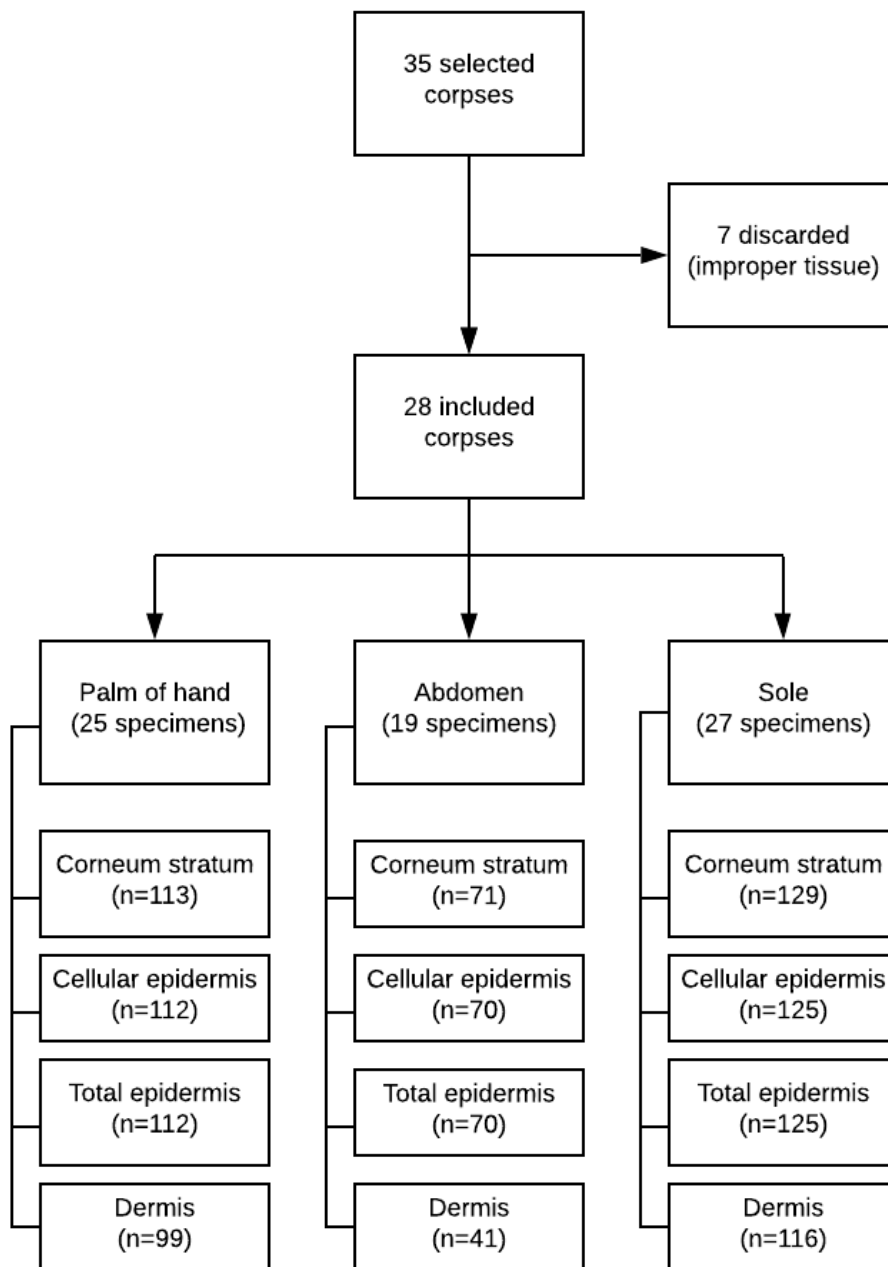


Fig 2. Flowchart diagram detailing the number of analyzed images, according to the skin over body areas

Gestational age ranged from 20.3 to 41.2 weeks of gestation. Clinical characteristics of newborns is described in Table 1. The main cause of death was major malformation, accounting for 16 (57.1% - line 3) newborns. There was no difference between stillborn and deaths after childbirth newborns, in relation to the cause of death ($p = 0.313$, line 2), GA ($p = 0.252$, line 7), birth weight ($p = 0.252$, line 8) and sex ($p = 0.215$, line 9).

Table 1. Clinical characteristics of newborns

Characteristics	Stillbirths (n=12)	Dead after delivery (n=16)	p - value
Causes of death			0.313*
Major malformation (n,%)	5 (17.86)	11 (39.28)	
Fetal distress (n,%)	2 (7.14)	1 (3.57)	
Diabetes (n,%)	0 (0)	1 (3.57)	
Unknown or others (n,%)	7 (58.3)	3 (18.75)	
Gestational age (weeks), average (SD)	33.1 (17.53)	35.2 (19.8)	0.252**
Birth weight (grams), average (SD)	1237.5 (2770)	1935 (3175)	0.252**
Sex			0.215*
Male	6 (21.43%)	3 (10.71%)	
Female	5 (17.86%)	11 (39.28%)	
Undetermined	1 (3.57%)	2 (7.14%)	

*Qui-square Test. **Mann-Whitney Test. SD: standard deviation.

Thickness of the newborns skin layers

One hundred and eighty-three skin images were analyzed from 71 slides. The dimensions of the skin layers, their intrinsic variations, and comparisons between areas of the body are presented in Table 2. The median epidermal thickness on the skin over palm was similar to that of the sole: 152.1 (43.9 to 251.9) μm and 146.2 (56.2 to 276.4) μm ($p = 0.618$) respectively lines 11 and 12. However, the median thickness of the dermal layer was higher

over the periumbilical abdominal area 724.0 (287.0 a 1107.0) μm , line 16, than sole 396.3 (174.0 a 493.2), line 15, and palm 384.1 (166.0 a 751.0) μm , line 14, $p < 0.001$. The standardized variability of measurements for layers of the skin had high value in skin layers over the periumbilical abdominal area, lines 11, 12 and 13.

Table 2. Dimensions of the skin layers at birth, with comparisons between the assessed areas of the body

	Median (95% CI)	Min-Max	CV# (%)	Comparisons		
				P*	P**	P***
Thickness of the corneum stratum (μm)						
Palm	63.6 (21.3 - 81.9)	6.1 - 154.5	32.9	0.707		
Sole	72.4 (7.6 - 176.0)	7.6 - 176.0	34.1			0.002
Periumbilical abdominal area	18.0 (8.0 - 43.4)	8.0 - 43.4	46.6		0.010	
Epidermal thickness (μm)						
Palm	72.0 (33.0 - 101.7)	33.0 - 101.7	44.2	0.701		
Sole	78.8 (41.2 - 128.5)	41.2 - 128.5	41.6			<0.001
Periumbilical abdominal area	44,3 (19.0 – 61.2)	19 – 61.2	41.7		<0.001	
Epidermal total thickness (μm)						
Palm	152.1 (43.9 - 251.9)	43.9 - 251.9	77.1	0.618		
Sole	146.2 (122.6 - 170.3)	56.2 - 276.4	74.5			<0.001

Periumbilical abdominal area	66.0 (28.1 - 99.5)	28.1 - 99.5	85.9		<0.001	
Dermal thickness (µm)						
Palm	384.1 (166.0 - 751.0)	166.0 - 751.0	21.9	0.977	0.002	<0.001
Sole	396.3 (174.0 - 493.2)	174.0 - 493.2	20.3			
Periumbilical abdominal area	724.0 (287.0 - 1107.0)	287.0 - 1107.0	18.7			

Comparisons: *difference between palm and sole areas. **difference between palm and periumbilical abdominal area. *** difference entre a sole and periumbilical abdominal area.

#CV: average of the coefficient of variation obtained for each image.

The area of fibrous connective tissue of the skin over periumbilical area $0.259 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (0.093 to 0.526) had a median value similar to that of the sole $0.235 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (0.008 to 0.524), and palm $0.248 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (0.069 to 0.346), $P = 0.708$ and $P = 0.817$, respectively (Table 3, lines 4, 5 and 6). However, the median value of the area of the sweat glands in the skin over periumbilical area, $0.294 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (0.020 to 3.651), was higher than that in the palm $0.097 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (0.028 to 0.172) or sole, $0.088 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (0.033 to 0.242), lines 8 and 9, $P < 0.001$, for both comparisons.

Table 3. Concentration of fibrous tissue and glands of the skin at birth, with comparisons between the assessed areas of the body

		Comparisons
--	--	--------------------

	Median (Min-Max)	P*	P**	P***
Area of fibrous connective tissue (10⁶ μm²)				
Palm	0.248 (0.069 to 0.346)	1		
Sole	0.235 (0.008 to 0.524)			0.708
Periumbilical abdominal area	0.259 (0.093 to 0.526)		0.817	
Area of sweat glands (10⁶ μm²)				
Palm	0.097 (0.028 to 0.173)	0.718		
Sole	0.088 (0.033 to 0.242)			<0.001
Periumbilical abdominal area	0.025 (0.010 to 0.061)		<0.001	
Area of sebaceous glands (10⁶ μm²)				
Periumbilical abdominal area	0.294 (0.020 to 3.652)	...	...	...

Comparisons: *difference between palm and sole. ** difference between palm and periumbilical area. *** difference between sole and periumbilical area.

The correlation between the gestational age and morphometry of the skin at birth is presented in Table 4. Scatter plots with the linear correlation of each morphometric variable with the gestational age are in supplementary files S1 to S13. In the univariate analysis, the epidermal thickness layer highlighted as the dimension strongly associated with gestational age: in the skin over palm ($r = 0.867$, $P < 0.001$, line 3), periumbilical abdominal area ($r = 0.806$, $P < 0.001$, line 8), and sole ($r = 0.712$, $P < 0.001$, line 14). The fibrous connective tissue (lines 5, 10 and 16), sweat or sebaceous glands areas had mild or absent correlations with the gestational age (lines 6, 11, 12 and 17). However, compositions of the morphometric parameters fitted multivariate models that explained better the variability of the gestational age than univariate correlations. Considering the skin of the periumbilical area, the composition formed by the thickness of the epidermis, dermis and the area of sebaceous glands showed an excellent correlation with gestational ($r=0.99$ $p<0.001$, line 8). Concern the skin over the hand and sole, the multivariate model grouping morphometry parameters also enhanced the model of prediction of gestational age, in relation to the univariate models: adjusted $r=0.94$ $p<0.001$ (line 3), and $r=0.99$ $p<0.001$ – line 8).

Table 4. Predictive models for gestational age, based on morphometry values of the skin at birth

	Univariate analysis	Multivariate analysis

	Linear coefficient (P-value)	Adjusted Coefficient of correlation	P-value of the model
Skin over palm			
Epidermal thickness (μm)	0.867 (<0.001)	0.655	0.94 (p<0.001)
Dermal thickness (μm)	0.805 (<0.001)	0.256	
Area of fibrous connective tissue (μm^2)	0.518 (0.014)	0.169	
Area of sweat glands (μm^2)	-0.143 (0.515)	...	...
Skin of periumbilical abdominal area			
Epidermal thickness (μm)	0.806 (<0.001)	0.559	0.99 (p<0.001)
Dermal thickness (μm)	0.579 (0.038)	-0.216	
Area of fibrous connective tissue (μm^2)	0.538 (0.071)	...	...
Area of sweat glands (μm^2)	0.441 (0.131)	...	...
Area of sebaceous glands (μm^2)	- 0.845 (0.001)	-0.646	
Skin over sole			
Epidermal thickness (μm)	0.712 (<0.001)	0.540	0.83 (p<0.001)

Dermal thickness (μm)	0.660 (<0.001)	0.456	
Area of fibrous connective tissue (μm^2)	-0.266 (0.189)	...	...
Area of sweat glands (μm^2)	- 0.266 (0.189)	...	...

R-square of multivariate models: 0.87 (palm) 0.97 (abdomen) 0.69 (sole). Durbin-Watson analysis: 1.94 (palm) 1.90 (abdomen) 1.45 (sole).

DISCUSSION

Main findings

In this study, the main contribution was to correlate dimensions measured by morphometry of the skin of a newborn with its gestational age, a new knowledge that can objectively estimate the chronology of pregnancy, from histology. The processing of images and the synthesis of values with inferential statistics on the measurements of layers, sublayers, gland area and fibrous connective tissue allowed the development of mathematical models of prediction. In addition, the study documented the intra-subject variability of these measures, numerically reflecting the ripple of the skin layers, guided by the dermal papillae. Regarding the external validity, the selected sample gathered newborns with a wide range of gestational age from extreme prematurity, 20.3 weeks, to term, 41.6 weeks. Although major malformations were responsible for most deaths (57.1%), conditions associated with changes in skin structure were excluded in the recruitment phase.

Regarding morphometric measurements, the results fill a knowledge gap in the study of human skin in this age group, including samples of premature births. In a systematic review published by De-Souza et al.[4], previous similar studies that provide measurements of newborn skin thickness were considered insufficient to describe morphometry in a reproducible and detailed manner. In addition to the care with microscopic measurements, the chronology of pregnancy was calculated based on early obstetric ultrasound examination, considered a reference standard for pregnancy dating[10].

There are numerous challenges of inaccurate calculation of pregnancy chronology by available clinical methods[19], and this is also a motivation for the use of fetal skin histology in pregnancy dating. The proposed models of prediction of gestational age may support the

investigation of perinatal death and support non-invasive studies with similar applications[7,20]. Infant mortality has at preterm birth, one of the major current challenges of obstetric and neonatal care[19,24]. Although the approach is invasive, using skin biopsy in the corpses of newborns, the process brought an opportunity to estimate the chronology of pregnancy, at the time of death, from the morphometry of the skin of certain regions and technique. The histological analysis of the skin, through the visual analysis of architectural patterns the tissues already proved predictive of gestational age in a previous study[25], without however presenting quantitative elements that allow the dating.

Comparison with prior studies

In relation to the magnitude of the measurements, the thickness of the epidermis was greater in the region of the palm and sole of the foot, in relation to the periumbilical region, a finding that confirms previous reports that in these places the stratification of the epidermis is earlier and more intense than in other regions of the body[25,26]. It is possible that the early and progressive multiplication of the epidermis in these places is an explanation for the strong correlation found between the thickness of the skin layers and the chronology of pregnancy, even as an isolated marker. The comparability of the values found with previous reports is hampered by the incomplete description of the various measures and techniques already published in the scientific literature. Measurements of part of the sublayers, for example, the thickness of the epidermis without including the stratum corneum, only dermis thickness[9] and measurements made in different places of the body and ages of the children studied[27,28,29]. However, the measurement of epidermal thickness, according to Kakasheva-Mazhenkovska et al.[27, was 193.2 μm in the sole of the foot, 161.6 μm in the abdomen and 142.0 μm in the hand, comparable to the present study. The measurements of

the epidermis described here also corroborate the findings of a non-invasive study that performed measurements of different sites of the body of newborns through high frequency ultrasound[7], which showed values of the thickness of the epidermis in the region of the sole of the foot were 175.4 (17.6) μm . In the dermal layer, we obtained values apparently lower than 873.0 μm in the palm, 719.9 μm in the sole of the foot and 1297.0 μm in the abdomen[27]. We attribute these differences to variations in technique and gestational age of the samples.

More recently, Dhingra et al. analyzed four regions of the body of 30 fetuses from 11 to 40 weeks of gestation. The epidermal thickness had a significant positive correlation with gestational age[30]. Our study corroborated such results of a strong correlation with gestational age in the skin over the abdomen and palm. However, this study did not combine variables and nor assessed gland area and fibrous connective tissue in the prediction as the present approach.

Limitations and highlights

The main limitation of this study was the strict eligibility criteria for pregnancy dating and tissue quality, which made it difficult to obtain the post-mortem specimen, considered rare[31]. On the other hand, we emphasize that the multivariate models achieved high correlation coefficients for groups of morphometric measures, 0.94 in the palm region, 0.99 in the abdomen region and 0.83 in the sole of the foot, Table 4. In addition, the objective measurement of several tissue components such as the area of connective tissue and glands, in order to estimate gestational age, is unprecedented. The mathematical models have the potential to automate the analysis process, and may facilitate in the future the obtaining of

gestational age information from the systematized analysis of a histological image of the skin. In addition, we believe that future studies may find utility in the results presented in this analysis in tissue engineering, simulation models of the skin, mainly, subsidize more appropriate care with the skin of the newborn.

Conclusions

Skin morphometry, especially the measurement of layer thickness, proved to be an important marker of gestational age at birth. The representation of structural changes in the skin in composite mathematical models, involving various elements of this tissue, proved to be promising in the automation of the pregnancy dating process from histological images.

Financial Disclosure Statement

This research was supported by the Grand Challenges Exploration from the Bill & Melinda Gates Foundation (Grant number OPP1128907, Contract) <http://www.gatesfoundation.org/> and Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Grant number AUC00015-17), Brazil <http://www.fapemig.br/en/>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

References

1. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of anatomy*. 2019;234(4):438-55. MID: 30740672. PMCID: PMC6422806. DOI: 10.1111/joa.12942
2. Byrne C, Hardman M, Nield K. Covering the limb–formation of the integument. *Journal of anatomy*. 2003;202(1):113-23. PMCID: PMC1571060 PMID: 12587926. i: 10.1046/j.1469-7580.2003.00142.x
3. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *International journal of pharmaceutics*. 2012;435(1):3-9. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.005
4. de-Souza IMF, Vitral GLN, Reis ZSN. Skin thickness dimensions in histological section measurement during late-fetal and neonatal developmental period: A systematic review. *Skin Research and Technology*. 2019. <https://doi.org/10.1111/srt.12719>
5. Gambichler T, Matip R, Moussa G, Altmeyer P, Hoffmann K. In vivo data of epidermal thickness evaluated by optical coherence tomography: effects of age, gender, skin type, and anatomic site. *Journal of dermatological science*. 2006;44(3):145-52. PMID: 17071059 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2006.09.008
6. Steven B. Hoath HIM. Neonatal Skin: Structure and Function. Second Edition, Revised and Expanded ed1982.
7. Vitral GLN, Aguiar RAPL, de Souza IMF, Rego MAS, Guimarães RN, Reis ZSN. Skin thickness as a potential marker of gestational age at birth despite different

fetal growth profiles: A feasibility study. PLoS One. 2018;13(4):e0196542.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196542>

8. Oriá RB, Ferreira FVA, Santana ÉN, Fernandes MR, Brito GA. Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):425-34. . <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000400004>

9. Smith LT, Holbrook KA, Byers PH. Structure of the dermal matrix during development and in the adult. *Journal of Investigative Dermatology*. 1982;79(1):93-104. <https://doi.org/10.1038/jid.1982.19>

10. Gynecologists ACoOa. Method for estimating due date. Committee Opinion No. 611. *Obstet Gynecol*. 2014;124(4):863-6. <https://doi.org/10.1038/jid.1982.19>

11. Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;111(2):320-6. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00289.x>

12. Leung A, Balaji S, Keswani SG. Biology and function of fetal and pediatric skin. *Facial Plastic Surgery Clinics*. 2013;21(1):1-6. PMCID: PMC3654382. PMID: 23369584. doi: 10.1016/j.fsc.2012.10.001

13. Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C. Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development*. 1998;125(8):1541-52.

14. Oranges T, Dini V, Romanelli M. Skin physiology of the neonate and infant: clinical implications. *Advances in wound care*. 2015;4(10):587-95. PMCID: PMC4593874. PMID: 26487977. doi: 10.1089/wound.2015.0642

15. Waaijer ME, Gunn DA, Catt SD, Van Ginkel M, De Craen AJ, Hudson NM, et al. Morphometric skin characteristics dependent on chronological and biological age: the Leiden Longevity Study. *Age*. 2012;34(6):1543-52. PMC3528376. PMID: 21909657. doi: 10.1007/s11357-011-9314-5
16. Organization WH. Born too soon: the global action report on preterm birth. 2012.
17. Karl S, Suen CSLW, Unger HW, Ome-Kaius M, Mola G, White L, et al. Preterm or not—an evaluation of estimates of gestational age in a cohort of women from rural Papua New Guinea. *PloS one*. 2015;10(5):e0124286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124286>
18. Silveira MF, Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, Barros FC, Victora CG. Aumento da prematuridade no Brasil: revisão de estudos de base populacional. *Revista de Saúde Pública*. 2008;42:957-64. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102008000500023>
19. Lee AC, Panchal P, Folger L, Whelan H, Whelan R, Rosner B, et al. Diagnostic accuracy of neonatal assessment for gestational age determination: a systematic review. *Pediatrics*. 2017;140(6):e20171423. PMID: 29150458 DOI: 10.1542/peds.2017-1423
20. Reis ZSN, Vitral GLN, de Souza IMF, Rego MAS, Guimaraes RN. Newborn skin reflection: Proof of concept for a new approach for predicting gestational age at birth. A cross-sectional study. *PloS one*. 2017;12(9):e0184734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184734>

21. Caliari MV. Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes: Editora UFMG; 1997.
22. Prata LO, Rodrigues CR, Martins JM, Vasconcelos PC, Oliveira FMS, Ferreira AJ, et al. ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(1):8-21. PMID: 27550926 PMCID: PMC5206984 DOI: 10.1177/1535370216665174
23. Costa C, Brito K, Gomes M, Caliari M. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite*. 2007;14(4):329-34. PMID: 18225422 DOI: 10.1051/parasite/2007144329
24. Howson CP, Kinney MV, McDougall L, Lawn JE, Group BTSPBA. Born too soon: preterm birth matters. *Reprod Health*. 2013;10 Suppl 1:S1.
25. Ersch J, Stallmach T. Assessing gestational age from histology of fetal skin: an autopsy study of 379 fetuses. *Obstetrics & Gynecology*. 1999;94(5):753-7. PMID: 10546723 DOI: 10.1016/s0029-7844(99)00379-8
26. Hashimoto K, Gross BG, DiBella RJ, Lever WF. The ultrastructure of the skin of human embryos. IV. The epidermis. *J Invest Dermatol*. 1966;47(4):317-35. <https://doi.org/10.1038/jid.1966.150>
27. Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Kostovska N, Gjokik G. Histomorphometrical characteristics of human skin from capillitium in subjects of different age. *Prilozi*. 2011;32(2):105-18. PMID: 22286616
28. Fairley JA, Rasmussen JE. Comparison of stratum corneum thickness in children and adults. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1983;8(5):652-4. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(83\)70074-5](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(83)70074-5)

29. Albideri A. Histological and Cytoarchitectural Measurements of Human Epidermis in Different Anatomical Sites of Embryonic, Fetal and Neonatal Iraqi Subjects in Al-Hilla/Iraq Maternity Hospital. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018;10(4):812-8.
30. Dhingra S, Asghar A. The Epidermal Growth Pattern in Human Fetuses. 2020. DOI: 10.4103/ijpd.IJPD_42_19
31. Hoath SB, Maibach HI. Neonatal skin: structure and function: CRC Press; 2003.

ARQUIVOS SUPLEMENTARES DO ARTIGO II

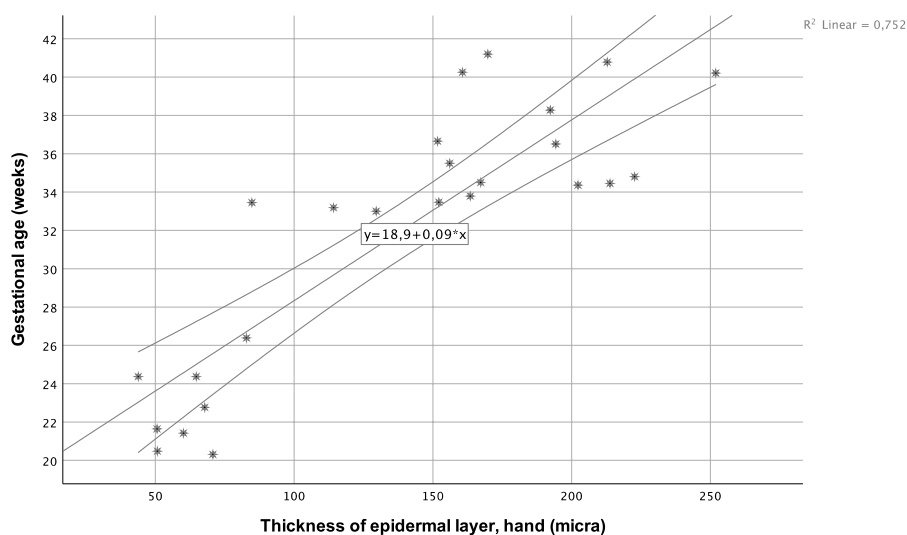


Gráfico 1. Correlação entre a idade gestacional e espessura da epiderme, na região da palma da mão. R2: coeficiente de determinação da regressão.

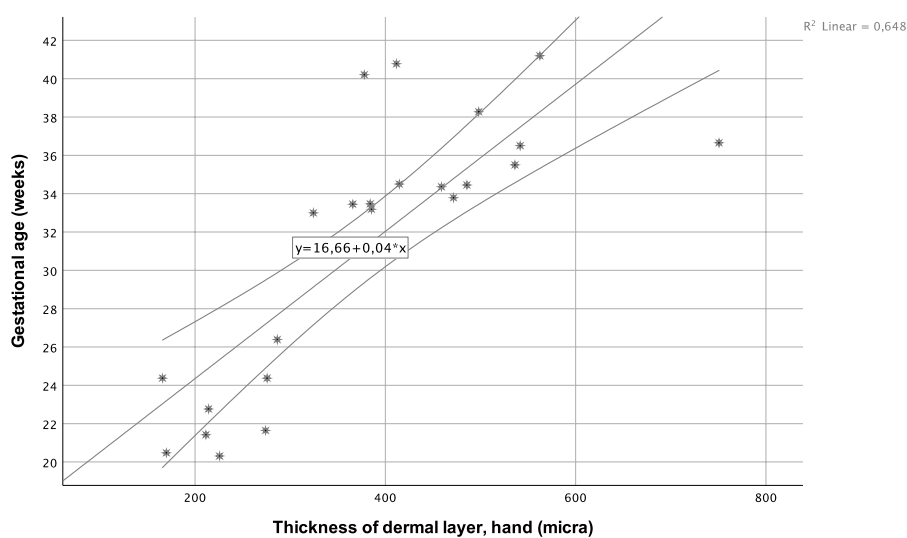


Gráfico 2. Correlação entre a idade gestacional e espessura da derme, na região da palma da mão. R2: coeficiente de determinação da regressão.

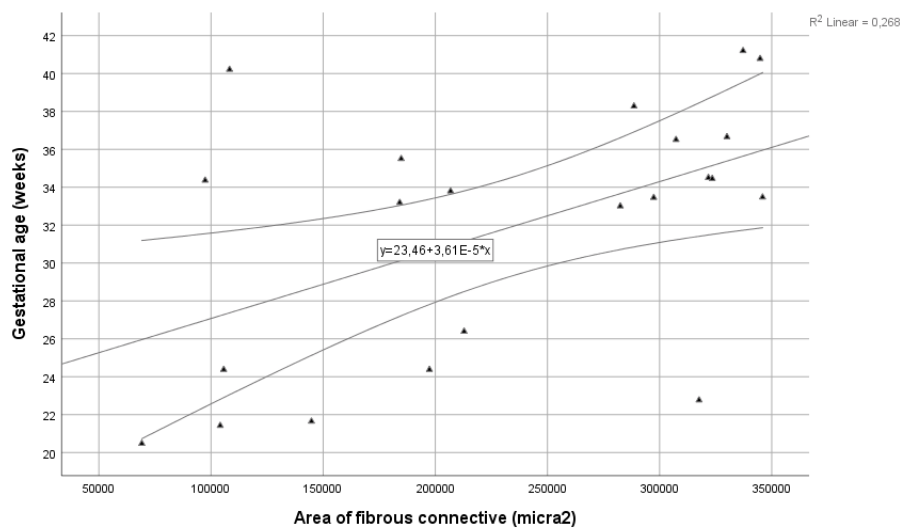


Gráfico 3. Correlação entre a idade gestacional e a área de fibras, na região da palma da mão. R2: coeficiente de determinação da regressão.

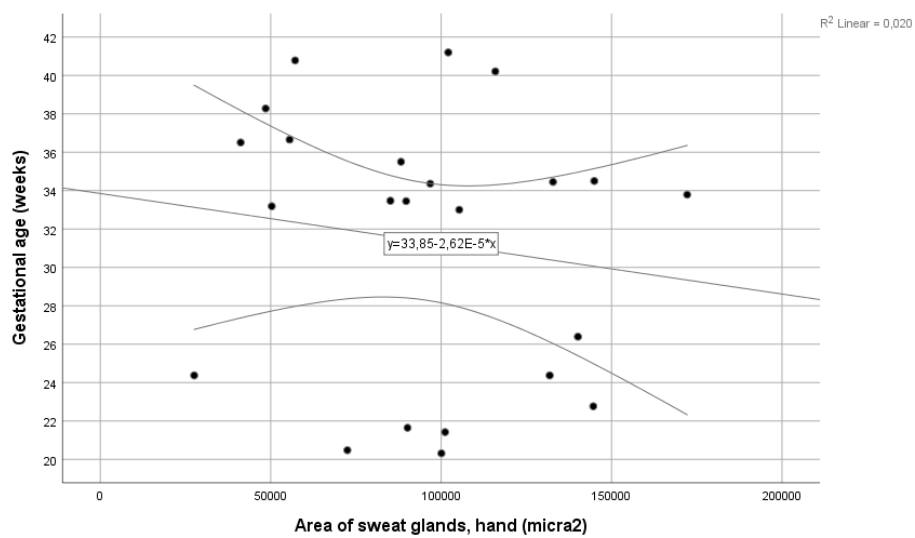


Gráfico 4. Correlação entre a idade gestacional e a área de glândulas sudoríparas, na região da palma da mão. R2: coeficiente de determinação da regressão.

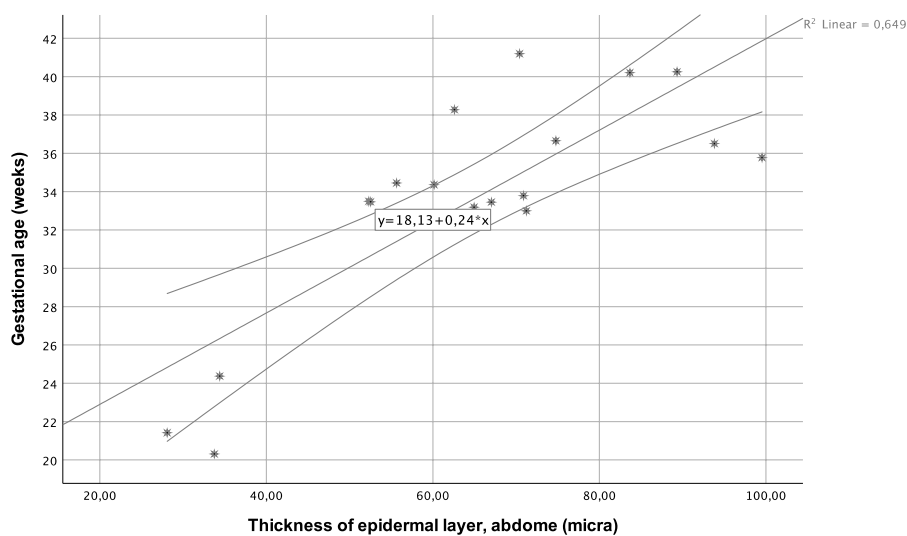


Gráfico 5. Correlação entre a idade gestacional e espessura da epiderme, na região do abdome. R2: coeficiente de determinação da regressão.

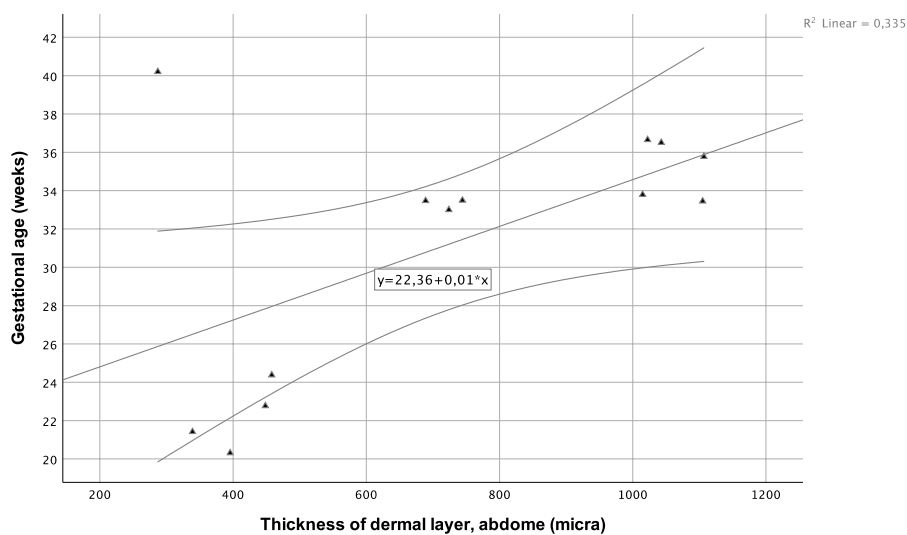


Gráfico 6. Correlação entre a idade gestacional e espessura da derme, na região do abdome. R2: coeficiente de determinação da regressão.

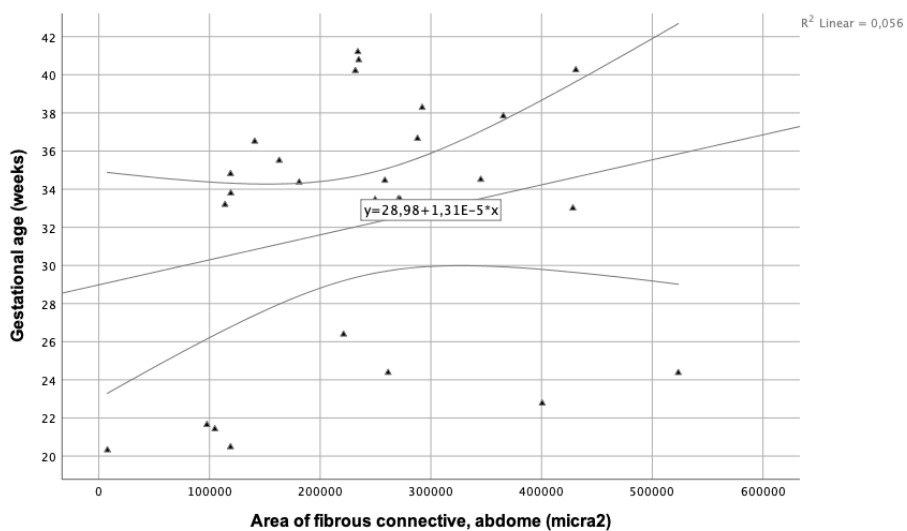


Gráfico 7. Correlação entre a idade gestacional e a área de fibras, na região do abdome.

R2: coeficiente de determinação da regressão.

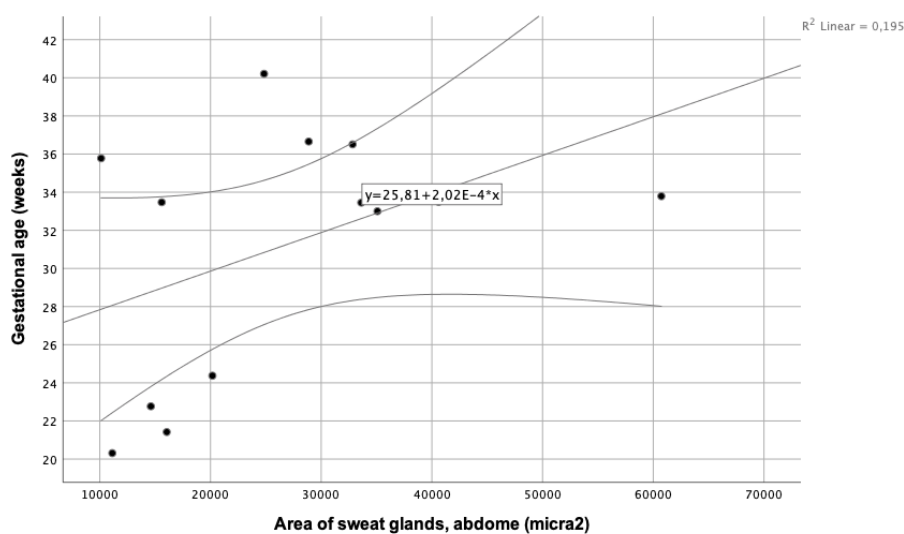


Gráfico 8. Correlação entre a idade gestacional e a área de glândulas sudoríparas, na região do abdome. R2: coeficiente de determinação da regressão.

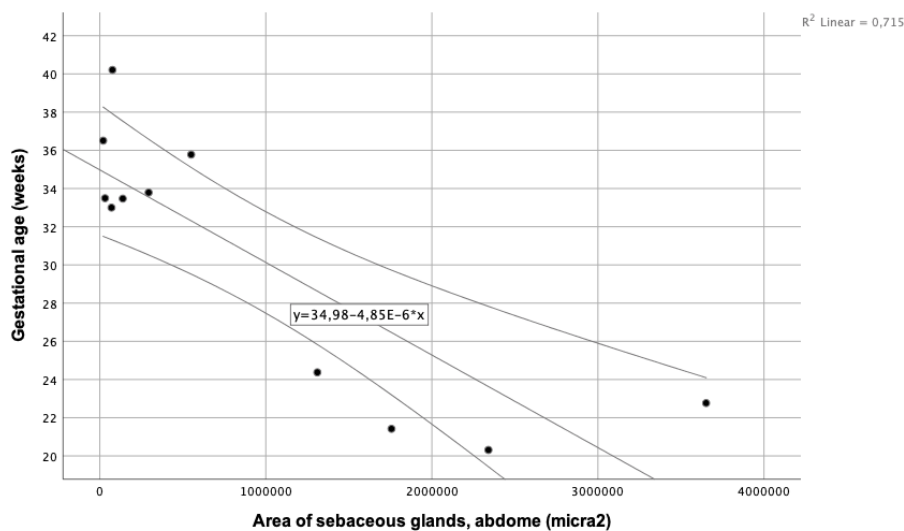


Gráfico 9. Correlação entre a idade gestacional e o volume de glândulas sebáceas, na região do abdome. R2: coeficiente de determinação da regressão.

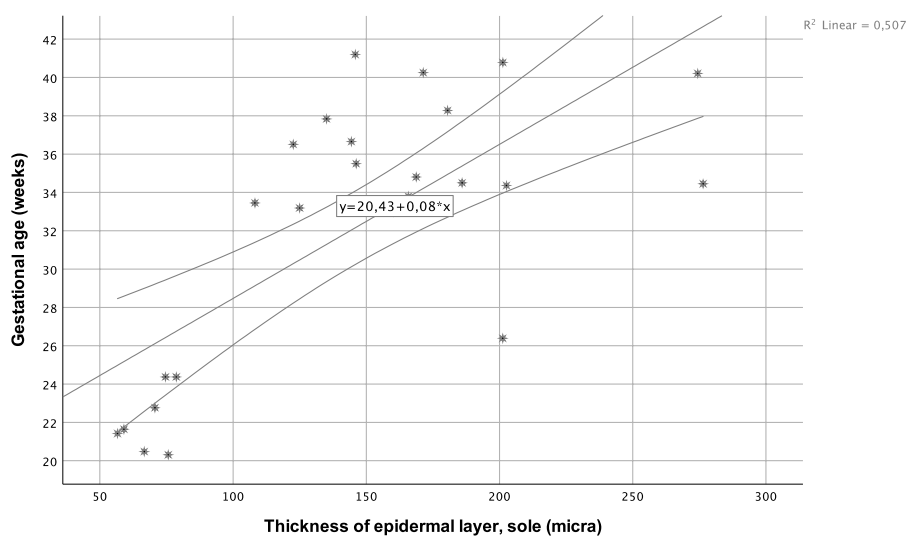


Gráfico 10. Correlação entre a idade gestacional e espessura da epiderme, na região da sola do pé. R2: coeficiente de determinação da regressão.

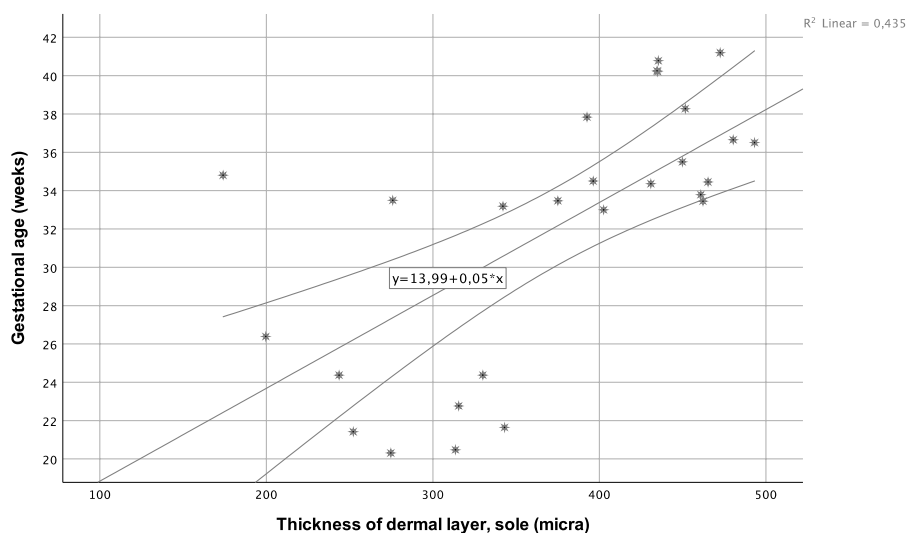


Gráfico 11. Correlação entre a idade gestacional e espessura da derme, na região da sola do pé. R^2 : coeficiente de determinação da regressão.

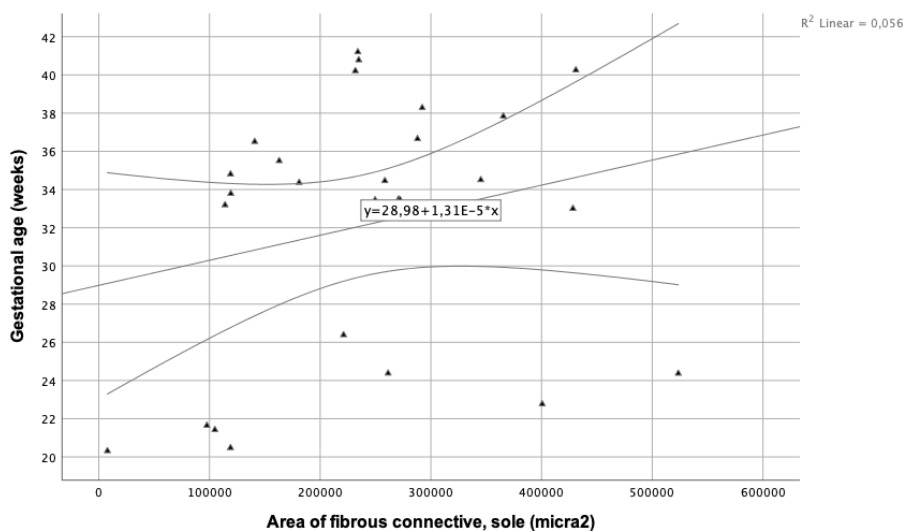


Gráfico 12. Correlação entre a idade gestacional e a área de fibras, na região da sola do pé. R^2 : coeficiente de determinação da regressão.

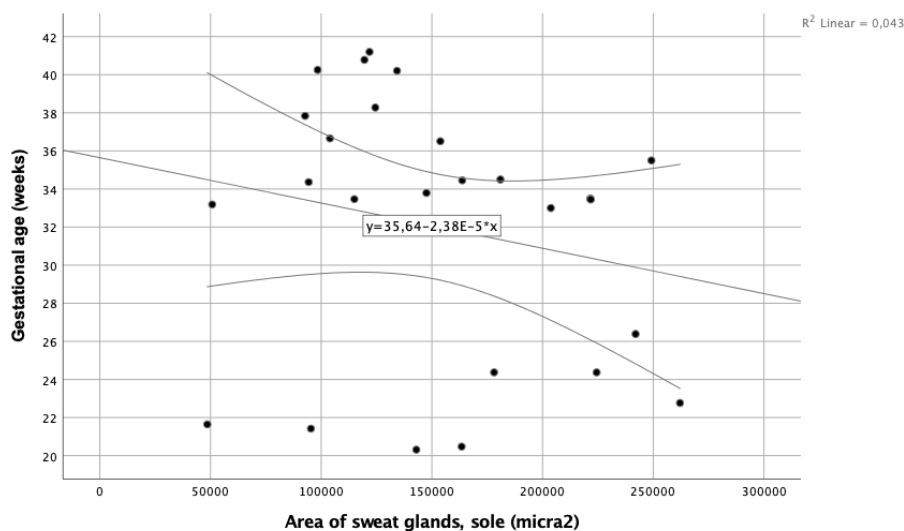


Gráfico 13. Correlação entre a idade gestacional e a área de glândulas sudoríparas, na região da sola do pé. R2: coeficiente de determinação da regressão.

5.1 Notificação de invenção para fins de depósito de patente

A notificação de invenção NI 110/2019 (Anexo12) apresenta uma invenção identificada como “PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL POR MEIO DE UM MODELO DE PREDIÇÃO AJUSTADO A PARTIR DE VARIÁVEIS EXTRAÍDAS DA HISTOMORFOMETRIA DA PELE” que apresenta como aspectos principais os elementos/conceitos essenciais relacionados na Tabela 1:

Tabela 1: Elementos essenciais da Tecnologia NI 110/2019.

Identificação	Elementos/Conceitos
1	IDADE GESTACIONAL
2	PROCESSAMENTO DE IMAGEM POR COMPUTADOR
3	ESPESSURA DA PELE
4	MORFOLOGIA, HISTOLOGIA
5	FENÔMENOS FISIOLÓGICOS DA PELE

A tecnologia propicia a estimativa semi-automatizada de elevada acurácia da IG, revelando o momento do óbito, na perspectiva da cronologia gestacional. A estimativa da IG pela análise automatizada da pele aqui apresentada tem o potencial de aferir de forma mais rápida a cronologia da gravidez, especialmente nos casos em que ela é desconhecida através de referenciais clínicos como a data da última menstruação ou pelas informações obtidas pelo exame de ultrassom obstétrico.

6. DISCUSSÃO

Ao final do percurso deste estudo, inúmeras foram as contribuições alcançadas de seus resultados, frente aos objetivos propostos e à evolução da tecnologia denominada Skinage⁶⁶. Durante a revisão sistemática da literatura, ficou claro que poucos são os estudos a respeito da histomorfometria da pele associada a cronologia da gestação. Esta revisão, realizada com metodologia de sistematização, contribuiu para esclarecer as lacunas da ciência em relação ao conhecimento das dimensões da pele durante a vida intrauterina. Tomando como base este desafio, a primeira etapa da análise das biópsias de pele realizadas, foi apresentado no segundo artigo de forma a se obter medidas mais detalhadas do ponto de vista da sua variabilidade natural.

Já a abordagem direta da pergunta primária da pesquisa, a busca pelas relações entre a histomorfometria da pele e a cronologia da gravidez, o segundo artigo trouxe resultados inéditos. A principal contribuição foi associar a espessura das camadas da pele e do tecido conjuntivo fibroso como um potencial marcador para estimar a IG ao nascimento, com elevados índices de correlação. Para viabilizar esta abordagem, a metodologia de análise neste estudo foi delineada de forma a obter uma estatística descritiva e reproduzível. De forma similar, De- Souza e cols ⁶⁷ em sua revisão sistemática, apresentou estudos que trazem medidas da espessura da pele em conceptos, porém foram considerados insuficientes para descrever a histomorfometria de forma detalhada e reproduzível. Modificações visíveis ao exame clínico da pele dos recém nascidos de diferentes IGs já haviam sido evidenciadas em relação à presença de pelos, unhas que alinham-se gradualmente com a IG, assim como com

a espessura de forma qualitativa, servindo esses como um dos marcadores de maturidade ⁶⁸. Para apoiar, há relatos de que o estudo histológico da pele é capaz de demonstrar que a maturação funcional e estrutural da pele é um potencial marcador da cronologia gestacional ³⁰.

A datação da gravidez em conceitos, a partir da análise histológica da pele e de outros órgãos, é prática recomendada durante necropsias. A morte precoce de um feto ou de um recém-nascido na primeira semana de vida, especialmente próximo de sua viabilidade, é um fenômeno que demanda investigação na busca pelas causas ⁵⁴. Sob esse aspecto de aplicabilidade em cenários de nascimento, o estudo apoia a investigação do óbito no período perinatal. A mortalidade infantil tem no nascimento pré-termo, um dos grandes desafios atuais do cuidado obstétrico e neonatal ²⁹. Pelo menos a metade dos fetos que já nasceram mortos, os natimortos, tiveram óbito no período intraparto e a maioria ocorre nos países em desenvolvimento ⁵⁴. Estima-se que em 2009, 2,6 milhões de natimortos tenham nascido no mundo, mais do que 8200 mortos/dia. Em 2017 cerca de 2,5 milhões de recém-nascidos morreram, principalmente por causas evitáveis. Quase dois terços dos bebês que morrem eram nascidos prematuros. Além disso, cerca de um milhão de recém-nascidos prematuros e doentes sobrevivem com alguma incapacidade a longo prazo ⁶⁹. Já em 2018, 2,5 milhões de recém-nascidos morreram no primeiro mês de vida em 2018, aproximadamente 7.000 todos os dias ⁷⁰.

A maior limitação do presente foram os detalhamentos dos critérios de elegibilidade para a datação da gravidez e a qualidade dos tecidos, onde 7% foram excluídos por baixa qualidade. Além disso, não foi fácil obter a autorização do país para a coleta das amostras de tecido. Outro fator a ser levado em consideração foram os inúmeros testes feitos ao longo dos anos

para aferir adequadamente a espessura das camadas da pele, levando em conta as suas ondulações. Foram feitos vários estudos sobre as técnicas de histomorfometria da pele para chegarmos ao resultado final do nosso estudo. Tenho certeza de que foi um trabalho árduo de descobertas e de contribuições das várias áreas da ciência e da educação.

Como resultado da investigação da associação da espessura da pele e de seus constituintes em conceitos mortos, obtivemos dois artigos científicos sobre o tema e uma notificação de invenção para pedido de patente com o seguinte tema: Processo para determinação da idade gestacional por meio de um modelo de predição ajustado a partir de variáveis extraídas da histomorfometria da pele. A hipótese que postulamos é que o grau de maturidade da pele de um recém-nascido, avaliado pela sistematização da análise de imagens microscópicas, é capaz de prever a sua idade gestacional. Uma das vantagens propiciadas pela tecnologia aqui apresentada é permitir uma estimativa semi-automatizada de elevada acurácia da idade gestacional, revelando o momento do óbito, na perspectiva da cronologia gestacional. A estimativa da IG pela análise automatizada da pele aqui apresentada tem o potencial de aferir de forma mais rápida a cronologia da gravidez, especialmente nos casos em que ela é desconhecida através de referenciais clínicos como a data da última menstruação ou pelas informações obtidas pelo exame de ultrassom obstétrico.

7. CONCLUSÕES

Em nossa Revisão sistemática evidenciamos que a espessura histológica confiável da pele de recém-nascidos é desconhecida e existem poucos estudos abordando esse tópico. Esses, não possuem qualidade metodológica e não são reprodutíveis.

A espessura das camadas da pele em conceptos se destacou como um importante marcador da datação da gravidez, uma vez que se correlacionou à idade gestacional. A pele do abdômen foi a melhor região para explorar esse relacionamento. Tais achados podem apoiar abordagens não invasivas da imagem da pele para estimar a IG com várias aplicações clínicas.

A avaliação da espessura da pele dos conceptos em diferentes idades gestacionais por meio de métodos histomorfométricos poderá se constituir em importante ferramenta para auxiliar na construção de dispositivos semi automatizados de elevada acurácia da idade gestacional, revelando o momento exato do óbito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gynecologists ACoOa. Method for estimating due date. Committee Opinion No. 611. *Obstet Gynecol.* 2014;124(4):863-866.
2. Karl S, Suen CSLW, Unger HW, et al. Preterm or not—an evaluation of estimates of gestational age in a cohort of women from rural Papua New Guinea. *PloS one.* 2015;10(5):e0124286.
3. Organization WH. Born too soon: the global action report on preterm birth. 2012.
4. Silveira MF, Santos IS, Barros AJ, Matijasevich A, Barros FC, Victora CG. Aumento da prematuridade no Brasil: revisão de estudos de base populacional. *Revista de Saúde Pública.* 2008;42:957-964.
5. Lee AC, Mullany LC, Ladhani K, et al. Validity of newborn clinical assessment to determine gestational age in Bangladesh. *Pediatrics.* 2016;138(1):e20153303.
6. Organization WH. Human resources for medical devices, the role of biomedical engineers. 2017.
7. Lee AC, Blencowe H, Lawn JE. Small babies, big numbers: global estimates of preterm birth. *The Lancet Global Health.* 2019;7(1):e2-e3.
8. MATIAS A, TIAGO P, MONTENEGRO N. Cálculo da idade gestacional: métodos e problemas. *Acta medica portuguesa.* 2002;15(1):17-21.
9. Owen Jr JA. Physiology of the menstrual cycle. *The American journal of clinical nutrition.* 1975;28(4):333-338.
10. Swank ML, Caughey AB, Farinelli CK, et al. The impact of change in pregnancy body mass index on cesarean delivery. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the*

- Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2014;27(8):795-800.
11. Beydoun H, Ugwu B, Oehninger S. Assisted reproduction for the validation of gestational age assessment methods. *Reproductive biomedicine online.* 2011;22(4):321-326.
 12. Lee AC, Panchal P, Folger L, et al. Diagnostic accuracy of neonatal assessment for gestational age determination: a systematic review. *Pediatrics.* 2017;140(6):e20171423.
 13. Tan C, Statham B, Marks R, Payne P. Skin thickness measurement by pulsed ultrasound; its reproducibility, validation and variability. *British Journal of Dermatology.* 1982;106(6):657-667.
 14. Oranges T, Dini V, Romanelli M. Skin physiology of the neonate and infant: clinical implications. *Advances in wound care.* 2015;4(10):587-595.
 15. Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr J. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2009;72(2):295-303.
 16. Albideri A. Histological and Cytoarchitectural Measurements of Human Epidermis in Different Anatomical Sites of Embryonic, Fetal and Neonatal Iraqi Subjects in Al-Hilla/Iraq Maternity Hospital. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2018;10(4):812-818.
 17. Gambichler T, Matip R, Moussa G, Altmeyer P, Hoffmann K. In vivo data of epidermal thickness evaluated by optical coherence tomography: effects of age,

- gender, skin type, and anatomic site. *Journal of dermatological science*. 2006;44(3):145-152.
18. Steven B. Hoath HIM. *Neonatal Skin : Structure and Function*. Second Edition, Revised and Expanded ed1982.
 19. MCGRATH J, EADY, R., POPE F. *Anatomy and organization of human skin. Rook's Textbook of Dermatology*. 2008.
 20. Byrne C, Hardman M, Nield K. Covering the limb—formation of the integument. *Journal of anatomy*. 2003;202(1):113-123.
 21. Engel A, Eichner R, Aebi U. Polymorphism of reconstituted human epidermal keratin filaments: determination of their mass-per-length and width by scanning transmission electron microscopy (STEM). *Journal of ultrastructure research*. 1985;90(3):323-335.
 22. Dale BA, Holbrook KA, Kimball JR, Hoff M, Sun T-T. Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development. *The Journal of cell biology*. 1985;101(4):1257-1269.
 23. King A, Balaji S, Keswani SG. Biology and function of fetal and pediatric skin. *Facial Plastic Surgery Clinics*. 2013;21(1):1-6.
 24. Sadler TW. *Langman, Embriologia médica*. 13 ed. ed2017.
 25. Moore KL, Pearsaud TVN. *Embriologia Clínica*. 7 Edição ed2004.
 26. da Silva AP, da Silva EdA, Hernandez-Blazquez FJ. Processo de Queratinização no Desenvolvimento do Sistema Tegumentar em Mamíferos-Revisão. *Saúde e Pesquisa*. 2008;1(2):201-207.

27. Smith LT, Holbrook KA, Byers PH. Structure of the dermal matrix during development and in the adult. *Journal of Investigative Dermatology*. 1982;79(1):93-104.
28. Holbrook KA, Odland GF. Regional development of the human epidermis in the first trimester embryo and the second trimester fetus (ages related to the timing of amniocentesis and fetal biopsy). *Journal of Investigative Dermatology*. 1980;74(3).
29. Kolarsick PA, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011;3(4):203-213.
30. Ersch J, Stallmach T. Assessing gestational age from histology of fetal skin: an autopsy study of 379 fetuses. *Obstetrics & Gynecology*. 1999;94(5):753-757.
31. Holbrook KA, Odland GF. The fine structure of developing human epidermis: light, scanning, and transmission electron microscopy of the periderm. *Journal of Investigative Dermatology*. 1975;65(1):16-38.
32. Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C. Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development*. 1998;125(8):1541-1552.
33. Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(30):17702-17711.
34. Cabral A, Fischer DF, Vermeij WP, Backendorf C. Distinct functional interactions of human Skn-1 isoforms with Ese-1 during keratinocyte terminal differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(20):17792-17799.

35. Machado M, Hadgraft J, Lane M. Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. *International journal of cosmetic science*. 2010;32(6):397-409.
36. Luiz Carlos Junqueira JC. *Histologia Básica Texto e Atlas* 13 ed. ed2018.
37. Carolina de Lourdes J. HISTOFISIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DAS QUEIMADURAS: CONSEQUENCIAS LOCAIS E SISTÊMICAS DAS PERDAS TECIDUAIS EM PACIENTES QUEIMADOS. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies*. 2009;1(3).
38. Luconi R, Ribeiro C, Casarin M, Pieniz C, Quatrin M. DETERMINAÇÃO DE IDADE FETAL UTILIZANDO CRITÉRIOS COMPARATIVOS ENTRE CARACTERÍSTICAS EXTERNAS DO FETO, BIOMETRIA E DESENVOLVIMENTO HISTOLÓGICO DOS ANEXOS DA PELE.
39. Wysocki AB. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *The Nursing Clinics of North America*. 1999;34(4):777-797, v.
40. Holbrook KA, Byers PH. Skin is a window on heritable disorders of connective tissue. *American journal of medical genetics*. 1989;34(1):105-121.
41. Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;111(2):320-326.
42. Stamatas G, Nikolovski J, Mack M, Kollias N. Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on in vivo studies. *International journal of cosmetic science*. 2011;33(1):17-24.

43. Vyas S, Meyerle J, Burlina P. Non-invasive estimation of skin thickness from hyperspectral imaging and validation using echography. *Computers in biology and medicine*. 2015;57:173-181.
44. Kumagai K, Koike H, Nagaoka R, Sakai S, Kobayashi K, Saijo Y. High-resolution ultrasound imaging of human skin in vivo by using three-dimensional ultrasound microscopy. *Ultrasound in medicine & biology*. 2012;38(10):1833-1838.
45. Neerken S, Lucassen GW, Bisschop MA, Lenderink E, Nuijs TA. Characterization of age-related effects in human skin: a comparative study that applies confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*. 2004;9(2):274-281.
46. Lu C, Ma Z, Mandal M. Automated segmentation of the epidermis area in skin whole slide histopathological images. *IET Image Processing*. 2015;9(9):735-742.
47. Gross J, Schmitt FO. The structure of human skin collagen as studied with the electron microscope. *The Journal of experimental medicine*. 1948;88(5):555.
48. Waaijer ME, Gunn DA, Catt SD, et al. Morphometric skin characteristics dependent on chronological and biological age: the Leiden Longevity Study. *Age*. 2012;34(6):1543-1552.
49. Oriá RB, Ferreira FVA, Santana ÉN, Fernandes MR, Brito GA. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):425-434.

50. Miot HA, Brianezi G. Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2010;85(3):361-364.
51. Oikarinen A. Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 1994;10(2):47-52.
52. Vitellaro-Zuccarello L, Cappelletti S, Rossi VDP, Sari-Gorla M. Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age, sex, and body region. *The Anatomical Record*. 1994;238(2):153-162.
53. Knight KR, Lepore DA, Horne R, et al. Collagen content of uninjured skin and scar tissue in foetal and adult sheep. *International journal of experimental pathology*. 1993;74(6):583.
54. Organization WH. SURVIVE and THRIVE Transforming care for every small and sick newborn. In: World Health Organization; 2018:20.
55. Lee AC, Panchal P, Folger L, et al. Diagnostic Accuracy of Neonatal Assessment for Gestational Age Determination: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2017;140(6).
56. Gaspar J, Chagas J, Cruz-Correa R, Reis ZSN. Health information system for obstetric and neonatal healthcare monitoring: SISMater. Paper presented at: 2013 8th Iberian Conference on Information Systems and Technologies (CISTI)2013.
57. TB. F. Soleil et peau. *J Med Esthet* 1975;2:33-34.
58. Caliari MV. *Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes*. Editora UFMG; 1997.

59. Prata LO, Rodrigues CR, Martins JM, et al. ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(1):8-21.
60. Costa C, Brito K, Gomes M, Caliar M. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite*. 2007;14(4):329-334.
61. Vitral GLN, Aguiar RAPL, de Souza IMF, Rego MAS, Guimarães RN, Reis ZSN. Skin thickness as a potential marker of gestational age at birth despite different fetal growth profiles: A feasibility study. *PloS one*. 2018;13(4):e0196542.
62. Fairley JA, Rasmussen JE. Comparison of stratum corneum thickness in children and adults. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1983;8(5):652-654.
63. De Viragh P, Meuli M. Human scalp hair follicle development from birth to adulthood: statistical study with special regard to putative stem cells in the bulge and proliferating cells in the matrix. *Archives of dermatological research*. 1995;287(3-4):279-284.
64. Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Gjokik G, Janevska V. Variations of the histomorphological characteristics of human skin of different body regions in subjects of different age. *Prilozi*. 2011;32(2):119-128.
65. Kakasheva-Mazhenkovska L, Milenkova L, Kostovska N, Gjokik G. Histomorphometrical characteristics of human skin from capillitium in subjects of different age. *Prilozi*. 2011;32(2):105-118.

66. Reis ZSN, Vitral GLN, de Souza IMF, Rego MAS, Guimaraes RN. Newborn skin reflection: Proof of concept for a new approach for predicting gestational age at birth. A cross-sectional study. *PloS one*. 2017;12(9):e0184734.
67. de-Souza IMF, Vitral GLN, Reis ZSN. Skin thickness dimensions in histological section measurement during late-fetal and neonatal developmental period: A systematic review. *Skin Research and Technology*. 2019.
68. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *The Journal of Pediatrics*. 1991;119(3):417-423.
69. BRASIL O. Quase 30 milhões de recém-nascidos prematuros e doentes necessitam de tratamento para sobreviver todos os anos. Disponível em :https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5821:quase-30-milhoes-de-recem-nascidos-prematuros-e-doentes-necessitam-de-tratamento-para-sobreviver-todos-os-anos&Itemid=820. Accessed Acesso em : 10/01/2020, 2020.
70. Unidas O-ON. Levels & Trends in Child Mortality In:2019.

9. APÊNDICES E ANEXOS

9.1. Parecer de aprovação do Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 44834915.3.0000.5149

Interessado(a): Profa. Zilma Silveira Nogueira Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 25 de junho de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de propriedades biofísicas da pele humana no período perinatal e de suas relações com a cronologia da gestação**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.



Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

9.2. Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DA PELE HUMANA NO PERÍODO PERINATAL E DE SUAS RELAÇÕES COM A CRONOLOGIA DA GESTAÇÃO

Cara senhora,

- 1- Você está sendo convidada a participar deste estudo porque está internada para o parto no Hospital Sofia Feldman ou no Hospital das Clínicas da UFMG e porque seu bebê faleceu.
- 2- O objetivo deste estudo é descobrir novas técnicas para estimar a idade de um bebê ao nascer, ou seja, o tempo de duração da gravidez. Acreditamos que a pele possui características que, se bem estudadas, podem de alguma forma refletir a idade das pessoas, e também dos bebês.
- 3- Incertezas na cronologia da gravidez podem aumentar o risco dos bebês no momento de seu nascimento e comprometer sua saúde e sobrevivência.
- 4- As técnicas atuais para se estimar a idade do bebê possuem grande margem de erro, mesmo quando se utiliza o exame de ultrassom na gravidez.

- 5- Para isto, pedimos sua permissão para fazer exame da pele de seu bebê ao nascer, mesmo sabendo que ele já faleceu, nas regiões da palma da mão, planta do pé e abdome (barriga, perto do umbigo).
- 6- Precisaremos retirar um pequeno pedaço de pele (biopsia) de cerca de 1cm em cada um destes locais. Usaremos estes pequenos pedaços de pele para analisar as características e que possam refletir a idade da gravidez com equipamentos (espectrofotômetro) que usam a luz para descobrir substâncias na pele. Se necessário um pequeno ponto com fio cirúrgico será realizado para recompor a aparência externa do corpo.
- 7- Informamos que os resultados da pesquisa serão publicados ou apresentados em congressos sem revelar sua identidade. Os dados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e não serão usados para outros fins.
- 8- Sua participação deve ser voluntária e caso não concorde ou resolva desistir a qualquer momento isto não trará nenhum constrangimento para você ou para a forma como você será tratada neste hospital.
- 9- Caso seja de seu interesse, os resultados estarão guardados com o pesquisador e lhe serão entregues assim que você solicitar.
- 10- Eu....., portadora de documento de identidade..... expedido pela....., estou ciente do que foi exposto acima e autorizo o uso de minhas informações e de meu bebê falecido para este projeto de pesquisa. Participo voluntariamente deste estudo e estou ciente de que as amostras colhidas no meu bebê após o nascimento não trarão prejuízo à minha saúde ou à aparência geral de seu corpo para o sepultamento.

11- O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador. O COEP-UFMG deverá ser contatado no caso de haver dúvidas quanto aos aspectos éticos da pesquisa.

Belo Horizonte, ____/____/____

Assinatura da paciente:

Assinatura do pesquisador:

Telefones de contato:

Maternidade Hospital das Clínicas da UFMG – (31) 34099422

Hospital Sofia Feldman – (31) 34082200

Zilma Reis – (31) 85177473

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – Av. Prof. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, CEP: 31270-901. E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Fone (31) 34094592.

9.3. Base de Dados para coleta das biopsias

BD SKIN AGE – BIOPSIAS

DADOS SOBRE A GESTAÇÃO

CASO NUMERO* _____

Prontuário Materno* _____

Nome da Gestante* _____

DUM

Em branco: Não sabe

Cor da pele da mulher*

Escala de I a VI

Peso da Gestante* _____ Altura da gestante* _____ IMC da gestante: _____

Data do primeiro Ultrassom *

IG no primeiro Ultrassom*

Semanas Completas

IG no primeiro Ultrassom*

Dias

Data da morte Neonatal* _____

Example: 03/05/2013 11:30 AM

Data de Nascimento Neonatal*: _____

Example:03/05/2013 11:30 AM

IG da morte Neonatal:

Idade gestacional mais precisa possível (US do 1o. trimestre) Semanas completas

IG da morte Neonatal:

Idade gestacional mais precisa possível (US do 1o. trimestre) Dias

Causa da morte Neonatal *

Em caso de causa mortis conhecida, especificar em Outro

☐ Conhecida

☐ Desconhecida

Causa da morte se conhecida:

Sexo neonatal:

☐ Feminino

☐ Masculino

☐ Indeterminado

Peso do neonato:

Peso ao nascer (g)

Classificação Peso/IG

O FIG

O AIG

O GIG

O Other

BIOPSIAS

Data da coleta de biopsias: _____

Example:03/05/2013 11:30 AM

Código da biopsia:

Locais da Biopsia:

☐ Umbilical (U)

☐ Mão (M)

☐ Pé (P)

☐ Outros

MEDIDAS DE ESPESSURA DA PELE

Locais Examinados: A (antebraço) P (pé) O (outros)

Us automático- Derme- Medida automaticamente no software do ultrassom

	DermeAntnUS Espessura da pele US derme Antebraço	dermePnUS Espessura da pele US derme Pé	DermeOnUS Espessura da pele US derme Mão
Medida 1			
Medida 2			
Medida 3			

Us automático- epiderme- Medida automaticamente no software do Rodney

	epiAntnUS Espessura da pele US derme Antebraço		epiPnUS Espessura da pele US derme Pé		EpiOnUS Espessura da pele US derme Mão	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Medida 1						
Medida 2						

Medida 3						
----------	--	--	--	--	--	--

Observações:

ESPECTROSCOPIAS

	ANTn-SP Espectroscopia Antebraço	Pn-Sp Espectroscopia Pé	On-Sp Espectroscopia Mão
Medida correspondente ao LED1			
Medida correspondente ao LED 2			
Medida correspondente ao LED3			

PROTOTIPO- FOTOMETRIA

	ANTn-Ft	Pn-Ft	On-Ft
--	---------	-------	-------

	Fotometria Antebraço	Fotometria Pé	Fotometria Mão
Medida 1			
Medida 2			
Medida 3			

9.4. Processamento das amostras

Processamento das amostras

- a) Desidratação: Mergulhou o material em diferentes concentrações de álcool em ordem crescente 70°, 80° e 90°
- b) Clareamento ou diafinização: Utilizou Xilol I e Xilol II para permitir melhor a penetração de parafina na peça
- c) Inclusão: Preparou um bloco em parafina líquida a 60° C, depois colocadou em estufa na mesma temperatura e depois fez- se a inclusão, derramando-se numa forma plástica a parafina com o material.
- d) Microtomia: Os blocos de parafina forão cortados na espessura de 6 micromeros para a obtenção de cortes do material.
- e) Banho Maria a 68 °C
- f) Pescagem: Mergulhou a lâmina na água e colocou o material esticado sobre a lâmina. Em seguida secou a lâmina em uma platina aquecedora.

9.5. Método de Coloração de Tricrômico de Gomori

Coloração de Tricrômico de Gomori

Vide Preparo de soluções:

- Corante de Gomori;
- Bissulfito de sódio 5%
- Lugol.

Para o preparo do corante de gomori, utilizou-se 3g de cromótopo 2R, 1,5g de verde luz, 3g de ácido fosfotungstico, 5ml de ácido acético glacial e 500ml de água destilada qsp.

Modo de preparo:

- a) Esquentou a metade da água.
- b) Dissolveu o cromótopo 2R na outra metade da água (fria).
- c) Dissolveu a verde luz.
- d) Acrescentou o ácido fosfotungstico e logo após o ácido acético.

Técnica:

- a) Desparafinou em Xilol de 10 a 20 minutos
- b) Hidratou em serie decrescente de concentração de álcool (álcool absoluto ao 70%)
- c) Lavou rapidamente em água corrente durante 5 minutos
- d) Corou pela hematoxilina - 1':30"
- e) Lavou em água corrente de 30 a 60 minutos
- f) Corou pelo corante de gomori - 15 minutos
- g) Lavou em água corrente rapidamente para remover o excesso do corante

- h) Desidratou em serie crescente de concentração de álcool (álcool 70% ao absoluto II) por 3 minutos cada
- i) Diafanizou em Xilol I e II
- j) Secou rapidamente com uso de ventilador
- k) Montou a lâmina

9.6. Protocolo de Medidas

Mensuração das camadas da pele (Separadamente)

- 1- Abrir o **software KS300**
- 2- Clicar na função **Open** e abrir a sequência de algoritmos (**Macro_Michelle**)

```

1  imgdelete ""
2  showwindow "Gallery"
3  ! imgload "c:\profes\2\marcelo\wagner",1
4  MSload "panoramic10x"
5  MSsetprop "POINTFEAT","DISTANCE"
6  MSmeaspoint 1,"DATABASE",0,10,1,2,2,1,1
7  datalist "DATABASE",0,0
8  stop
9  showwindow "editor"
10 imgcopy 1,"derme"
11 stop
12 ! distlevrgb "derme",2,1,0,72,176,152,223,157,221,10,"RGB"
13 binscrap 2,10,0,20,0
14 MSload "panoramic10x"
15 MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA"
16 MSmeasmask 10,1,"DATABASE",0,2,10
17 datalist "DATABASE",0,0
18 stop
19 showwindow "editor"
20 imgcopy 1,"sudoripara"
21 stop
22 ! distlevrgb "sudoripara",3,1,0,17,255,6,238,29,254,10,"RGB"
23 MSload "panoramic10x"
24 MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA"
25 MSmeasmask 3,"sudoripara","DATABASE",0,2,10
26 datalist "DATABASE",0,0
27 stop
28 showwindow "editor"
29 imgcopy 1,"Sebacea"
30 stop
31 ! distlevrgb "Sebacea",4,1,0,17,255,6,240,29,255,10,"RGB"
32 MSload "panoramic10x"
33 MSsetprop "FIELDFEAT","FLDAREA"
34 MSmeasmask 4,"Sebacea","DATABASE",0,2,10
35 datalist "DATABASE",0,0

```

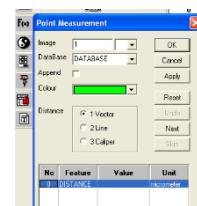
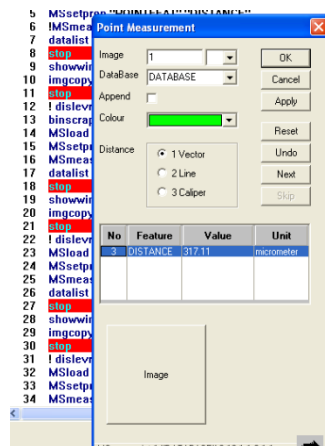
- 3- Desativar a funcionalidade **Record**  que está na barra de menu da Macro

- 4- Ativar a funcionalidade **Play** 

- 5- Na sequência, a macro abre a janela **Load**

- 6- Selecionar a pasta e abrir a imagem de interesse

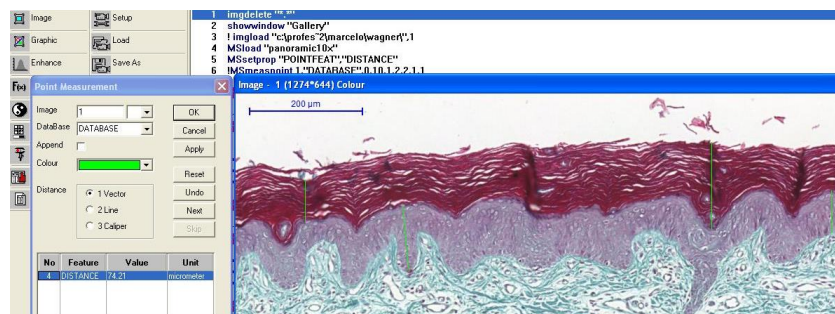
- 7- Na sequência, a macro abre a funcionalidade **Point Measurement**



8- Selecionar na opção **Distance** a função **Vector**

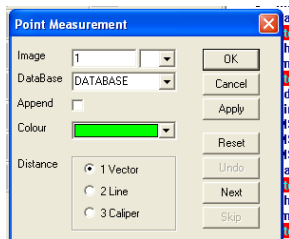
9- Clicar com o botão direito em cima da imagem na funcionalidade **Point Measurement** e selecionar a opção **Big Display**

10- Iniciar a medida com um cliquedo botão esquerdo do mouse e finalizar com um clique do mesmo botão



11- Repetindo o procedimento anterior finalizar as medidas desta imagem selecionando

OK



12- Na sequência, será aberta a funcionalidade **List – DATABASE** onde serão visualizados os resultados das medidas em micrometros (μm)

No	DISTANCE micrometer
1	179,61
2	167,87
3	317,11

13- Selecionar a funcionalidade **Edit** e na sequência, a funcionalidade **Copy**

14- Na sequência abrir o software **Excel** (Microsoft office) e colar os resultados das medidas em uma planilha. Salvar como arquivo.

Observação: Fazer 10 medidas divididas em dois grupos de 5 medidas cada, tomando como ponto de orientação, ora o ápice da crista papilar, ora o ápice da crista epidérmica. Este procedimento foi utilizado para o cálculo da espessura da camada córnea, epiderme e derme.

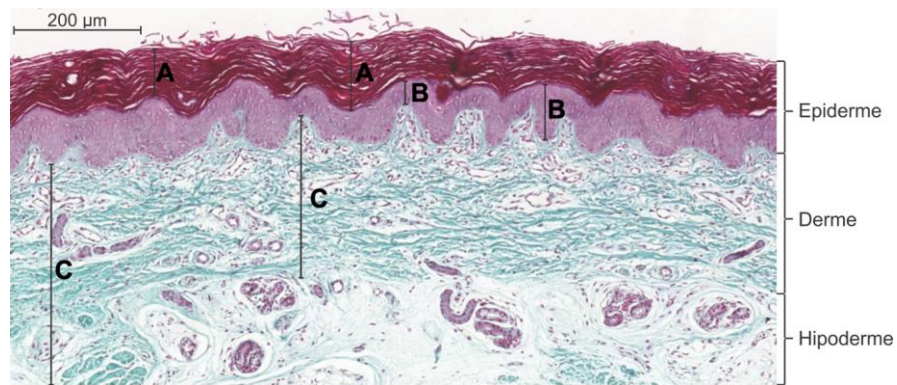


Figura 1- Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.

A: representa medidas da espessura do estrato

B: representa medidas da espessura da epiderme celular

C: representa medidas da espessura da derme

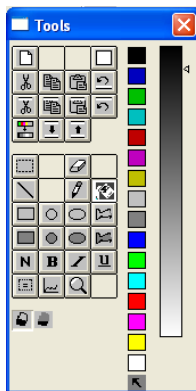
Escala de 200 micras, aumento 8x; coloração: tricrômico de Gomori.

Software PannoramicViewer

9.7. Mensuração da área do tecido Conjuntivo Fibroso

Mensuração da área do tecido Conjuntivo Fibroso

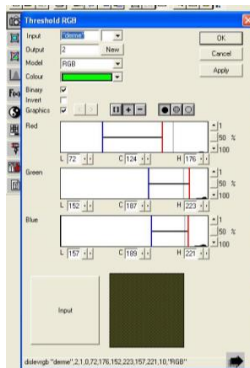
- 1- Selecionar a linha 9 do macro e clicar **Play** . Na sequência será aberta a funcionalidade **Image Edit Tools**



- 2- Ir à funcionalidade **Gallery** e dar um duplo clique na imagem de interesse
- 3- Selecionar a função **Draw line** , a espessura adequada (1 a 4) e a cor que permita um contraste de fácil visualização.
- 4- Através de um duplo clique na imagem de interesse, maximizar a mesma que se encontra na janela **Gallery**



- 5- Desenhar os limites do tecido conjuntivo fibroso
- 6- Selecionar a função **Fill**  e preencher as regiões localizadas fora dos limites da derme criando um plano gráfico da cor que foi escolhida previamente no item 2.
- 7- Fixar o plano gráfico na imagem real selecionando a função **Copy graphics plane into the image** 
- 8- Apagar o plano gráfico virtual clicando 2x na função **delete graphics plane** 
- 9- Selecionar a linha 12 do macro
- 10- Selecionar a função **Play** 
- 11- Na sequência, para o cálculo da área do tecido conjuntivo fibroso em μm^2 , será aberta a funcionalidade **Threshold RGB**



- 12- Conferir o número das imagens **Input** (imagem de interesse) e **Output** (imagem binária a ser criada)



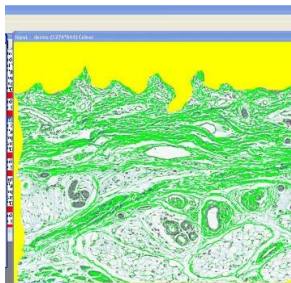


13- Selecionar a função **Binary**

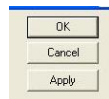
14- Na sequência clicar o botão direito na imagem **Input** e selecione **Big Display** para a maximização da imagem

15- Dirigir o cursor para a imagem maximizada e selecionar os pixels com tons de verde do tecido conjuntivo fibroso através de pequenos traçados.

16- Automaticamente na imagem maximizada, os pixels selecionados serão realçados por meio de uma cor que foi previamente selecionada na função **Colour**



17- Ajustar a seleção excessiva de pixels usando as funções **forward**, **backward**, **+** e **-**

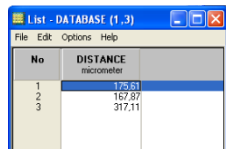


18- Ao clicar em **Ok** finaliza-se o processo de criação da imagem binária

19- Na sequência a macro automaticamente selecionará o arquivo de calibração **panoramic**

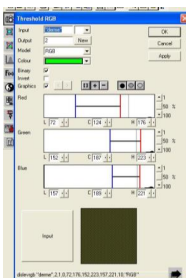
10x e a fórmula para o cálculo da área em μm^2

- 20- Na sequência a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Utilities** do menu **Binary**, onde será selecionada a opção **Scrap** e os intervalos de **Min Area = 0** e de **Max Area = 20**
- 21- Na sequência a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Automatic Measurement** e fornecerá a área do tecido conjuntivo fibroso em μm^2
- 22- Na sequência, será aberta a funcionalidade **List- DATABASE** onde serão visualizados os resultados das medidas em micrometros (μm)



No	DISTANCE micrometres
1	176.61
2	167.87
3	317.11

- 23- Selecionar a funcionalidade **Edit** e, na sequência, a funcionalidade **Copy**
- 24- Na sequência abrir o software **Excel** (Microsoft office) e colar os resultados das medidas em uma planilha. Salvar como arquivo.
- 25- Na sequência, clique novamente na linha 12 para o cálculo **da área total da Derme**, a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Threshold RGB**



- 26- Conferir o número das imagens **Input** (imagem de interesse) e **Output** (imagem binária a ser criada)



27- Selecionar a função **Binary**

28- Na sequência clicar o botão direito na imagem **Input** e selecione **Big Display** para a maximização da imagem

29- Dirigir o cursor para a imagem maximizada e selecionar todos os pixels presentes na derme, através de pequenos traçados.

30- Automaticamente na imagem maximizada, os pixels selecionados serão realçados por meio de uma cor que foi previamente selecionada na função **Colour**

31- Ao clicar em **Ok** finaliza-se o processo de criação da imagem binária

32- Na sequência a macro automaticamente selecionará o arquivo de calibração **panoramic 10x** e a fórmula para o cálculo da área em μm^2

33- Na sequência a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Automatic Measurement** e fornecerá a área da derme em μm^2

34- Na sequência, será aberta a funcionalidade **List- DATABASE** onde serão visualizados os resultados das medidas em micrometros (μm)

No	DISTANCE micrometer
1	172.53
2	157.87
3	317.11

35- Selecionar a funcionalidade **Edit** e, na sequência, a funcionalidade **Copy**

36- Na sequência abrir o software **Excel** (Microsoft office) e colar os resultados das medidas em uma planilha. Salvar como arquivo.

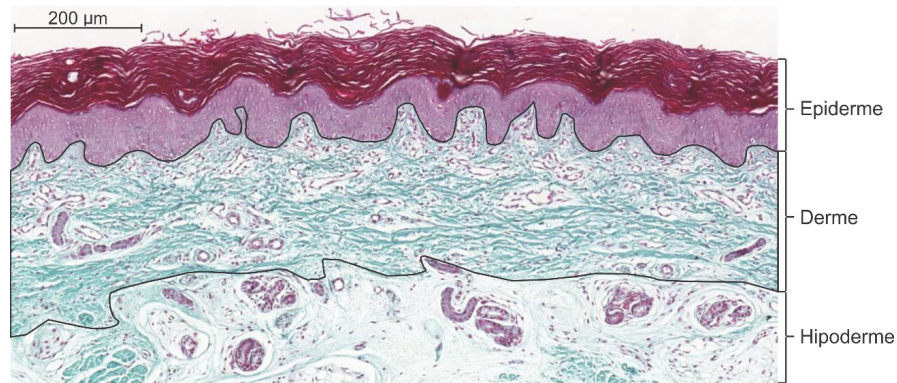


Figura 2- Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.

O contorno foi feito para ilustrar a medida do tecido conjuntivo fibroso e da área da derme total

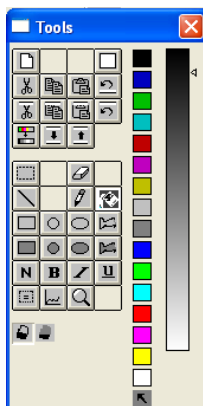
Escala de 200 micras, aumento 8x; coloração: tricrômico de Gomori.

Software PannoramicViewer

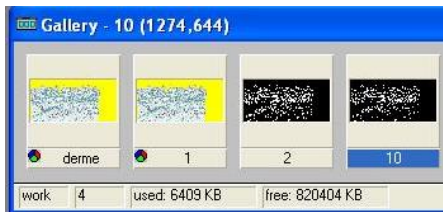
9.8. Mensuração das Glândulas Sudoríparas

Mensuração das Glândulas Sudoríparas

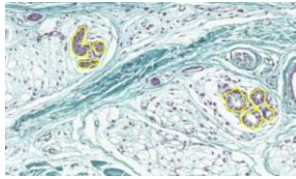
- 1- Clicar na linha 20 e apertar a funcionalidade **Play**  para iniciar a mensuração das glândulas sudoríparas
- 2- Ir à funcionalidade **Gallery** e dar um duplo clique na imagem
- 3- Na sequência, para o cálculo da área total das glândulas sudoríparas, a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Image Edit Tools**



- 4- Selecionar a função **Draw line** , a espessura adequada (1 a 4) e a cor que permita um contraste de fácil visualização.
- 5- Através de um duplo clique na imagem de interesse, maximizar a mesma que se encontra na janela **Gallery**



6- Desenhar as glândulas sudoríparas

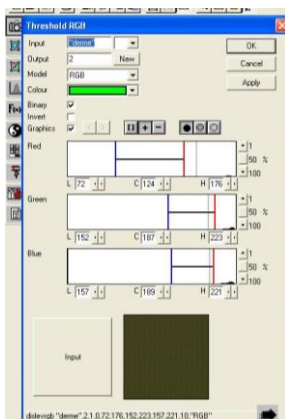


7- Selecionar a função **Fill**  e preencher as regiões localizadas fora dos limites das glândulas sudoríparas criando um plano gráfico da cor que foi escolhida previamente no item 2

8- Fixar o plano gráfico na imagem real selecionando a função **Copy graphics plane into the image** 

9- Apagar o plano gráfico virtual clicando 2x na função **delete graphics plane** 

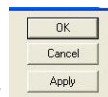
10- Na sequência, para o cálculo da área das Glândulas sudoríparas, a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Threshold RGB**



- 11- Conferir o número das imagens **Input** (imagem de interesse) e **Output** (imagem binária a ser criada)

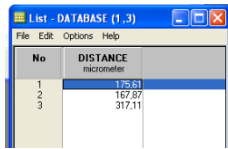


- 12- Selecionar a função **Binary**
- 13- Na sequência clicar o botão direito na imagem **Input** e selecione **Big Display** para a maximização da imagem
- 14- Dirigir o cursor para a imagem maximizada e selecionar todos os pixels presentes nas glândulas sudoríparas, através de pequenos traçados
- 15- Automaticamente na imagem maximizada, os pixels selecionados serão realçados por meio de uma cor que foi previamente selecionada na função **Colour**



- 16- Ao clicar em **Ok** finaliza-se o processo de criação da imagem binária
- 17- Na sequência a macro automaticamente selecionará o arquivo de calibração **panoramic 10x** e a fórmula para o cálculo da área em μm^2
- 18- Na sequência a macro selecionará a funcionalidade **Automatic Measurement** e fornecerá a área das glândulas sudoríparas em μm^2

19- Na sequência, será aberta a funcionalidade **List- DATABASE** onde serão visualizados os resultados das medidas em micrometros (μm^2)



No	DISTANCE micrometer
1	172,51
2	152,57
3	317,11

20- Selecionar a funcionalidade **Edit** e, na sequência, a funcionalidade **Copy**

21- Na sequência abrir o software **Excel** (Microsoft office) e colar os resultados das medidas em uma planilha. Salvar como arquivo.

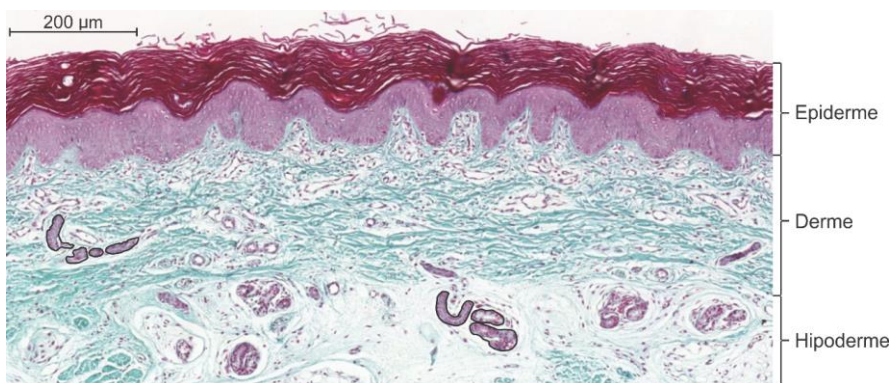


Figura 3 - Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.

As linhas foram introduzidas para facilitar a realização de medidas nas glândulas

Escala de 200 micras, aumento 8x; coloração: tricomico de Gomori.

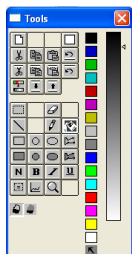
9.9. Mensuração das Glândulas Sebáceas

Mensuração das Glândulas Sebáceas

15- Clicar na linha 29 e apertar a funcionalidade **Play** 

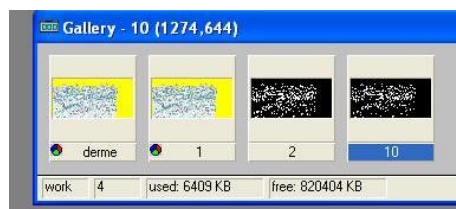
16- Ir na funcionalidade **Gallery** e dar um duplo clique na imagem

17- Na sequência, para o cálculo da área total das glândulas sebáceas, a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Image Edit Tools**



18- Selecionar a função **Draw line** , a espessura adequada (1 a 4) e a cor que permita um contraste de fácil visualização.

19- Através de um duplo clique na imagem de interesse, maximizar a mesma que se encontra na janela **Gallery**



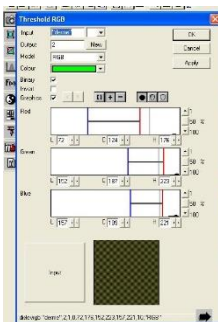
20- Desenhar as glândulas sebáceas

21- Selecionar a função **Fill**  e preencher as regiões localizadas fora dos limites das glândulas sebáceas criando um plano gráfico da cor que foi escolhida previamente no item 2

22- Fixar o plano gráfico na imagem real selecionando a função **Copy graphics plane into the image** 

23- Apagar o plano gráfico virtual clicando 2x na função **delete graphics plane** 

24- Na sequência, para o cálculo da área das Glândulas sebáceas, a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Threshold RGB**



25- Conferir o número das imagens **Input** (imagem de interesse) e **Output** (imagem binária a ser criada)



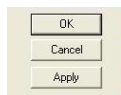


26- Selecionar a função **Binary**

27- Na sequência clicar o botão direito na imagem **Input** e selecione **Big Display** para a maximização da imagem

28- Dirigir o cursor para a imagem maximizada e selecionar todos os pixels presentes nas glândulas sebáceas, através de pequenos traçados.

29- Automaticamente na imagem maximizada, os pixels selecionados serão realçados por meio de uma cor que foi previamente selecionada na função **Colour**



30- Ao clicar em **Ok** finaliza-se o processo de criação da imagem binária

31- Na sequência a macro automaticamente selecionará o arquivo de calibração **panoramic 10x** e a fórmula para o cálculo da área em μm^2

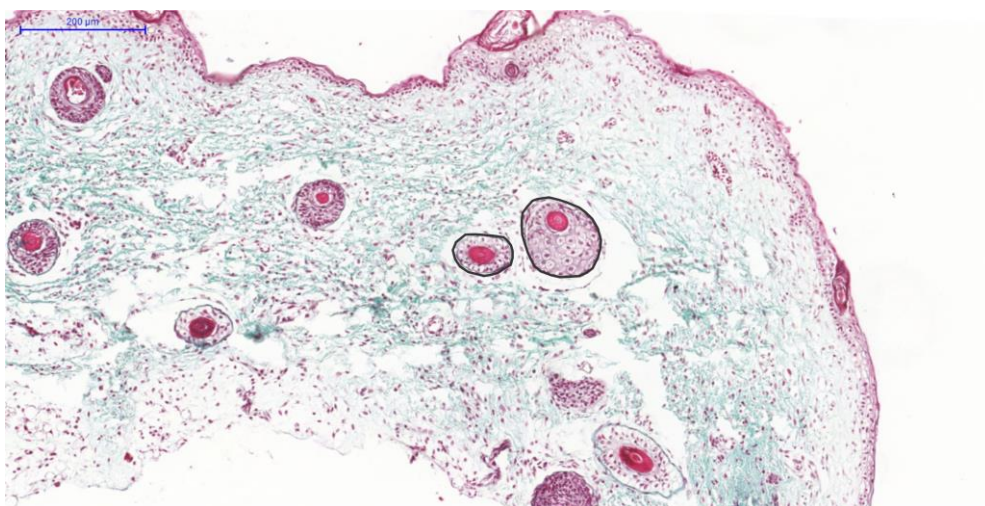
32- Na sequência a macro automaticamente selecionará a funcionalidade **Automatic Measurement** e fornecerá a área das glândulas sebáceas em μm^2

33- Na sequência, será aberta a funcionalidade **List- DATABASE** onde serão visualizados os resultados das medidas em micrometros (μm^2)

No	DISTANCE micrometer
1	179,61
2	167,87
3	217,11

34- Selecionar a funcionalidade **edite**, na sequência, a funcionalidade **copy**

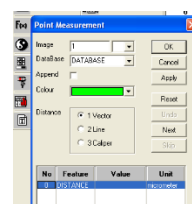
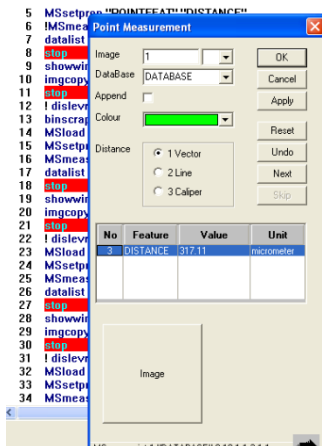
35- Na sequência abrir o software **Excel** (Microsoft office) e colar os resultados das medidas em uma planilha. Salvar como arquivo.



9.10. Mensuração da área da derme e Hipoderme

Mensuração da área da derme + Hipoderme

- 1- Volte a linha 1 e ative a funcionalidade **Play** 
- 2- Na sequência, a macro abre a janela **Load**
- 3- Selecionar a pasta e abrir a imagem de interesse
- 4- Na sequência, a macro abre a funcionalidade **Point Measurement**



- 5- Selecionar na opção **Distance** e a função **Vector**
- 6- Clicar com o botão direito em cima da imagem **Input** e selecionar a opção **Big Display**
- 7- Iniciar a medida com um clique do botão esquerdo do mouse e finalizar com um clique do mesmo botão

8- Repetindo o procedimento anterior finalizar as medidas desta imagem selecionando



9- Na sequência, será aberta a funcionalidade **List – DATABASE** onde serão visualizados os resultados das medidas em micrometros (μm)

No	DISTANCE micrometer
1	179,61
2	167,87
3	317,11

10- Selecionar a funcionalidade **Edit** e, na sequência, a funcionalidade **Copy**

11- Na sequência abrir o software **Excel** (Microsoft office) e colar os resultados das medidas em uma planilha. Salvar como arquivo.

Observação: Fazer 3 medidas da largura e 3 da altura de maneira aleatória que contemplem a maior parte da extensão da derme e da hipoderme

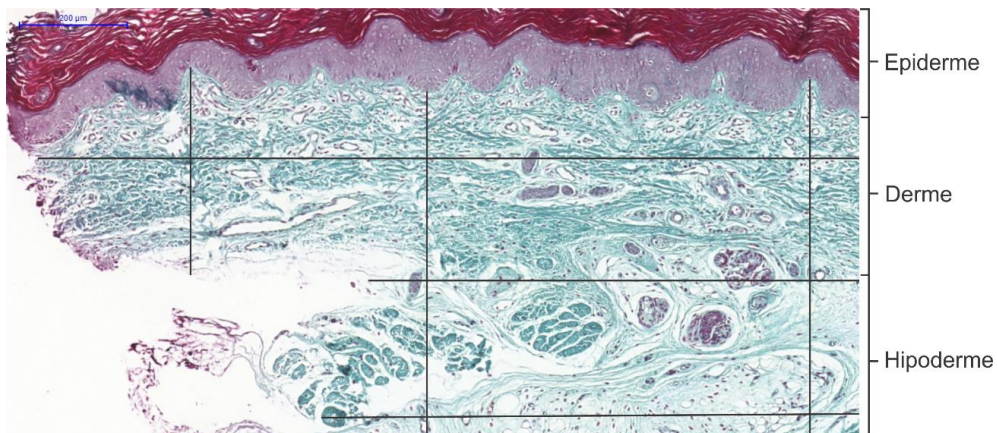


Figura 4 - Imagem histológica da pele capturada por digitalização de lâmina histológica de biópsia de pele de um natimorto de 40 semanas gestacionais, sola do pé.

As linhas foram introduzidas para facilitar a realização de medidas em secções da lâmina.

Escala de 200 micras, aumento 10x; coloração: tricomico de Gomori.

Software PannoramicViewer

9.11. Memória do Cálculo Amostral

Memória de cálculo amostral, realizada no software estatístico GPower

[1] -- Wednesday, December 18, 2019 -- 09:01:29

t tests - Linear bivariate regression: One group, size of slope

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input:	Tail(s)	=	One
	Slope H1	=	0,6
	α err prob	=	0,05
	Power (1- β err prob)	=	0,8
	Slope H0	=	0
	Std dev σ_x	=	1
	Std dev σ_y	=	1
Output:	Noncentrality parameter δ	=	2,7041635
	Critical t	=	1,7958848
	Df	=	11
	Total sample size	=	13
	Actual power	=	0,8126118

9.12. Análise Parcial De Viabilidade De Proteção Patentária



ANÁLISE PARCIAL DE VIABILIDADE DE PROTEÇÃO PATENTÁRIA

A presente análise visa à verificação da invenção NI 110/2019 quanto sua conformidade em relação aos artigos 10, 11, 12, 15, 18 e 22 e da Lei da Propriedade Industrial (LPI) Nº 9.279, DE 14 DE MAIO DE 1996.

1. Apresentação da Tecnologia

A notificação de invenção NI 110/2019 apresenta uma invenção identificada como “PROCESSO PARA DETERMINAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL POR MEIO DE UM MODELO DE PREDIÇÃO AJUSTADO A PARTIR DE VARIÁVEIS EXTRAÍDAS DA HISTOMORFOMETRIA DA PELE” que apresenta como aspectos principais os elementos/conceitos essenciais relacionados na tabela 1:

Tabela 1 – Elementos essenciais da Tecnologia NI 110/2019.

Identificação	Elementos/Conceitos
1	IDADE GESTACIONAL

2	PROCESSAMENTO DE IMAGEM POR COMPUTADOR
3	ESPESSURA DA PELE
4	MORFOLOGIA, HISTOLOGIA
5	FENÔMENOS FISIOLÓGICOS DA PELE

A tecnologia propicia a estimativa semi-automatizada de elevada acurácia da idade gestacional, revela o momento do óbito, na perspectiva da cronologia gestacional. A estimativa da idade gestacional pela análise automatizada da pele aqui apresentada tem o potencial de aferir de forma mais rápida a cronologia da gravidez, especialmente nos casos em que ela é desconhecida através de referenciais clínicos como a data da última menstruação ou pelas informações obtidas pelo exame de ultrassom obstétrico.

2. Análise da invenção NI 110/2019 em relação à LPI.

A LPI apresenta os requisitos que devem ser atendidos para a obtenção da proteção patentária. Adiante será avaliado o conteúdo da invenção quanto sua conformidade aos artigos 10, 11, 12, 15, 18 e 22 e da LPI, conforme apresentado no quadro 1. Estes requisitos não garantem a patenteabilidade, por este motivo a análise ora realizada é parcial.

Quadro 1 – Avaliação do conteúdo da invenção NI 110/2019 quanto a sua conformidade aos artigos 10, 11, 12, 15, 18 e 22 e da LPI.

	Artigo da LPI	Breve descrição	Avaliação de conformidade da NI 110/2019
1	10º	Apresenta a matéria excluída de proteção patentária por não ser invenção.	Aparentemente conforme
2	11º	A invenção não pode estar compreendida no estado da técnica.	
3	12º	Impossibilidade de patenteamento após o término do período de graça.	
4	15º	Aplicação Industrial	
5	18º	Apresenta a matéria excluída de proteção patentária.	
6	22º	O pedido de patente de invenção deverá ter um único conceito inventivo.	

4. Conclusão

Diante do exposto nos itens 1 e 2 deste relatório, verifica-se a que a invenção proposta na NI 110/2019 apresenta viabilidade de patenteamento porque, aparentemente, atende aos requisitos apresentados no quadro 1.

Entretanto, recomenda-se a realização de uma análise de patenteabilidade regular para que sejam aferidos os requisitos de novidade e atividade inventiva previstos no artigo 8º da LPI. A análise de patenteabilidade demanda uma análise mais aprofundada e demorada que poderá ser realizada caso os inventores manifestem a confirmação de sua intenção de patenteamento da tecnologia.

4.1 Recomendações com base nas conclusões

Uma vez que o depósito do pedido de patente deve ocorrer preferivelmente antes da publicação da tecnologia, pedimos aos inventores que se manifestem em relação à data de previsão de publicação do artigo/dissertação correspondente.

SETOR DE PROPRIEDADE INTELECTUAL	
ANALISTA RESPONSÁVEL	Guilherme Leal Fernandes
COORDENADOR DO SETOR	Raissa De Luca
DATA	12/12/2019