

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Instituto de Ciências Exatas – ICEx
Programa de Pós Graduação em Física

Microscopia multifótons em tecidos biológicos

por

Aloísio Miguel Garcia

Belo Horizonte, junho de 2018.

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Instituto de Ciências Exatas – ICEx
Programa de Pós Graduação em Física

Microscopia multifótons em tecidos biológicos

por

Aloísio Miguel Garcia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Paula

Tese apresentada à UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Física

Belo Horizonte, junho de 2018.

Agradecimentos

A Jesus Cristo, que tem me dado forças, através dos evangelhos, para continuar lutando pelos meus ideais e nunca perder a esperança.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria de Paula, responsável por nortear meu desenvolvimento acadêmico durante o doutorado.

Ao meu amigo Mychel Gonçalves Silva, do grupo de Biofotônica, por ter ajudado na montagem experimental.

Aos meus amigos Egleidson Fredrik do Amaral Gomes e Luana Aparecida dos Reis, também do grupo de Biofotônica, por terem me ajudado em algumas medidas.

Aos colegas de laboratório pelas diversas ideias provenientes de nossas reuniões.

Aos pesquisadores, Prof. Marcelo Mamede (Departamento Anatomia e Imagem), Eduardo Paulino Junior (Departamento Anatomia Patológica) e Felipe L Magalhães (Departamento Anatomia e Imagem), pelas amostras de próstata e por suas colaborações neste projeto.

Ao pesquisador Eduardo Paulino Junior (Departamento Anatomia Patológica) pelo escaneamento óptico de algumas amostras de próstata.

À professora Jaqueline S Soares (Departamento de Física-UFOP), por suas ideias provenientes de nossas reuniões.

A toda equipe do laboratório de Nano-espectroscopia pela permissão e auxílio na utilização do microscópio óptico, utilizado para a obtenção das imagens ópticas.

A toda equipe da biblioteca Professor Manoel Lopes de Siqueira pelo empenho e disposição em esclarecer e solucionar qualquer problema acadêmico em seu âmbito.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Física UFMG.

À CAPES, Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro.

À comissão examinadora por terem aceitado o convite.

Resumo

Atualmente não existe um método quantitativo para o diagnóstico de câncer de próstata. Para a realização do diagnóstico, os patologistas utilizam um padrão histológico de graduação que está relacionado à morfologia das glândulas (ácinos) presentes na biópsia e na organização do tecido conjuntivo no entorno da glândula, conhecido como padrão de Gleason. O método é subjetivo e depende muito da experiência e treinamento do patologista.

Recentemente com o avanço no desenvolvimento de laser femtosegundos, as microscopias óptica não lineares, principalmente a microscopia por geração de segundo harmônico (SHG, do inglês second harmonic generation) se tornaram ferramentas importantes para aplicações em diagnósticos de doenças. Um desenvolvimento importante seria a utilização destas microscopias como uma ferramenta quantitativa para o diagnóstico de câncer.

Neste trabalho apresentamos estudos de biópsias de próstata através de microscopias multifótons com o objetivo de obter um método quantitativo para diagnóstico de câncer. Mostramos resultados obtidos através de imagens SHG das fibras de colágeno e imagens de fluorescência em biópsias coletadas de pacientes tratados no Hospital das Clínicas da UFMG. As amostras foram extraídas de diferentes posições da próstata, com diagnósticos: normal, hiperplasia prostática benigna e várias graduações de malignidade de câncer. Apresentamos um método de análise de imagens baseado no cálculo da anisotropia das fibras de colágeno. As análises mostram diferenças no alinhamento das fibras de colágeno no entorno dos ácinos, que são alteradas com a agressividade do câncer. Medindo a anisotropia (grau de alinhamento) das fibras de colágeno obtemos que quanto maior o grau de malignidade do câncer de próstata maior a tendência das fibras de colágeno se alinharem em torno das glândulas. Estes resultados correlacionam diretamente com o escore de Gleason, que é o padrão utilizado pelos patologistas para diagnóstico.

Abstract

There is currently no quantitative method for the diagnosis of prostate cancer. In order to make the diagnosis, pathologists use a histological pattern of graduation that is related to the morphology of glands (acini) present in the biopsy and in the organization of the connective tissue around the gland that is known as the Gleason pattern. The method is subjective and depends heavily on the experience and training of the pathologist.

With the recent advance in the development of femtosecond laser, non-linear optical microscopy, in special Second Harmonic Generation (SHG), has become a powerful tool in helping to diagnose diseases. One important development would be the use of the SHG microscopy as a quantitative tool for the diagnosis of cancer.

In this work we present studies of prostate biopsies through multiphoton microscopies with the purpose of obtaining cancer diagnosis. We show results obtained through SHG images of collagen fibers and fluorescence images in biopsies collected from patients treated at Hospital das Clínicas da UFMG. The samples were drawn from different positions of the prostate, with diagnosis as follows: normal, benign prostatic hyperplasia and several malignancy of cancer. We present a method of image analysis based on the calculation of anisotropy of collagen fibers. The analysis show differences in the alignment of collagen fibers around the acini which are altered with the aggressiveness of cancer. Measuring the anisotropy (degree of alignment) of the collagen fibers we show that the higher the degree of malignancy of prostate cancer the greater the tendency of collagen fibers to become aligned around the glands. These results correlate directly with the Gleason score, which is the standard method used by pathologists for diagnosis.

Sumário

Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Capítulo 1.....	3
Introdução.....	3
Capítulo 2.....	6
2.1 Fluorescência por Absorção de Dois Fótons.....	6
2.2 Geração de Segundo Harmônico.....	8
2.3 Propriedades de Polarização de SHG em Fibras de Colágeno.....	10
Capítulo 3.....	15
3.1 Próstata.....	15
3.2 Histologia da próstata.....	16
3.3 Sistema Gleason.....	17
Capítulo 4.....	19
Técnicas experimentais.....	19
4.1 Microscopia de Fluorescência.....	19
4.2 Microscopia por Geração de Segundo Harmônico.....	21
4.3 Microscopia Óptica de Campo Claro.....	22
4.4 Preparação do Tecido de Próstata.....	22
Capítulo 5.....	26
Tensor Nemático.....	26
5.1 Conceito de Tensor Nemático.....	26
Capítulo 6.....	28
Resultados Experimentais.....	28
6.1 Imagens Ópticas de Campo Claro.....	28
6.2 Imagens de Fluorescência.....	30
6.3 Imagens de SHG.....	31
Capítulo 7.....	41
Análises e Discussões.....	41
7.1 Anisotropia das Imagens de SHG.....	41
7.2 Anisotropia das Imagens para Amostras Frescas.....	47
7.3 Curva de Distribuição Gaussiana das Orientações das Fibras de Colágeno.....	48

7.4 Anisotropia das Imagens de Fluorescência.....	52
7.5 Intensidade das imagens de SHG	53
7.6 Intensidade das imagens de Fluorescência	55
Capítulo 8.....	57
Conclusões e Perspectivas.....	57
Apêndice I.....	59
Referências Bibliográficas.....	60

Capítulo 1

Introdução

A Microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons (TPEF, do inglês *two photon excited fluorescence*) foi um dos primeiros métodos de microscopia óptica não-linear utilizado para estudos em materiais biológicos [1]. Recentemente, esta técnica tem sido bastante utilizada como uma possível ferramenta de diagnóstico para vários tipos de cânceres (ovário e mama) [2]–[4]. Na técnica de microscopia de TPEF, dois fótons são absorvidos quase-simultaneamente para excitar a amostra. Posteriormente, com a maior sensibilidade de detectores e melhores filtros ópticos, microscopias de segundo e terceiro harmônicos foram também utilizados para aplicações na biomedicina [5]–[20].

As Imagens de microscopia por geração de segundo harmônico (SHG, do inglês *second harmonic generation*) têm sido muito utilizadas para estudos biomédicos, especialmente em diagnóstico de câncer [21]. No processo de geração de segundo harmônico, fótons com a mesma frequência interagem com um material não linear para gerar novos fótons com o dobro da energia, ou seja o dobro da frequência ou metade do comprimento de onda dos fótons iniciais. Já existem estudos para vários tipos de câncer utilizando geração de segundo harmônico, por exemplo, em câncer de mama, ovário e pulmão [9], [11], [22]. Entretanto, essa técnica tem sido muito pouco utilizada para diagnóstico de câncer de próstata.

O câncer de próstata é a sexta principal causa de morte em homens no mundo e diagnósticos precoces podem evitar muitas mortes [23]. Sabemos que nas biópsias de próstata, são as fibras de colágeno tipo I que geram o sinal de segundo harmônico [12], [24]. O colágeno, que é a proteína mais abundante nos vertebrados, constitui nos tecidos a rede estrutural da matriz extracelular e pode variar em estrutura, dependendo do tipo de colágeno [25]. A quantidade e a distribuição de colágeno são importantes para as propriedades estruturais e mecânicas do tecido e desempenham um papel importante em diversas doenças, incluindo o câncer. Assim as imagens por SHG permitem estudar a organização das fibras de colágeno no

câncer de próstata. Já foi observado para outros tipos de cânceres, principalmente câncer de mama e ovário, que a organização das fibras de colágeno está relacionada com o diagnóstico, indicando se o tecido é canceroso e qual o grau de “agressividade” do mesmo [9], [26]–[28].

Uma das grandes vantagens de se usar microscopia multifótons na caracterização dos tecidos biológicos é que devido ao comprimento de onda de excitação ser próximo do infravermelho, especificamente utilizamos o comprimento de onda de 800 nm, o poder de penetração na amostra é maior. Outras vantagens são um foto-dano inferior e ausência de toxicidade [18]. A toxicidade é causada pelos marcadores biológicos normalmente utilizados em microscopias por fluorescência com excitação por um fóton. Em SHG e TPEF não é necessário a marcação biológica. O importante é utilizar uma fonte de luz pulsada com alta potência de pico e baixa intensidade média. Para isso utilizamos um laser de Ti-safira pulsado em femtossegundos com essas características.

Neste trabalho de doutorado, utilizamos as microscopias de SHG e de TPEF para estudar amostras de tecido humano de próstata com o objetivo de aprimorar os diagnósticos e obter métodos quantitativos visando permitir diagnósticos precoces de tumores. Obtivemos imagens por SHG, TPEF e fluorescência por absorção de um fóton em biópsias humanas de próstata frescas e fixadas em lâminas histológicas. O processo de SHG ocorre somente em materiais não centro-simétricos, tais como as fibras de colágeno tipo I [11]. As lâminas com as biópsias de próstata, usadas nestes estudos, foram obtidas em projeto em colaboração com o grupo do professor Marcelo Mamede, do Departamento de Anatomia e Imagem, Faculdade de Medicina, UFMG. O diagnóstico patológico das amostras de próstata foi feito pelos patologistas Eduardo Paulino Junior, do Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, UFMG e Mário F. R. de Lima do Laboratório Análys Patologia, Belo Horizonte. Em seguida, analisamos a organização e intensidade provenientes das imagens de SHG e TPEF. As análises da organização das proteínas presentes na matriz extracelular foram feitas usando o conceito de tensor nemático. Com este método foi calculado o gradiente da intensidade na imagem para obter a direção das fibras de colágeno. As análises mostram diferenças no alinhamento das fibras de colágeno no entorno das glândulas (ácinos), que são alteradas com a agressividade do câncer. Medindo a anisotropia

(grau de alinhamento) das fibras de colágeno obtivemos que quanto maior o grau de malignidade do câncer de próstata maior a tendência das fibras de colágeno se alinharem em torno das glândulas. Estes resultados correlacionam diretamente com o escore de Gleason, que é o padrão utilizado pelos patologistas para diagnóstico, demonstrando a potencialidade de aplicações para diagnóstico.

A tese está organizada como a seguir. No capítulo 2, apresentamos uma breve revisão sobre as técnicas não-lineares de absorção de dois fótons e geração de segundo harmônico e as propriedades do colágeno que levam à geração de segundo harmônico. No capítulo 3 descrevemos as características da próstata relevantes para este estudo. As técnicas experimentais e detalhes das amostras estão descritas no capítulo 4. No capítulo 5 está descrito o método de análise das imagens utilizando o conceito de tensor nemático. Os resultados estão apresentados no capítulo 6. E as análises das orientações e intensidades das imagens e discussões estão mostrados no capítulo 7. No capítulo 8 apresentamos as conclusões e perspectivas. E no apêndice I, estão listados os trabalhos publicados durante o doutorado.

Capítulo 2

2.1 Fluorescência por Absorção de Dois Fótons

A primeira evidência de absorção de dois fótons foi obtida por Goppert Mayer em 1931, e depois também foi observado por Axe em 1964 [29]. O processo de absorção de dois fótons [30], descrito teoricamente por Maria Goppert Mayer, envolve a absorção quase simultânea de dois fótons (de energias E_1 e E_2) por um material, por exemplo, uma molécula de uma proteína, como colágeno. Essa absorção ocorre quando as energias $E_1 + E_2$ estão em ressonância com um dos estados eletrônicos do sistema. Devido à excitação, a molécula é levada para um estado f acima do estado fundamental g como mostra a figura 2.1. Esse processo pode ser pensado como uma interação inicial de um fóton de energia E_1 com a molécula, a qual é deixada em um estado de energia virtual temporário, com energia E_1 , acima do estado fundamental. Este não é um estado real da molécula e ele existe somente para um curto intervalo de tempo τ_v . Se durante τ_v um segundo fóton de energia E_2 interage com a molécula, ela pode ser levada para o estado excitado f . A ordem de magnitude para τ_v , que pode ser estimado do princípio da incerteza, é de 10^{-15} - 10^{-16} s para fótons de energia na faixa do visível e infravermelho próximo [30]. A palavra quase simultâneo para 2PA (do inglês two photon absorption) é usado para indicar que os dois fótons interagem com a molécula dentro do intervalo de tempo τ_v e que não existe um estado real intermediário nesse processo. Além da existência de um estado eletrônico de energia apropriada, como no caso de 1PA (do inglês one photon absorption), para que ocorra a absorção de dois fótons é necessário também que as regras de seleção sejam satisfeitas.

Algumas amostras biológicas são fluorescentes, ou seja, elas possuem naturalmente alta seção transversal de absorção e emitem radiação que é comumente denominada autofluorescência. Logo não há necessidade de marcá-las com algum marcador fluorescente. Entretanto, a maioria das estruturas biológicas não são autofluorescentes e necessitam ser acopladas a algum corante fluorescente para serem visualizadas por microscopia de fluorescência. Esses corantes são escolhidos com duas propriedades específicas: possuir transições eletrônicas

específicas para um determinado comprimento de onda de absorção e ter uma afinidade particular para uma determinada molécula, marcando-a na amostra. A maioria dos corantes vem com um radical que funciona como uma ponte na ligação química entre o corante e a molécula que se deseja marcar.

Neste trabalho apresentamos resultados de microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons e por absorção de um fóton para algumas biópsias de próstata marcadas com o corante eosina, que é o corante fluorescente na marcação H&E.

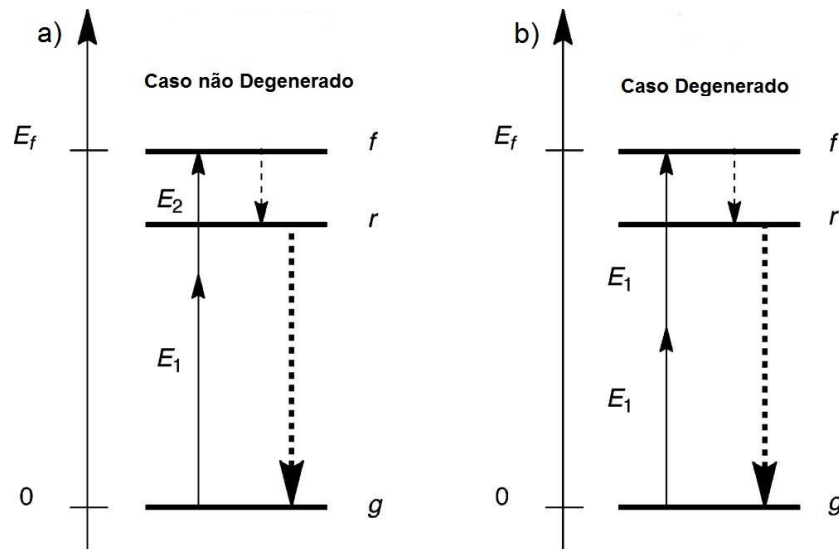


Figura 2.1: Diagrama esquemático dos níveis de energia, mostrando a excitação de uma molécula, de um estado g para um estado f por um processo de absorção de dois fótons (linha contínua). Imagem (modificada) retirada da referência [30]. Os fótons podem ter a mesma energia E_1 (caso degenerado, $E_f = 2E_1$, figura 2.1b) ou energias diferentes E_1 e E_2 (caso não degenerado, $E_f = E_1 + E_2$, figura 2.1a). Depois da excitação, o sistema relaxa rapidamente para um estado r , em geral um nível vibrônico de energia mais baixa que o estado f (linha tracejada). O sistema finalmente retorna ao estado fundamental por processos radiativos ou não radiativos (linha tracejada em negrito).

2.2 Geração de Segundo Harmônico

A geração de segundo harmônico, observado pela primeira vez por Franken *et al* em 1961 [31], é a resposta do material a um campo externo muito intenso, ou seja a interação não linear do campo externo com os dipolos elétricos do meio. Durante o processo, dois fótons de energia E_1 são destruídos ao interagir com o material e um fóton com o dobro da energia $2E_1$ é criado como mostrado na figura 2.2. A linha sólida na figura 2.2(a) representa o estado fundamental atômico, e as linhas pontilhadas representam, o que são conhecidos como níveis virtuais.

Considera-se que a interação da luz com o material produz uma polarização não linear em relação ao campo elétrico externo. Essa relação é obtida adotando a expansão em série de potências do vetor de polarização [32]:

$$\tilde{P}(t) = \varepsilon_0 [\chi^{(1)} \tilde{E}(t) + \chi^{(2)} \tilde{E}^2(t) + \chi^{(3)} \tilde{E}^3(t) + \dots + \chi^{(N)} \tilde{E}^N(t)] \quad (2.1)$$

Onde $\chi^{(N)}$ é o tensor susceptibilidade ótica de ordem N, e \tilde{E} é o campo elétrico incidente. O termo $\tilde{P}^{(2)}(t) = \chi^{(2)} \tilde{E}^2(t)$ é a polarização de segunda ordem, que é responsável pela geração do segundo harmônico. O tensor susceptibilidade, $\chi^{(N)}$, é determinado pela estrutura cristalina do material e desempenha um papel importante como condição para a geração de segundo harmônico e harmônicos de ordem maiores que dois. Para que a interação de segunda ordem seja possível, o tensor de segunda ordem $\chi^{(2)}$ deve ser não nulo, o que ocorre para materiais com estrutura que não apresenta simetria de inversão (não centrossimétrico). A figura 2.2 (b), apresenta esquematicamente a dependência da geração de segundo harmônico com o tensor susceptibilidade de segunda ordem, χ^2 .

Se incidirmos sobre um material, para o qual a susceptibilidade de segunda ordem, $\chi^{(2)}$, é não nulo, um campo elétrico dado por $\tilde{E}(t) = E e^{-i\omega t} + c.c.$, a polarização não linear de segunda ordem será dada pela equação:

$$\tilde{P}^{(2)}(t) = 2\varepsilon_0 \chi^{(2)} E E^* + (\varepsilon_0 \chi^{(2)} E^2 e^{-i2\omega t} + c.c.) \quad (2.2)$$

A equação 2.2 é obtida substituindo a equação do campo elétrico no termo de segunda ordem da polarização. Note que nesta equação a polarização de segunda ordem consiste de uma contribuição para frequência zero (o primeiro termo) e uma contribuição para frequência 2ω (o segundo termo). De acordo com a equação de onda, $\nabla^2 \tilde{E} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \tilde{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \tilde{P}^{NL}}{\partial t^2}$, a última contribuição da equação de polarização, equação 2.2, pode levar à geração de radiação para a frequência de segundo harmônico. Note que a primeira contribuição da equação de polarização não leva a geração de radiação eletromagnética (porque a sua segunda derivada temporal, na equação de onda é nula); isso leva a um processo conhecido como retificação óptica, em que um campo elétrico estático é criado através do material não linear. Sob condições experimentais adequadas, o processo de geração de segundo harmônico pode ser tão eficiente que quase todos os feixes de frequência ω sejam convertidos para feixes de segundo harmônico (frequência 2ω).

Quando ambas as ondas, dos feixes incidentes e de SHG, se propagam com velocidade de fase igual, ou seja, $n_\omega = n_{2\omega}$, ao longo do comprimento do material, a potência fluirá da onda incidente à onda do segundo harmônico (SH), ocorrendo casamento de fase entre as ondas incidente e SH. No entanto, devido à dispersão, as ondas não se propagam, geralmente, com velocidade de fase igual, e após se propagar uma distância conhecida como comprimento de coerência, L_C , as ondas estarão fora de fase. Sendo assim, as ondas SH geradas pela onda incidente em diferentes posições dentro do material não-linear, não se adicionam continuamente em fase. Eventualmente, a interferência destrutiva das ondas SH causa um decréscimo no segundo harmônico gerado. Ou seja a intensidade do sinal SH depende das condições de casamento de fase ao longo da propagação no material.

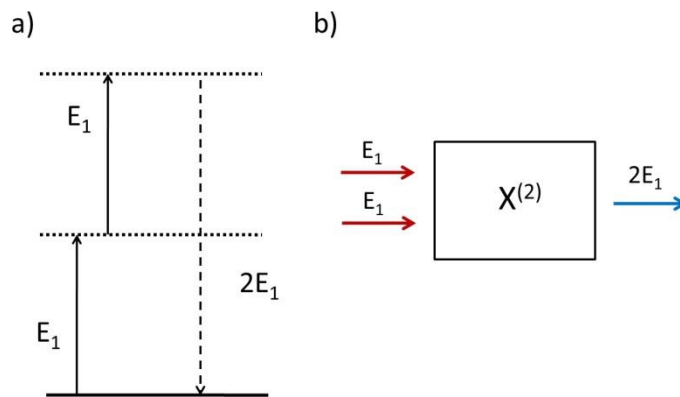


Figura 2.2: a) Desenho esquemático da geração do segundo harmônico, onde dois fótons de energia E_1 geram um fóton com o dobro da energia; b) A dependência do SHG com o material é descrito pelo tensor $\chi^{(2)}$. Fonte: Adaptado de Boyd [32].

Na próxima seção vamos discutir as características da geração de segundo harmônico pelo material que nós estudamos, que são as fibras de colágeno tipo I, presentes no tecido de próstata. Mostraremos a relação da intensidade de segundo harmônico com o tensor susceptibilidade de segunda ordem, χ^2 , do colágeno ao incidirmos no tecido de próstata um laser linearmente polarizado.

2.3 Propriedades de Polarização de SHG em Fibras de Colágeno

O colágeno é composto de moléculas de tropocolágeno, que têm comprimento, $L \approx 280 \text{ nm}$, e diâmetro, $d \approx 1,5 \text{ nm}$. Matrizes escalonadas de moléculas de tropocolágeno formam as fibrilas, que se organizam para formar as fibras de colágeno [33], [34], figura 2.3.

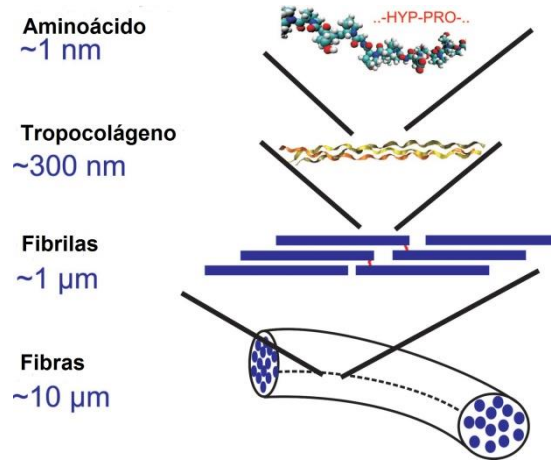


Figura 2.3: visão esquemática das características hierárquicas do colágeno, variando do nível de sequência de aminoácido, em escala nanométrica, até a escala das fibras de colágeno, com comprimentos da ordem de 10 μm . Figura adaptada de [33].

O colágeno tipo I, que é a proteína mais abundante na terra [35], forma, junto com elastinas, fibronectinas e lamininas, a estrutura molecular dentro da matriz extracelular, conhecido como estroma. Isso não só fornece força mecânica, mas também regula a adesão celular e dirige o desenvolvimento do tecido. Já foi mostrado que a organização do colágeno está associada diretamente ao crescimento e progressão de muitos tipos de tumores, tais como em cânceres de ovário e mama [9]–[11], [15], [16].

O colágeno, que tem grupo de simetria C_{∞} , possui duas componentes independentes não nulas do tensor susceptibilidade: $\chi_{yyy}^{(2)}$ e $\chi_{yxx}^{(2)} = \chi_{yzz}^{(2)} = \chi_{xyx}^{(2)} = \chi_{zyz}^{(2)} = \chi_{xxy}^{(2)} = \chi_{zzy}^{(2)}$. Considerando o eixo da fibra de colágeno ao longo do eixo y , figura 2.4, e um campo elétrico de excitação linearmente polarizado, E_1 , a intensidade total de SHG pode ser escrita como:

$$I_{total}(\theta) \approx I[(\rho_1 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta)^2 + (\rho_2 \sin^2(2\theta))] \quad (2.3)$$

Onde θ é o ângulo entre a polarização do laser incidente (E_1) e o eixo da fibra de colágeno; ρ_1 é igual a $\chi_{yyy}^{(2)} / \chi_{yxx}^{(2)}$ e ρ_2 igual a $\chi_{xyx}^{(2)} / \chi_{yxx}^{(2)}$. Os valores de ρ_1 e ρ_2 fornecem informações estruturais da amostra estudada. Sob a condição em que ambas as frequências, fundamental e de SHG, estão longe da ressonância eletrônica, a simetria de Kleinman diz que $\chi_{xyx}^{(2)} = \chi_{yxx}^{(2)}$ (ou seja, $\rho_2 = 1$). Nas fibras de colágeno do tendão da cauda de um rato $\rho_1 = 1,80$ [36]. Para a obtenção da

equação 2.3, decompomos o campo elétrico do feixe incidente nas direções x e y como $E_x^\omega = E_1 \sin \theta$ e $E_y^\omega = E_1 \cos \theta$ e substituímos na equação de polarização de segunda ordem ($P_i^{2\omega} = \chi_{ijk}^2 E_j E_k$). Esta equação, em termos de matriz, pode ser escrita como:

$$\begin{bmatrix} P_x^{2\omega} \\ P_y^{2\omega} \\ P_z^{2\omega} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & \chi_{xxy}^{(2)} & 0 & \chi_{xyx}^{(2)} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \chi_{yxx}^{(2)} & 0 & 0 & 0 & \chi_{yyy}^{(2)} & 0 & 0 & \chi_{yzz}^{(2)} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \chi_{zyz}^{(2)} & 0 & \chi_{zzz}^{(2)} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} E_x^\omega E_x^\omega \\ E_x^\omega E_y^\omega \\ E_x^\omega E_z^\omega \\ E_y^\omega E_x^\omega \\ E_y^\omega E_y^\omega \\ E_y^\omega E_z^\omega \\ E_z^\omega E_x^\omega \\ E_z^\omega E_y^\omega \\ E_z^\omega E_z^\omega \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

O tensor susceptibilidade de segunda ordem, mostrado na equação 2.4, apresenta 7 elementos não nulos. Os elementos $\chi_{xxy}^{(2)}$ e $\chi_{xyx}^{(2)}$ representam a polaridade da fibra de colágeno devido a quiralidade. A intensidade total de SHG, equação 2.3, é proporcional ao quadrado da equação de polarização ($P_i^{2\omega}$). As intensidades das componentes de SHG paralelo, $I_y(\theta)$, e perpendicular, $I_x(\theta)$, com relação ao eixo da fibra de colágeno, podem ser escritas como:

$$I_y(\theta) \propto I(\rho_1 \cos^2 \theta + \sin^2 \theta)^2 \quad (2.5)$$

$$I_x(\theta) \propto I\rho_2 \sin^2(2\theta) \quad (2.6)$$

As equações 2.5 e 2.6 são proporcionais ao quadrado da polarização de SHG nas direções y (ou seja, $P_y^{2\omega}$) e x (ou seja, $P_x^{2\omega}$), respectivamente. A componente $P_z^{2\omega}$ é nula, pois $E_z^\omega = 0$ na direção de propagação do campo elétrico incidente. Essas componentes de intensidades de SHG, paralelas e perpendiculares, podem ser medidas girando a polarização do laser e medindo a intensidade com um polarizador analisador paralelo ou perpendicular ao eixo das fibras.

Notamos, pela equação 2.3, que independente do ângulo de polarização do laser, em relação ao eixo da fibra de colágeno, pode-se observar sinal de SHG, porém com intensidades diferentes. A figura 2.5-A mostra o gráfico polar da equação 2.3. Para plotar este gráfico teórico, consideramos $\rho_1 = 1,80$ e $\rho_2 = 1$, como mostrado anteriormente. Observando a figura 2.5-A, vemos que a maior intensidade

de SHG ocorre para o ângulo $\theta = 0^\circ$, ou seja, quando a polarização do laser é paralela às fibras de colágeno. O menor valor da intensidade de SHG corresponde ao ângulo de 90° , ou seja, quando a polarização do laser é perpendicular às fibras de colágeno. As figuras 2.5-B e 2.5-C mostram os gráficos polares das intensidades de SHG, paralela e perpendicular às fibras de colágeno, representados pelas equações 2.5 e 2.6, respectivamente. Observando a figura 2.5-B, vemos que a maior intensidade de SHG na direção y ocorre quando o campo elétrico incidente está paralelo às fibras de colágeno e o menor valor ocorre quando o campo elétrico incidente está perpendicular às fibras. Já a figura 2.5-C mostra que a maior intensidade de SHG na direção x ocorre quando o campo elétrico incidente forma um ângulo de 45° com as fibras de colágeno.

Neste trabalho, obtemos imagens de SHG de biópsias de próstata normal e tumoral, usando laser linearmente polarizado e circularmente polarizado. Usando laser circularmente polarizado a intensidade de SHG é uniforme em todas as direções. Na seção 6.3 apresentamos resultados de SHG em função de polarização para as amostras estudadas.

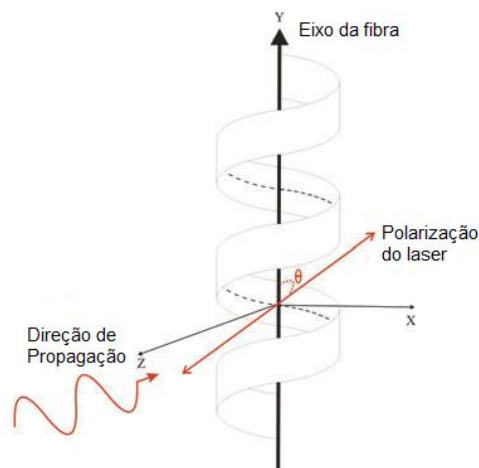


Figura 2.4: Relações entre a direção de propagação do laser (eixo z), direção de polarização do laser (plano x-y) e o eixo das fibras (eixo y). θ é o ângulo entre o eixo das fibras e a direção de polarização do laser [18].

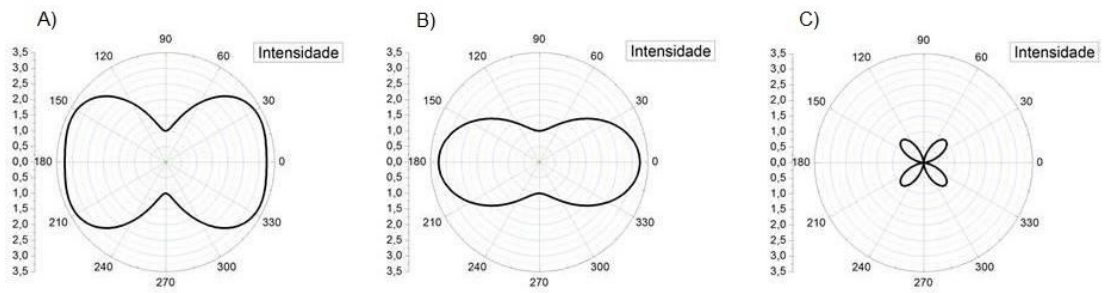


Figura 2.5: Gráficos polares mostrando as intensidades de SHG em função do ângulo de polarização do laser para as fibras de colágeno. As figuras 2.5-A, 2.5-B e 2.5-C mostram os gráficos das intensidades de SHG, total, paralela e perpendicular às fibras de colágeno, respectivamente.

Capítulo 3

Neste capítulo, descrevemos a próstata, a histologia da próstata e sobre o sistema Gleason, que é o método mais utilizado pelos patologistas para o diagnóstico de câncer de próstata.

3.1 Próstata

A próstata [37] é uma pequena glândula localizada na pelve masculina, cujo peso normal é aproximadamente 20 g [38]. Ela é responsável por produzir 40% a 50% dos fluidos que constituem o sêmen, tendo uma função biológica importante na fase reprodutora do homem, conferindo proteção e nutrientes fundamentais à sobrevivência dos espermatozoides. Além disso, a próstata é muito importante na prática urológica, já que é sede de vários processos que causam transtornos a pacientes de idades variadas. Como todos os outros tecidos e órgãos do corpo, a próstata é composta por células, que normalmente se dividem e se reproduzem de forma ordenada e controlada, no entanto, quando ocorre uma disfunção celular que altere este processo de divisão e reprodução, produz-se um excesso de tecido, que dá origem ao tumor, podendo este ser classificado como benigno ou maligno. A próstata pode ser sede desses dois processos: o crescimento benigno, chamado de hiperplasia prostática benigna (HPB), e o maligno, denominado câncer de próstata, podendo este último surgir associado ou não ao crescimento benigno.

O “padrão ouro” no diagnóstico de câncer de próstata é a utilização do sistema Gleason, que é baseado na análise histológica de biópsias, onde a precisão depende da experiência do patologista. O sistema Gleason foi desenvolvido na década de 1960 e continua sendo a principal ferramenta no diagnóstico de câncer de próstata [39].

A proteína mais abundante no tecido de próstata é o colágeno tipo I [35], que é composto por três cadeias, formando uma tríplice hélice, como descrito na seção 2.3. Além do colágeno, temos também na próstata outras proteínas, por exemplo, miosina e a eosina, que estão presentes nos tecidos musculares liso.

Neste trabalho estudamos múltiplas amostras de biópsias de próstata, usando microscopia por geração de segundo harmônico e microscopia de fluorescência, com o objetivo de obtermos um método quantitativo e mais eficiente no diagnóstico de câncer de próstata. As amostras de próstata foram obtidas de pacientes submetidos a prostatectomia radical.

3.2 Histologia da próstata

A histologia da próstata [40]–[43] mostra dois componentes fundamentais: As glândulas (ácinos) e o estroma, como mostra a figura (3.1a). A glândula prostática ou próstata [44] está disposta em três camadas concêntricas: uma camada mucosa (zona interna), uma camada submucosa (zona intermediária) e uma camada periférica contendo as principais glândulas prostáticas, figura (3.1b). A zona mais interna apresenta um epitélio pseudo-estratificado e é formada pelas glândulas mucosas. Na zona intermediária (ou de transição) encontram-se as glândulas da submucosa, onde frequentemente ocorre a maioria dos processos de hiperplasia benigna, causando dificuldades na micção. A zona periférica é a mais volumosa da próstata e é formada pelas glândulas principais, apresentando um epitélio mais regular. Esta zona, no entanto, destaca-se por ser o maior local de origem dos tumores malignos (câncer) de próstata.

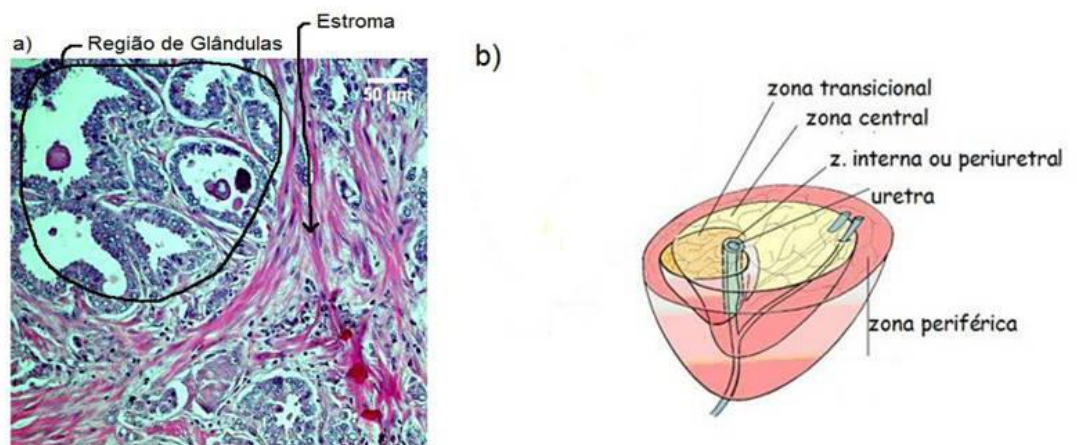


Figura 3.1: (a) imagem óptica de uma biópsia de próstata, mostrando as glândulas (ácinos) e o estroma. (b) representação esquemática das regiões da próstata (glândula prostática) [44].

3.3 Sistema Gleason

O sistema Gleason, para o câncer de próstata, foi desenvolvido na década de 60 e continua sendo a técnica mais utilizada para o diagnóstico de câncer em homens [39]. Esse sistema, figura 3.2, usa um diagrama esquemático, que funciona como uma escala de analogia visual, facilitando o diagnóstico, onde são definidos cinco padrões histológicos de graduação [39], [40]. Nos padrões de 1 a 3, de maneira geral, há manutenção da morfologia glandular fundamental. No padrão 4, há perda parcial dessa morfologia e, no padrão 5, a perda é quase total. Quanto maior o padrão de Gleason, mais “agressivo” é o câncer. O adenocarcinoma da próstata, ou câncer de próstata, apresenta heterogeneidade morfológica acentuada e, frequentemente, mais de um padrão está presente. O padrão prevalente, denominado padrão primário, e o segundo, denominado padrão secundário, eram somados para obter-se o chamado sistema Gleason, recomendando-se que todos os elementos dessa soma fossem mencionados (por exemplo, padrão de Gleason $3+4=7$). Neste exemplo o padrão primário é o Gleason 3, que aparece com maior frequência, e o Gleason 4 é o padrão secundário, que aparece com menos frequência. Se o tumor apresentasse apenas um padrão, o sistema Gleason era obtido duplicando aquele padrão. Recentemente, em 2014 [38], a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP, do inglês International Society of Urological Pathology) recomendou um novo sistema. Nesta nova classificação do sistema Gleason, pacientes anteriormente classificados como Gleason 6 ($3+3=6$) passaram a fazer parte do grupo 1. Os Gleason $3+4=7$ e $4+3=7$ foram divididos em dois grupos prognósticos diferentes, agora denominados 2 e 3, respectivamente. O Gleason 8 tornou-se o grupo 4 e os Gleason 9-10 foram classificados como grupo 5. Estas novas categorias prognósticas de 1 a 5 estão correlacionadas com uma taxa de ausência de recidiva bioquímica, em 5 anos, de 94,6%, 82,7%, 65,1%, 63,1% e 34,5%, respectivamente, considerando biópsias prostáticas.

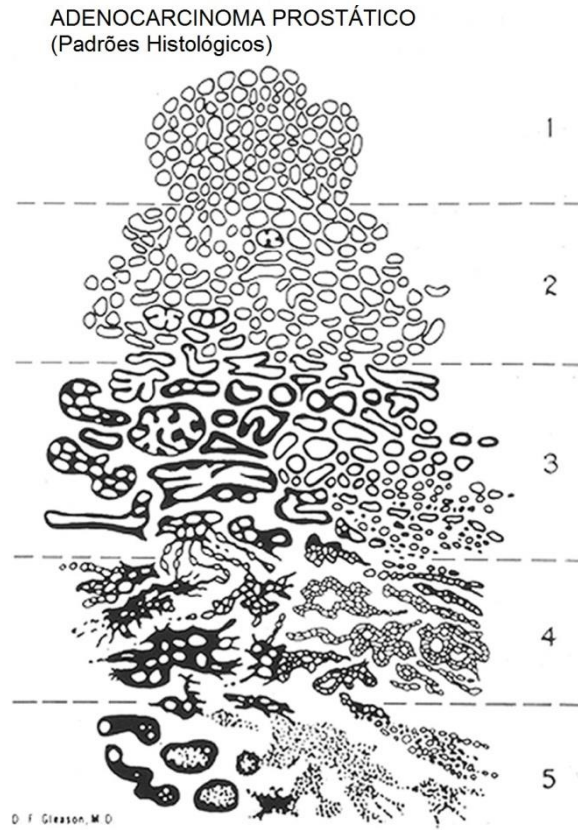


Figura 3.2: Esquema da representação do adenocarcinoma da próstata de acordo com o sistema de Gleason. Figura adaptada de [45].

Capítulo 4

Técnicas experimentais

Neste capítulo, iremos mostrar como as biópsias de próstata foram preparadas e quais foram as técnicas de microscopia utilizadas para a obtenção das imagens de SHG, fluorescência e óptica de campo claro.

4.1 Microscopia de Fluorescência

Para a obtenção das imagens por microscopia de fluorescência, nós utilizamos o microscópio confocal FV-300 da Olympus. Na montagem mostrada na figura 4.1 é possível excitar a amostra por um ou dois fótons. Além do laser pulsado de Ti:safira, sintonizável, outros dois lasers contínuos (cw), 488 e 543 nm podem ser utilizados. Os feixes de laser entram no microscópio por um espelho dicróico (DM1) que transmite o laser infravermelho e reflete o visível.

O feixe de excitação entra na unidade de escaneamento e é refletido por um espelho dicróico (DM2) para o par de espelhos (SM) que permite o movimento de varredura xy para excitar a área a ser medida na amostra. Em seguida o feixe é focado na amostra pela objetiva de focalização. O laser transmitido é coletado por uma lente no interior do condensador e focaliza na fotomultiplicadora (PMT3).

A fluorescência é coletada pela mesma objetiva de focalização, que ao passar novamente pelo dicróico DM2, reflete o laser de excitação e transmite a fluorescência. Uma íris é colocada no caminho do feixe para deixar passar somente a luz proveniente do plano focal e bloquear a luz restante. No interior da unidade de escaneamento há duas fotomultiplicadoras PMT1 e PMT2, que são usadas para obter imagens de diferentes regiões da banda de fluorescência.

A montagem permite a escolha de três componentes ópticos para separar a fluorescência: pode se usar um espelho metálico que reflete toda a fluorescência

para PMT1, um espelho dicróico (DM3) que reflete os comprimentos de onda menores que 505 nm, ou um segundo espelho dicróico (DM4) que reflete comprimentos de onda menores que 570 nm e transmite o restante.

Um filtro passa banda é utilizado antes de cada uma das fotomultiplicadoras para eliminar o restante de laser espalhado e selecionar as bandas de fotoluminescência a serem coletadas. Nos resultados mostrados no capítulo 6, utilizamos o filtro passa banda (560-600 nm) para PMT2 e o filtro passa banda (510-540 nm) para a PMT1.

Através de um controle piezoelétrico a objetiva de focalização pode se movimentar na direção da propagação do feixe de excitação, movimentando assim o plano focal e obtendo imagens em diferentes profundidades. Através de um software gráfico podemos usar essas imagens e obter uma imagem em três dimensões da amostra analisada.

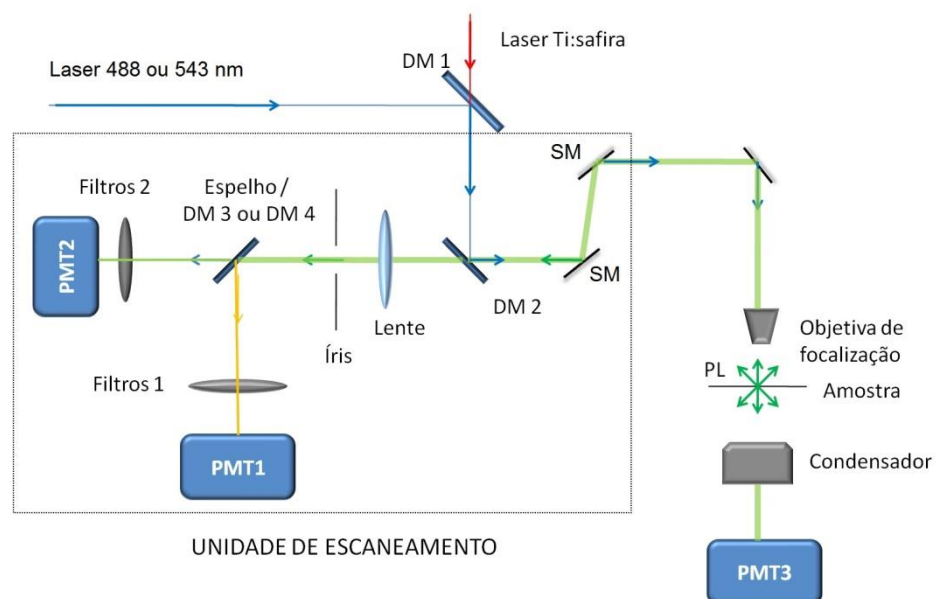


Figura 4.1: Diagrama esquemático, mostrando os detalhes do microscópio confocal. DM: espelho dicróico, PMT: fotomultiplicadora, SM: espelho de varredura.

4.2 Microscopia por Geração de Segundo Harmônico

As imagens de microscopia por geração de segundo harmônico foram obtidas usando o mesmo microscópio Fluoview-FV-300 (*Olympus-BX61WI*), utilizado na obtenção das imagens de fluorescência. Porém adaptamos o microscópio para permitir a realização dessas medidas. Acrescentamos um espelho dicróico logo acima da objetiva e uma fotomultiplicadora mais sensível para a coleta do segundo harmônico. Para excitar a amostra usamos um laser pulsado de Ti-safira Chameleon, sintonizável, em 800 nm. A emissão do segundo harmônico é em 400 nm. A figura 4.2 mostra o desenho esquemático da montagem experimental implementada para a coleta do SHG. Após a unidade de escaneamento do microscópio inserimos um espelho dicróico, que transmite o infravermelho e reflete o visível, e uma objetiva de 20X de aumento, com imersão em água e abertura numérica (N.A) de 0.9, focaliza a luz sobre a amostra. O sinal de segundo harmônico (SHG) é coletado por retro espalhamento pela mesma objetiva de focalização. O espelho dicróico transmite o infravermelho (680 – 1080 nm) e reflete o visível (abaixo de 680 nm). Um filtro em 400 nm com largura de banda de 20 nm é colocado na frente da fotomultiplicadora PMT4 para filtrar o laser espalhado. O resultado é a formação da imagem por varredura do plano focal do segundo harmônico da amostra. Para obtermos luz circularmente polarizada, inserimos uma placa de um quarto de onda na frente do laser, antes deste chegar ao microscópio. Antes de chegar ao microscópio, o feixe do laser de Ti-safira passa por uma placa de meia-onda e um polarizador para controle de potência. A potência na amostra, ajustada através da placa de meia-onda e polarizador, foi de 2,2 mW.

Para a obtenção das imagens (2D) de segundo harmônico das biópsias de próstata, fixadas em lâminas, medimos o sinal de SHG em três diferentes profundidades da amostra, para garantirmos que toda a amostra seja observada. Em seguida somamos essas três imagens para chegarmos na imagem final de SHG. As imagens de segundo harmônico, das amostras frescas, foram obtidas medindo o sinal de SHG para várias profundidades diferentes, onde o passo entre cada uma delas foi de $1\mu\text{m}$.

convencional. Posteriormente, foram encaminhados ao centro de tecnologia em Medicina Molecular da FM-UFMG para a realização dos estudos de ^{18}F -FDG e ^{18}F -colina PET/CT, parte do projeto do Prof. Mamede. Finalizada a fase de estadiamento, os pacientes eram reencaminhados ao setor de Urologia do HC-UFMG para ressecção cirúrgica da lesão.

Esta pesquisa foi realizada segundo princípios éticos e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, de acordo com a resolução N° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo COEP – UFMG no dia 20 de fevereiro de 2013 coordenado pelo prof. Marcelo Henrique Mamede Lewer e intitulado ‘Papel do PET/CT com ^{18}F -FDG e ^{18}F -colina nos pacientes com câncer de próstata’. Os pacientes foram informados sobre a pesquisa e assinaram termo de permissão para o uso das amostras.

Os tecidos estudados foram removidos do organismo através de biópsia. Considerando que a próstata retirada de um paciente apresenta múltiplos diagnósticos, como por exemplo, tecido prostático normal, hiperplasia prostática, benigna, neoplasia intra-epitelial, e diversas graduações de malignidade, dependendo da região analisada, múltiplas amostras foram coletadas de cada próstata utilizando uma punção de 1 mm de diâmetro.

Para as medidas de microscopia em lâmina, o fragmento de próstata coletado seguia para processamento histopatológico tradicional de amostras prostáticas. Este processo foi realizado pela técnica em patologia do laboratório de patologia da Faculdade de Medicina-UFMG. Após desidratação, clarificação e impregnação com parafina, as amostras eram cortadas por micrótomo em fatias bem finas e uniformes, com espessura de 4 a 6 micrômetros. Em seguida os cortes de próstata são fixados em lâminas de microscópio. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina para o diagnóstico pelo patologista. Após a microtomia, as células e o material extracelular são transparentes e os corantes melhoram a visualização das estruturas teciduais. As lâminas foram analisadas pelo patologista da Faculdade de Medicina da UFMG Prof. Ms. Eduardo Paulino Junior e por outro patologista externo à faculdade de medicina, como pode ser observado no quadro 4.1.

Quando houve discordância quanto ao diagnóstico de uma amostra, foi realizado um consenso entre os dois patologistas sendo definido desta forma o diagnóstico final. O índice de concordância geral entre os patologistas foi considerado moderado. Mas observa-se que a principal disparidade entre os patologistas envolvidos neste estudo foi na determinação do padrão histopatológico Gleason 3 ou 4, o que pode ter sido provocado pelas alterações relativamente recentes na classificação histopatológica pela ISUP em novembro de 2014. Entretanto, esta diferença na classificação da amostra altera o prognóstico a ser informado ao paciente e a conduta indicada.

As mesmas amostras de próstata (as punções frescas, antes do processamento de corte histológico) foram também estudadas por medidas de Espalhamento Raman. Estes resultados estão apresentados no trabalho de mestrado de Felipe Lima Magalhães [47], Departamento de Anatomia e Imagem, Faculdade de Medicina, UFMG, sob a orientação da Profa. Jaqueline S. Soares, Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Foram obtidos espectros Raman utilizando um laser de excitação em 1064 nm para várias das proteínas presentes nas amostras.

Quadro 4.1: Diagnósticos histopatológicos fornecidos por 2 diferentes patologistas e diagnóstico consensual para cada amostra. Onde NIP é neoplasia intraepitelial prostática, estroma é a zona fibro-muscular anterior, composto de músculo liso e tecido fibroso, e microócinos são regiões de glândulas normais.

N° Amostra	Paciente/região/amostra	Diagnóstico patologista 1	Diagnóstico patologista 2	Diagnóstico final
09	1AE5	Gleason 3+3	Gleason 3+3	Gleason 3+3
55	1AE7	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
56	1TE3	NIP baixo grau	NIP	Glândula Normal
74	2AE1	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
57	2BE1	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
04	2BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
34	2TD2	Gleason 3+4	Gleason 4+3	Gleason 3+4
32	2TD3	Gleason 3+3	Gleason 4+3	Gleason 3+4
12	3TD3	Gleason 4+4	Gleason 4+4	Gleason 4+4
23	3TD5	Gleason 3+3	Gleason 4+3	Gleason 3+4
43	3TE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
37	4AD1	Gleason 3+3	Gleason 4+3	Gleason 3+4
14	4AD6	Gleason 3+4	Gleason 3+4	Gleason 3+4
27	4AE4	Gleason 3+3	Gleason 4+3	Gleason 3+4

02	4BE3	Gleason 3+3	Estroma	Gleason 3+3
07	4TD1	Gleason 3+3	Gleason 3+4	Gleason 3+3
03	4TD2	Glândula Normal	Microácinos	Glândula Normal
35	4TD6	Gleason 4+4	Gleason 4+4	Gleason 4+4
24	4TD8	Gleason 5+4	Gleason 4+4	Gleason 4+3
31	4TD9	Gleason 4+4	Gleason 4+4	Gleason 4+4
05	4TD10	Gleason 3+3	Gleason 3+4	Gleason 3+3
21	4TE1	Gleason 3+4	Gleason 4+4	Gleason 3+4
10	4TE7	Gleason 3+3	Gleason 3+4	Gleason 3+3
18	4TE10	Gleason 3+3	Gleason 4+4	Gleason 3+4
19	5AD1	Gleason 3+4	Gleason 3+4	Gleason 3+4
13	5AD3	Gleason 3+4	Gleason 3+4	Gleason 3+4
08	5AD5	Gleason 3+4	Gleason 3+4	Gleason 3+4
73	5BD7	Glândula Normal	Microácinos	Glândula Normal
42	5BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
47	6BD1	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
60	6BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
65	6BE4	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
48	6TE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
63	6TE3	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
30	7AD1	Gleason 3+4	Gleason 4+4	Gleason 4+3
64	7BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
62	7TD1	Gleason 3+3	Gleason 3+3	Gleason 3+3
11	7TD5	Gleason 4+3	Gleason 4+4	Gleason 4+3

Capítulo 5

Tensor Nemático

Para analisar o grau de alinhamento das proteínas nas imagens de SHG e de TPEF e obtermos um diagnóstico mais preciso para as biópsias de próstata, nós usamos o cálculo da anisotropia. O conceito de tensor nemático, mostrado na próxima seção, é utilizado neste tipo de cálculo.

5.1 Conceito de Tensor Nemático

Neste trabalho, o conceito de tensor nemático foi utilizado para calcular o vetor gradiente dos sinais de segundo harmônico e fotoluminescência nas imagens de microscopia das biópsias de próstata [48]. O vetor gradiente é perpendicular à direção de alinhamento das fibras na imagem. O vetor tangente, que é perpendicular ao vetor gradiente, é definido como a orientação média das fibras na imagem analisada. Este vetor é definido como anisotropia, e mede quão bem as fibras estão alinhadas. Os valores da anisotropia variam de 0 a 1. Quando as fibras estão distribuídas aleatoriamente o valor da anisotropia é igual a 0 e quando as fibras estão orientadas na mesma direção o valor da anisotropia é igual a 1.

O vetor tangente à estrutura fibrilar, para um mapa de intensidade 2D, é dado pela seguinte equação:

$$t = (t_x, t_y) = \frac{(\partial I/\partial y, -\partial I/\partial x)}{\sqrt{(\partial I/\partial x)^2 + (\partial I/\partial y)^2}} \quad (5.1)$$

Onde $I(x, y)$ é o nível de intensidade do pixel na imagem de microscopia em função das coordenadas 2D (x, y) . O vetor tangente, t , é um vetor unitário. O sinal negativo no vetor tangente está relacionado à perpendicularidade entre este vetor e o vetor gradiente. O tensor nemático local é uma matriz simétrica 2x2: $n_{x,x} = t_x^2$, $n_{x,y} = n_{y,x} = t_x t_y$, $n_{y,y} = t_y^2$. O tensor nemático para uma área selecionada é igual a média do tensor local $\langle n \rangle$. Considerando $n_1 > n_2$ como os autovalores de $\langle n \rangle$, o autovetor e_1 define a orientação média da matriz fibrilar e $q = n_1 - n_2$ define a anisotropia.

Quando estávamos finalizando as análises da anisotropia vimos na literatura trabalhos apresentando um método matematicamente similar, o método do tensor estrutural proposto por Bueno [49]–[51]. No método de Bueno, o similar à anisotropia é o cálculo do grau de isotropia, DoI . Ele também acrescenta a este cálculo a taxa de isotropia, RoI , que é definida como: $RoI = DoI_{Local}/DoI_{Global}$. Uma amostra isotrópica apresenta $RoI=1$. Utilizando esse método repetimos os cálculos para algumas amostras. Estes testes mostraram que os valores obtidos para o RoI e anisotropia são equivalentes.

Para as análises de anisotropia nós utilizamos o software ImageJ [52]. Através da ferramenta (FibrilTool) [48], deste software, nós analisamos a orientação do padrão de orientação das fibras e plotamos os resultados na imagem. Resumidamente, esta ferramenta calcula o tensor nemático com base no nível de intensidade do pixel em uma região da imagem. O gradiente do nível de intensidade permite a definição de um vetor unitário que é localmente tangente às fibrilas. O autovetor do tensor nemático é definido como a orientação do padrão analisado.

Capítulo 6

Resultados Experimentais

Neste capítulo mostraremos os resultados experimentais de microscopias obtidos durante o período de doutorado. Através da microscopia de SHG foram obtidas imagens das fibras de colágeno para várias biópsias de próstata humana. Também fizemos medidas de microscopias de fluorescência por absorção de um e dois fótons para as mesmas biópsias. As imagens de fluorescência mostram, principalmente, as células que são marcadas com o marcador biológico eosina. Algumas proteínas emitem autofluorescência, porém suas intensidades são bem menores do que a intensidade da fluorescência do corante eosina.

6.1 Imagens Ópticas de Campo Claro

As imagens ópticas são importantes na escolha das regiões para medir os sinais de segundo harmônico e fluorescência, pois através delas podemos localizar as regiões de ácinos e de estroma nas amostras. Como o câncer causa uma diferenciação maior nas regiões de ácinos, priorizamos estas regiões na realização das medidas.

Na figura 6.1, está representado, como exemplo, uma imagem óptica para cada um dos diagnósticos. Estas imagens foram obtidas usando um microscópio NIKON Eclipse. A imagem (A) mostra uma biópsia com diagnóstico normal, a imagem (B) é para um diagnóstico Gleason (3+3), a imagem (C) é para um diagnóstico Gleason (4+4) e a imagem (D) é para um diagnóstico Gleason (4+5). Quanto “mais agressivo” o câncer maior o padrão (número) de Gleason. À medida que a malignidade do câncer aumenta as glândulas ficam menos definidas.

Os tecidos de próstata são compostos principalmente por regiões glandulares (ácinos) e de estroma. Esses tecidos estão marcados com a coloração H&E (Hematoxilina-Eosina). Na figura 6.1, em azul-púrpura, temos os núcleos das

células, que são corados pela hematoxilina, enquanto que em róseo a vermelho temos os citoplasmas das células, que são corados pela eosina. A região em róseo vermelho é constituída, especificamente, de colágeno, fibra elástica e músculo liso.

Através das imagens, pode-se observar que quanto “mais agressivo” o câncer, ou seja, quanto maior o padrão de Gleason, maior a perda na morfologia glândular. Por exemplo, na imagem D, que é um Gleason (4+5), as glândulas estão em um formato de “foice”.

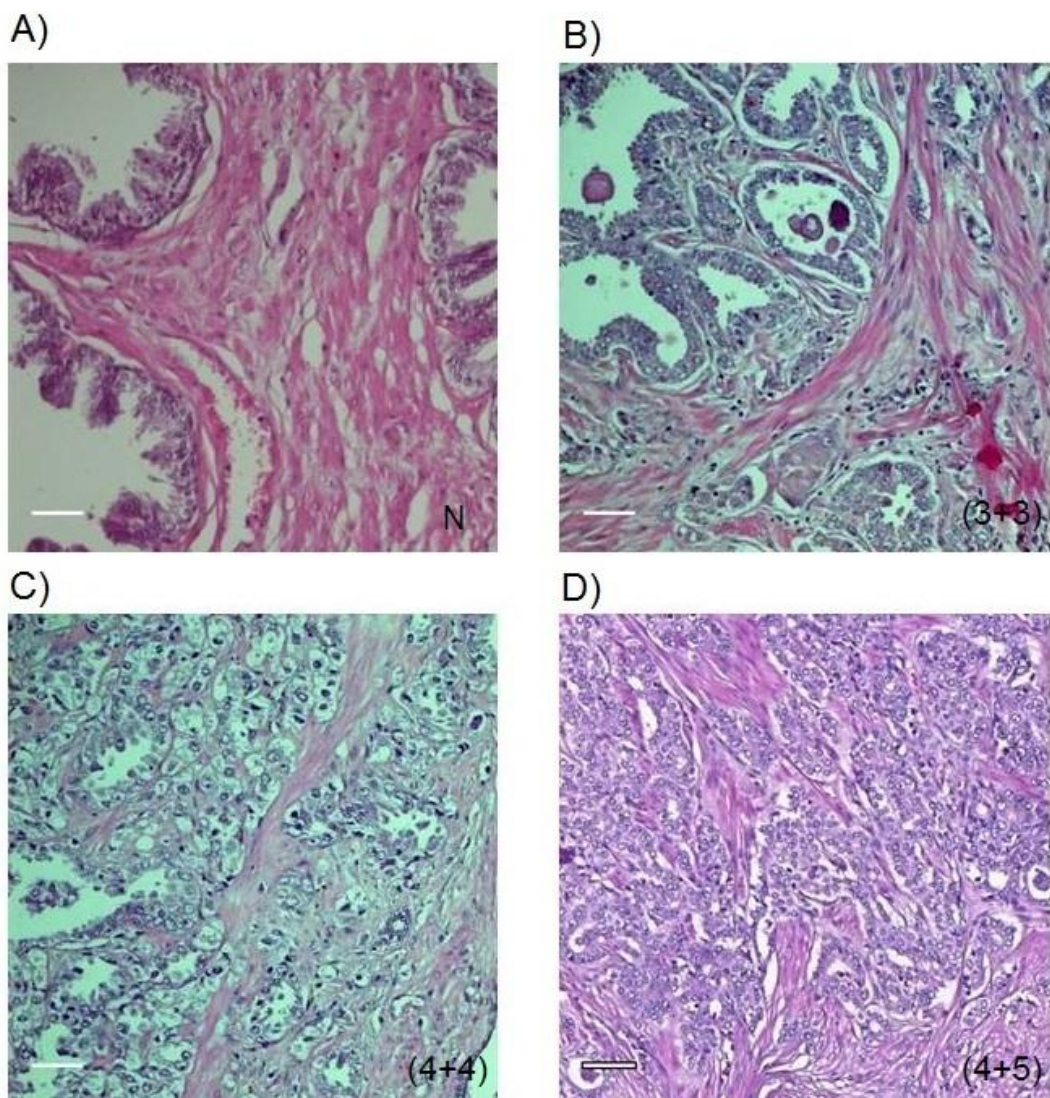


Figura 6.1: Imagens ópticas de biópsias de próstata em lâminas histológicas. A imagem (A) é um diagnóstico normal, a imagem (B) é um Gleason (3+3), a imagem (C) é um Gleason (4+4) e a imagem (D) é um Gleason (4+5). A barra de escala é de 50 µm.

6.2 Imagens de Fluorescência

Além das imagens de SHG, medimos também, para as biópsias de próstata, imagens de fluorescência por absorção de dois fótons. A fluorescência é referente, principalmente, ao marcador eosina, que marca o citoplasma das células presente no tecido. As imagens foram obtidas usando microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons, excitando a amostra com um laser pulsado de Ti-safira (800 nm). Obtemos 64 imagens de fluorescência, sendo 31 imagens normais e 33 imagens cancerígenas. Para as imagens de amostras cancerígenas podemos ter ou não mais de um padrão de Gleason presentes. A figura 6.2 mostra, como exemplo, imagens de fluorescência para diagnósticos normal na imagem A, e cancerígeno na imagem B. Esta imagem representa um Gleason G(3+3). Em vermelho estamos vendo a fluorescência de várias proteínas, que são marcadas com a eosina, ou que emitem autofluorescência. As imagens de fluorescência foram usadas nos cálculos de intensidade e anisotropia, mostrados no próximo capítulo.

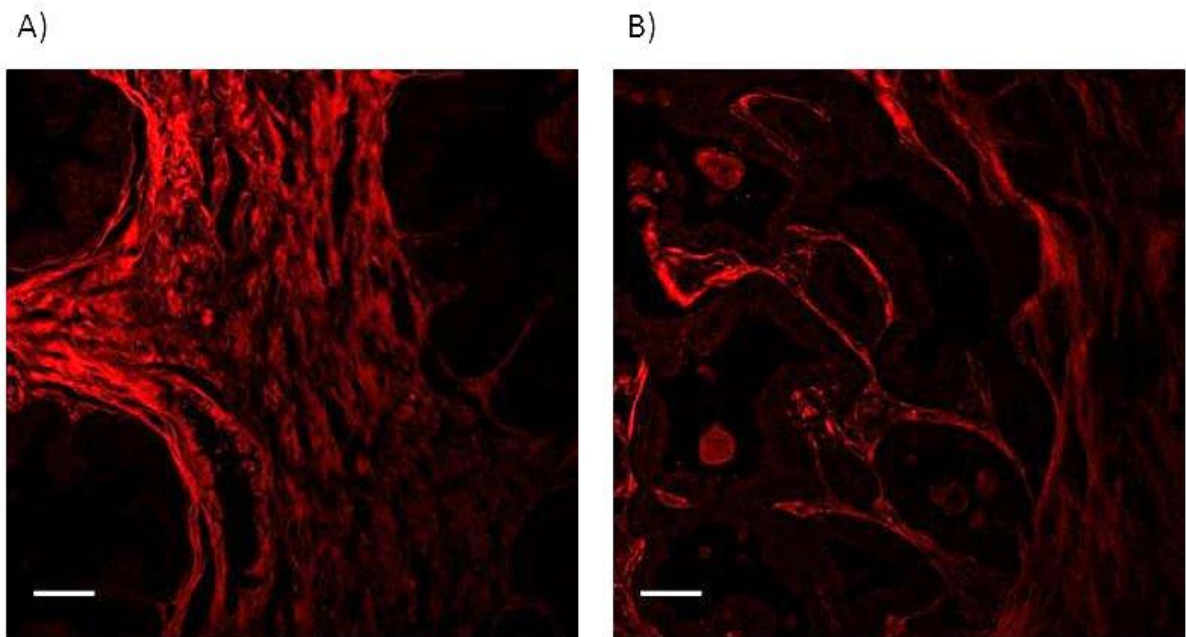


Figura 6.2: Imagens de fluorescência por absorção de dois fótons para biópsias de próstata. A figura A corresponde a um diagnóstico normal e a imagem B corresponde a um diagnóstico cancerígeno com Gleason (3+3). A barra de escala é de 50 μm .

6.3 Imagens de SHG

Diferente das imagens de fluorescência, onde o sinal é devido ao marcador eosina e a todas as proteínas autofluorescentes, o sinal de SHG é devido somente às fibras de colágeno tipo I, que são proteínas que não apresentam simetria de inversão (não centrossimétrico).

Inicialmente apresentamos uma análise da dependência da intensidade do SHG com a polarização do laser incidente. A figura 6.3 mostra duas imagens de SHG para a mesma região em um tecido normal: A primeira figura, 6.3 A, é a imagem de SHG usando o laser linearmente polarizado e a segunda figura, 6.3 B, é a imagem de SHG usando o laser circularmente polarizado. Comparando as duas imagens, mostradas na figura 6.3, vemos que independente da polarização do laser incidente, todas as fibras de colágeno (em todas as direções) estão visíveis em ambas imagens. Para uma análise quantitativa, calculamos a anisotropia e a intensidade média do sinal de SHG nas duas imagens, como mostrado na tabela 6.1. Foram calculados os valores utilizando diretamente a intensidade da imagem ou utilizando a função Threshold para normalizar a intensidade. Note que os valores de anisotropia são bem próximos nos dois casos. Também a intensidade é apenas um pouco menor para a medida com laser linearmente polarizado. Essas medidas foram repetidas para várias imagens.

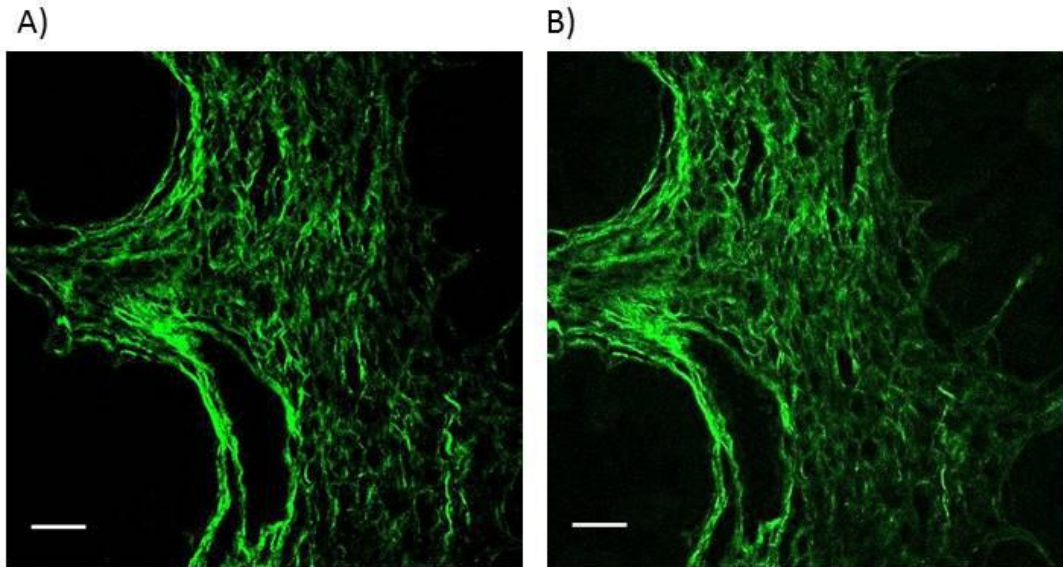


Figura 6.3: Imagens de SHG de biópsia com diagnóstico normal, usando luz linearmente polarizada (imagem A), e luz circularmente polarizada (imagem B). Em ambas as imagens estão representadas as fibras de colágeno em todas as direções. A barra de escala é de 50 μm .

Tabela 6.1: Valores da anisotropia e da intensidade média para as imagens da figura 6.3.

Laser	Anisotropia (sem Threshold)	Anisotropia (com Threshold)	Intensidade Média (sem Threshold)	Intensidade Média (com Threshold)
Linearmente Polarizado	0,16	0,17	30,92	59,52
Circularmente Polarizado	0,15	0,16	37,83	60,76

Medimos para a polarização linear a intensidade de SHG rodando a amostra (mesma amostra da figura 6.3) em relação a direção de polarização do laser e analisando a polarização do SHG perpendicular e paralela ao laser como descrito na seção 2.3. A figura 6.4 mostra essas intensidades em função do ângulo de rotação. Os gráficos de bolinhas são os valores medidos e os gráficos de linhas são os valores calculados utilizando as equações 2.3, 2.5 e 2.6. Para os cálculos utilizamos um ângulo inicial da fibra em relação ao laser de aproximadamente 10 graus para o paralelo e 50 graus para o perpendicular. Foi também somado um valor de intensidade constante (6000 para o paralelo) e (1800 para o perpendicular).

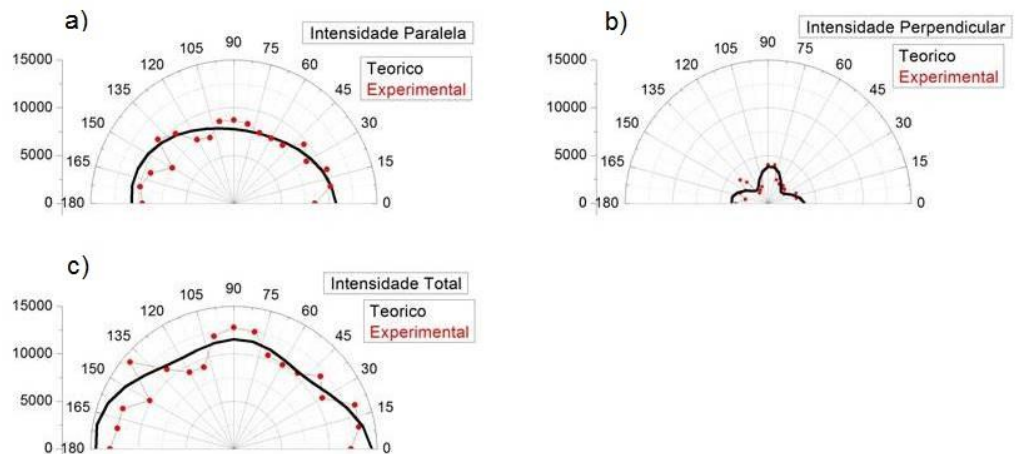


Figura 6.4: Intensidade SHG em função do ângulo entre a polarização do laser e as fibras de colágeno na imagem da amostra normal (figura 6.3A). Os gráficos de bolinhas são os valores medidos e os gráficos de linhas são os valores calculados utilizando as equações 2.3, 2.5 e 2.6. A figura 6.4(a) mostra os gráficos da intensidade paralela, a figura 6.4(b) os gráficos da intensidade perpendicular e a figura 6.4(c) os gráficos da intensidade total.

Note que os tecidos de próstata são altamente espalhadores, levando à despolarização tanto do sinal SHG quanto do laser à medida que propagam no tecido. Além disso os elementos ópticos do microscópio introduzem birrefringência e um feixe linearmente polarizado, por si só, já sai elipticamente polarizado no plano focal. Esses fatores influenciam na intensidade do sinal medido que apresenta apenas uma pequena dependência com a polarização incidente.

As equações apresentadas na seção 2.3 consideram uma situação bem simplificada de fibra no plano x-y. O empilhamento de fibras e a formação de conjuntos de fibras precisam ser considerados para um cálculo completo. Mas estes estudos não serão parte deste projeto. Porém, estes resultados mostram que utilizando luz linearmente polarizada podemos observar SHG para as fibras em todas as direções, porém com intensidades levemente diferentes para fibras alinhadas paralelas e perpendiculares à polarização do laser. Mas que não alteram os valores de anisotropia calculados. Assim utilizamos para as análises seguintes as imagens obtidas com o laser linearmente polarizado.

Para todas as imagens SHG coletamos imagens em três profundidades diferentes, com separação de $1 \mu\text{m}$, e em seguida fizemos uma intensidade média,

usando o programa ImageJ, entre as três imagens. Esse procedimento é importante, pois diminui o ruído nas imagens e garante que podemos compensar pequenas diferenças na focalização da amostra.

A figura 6.5 mostra algumas imagens de SHG de biópsia de próstata com os vários diagnósticos: normal (figura 6.5-A), Gleason (3+3) (figura 6.5-B), Gleason (4+4) (figura 6.5-C) e Gleason (4+5) (figura 6.5-D). No total obtivemos 33 imagens de amostras normais e 43 imagens de amostras cancerígenas. As regiões circulares nas imagens são as regiões de ácinos. Estas regiões são contornadas, principalmente, por fibras de colágeno. As outras regiões da amostra são regiões de estroma, formado por tecido muscular liso e tecido conjuntivo (fibras elásticas e colágeno). As imagens de SHG indicam que as fibras de colágeno ficam mais alinhadas quanto maior o padrão de Gleason. Por exemplo, a imagem de SHG para o tecido normal, figura 6.5(A), mostra que o colágeno está distribuído mais aleatoriamente quando comparada com a imagem de Gleason (4+5), figura 6.5(D).

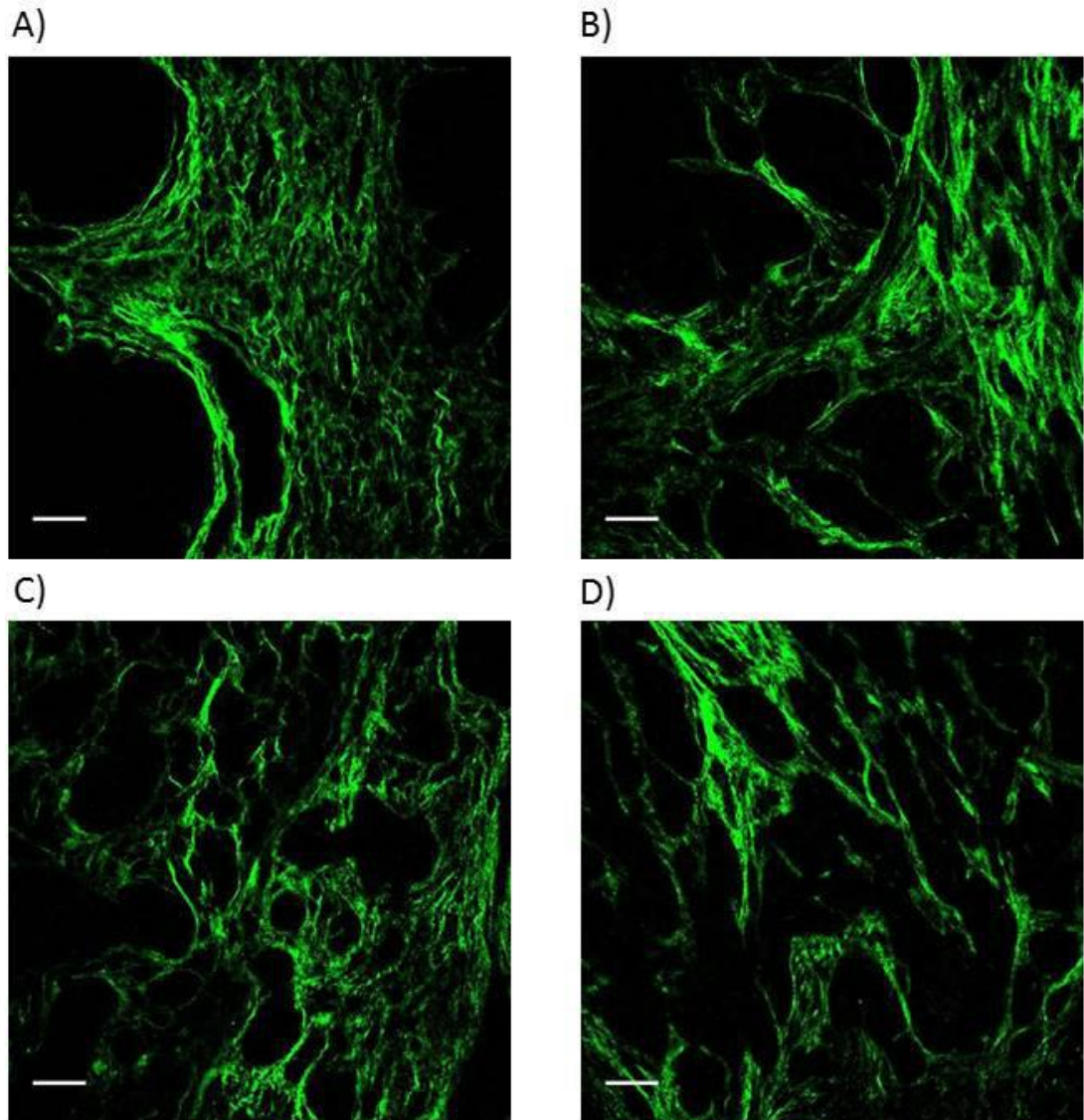


Figura 6.5: Imagens de SHG para biópsia com diagnóstico normal (imagem A), Gleason 3+3 (imagem B), Gleason 4+4 (imagem C) e Gleason 4+5 (imagem D). O mapa de intensidade em verde representa o sinal de segundo harmônico das fibras de colágeno tipo I. Estas imagens foram obtidas incidindo um laser linearmente polarizado na amostra. A barra de escala é de 50 μm .

Fizemos também uma superposição entre as imagens de SHG e fluorescência. Para essa superposição, as imagens de fluorescência por absorção de um fóton, que foram obtidas exatamente na mesma posição das imagens de SHG foram utilizadas. As imagens de fluorescência por absorção de dois fótons foram obtidas posteriormente e elas não estão exatamente na mesma posição das imagens de SHG. Há uma leve mudança de posição entre elas, mas que interfere na

superposição. As imagens de fluorescência com excitação por um fóton foram obtidas excitando a amostra com um laser de argônio, 488 nm.

As figuras 6.6, 6.7, 6.8 e 6.9 mostram, como exemplo, imagens para amostras de biópsias com os vários diagnósticos: normal, Gleason (3+3), Gleason (4+4) e Gleason (4+5), respectivamente. Sendo (a) imagem óptica, (b) imagem de fluorescência, (c) imagem de SHG usando luz linearmente polarizada e (d) superposição de fluorescência e SHG. Nas imagens de superposição, em amarelo vemos o colágeno, que emite fluorescência e gera segundo harmônico, e em vermelho vemos a fluorescência devido ao marcador eosina e as outras proteínas que emitem somente fluorescência.

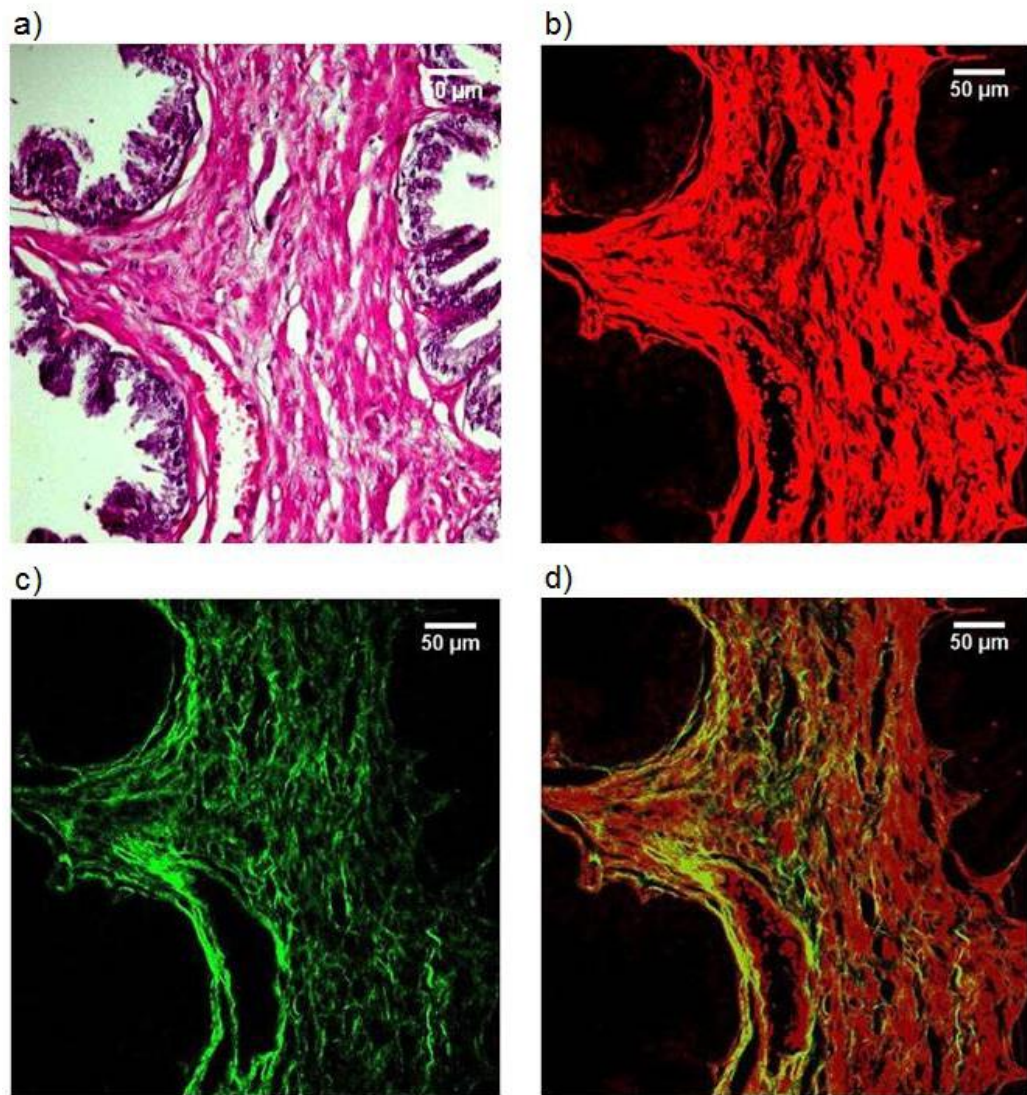


Figura 6.6: Amostra com diagnóstico normal, (a) imagem óptica, (b) imagem de fluorescência, (c) imagem de SHG e (d) superposição de fluorescência e SHG

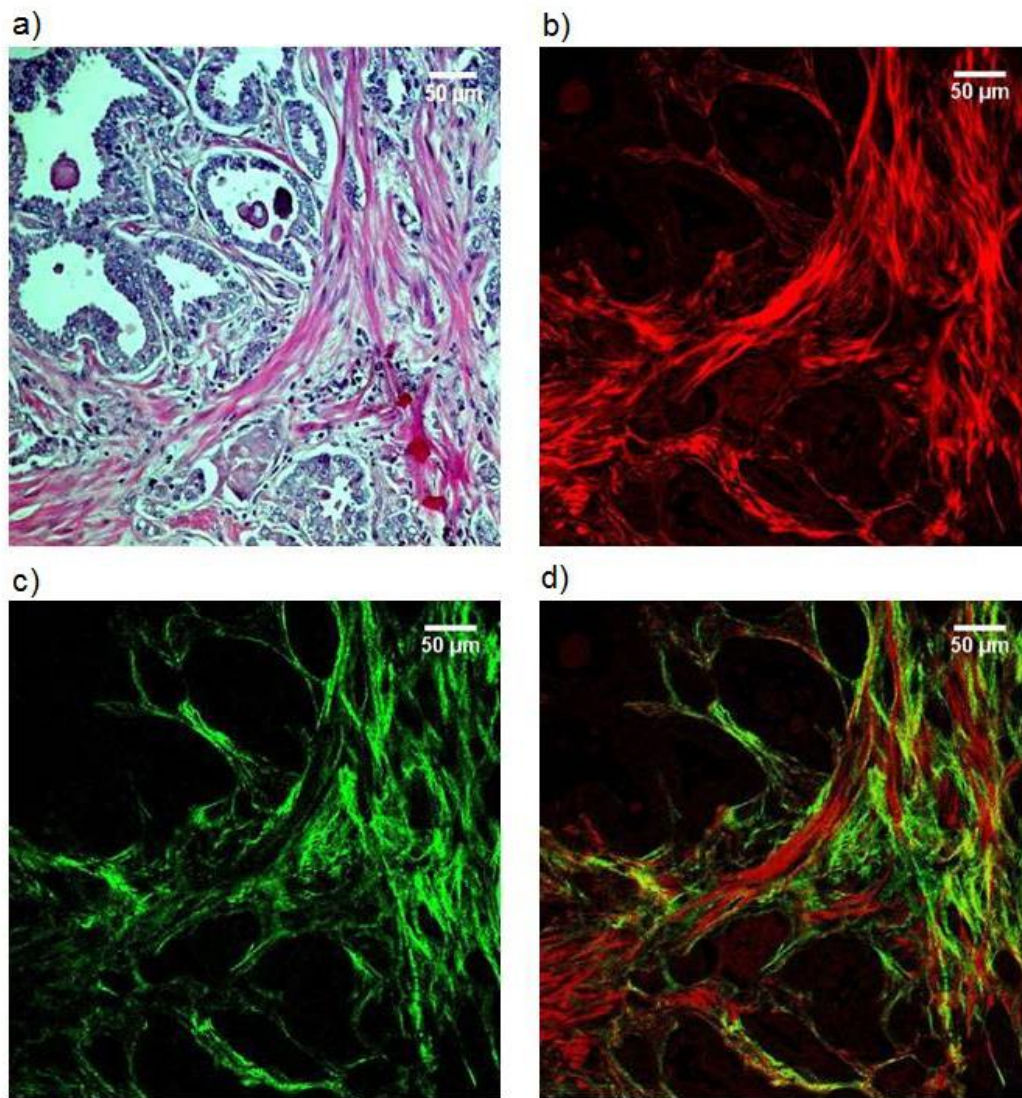


Figura 6.7: Amostra com diagnóstico Gleason (3+3), (a) imagem óptica, (b) imagem de fluorescência, (c) imagem de SHG e (d) superposição de fluorescência e SHG.

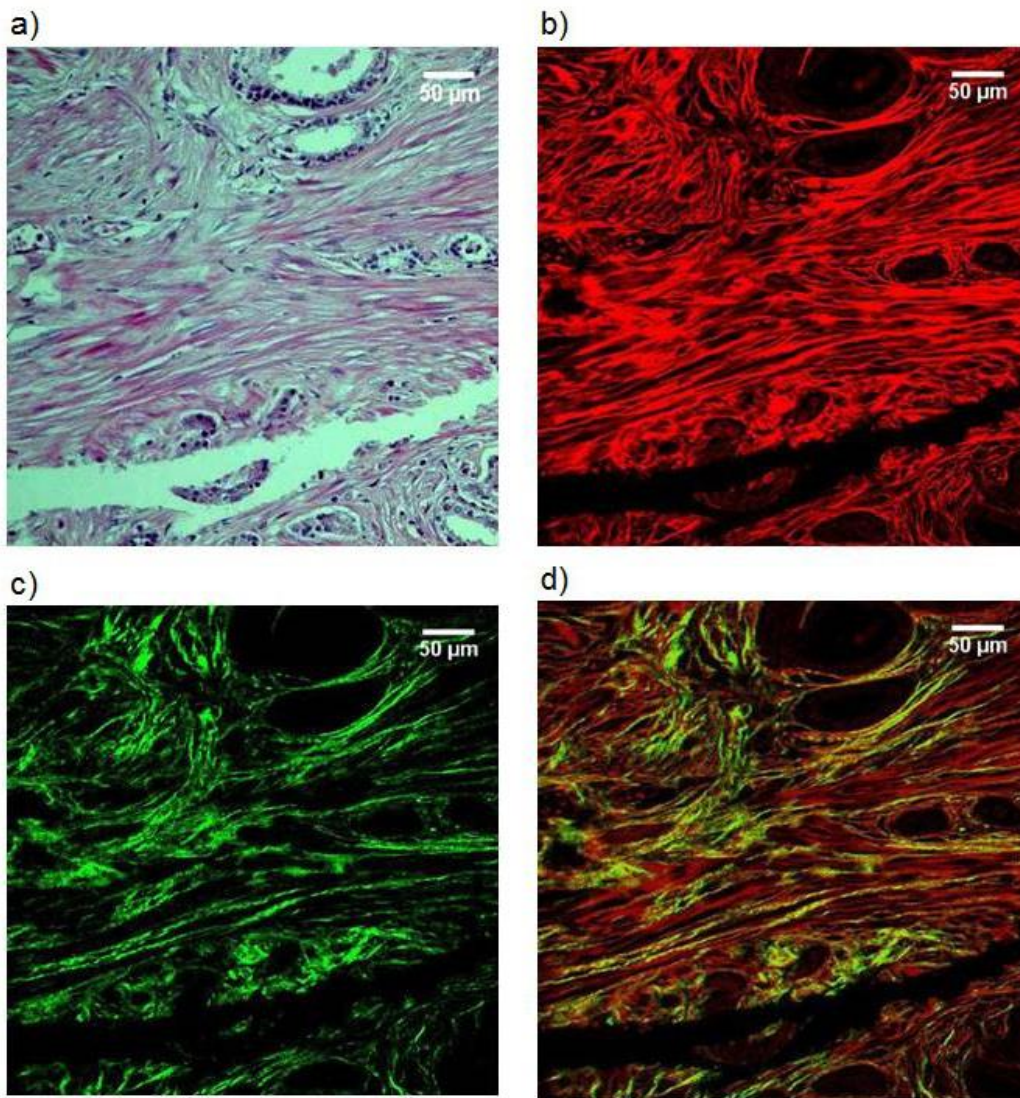


Figura 6.8: Amostra com diagnóstico Gleason (4+4), (a) imagem óptica, (b) imagem de fluorescência, (c) imagem de SHG e (d) superposição de fluorescência e SHG.

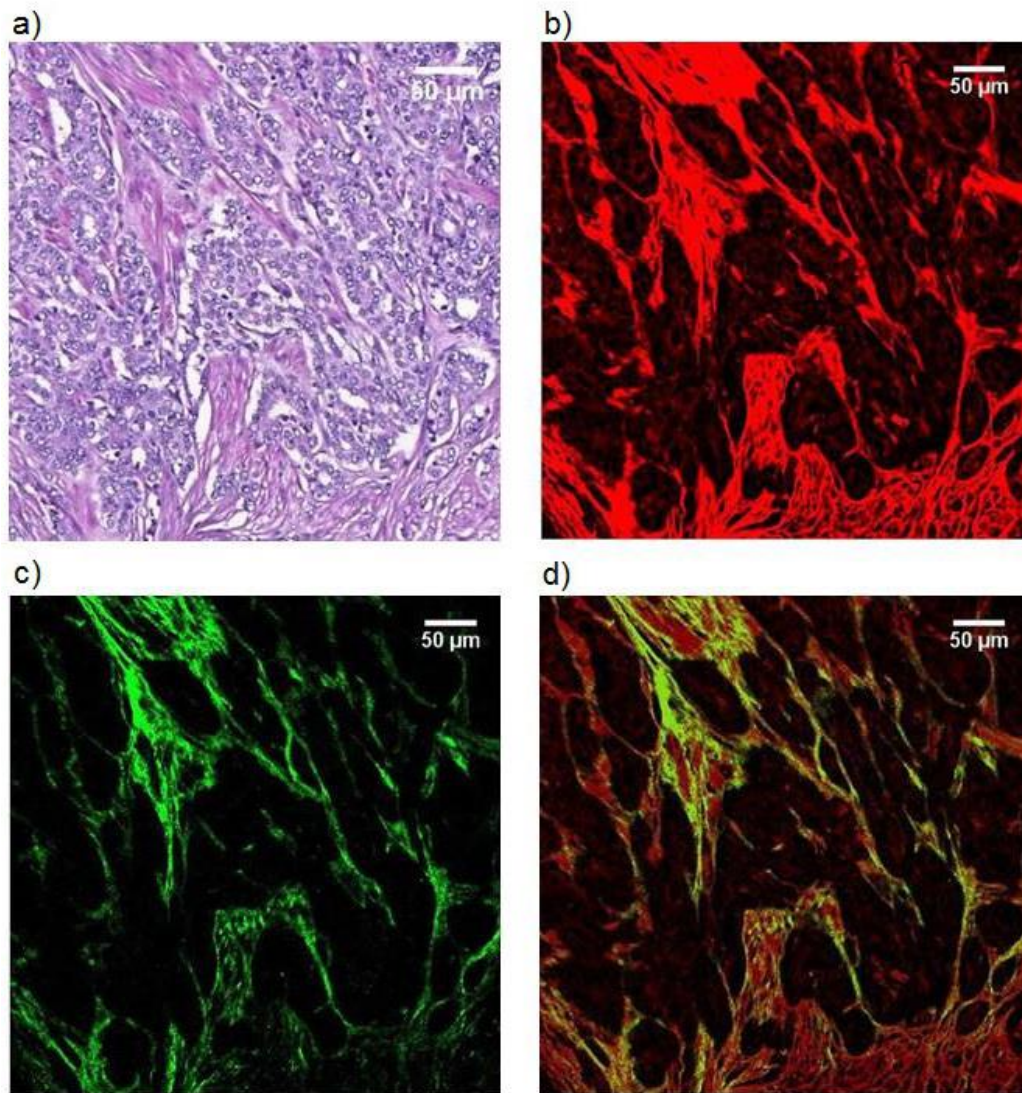


Figura 6.9: Amostra com diagnóstico Gleason (4+5), (a) imagem óptica, (b) imagem de fluorescência, (c) imagem de SHG e (d) superposição de fluorescência e SHG.

Capítulo 7

Análises e Discussões

Neste capítulo mostraremos as análises de anisotropia e de intensidade das imagens de SHG e de fluorescência. Por exemplo, através da análise de anisotropia das imagens de SHG, podemos obter uma correlação com o diagnóstico de câncer de próstata. Analisando a intensidade das imagens de SHG, obtemos informações quanto à quantidade de colágeno nas amostras cancerígenas e normais.

7.1 Anisotropia das Imagens de SHG

Para estudar o grau de organização (anisotropia) das fibras de colágeno nas biópsias de próstata, a partir de imagens de microscopia por geração de segundo harmônico, utilizamos o fibriltool [48], um plugin do programa ImageJ [52]. Usando este plugin podemos obter também a orientação média (ângulo médio) das estruturas fibrilares. Com relação ao grau de anisotropia é usado a seguinte convenção: o número 0 para nenhuma ordem das fibras de colágeno (matrizes puramente isotrópicas) e o número 1 para as fibras de colágeno perfeitamente ordenadas (matrizes puramente anisotrópicas). O conceito de tensor nemático, discutido no capítulo 3, foi usado para calcular o gradiente local das intensidades do sinal de segundo harmônico nas imagens, ou seja, para calcular a anisotropia.

A seguir os passos que efetuamos para a obtenção da anisotropia média dos tecidos de próstata, usando as imagens de SHG coletadas previamente: abrimos a imagem de SHG, usando o software ImageJ; Fizemos um Threshold da imagem. O Threshold é usado para limitar um objeto de interesse em uma imagem, eliminando os efeitos de background. Portanto todos os pixels na imagem que estão abaixo deste limite são convertidos em preto e todos os pixels com valores acima deste limite são convertidos em branco ou vice-versa; Inicialmente nós calculamos a anisotropia do colágeno usando a área inteira das imagens de SHG. Estas primeiras

análises foram feitas usando as imagens de SHG, obtidas com o laser linearmente polarizado. A figura 7.1 mostra a análise estatística do cálculo da anisotropia para as biópsias normal e cancerígena, usando o programa R [53]. Este gráfico está representado no formato boxplot. A representação através do Boxplot permite a análise visual da posição, dispersão e assimetria do conjunto de dados. O local onde a linha tracejada (vertical) começa (de baixo para cima) indica o mínimo e onde a linha tracejada termina indica o máximo. A linha horizontal dentro do retângulo indica a mediana. A mediana é a medida de tendência central mais indicada quando os dados possuem distribuição assimétrica, mais indicada até do que a média aritmética, que nesse caso seria influenciada pelos valores extremos. Um tipo de análise de variância (ANOVA) [54] foi usado para comparar os valores. A ANOVA é um procedimento usado para comparar a distribuição de grupos em amostras independentes. Na grande maioria das áreas, admite-se um valor crítico de p menor ou igual a 0,05, ou seja, assume-se como margem de segurança 5% de chance de erro, ou olhando por outro ângulo, 95% de chances de estar certo. De um ponto de vista mais prático, podemos afirmar que o valor de p representa a chance ou a probabilidade da diferença observada entre os tratamentos/categorias ser devido ao acaso, e não aos fatores que estão sendo estudados. Nesta análise, figura 7.1, nós obtemos um valor de $p = 0.0008$, que é um ótimo resultado.

Posteriormente, selecionamos uma área na imagem, onde existisse um único padrão de Gleason (normal, G3, G4, ou G5) e calculamos a anisotropia. Essas áreas foram selecionadas com a ajuda de um patologista. A área analisada é a mesma para todas as imagens. Estas regiões selecionadas são importantes na obtenção da anisotropia para cada padrão separado. Para o cálculo da anisotropia escolhemos regiões de ácinos, onde na presença de um câncer ocorrem reações estromais, modificando a estrutura do colágeno. Para a comparação direta com o padrão de Gleason específico, nós obtemos imagens de 59 biópsias, compostas de 25 imagens para tecido normal, 13 para G3, 18 para G4 e 3 para G5.

Exemplos de regiões usadas na análise de anisotropia estão indicados na figura 7.2. Em verde temos o sinal de SHG das fibras de colágeno tipo I. As regiões foram marcadas através de um retângulo amarelo. Cada região consta somente um único padrão de Gleason. A direção da linha vermelha mostra a orientação média das fibras de colágeno e o comprimento desta é proporcional ao

valor da anisotropia. Os resultados da anisotropia mostram que as fibras de colágeno ficam mais bem alinhadas para maiores padrões de malignidade neoplásica.

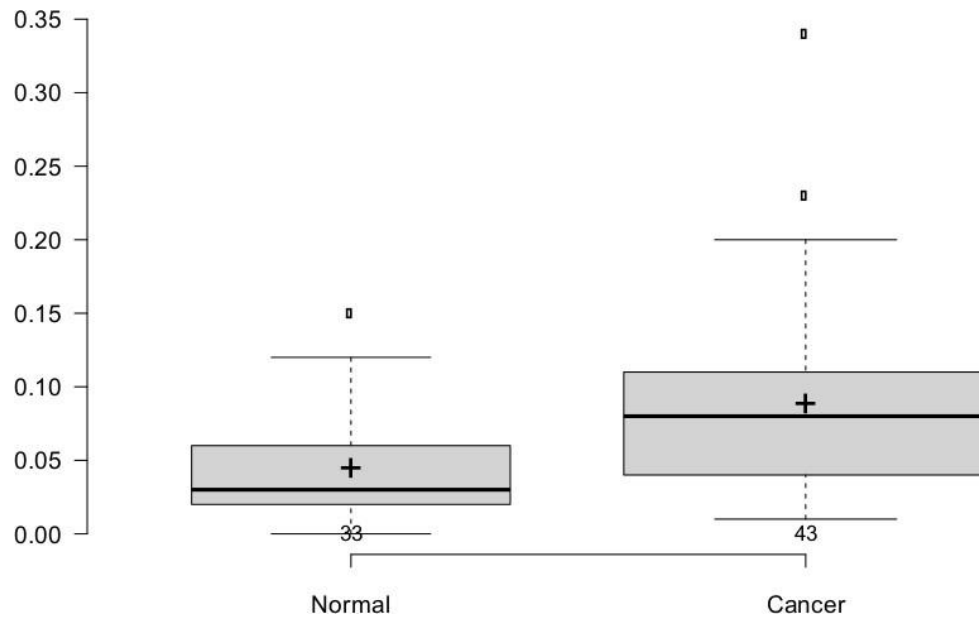


Figura 7.1. Boxplot: resultados dos cálculo da anisotropia, das imagens de SHG obtidas com o laser linearmente polarizado, para as biópsias normal (N), n=33, e cancerígeno (C), n=43. O eixo y representa os valores da anisotropia. As linhas centrais mostram as medianas; os limites da caixa indicam os percentuais de 25 e 75%, determinados pelo programa R; As cruces representam os valores médios. Os pontos acima do limite superior são valores atípicos, discrepantes, extremos ou outliers. Valor de $p = 0.0008$.

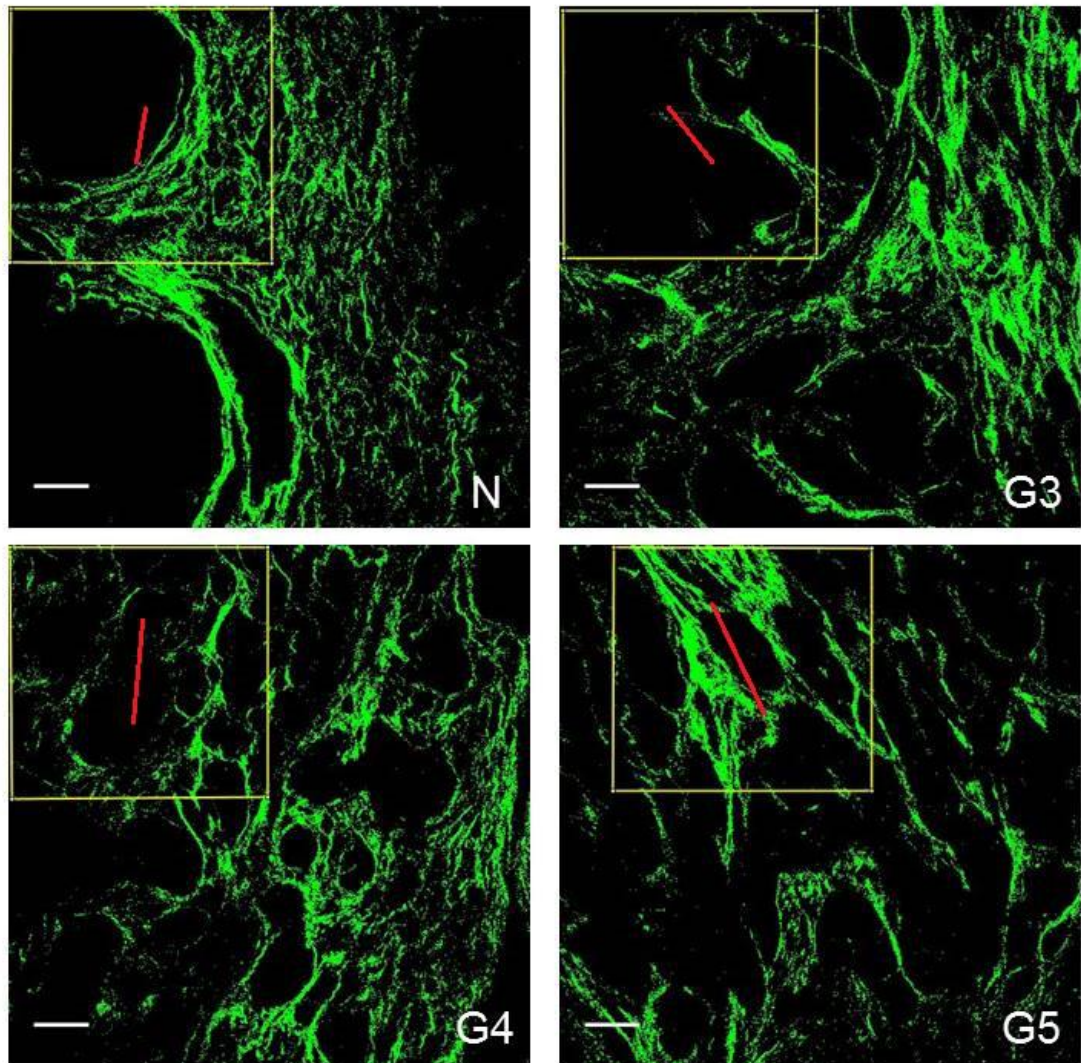


Figura 7.2: Imagens de SHG, usando luz linearmente polarizada, das amostras de próstata, mostrando regiões com um único padrão de Gleason: normal (N), Gleason 3 (G3), Gleason 4 (G4) e Gleason 5 (G5). As intensidades foram equalizadas usando a ferramenta threshold do programa ImageJ. A área usada para a análise da anisotropia está marcada por um retângulo amarelo e a linha vermelha dentro do retângulo indica o ângulo médio das fibras. O comprimento da linha é proporcional ao valor da anisotropia. A barra de escala é de 50 μm .

A figura 7.3 mostra a análise estatística do cálculo da anisotropia para essas 59 imagens SHG, representada através de um gráfico boxplot. Uma clara tendência pode ser observada: o valor médio da anisotropia (cruz) aumenta com o aumento do padrão de Gleason. O valor-p obtido ($p=0.0004$) mostra as diferenças estatisticamente significantes entre os valores dos grupos. É interessante notar que não há diferença entre as amostras normal e Gleason 3, ($p=0.4$). Esse é um

resultado importante, pois segundo os padrões histológicos de Gleason, há manutenção da morfologia glandular fundamental nos padrões de 1 a 3 [40], assim a anisotropia igual está confirmando esta manutenção. O valor-p entre Gleason 3 e Gleason 4 é $p=0.04$, mostrando a significância estatística entre eles. Isso ocorre, pois no padrão 4 há perda parcial da morfologia glandular. E o valor-p entre Gleason 4 e Gleason 5 é $p=0.1$, que pode ser devido ao pequeno número de amostras analisadas para o padrão 5 (somente três). Este é o único padrão com um número pequeno de biópsias neste trabalho. Neste gráfico, observando o segundo e o terceiro quartil do boxplot (ou seja onde se encontra 50% dos dados), vemos que quanto maior o padrão de Gleason maior é o valor da anisotropia.

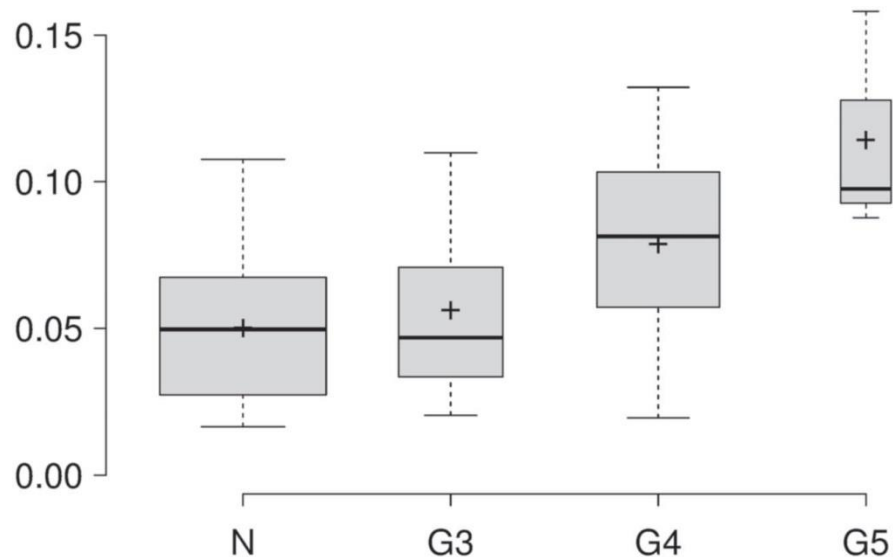


Figura 7.3: Valores de anisotropia em área específica da imagem de SHG obtida com o laser linearmente polarizado, com um único padrão de Gleason. Detalhes do Boxplot: o eixo y representa os valores da anisotropia; as linhas centrais mostram as medianas; os limites da caixa mostram os 25 e 75% determinados pelo programa R; as cruces representam os valores médios e as larguras das caixas são proporcionais à raiz quadrada da quantidade de amostras: $n = 33, 13, 18$ e 3 amostras para N, G3, G4 e G5, respectivamente.

Posteriormente, fizemos uma análise estatística do cálculo da anisotropia para as imagens de SHG, obtidas usando microscopia por geração de segundo harmônico, onde o laser incidente estava com a polarização circular. No total analisamos 66 imagens, sendo 32 imagens com diagnóstico normal e 34 imagens

com diagnóstico de câncer. A análise foi feita na área inteira da imagem. Cada imagem podia ter mais de um padrão de Gleason. Antes do cálculo da anisotropia, tiramos o Threshold das imagens, assim como foi feito nas imagens de SHG, onde o laser incidente estava linearmente polarizado.

A figura 7.4 mostra o cálculo estatístico da análise de anisotropia. O valor de p é igual a 0.0169, mostrando as diferenças estatisticamente significantes entre os valores dos grupos. O gráfico mostra que os valores da anisotropia do colágeno são maiores para tecidos cancerígenos, quando comparados aos tecidos normais, ou seja, as fibras de colágeno tendem a ficar mais bem organizadas nos tecidos cancerígenos. É importante salientar que o mesmo resultado foi obtido para a análise das imagens de SHG obtidas usando laser linearmente polarizado, figura 7.1.

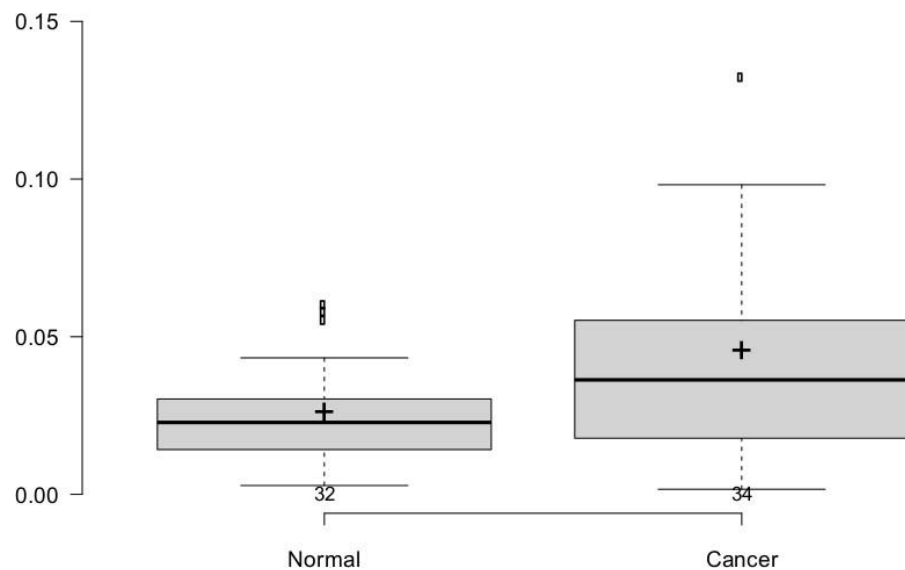


Figura 7.4. Boxplot: Valores de anisotropia das imagens de SHG obtidas com o laser circularmente polarizado, para as biópsias normal (N), n=32, e cancerígeno (C), n=34. O eixo y representa os valores da anisotropia. As linhas centrais mostram as medianas; os limites da caixa indicam os percentuais de 25 e 75%, determinados pelo programa R; As cruces representam os valores médios. Os pontos acima do limite superior são valores atípicos, discrepantes, extremos ou outliers. Valor de $p = 0.0169$.

7.2 Anisotropia das Imagens para Amostras Frescas

Uma vantagem das medidas de SHG é que elas podem ser obtidas sem a necessidade do processamento do tecido. Isto oferece um jeito mais rápido na obtenção da análise de biópsias recém-coletadas, levando a um diagnóstico mais rápido. Para demonstrar esta possibilidade, nós obtemos imagens de SHG para algumas biópsias frescas, sem nenhuma preparação extra, e calculamos as suas respectivas anisotropias. Os tecidos foram mantidos em solução de formalina antes de serem levados ao microscópio. As imagens foram feitas com o tecido em solução salina, usando uma lente objetiva de 20x com imersão em água. Incidimos na amostra um laser pulsado de 800 nm. O sinal de segundo harmônico gerado é em 400 nm.

A figura 7.5 mostra imagens para duas biópsias. Os valores médios das anisotropias calculadas são 0.05 para a amostra (a) e 0.15 para a amostra (b). Estes números indicam biópsias normais e cancerígenas, respectivamente. Estas biópsias foram obtidas de posições da próstata bem próximas de outras duas regiões que foram processadas com a marcação H&E e diagnosticadas como normal e padrão de Gleason 4, respectivamente.

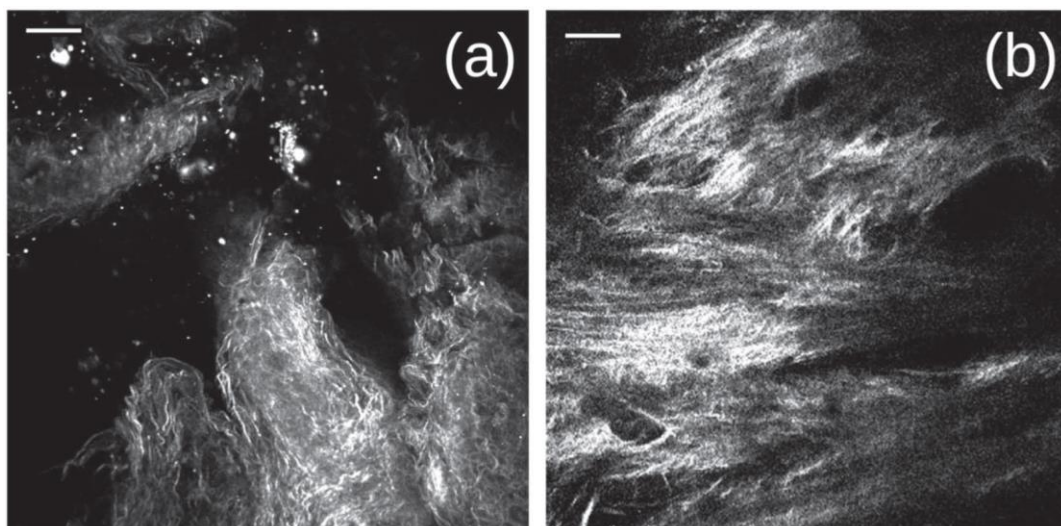


Figura 7.5. Imagens de SHG de biópsias frescas de próstata. Os valores calculados da anisotropia indicam: (a) tecido normal e (b) tecido cancerígeno. A barra de escala é de $50\mu m$.

7.3 Curva de Distribuição Gaussiana das Orientações das Fibras de Colágeno

Usando o “plugin” OrientationJ [55]–[58] do programa ImageJ, nós obtemos uma representação visual da orientação das fibras de colágeno e um histograma de distribuição das mesmas nas imagens de segundo harmônico para as biópsias de próstata. Através da análise visual podemos deduzir qual a orientação média do colágeno (ângulo médio) e através da sua distribuição (histograma), obtermos o seu grau de organização na região analisada. Sabemos que quanto mais estreito o histograma, maior a organização das fibras de colágeno na região analisada, logo maior a tendência de ser um câncer. O cálculo, usando o OrientationJ, usa a mesma ideia do tensor estrutural, utilizado no cálculo da anisotropia, através do plugin FibrilTool. Especificamos o tamanho da janela (região analisada) e o programa computa o tensor estrutural para cada pixel na imagem. As propriedades da orientação local das fibras são então visualizadas através de um mapa de cores, onde para cada orientação temos um padrão de cor diferente. A orientação é avaliada para cada pixel na imagem, baseado no tensor estrutural. Um histograma, com sua tabela de valores, são construídos e apresentados na tela.

As figuras 7.6, 7.7, 7.8 e 7.9 mostram as imagens dos mapas de cores e os seus respectivos histogramas para quatro imagens de segundo harmônico: normal (figura 7.6) e câncer (figuras 7.7, 7.8 e 7.9). As imagens (A), em cada figura, são as imagens de segundo harmônico, as imagens (B) são os mapas de cores da orientação do colágeno e as imagens (C) são os histogramas mostrando as distribuições do colágeno. Essa análise foi feita para 59 imagens de SHG, sendo 25 imagens de biópsias normais e 34 imagens de biópsias cancerígenas. Para obtermos a largura da distribuição do colágeno, plotamos uma curva gaussiana para cada um dos histogramas, usando o programa Origin [59], e obtemos a largura à meia altura da Gaussiana (w). Essas curvas Gaussianas estão representadas nas imagens (C) de cada figura. A seguir os valores de w : figura 7.6 ($w = 57,6 \pm 1,2$), figura 7.7 ($w = 43,0 \pm 1,1$), figura 7.8 ($w = 47,7 \pm 1,2$) e figura 7.9 ($w = 45,2 \pm 1,4$). Podemos ver, pelo valor de w , que a figura 7.6 corresponde a um diagnóstico normal, pois a largura à meia altura da sua distribuição é maior do que os valores de

w para os outros tecidos. As outras figuras correspondem a imagens de biópsias de tecidos cancerosos, em que estão mesclados vários tipos de Gleason.

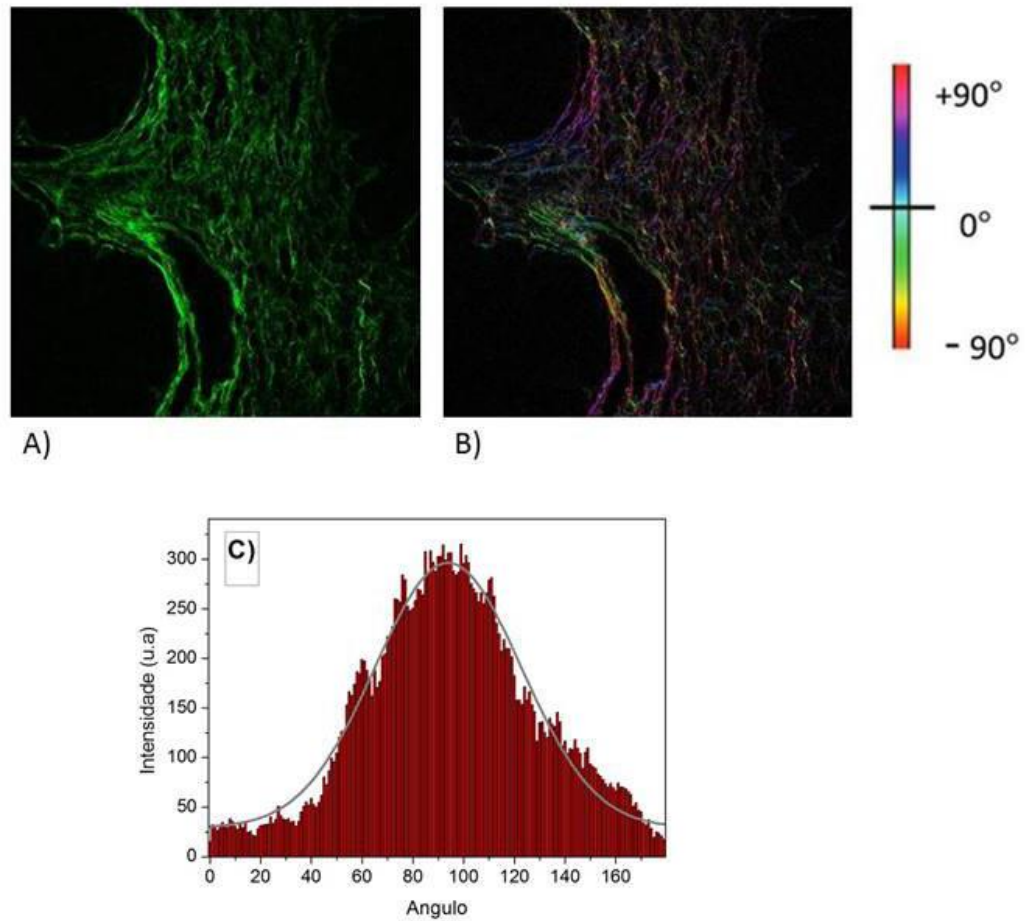
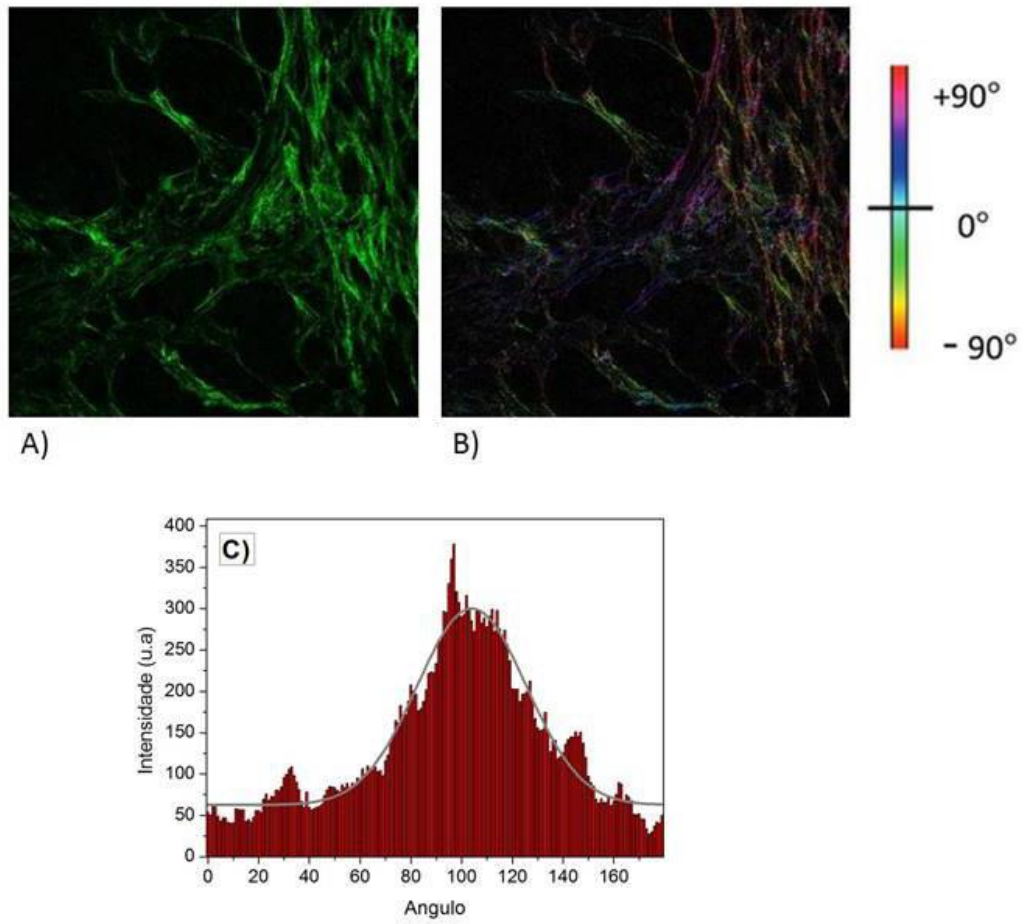
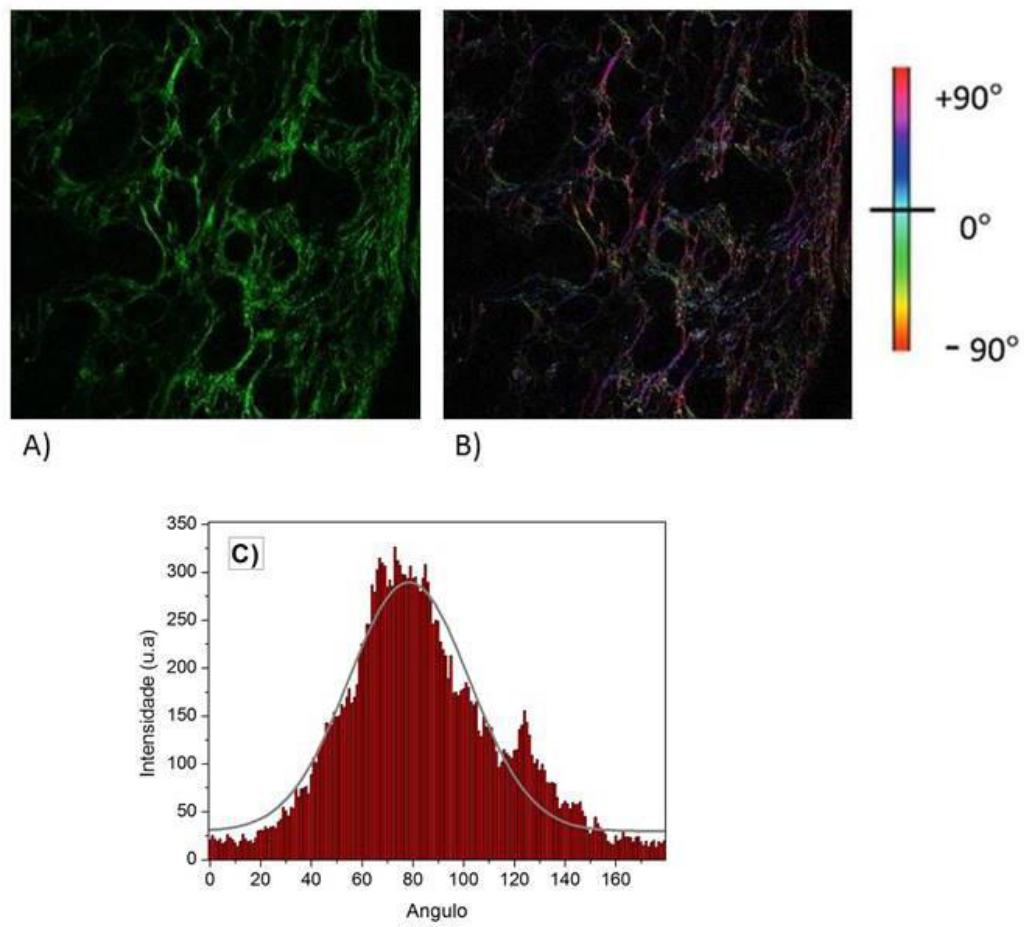


Figura 7.6: Imagem de SHG (A), mapa de cores (B) e histograma de ângulos (C) para biópsia normal.



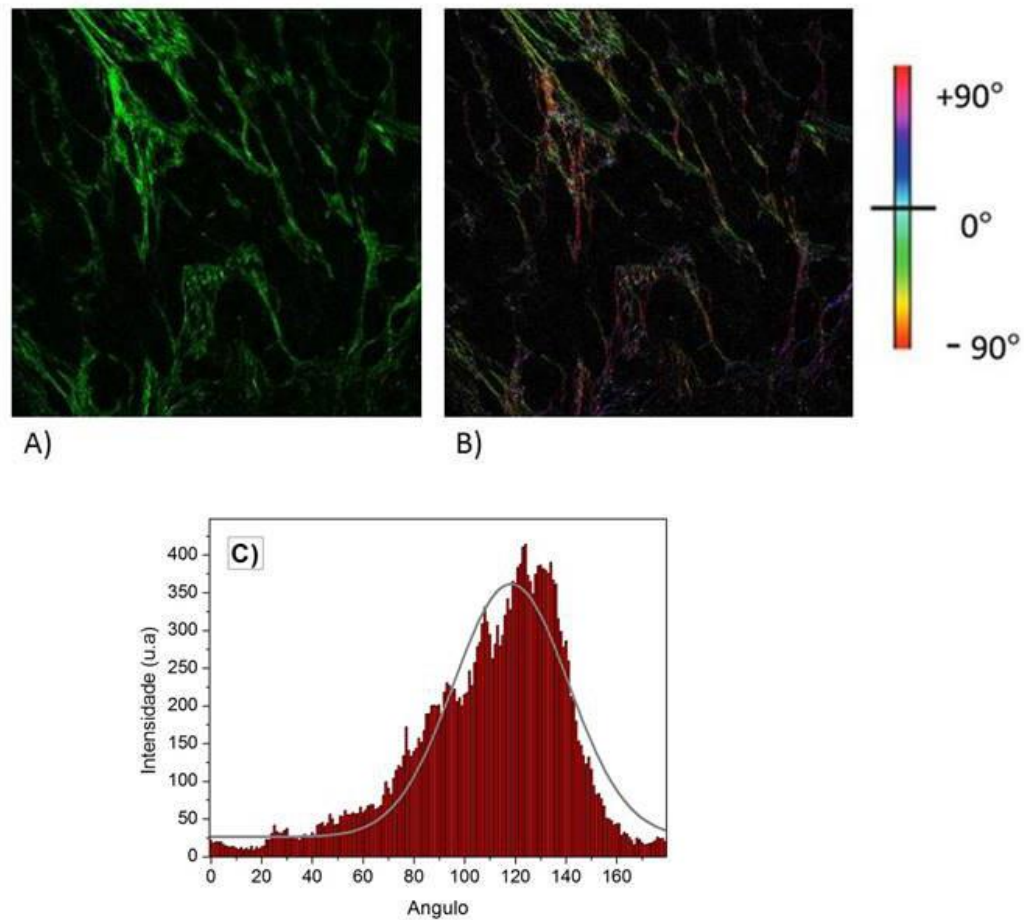
28

Figura 7.7: Imagem de SHG (A), mapa de cores (B) e histograma de ângulos (C) para biópsia de câncer.



28

Figura 7.8: Imagem de SHG (A), mapa de cores (B) e histograma de ângulos (C) para biópsia de câncer.



28

Figura 7.9: Imagem de SHG (A), mapa de cores (B) e histograma de ângulos (C) para biópsia de câncer.

7.4 Anisotropia das Imagens de Fluorescência

Fizemos também a análise estatística do cálculo da anisotropia para as imagens de fluorescência, obtidas usando microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons. Esta análise é importante para observarmos, se além do colágeno, outras proteínas presentes no tecido estão se organizando próximo das regiões de ácinos, nas biópsias tumorais de próstata. No total foram analisadas 64 imagens de fluorescência, sendo 31 imagens normais e 33 imagens de tecidos cancerosos. Nas imagens de tecidos cancerosos mais de um padrão de Gleason estava presente. A análise foi feita na área inteira da imagem. O cálculo da

anisotropia foi feito utilizando a ferramenta fibrilttools do programa ImageJ. Antes do cálculo da anisotropia, fizemos o threshold das imagens.

A figura 7.10, mostra a análise estatística da anisotropia. O valor-p entre os grupos, normal e câncer, é $p = 0,0031$, mostrando que há uma separação significativa entre eles. O gráfico da figura 7.10 está mostrando uma anisotropia média maior para as imagens de fluorescência das amostras cancerígenas, comparada com a anisotropia das imagens das amostras normais, ou seja, uma maior organização das proteínas presentes no tecido. A fluorescência nas imagens analisadas é devida ao marcador biológico eosina. Como uma grande proporção de fibras marcadas são as fibras de colágeno, elas podem estar dominando a anisotropia.

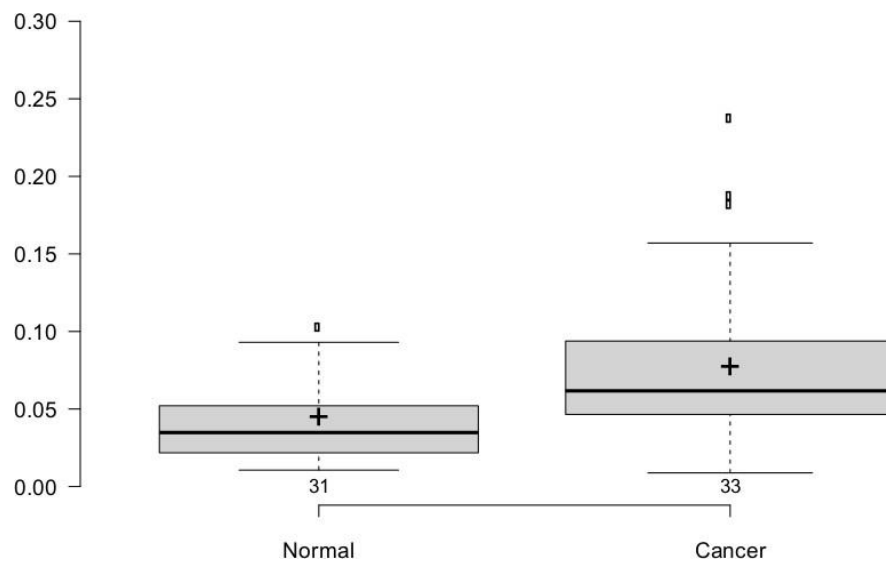


Figura 7.10. Boxplot das imagens de fluorescência: cálculo da anisotropia para as biópsias normais (N), $n=31$, e cancerígenas (C), $n=33$. O eixo y representa os valores da anisotropia. As linhas centrais mostram as medianas; os limites da caixa indicam os percentuais de 25 e 75%, determinados pelo programa R; As cruces representam os valores médios. Os pontos acima do limite superior são valores atípicos, discrepantes, extremos ou outliers. Valor de $p = 0,0031$.

7.5 Intensidade das imagens de SHG

Analisamos a intensidade do sinal emitido pelo colágeno nas imagens de SHG para as biópsias normais e cancerosas de próstata. Sabemos que, durante o desenvolvimento do câncer de próstata ocorre uma diminuição das fibras de

colágeno no tecido [60]. Foram utilizadas 68 imagens de SHG, sendo 25 de biópsias normais e 43 de biópsias de câncer. A análise foi feita utilizando a ferramenta “Analyze – Measure – Mean Gray Value” do programa ImageJ. Esta ferramenta calcula o valor médio da intensidade na imagem. Ele soma os valores de intensidade de todos os pixels dentro da região selecionada e divide pelo número de pixels. Diferente da análise de anisotropia, para o cálculo da intensidade do segundo harmônico das fibras de colágeno, não fizemos o “Threshold” das imagens, pois gostaríamos de manter a intensidade original de segundo harmônico. Fomos cautelosos para que as imagens não estivessem saturadas.

A figura 7.11 mostra a análise estatística da intensidade de SHG. Podemos ver que há uma redução da intensidade média de segundo harmônico das fibras de colágeno para as imagens de tecidos com câncer, quando comparado com as imagens de tecidos normais. Essa redução está relacionada a uma diminuição das fibras de colágeno nos tecidos cancerosos. Esse resultado mostra que a redução na intensidade do segundo harmônico das fibras de colágeno pode ser um indicativo de que o tecido de próstata é canceroso. Para esta análise obtemos um valor de $p=0,21$. Apesar deste valor estar acima de 5%, ele mostra uma melhor separação entre normal e câncer quando comparado ao valor de p da intensidade das imagens de fluorescência, como veremos na seção 7.6.

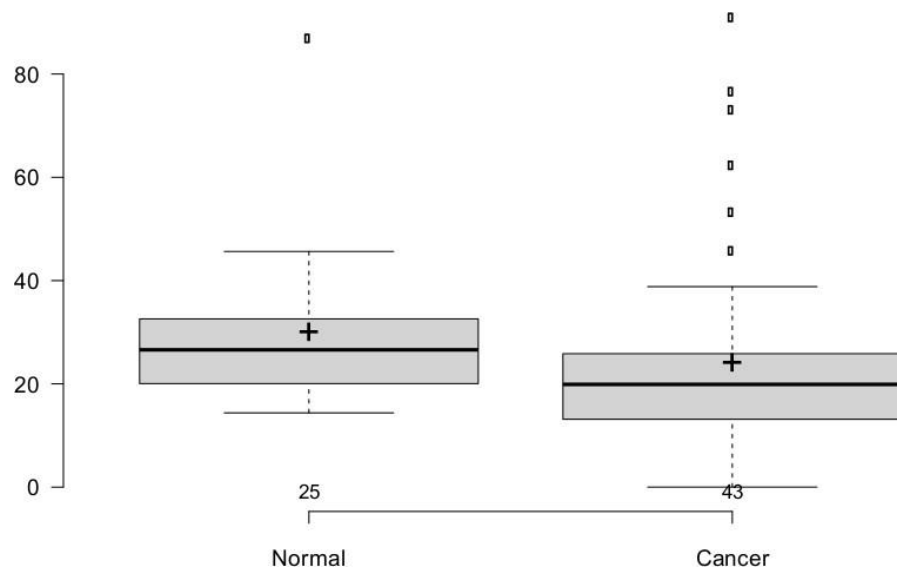


Figura 7.11: Cálculo da intensidade média de SHG nas biópsias normais (N), n=25, e cancerígenas (C), n=43. O eixo y representa os valores da intensidade média. As linhas centrais mostram as medianas; os limites da caixa indicam os percentuais de 25 e 75%, determinados pelo programa R; As cruces representam os valores médios. Os pontos acima do limite superior são valores atípicos, discrepantes, extremos ou outliers. Valor de $p=0,21$.

7.6 Intensidade das imagens de Fluorescência

Usando a ferramenta “Measure – Mean Gray Value” do programa ImageJ, analisamos também a intensidade das imagens de fluorescência das biópsias de próstata. As imagens de fluorescência foram obtidas usando microscopia por absorção de dois fótons, usando um laser sintonizável de Ti-Safira, 800 nm, para excitar a amostra. A intensidade de fluorescência nas imagens está relacionada a todas as proteínas autofluorescentes e todas as células que são marcadas com o corante eosina. A eosina marca especificamente o citoplasma da célula.

A figura 7.12, mostra a análise estatística do cálculo da intensidade de fluorescência das imagens de biópsias de próstata. A figura 7.12 mostra uma redução da intensidade média da fluorescência para as biópsias de próstata cancerígenas. Esta redução pode estar relacionada à diminuição das proteínas que emitem autofluorescência e/ou diminuição das células que estão marcadas com a eosina. Para esta análise obtemos um valor de $p=0,42$, ou seja, acima do valor de p

para a intensidade das imagens de SHG. Este resultado mostra que conseguimos uma melhor separação entre normal e câncer para a intensidade das imagens de SHG.

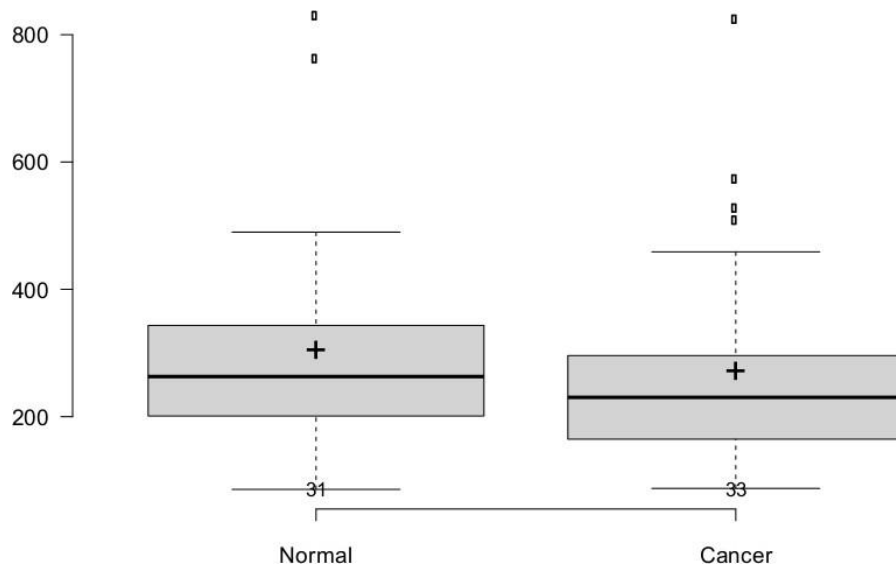


Figura 7.12: Cálculo da intensidade média de fluorescência das biópsias normais (N), n=31, e cancerígenas (C), n=33. O eixo y representa os valores da intensidade média. As linhas centrais mostram as medianas; os limites da caixa indicam os percentuais de 25 e 75%, determinados pelo programa R; As cruces representam os valores médios. Os pontos acima do limite superior são valores atípicos, discrepantes, extremos ou outliers. Valor de $p=0,42$.

Capítulo 8

Conclusões e Perspectivas

Através das medidas de SHG, para biópsias de próstata, obtemos uma análise quantitativa do alinhamento das fibras de colágeno nas regiões em torno dos ácinos. Nós observamos, que ocorre um aumento no alinhamento do colágeno para as amostras de câncer com maior grau de malignidade. Há uma pequena diferença no alinhamento do colágeno entre as amostras normais e padrão de Gleason 3, que pode ser devido à baixa agressividade deste câncer. Essa pequena diferença também pode estar relacionada à baixa recorrência bioquímica para o grau de Gleason 3. Além disso, os resultados mostraram que há uma clara separação dos padrões de Gleason 3 e Gleason 4. Mostramos também, para as imagens de SHG, uma redução da intensidade de segundo harmônico para as amostras de câncer. Isso pode estar relacionado à diminuição da quantidade de colágeno no tecido. Quanto à análise das imagens de fluorescência, observamos também um alinhamento das proteínas fluorescentes e uma diminuição de suas intensidades em torno das regiões de ácinos. Assim esse método também é uma possível ferramenta para auxiliar no diagnóstico de câncer. Porém as medidas SHG que mostram em mais detalhes a anisotropia das fibras de colágeno apresentam melhor separação estatisticamente significativa para os vários padrão Gleason.

Portanto, nossos resultados sugerem que estes novos métodos de análise podem se tornar úteis como ferramentas complementares para detecção de câncer. Os resultados preliminares para as biópsias frescas indicam que a anisotropia do colágeno pode ser uma boa maneira de discriminar as biópsias normais e cancerígenas de maneira mais rápida, sem quaisquer processamentos da amostra.

Um aspecto importante para a continuidade deste trabalhos será a utilização de métodos visando entender as causas da diminuição na intensidade de fluorescência das proteínas e o aumento de sua organização, nos tecidos

cancerosos. Uma possibilidade é estudos mais detalhados das várias proteínas por medidas de espectros de fluorescência. Em 2010, Yang Pu e colegas mostraram que durante o câncer de próstata, alterações bioquímicas podem ser reveladas no espectro de fluorescência do tecido [60]. Eles mostraram uma redução na emissão da fluorescência do colágeno e aumento na emissão de NADH (do inglês, nicotinamide adenine dinucleotide) em tecidos cancerígenos de próstata quando comparado a tecidos normais. Essa diferença é atribuída principalmente à alterações nos conteúdos de colágeno e NADH durante o desenvolvimento do câncer. Portanto um próximo passo desta pesquisa pode ser analisar como os espectros de fluorescência dessas proteínas modificam para cada um dos graus de agressividade do câncer.

Apêndice I

Lista de Publicações

- *Second harmonic generation imaging of the collagen architecture in prostate cancer tissue*, Aloísio M. Garcia, Felipe L. Magalhes, Jaqueline S. Soares, Eduardo Paulino Junior, Mário F. R. de Lima, Marcelo Mamede, Ana M. de Paula, *Biomed. Phys. Eng. Express*, vol. 4, no. 2, p. 25026, 2018. (doi:10.1088/2057-1976/aaa379)
- *Second harmonic generation microscopy as a cancer diagnosis tool*; Aloísio M. Garcia, Felipe L. Magalhes, Jaqueline S. Soares, Eduardo Paulino Junior, Mário F. R. de Lima, Marcelo Mamede, Ana M. de Paula, 2017 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC), 2017, Munich. (doi: 10.1109/CLEOE-EQEC.2017.8087781)

Referências Bibliográficas

- [1] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 11, pp. 1369–1377, 2003.
- [2] K. Tilbury and P. J. Campagnola, "Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer," *Perspect. Medicin. Chem.*, vol. 7, p. PMC-S13214, 2015.
- [3] K. B. Tilbury, K. R. Campbell, K. W. Eliceiri, S. M. Salih, M. Patankar, and P. J. Campagnola, "Stromal alterations in ovarian cancers via wavelength dependent Second Harmonic Generation microscopy and optical scattering," *BMC Cancer*, vol. 17, no. 1, p. 102, 2017.
- [4] S. Wu *et al.*, "Quantitative evaluation of redox ratio and collagen characteristics during breast cancer chemotherapy using two-photon intrinsic imaging," *Biomed. Opt. Express*, vol. 9, no. 3, pp. 1375–1388, 2018.
- [5] H. Chen *et al.*, "A multimodal platform for nonlinear optical microscopy and microspectroscopy," *Opt. Express*, vol. 17, no. 3, pp. 1282–1290, 2009.
- [6] M. Mathew, S. I. C. O. Santos, D. Zalvidea, and P. Loza-Alvarez, "Multimodal optical workstation for simultaneous linear, nonlinear microscopy and nanomanipulation: upgrading a commercial confocal inverted microscope," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 80, no. 7, p. 73701, 2009.
- [7] R. Cicchi, N. Vogler, D. Kapsokalyvas, B. Dietzek, J. Popp, and F. S. Pavone, "From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy," *J. Biophotonics*, vol. 6, no. 2, pp. 129–142, 2013.
- [8] P. G. Ellingsen, L. M. S. Aas, V. S. Hagen, R. Kumar, M. B. Lilledahl, and M. Kildemo, "Mueller matrix three-dimensional directional imaging of collagen fibers," *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, no. 2, p. 26002, 2014.
- [9] J. Adur *et al.*, "Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 9, p. 96017, 2011.
- [10] J. Adur *et al.*, "Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer," *J. Biophotonics*, vol. 7, no. 1–2, pp. 37–48, 2014.
- [11] J. S. Bredfeldt *et al.*, "Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer," *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, no. 1, p. 16007, 2014.
- [12] T. M. Bauman *et al.*, "Characterization of fibrillar collagens and extracellular matrix of glandular benign prostatic hyperplasia nodules," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e109102, 2014.

- [13] A. Zoumi, A. Yeh, and B. J. Tromberg, "Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 17, pp. 11014–11019, 2002.
- [14] P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White, and P. J. Keely, "Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion," *Eur. J. Nat. Hist.*, no. 3, pp. 65–84, 2007.
- [15] X. Wu *et al.*, "Label-free detection of breast masses using multiphoton microscopy," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e65933, 2013.
- [16] A. Golaraei *et al.*, "Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy," *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 10, pp. 4054–4068, 2016.
- [17] Y. Ling *et al.*, "Second harmonic generation (SHG) imaging of cancer heterogeneity in ultrasound guided biopsies of prostate in men suspected with prostate cancer," *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 6–7, pp. 911–918, 2017.
- [18] P. J. Campagnola and C.-Y. Dong, "Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis," *Laser Photon. Rev.*, vol. 5, no. 1, pp. 13–26, 2011.
- [19] J. Adur *et al.*, "Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 8, pp. 814071–8140710, 2012.
- [20] J. Adur *et al.*, "Optical biomarkers of serous and mucinous human ovarian tumor assessed with nonlinear optics microscopies," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47007, 2012.
- [21] A. A. de Thomaz, "Plataforma Fotônica Integrada e suas Aplicações em Estudos de Quantum Dots e Processos Biológicos," Phd's thesis, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física, 2013.
- [22] K. Burke, P. Tang, and E. Brown, "Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, p. 31106, 2013.
- [23] Instituto Nacional de Câncer, "Tipos de câncer: Próstata." 2018. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>.
- [24] X. Chen, O. Nadiarynk, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, "Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure," *Nat. Protoc.*, vol. 7, no. 4, p. 654, 2012.
- [25] S. M. Kakkad *et al.*, "Hypoxic tumor microenvironments reduce collagen I fiber density," *Neoplasia*, vol. 12, no. 8, pp. 608–617, 2010.
- [26] M. Fang, J. Yuan, C. Peng, and Y. Li, "Collagen as a double-edged sword in tumor progression," *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 4, pp. 2871–2882, 2014.

- [27] M. S. Hall *et al.*, “Fibrous nonlinear elasticity enables positive mechanical feedback between cells and ECMs,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 49, pp. 14043–14048, 2016.
- [28] A. Ghazaryan *et al.*, “Analysis of collagen fiber domain organization by Fourier second harmonic generation microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 3, p. 31105, 2013.
- [29] A. Diaspro, G. Chirico, and M. Collini, “Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy,” *Q. Rev. Biophys.*, vol. 38, no. 2, pp. 97–166, 2005.
- [30] M. Rumi and J. W. Perry, “Two-photon absorption: an overview of measurements and principles,” *Adv. Opt. Photonics*, vol. 2, no. 4, pp. 451–518, 2010.
- [31] P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich, “Generation of optical harmonics,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 7, no. 4, p. 118, 1961.
- [32] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Second Edi. Academic Press, 1992.
- [33] M. J. Buehler, “Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 33, pp. 12285–12290, 2006.
- [34] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, “The extracellular matrix at a glance,” *J Cell Sci*, vol. 123, no. 24, pp. 4195–4200, 2010.
- [35] D. S. Goodsell, “Collagen.” 2015. <http://pdb101.rcsb.org/motm/4>.
- [36] Y. Fu, H. Wang, R. Shi, and J.-X. Cheng, “Second harmonic and sum frequency generation imaging of fibrous astroglial filaments in ex vivo spinal tissues,” *Biophys. J.*, vol. 92, no. 9, pp. 3251–3259, 2007.
- [37] T. C. A. Tonon and J. P. F. Schoffen, “Câncer de próstata: uma revisão da literatura,” *Saúde e Pesqui.*, vol. 2, no. 3, 2009.
- [38] J. I. Epstein *et al.*, “The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 40, no. 2, pp. 244–252, 2016.
- [39] G. T. Mellinger, D. Gleason, and J. Bailar 3rd, “The histology and prognosis of prostatic cancer.,” *J. Urol.*, vol. 97, no. 2, pp. 331–337, 1967.
- [40] P. G. de Oliveira Salles, “Adenocarcinoma da próstata,” Phd's thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, 2010.
- [41] J. E. McNeal, “Origin and development of carcinoma in the prostate,” *Cancer*, vol. 23, no. 1, pp. 24–34, 1969.
- [42] J. E. McNeal, “The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis,” *J. Urol.*, vol. 107, no. 6, pp. 1008–1016, 1972.
- [43] J. E. McNeal, “Normal histology of the prostate.,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 12, no. 8,

pp. 619–633, 1988.

- [44] Tecnologia do Blogger, “Histologia da próstata masculina.” 2011. <http://cabmn.blogspot.com.br/2011/11/histologia-da-prostata.html>.
- [45] J. Gordetsky and J. Epstein, “Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications,” *Diagn. Pathol.*, vol. 11, no. 1, p. 25, 2016.
- [46] “Eclipse E200 Microscópio Educacional.” 2016. https://www.nikoninstruments.com/pr_BR/Produtos/Microscopios-Verticais/Educacional/Eclipse-E200-LED.
- [47] F. L. Magalhães, “Espectroscopia Raman da Glândula Prostática: Avaliação de Potenciais Marcadores Moleculares para o Câncer de Próstata,” Master's thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, 2016.
- [48] A. Boudaoud *et al.*, “FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images,” *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 2, pp. 457–463, 2014.
- [49] F. J. Ávila and J. M. Bueno, “Analysis and quantification of collagen organization with the structure tensor in second harmonic microscopy images of ocular tissues,” *Appl. Opt.*, vol. 54, no. 33, pp. 9848–9854, 2015.
- [50] J. M. Bueno, F. J. Ávila, and P. Artal, “Second Harmonic Generation Microscopy: A Tool for Quantitative Analysis of Tissues,” in *Microscopy and Analysis*, InTech, 2016.
- [51] F. J. Ávila, O. del Barco, and J. M. Bueno, “Quantifying external and internal collagen organization from Stokes-vector-based second harmonic generation imaging polarimetry,” *J. Opt.*, vol. 19, no. 10, p. 105301, 2017.
- [52] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, 2012.
- [53] M. Spitzer, J. Wildenhain, J. Rappsilber, and M. Tyers, “BoxPlotR: a web tool for generation of box plots,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 2, p. 121, 2014.
- [54] A. Field, *Descobrimo a estatística usando o SPSS-2*. Bookman Editora, 2009.
- [55] D. Sage, “OrientationJ.” 2018. <http://bigwww.epfl.ch/demo/orientation/>.
- [56] Z. Püspöki, M. Storath, D. Sage, and M. Unser, “Transforms and operators for directional bioimage analysis: a survey,” in *Focus on Bio-Image Informatics*, Springer, 2016, pp. 69–93.
- [57] R. Rezakhaniha *et al.*, “Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy,” *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 461–473, 2012.
- [58] E. Fonck *et al.*, “Effect of aging on elastin functionality in human cerebral arteries,” *Stroke*, vol. 40, no. 7, pp. 2552–2556, 2009.
- [59] P. M. Edwards, “Origin 7.0: scientific graphing and data analysis software,” *J. Chem.*

Inf. Comput. Sci., vol. 42, no. 5, pp. 1270–1271, 2002.

- [60] Y. Pu, W. Wang, G. C. Tang, and R. R. Alfano, “Changes of collagen and nicotinamide adenine dinucleotide in human cancerous and normal prostate tissues studied using native fluorescence spectroscopy with selective excitation wavelength,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 4, p. 47008, 2010.