

**Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D
Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
LEVB**

Projeto de Pesquisa de Iniciação Científica

**Análise de câncer de colo-retal por Imageamento no
Infravermelho**

Orientador: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin

**Projeto de Pesquisa: Estudo de Células Neoplásicas por Espectroscopia de Infravermelho
Próximo FAPESP (2001/14384-8)**

Aluno Bolsista: João Lucas Rangel Silva

Curso: 8° período de Engenharia Biomédica

Data de ingresso como bolsista CNPq-PIBIC: Julho de 2010

Bolsista de renovação CNPq-PIBIC

Sumario

Resumo	02
1. Introdução	03
1.1. Câncer de Colo-retal	03
1.2. Biopsia Óptica: Espectroscopia de Infravermelho Próximo (FT-IR)	04
1.2.1. Princípios	04
1.2.2. Vibrações Moleculares	05
1.2.3. Modo Imagem	06
2. Objetivo	07
3. Justificativa	07
4. Materiais e Métodos	07
4.1. Preparação das Amostras	07
4.1.1. Coleta e Transporte	07
4.1.2. Corte das Amostras	08
4.1.3. Coloração das Amostras	08
4.1.4. Preparação das janelas de CaF ₂	08
4.2. Espectroscopia no Infravermelho	09
4.2.1. Parâmetros de medida	09
4.3. Tratamento dos dados e análise estatística	10
5. Resultados	12
6. Conclusão	18
7. Referências Bibliográficas	18

RESUMO

O câncer de colo-retal é considerado o terceiro câncer com maior taxa de mortalidade no mundo. Fatores como má-alimentação e uso de drogas aumentam a chance de manifestação desta doença. Atualmente exames como toque retal, anoscopia e biópsia com estudo histopatológico da lesão são utilizados para o diagnóstico da doença, contudo esses exames necessitam de um tempo elevado para se obter algum tipo de resultado. Com isso novas técnicas estão sendo estudadas para se diminuir esse tempo e obter um diagnóstico precoce, aumentando assim a chance de cura do indivíduo [INCA, Estimativa 2010]. O imageamento no infravermelho tem se destacado como uma técnica de auxílio aos patologistas uma vez que caracteriza o tecido através de sua constituição bioquímica. Esta técnica pode detectar pequenas alterações bioquímicas que antecedem as mudanças morfológicas e assim obter um resultado preciso e rápido [KRAFFT, 2008; LASCH, 2004; LASCH, 2006].

Toda a metodologia foi realizada seguindo as normas de biossegurança. As amostras foram preparadas em dois cortes sequenciais de 12 μm cada; o primeiro corte foi depositado em janelas de CaF_2 , para análise por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e o segundo corte foi colocado em lâminas histológicas e coradas por HE. Posteriormente as amostras que foram depositadas nas lâminas histológicas foram enviadas ao patologista para confirmação histológica. As janelas de CaF_2 foram analisadas no modo imagem, em 3 diferentes pontos, utilizando o equipamento de FT-IR (Spotlight 400 – Perkin-Elmer) na região de $4000\text{-}900\text{cm}^{-1}$, 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . Todos os dados foram extraídos no software Cytospec (versão 1.4.02) para análise dos espectros contidos na matriz da imagem. Utilizando-se coeficiente de Pearson e o algoritmo de Ward's foi possível observar o agrupamento dos espectros por similaridade e verificar a sua correlação com a imagem morfológica. Outro método estatístico utilizado para verificação do agrupamento dos dados foi o método K-Means, este método se baseia na análise e comparações entre os dados e seus centroides. Estes métodos mostram o grande potencial da técnica na identificação das estruturas morfológicas [DÍAZ, 2007; CYTOSPEC].

A segunda parte desta metodologia consistiu-se na análise estatística multivariada de todos os espectros médios contidos em cada imagem bioquímica gerada pela similaridade espectral. Assim, foi possível localizar os modos vibracionais que demonstram as pequenas diferenças entre os tecidos. Nesta análise, utilizou-se primeiramente o software OPUS (versão 4.2, Bruker), para normalização dos dados e subtração da linha de base. O software Origin (versão 8.0), foi utilizado em seguida para realizar a comparação dos modos vibracionais que demonstraram as seguintes diferenças. Analisou-se a região de impressão digital da amostra ($1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$), assim como a região de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ que se caracterizam pelas ligações de CH_2 e CH_3 de

lipídios, proteínas e carboidratos. Podem-se citar alguns picos que evidenciam uma maior diferenciação entre os tecidos estudados; (a) o pico de CH₂ em 2849 e 2920 cm⁻¹, são mais intensos que os modos de CH₃ em 2960 e 2870 cm⁻¹, provavelmente devido a um processo de hipometilação durante a carcinogênese molecular; (b) Na avaliação do tecido conjuntivo foi possível observar três bandas agrupadas, uma em 1240 cm⁻¹ atribuída ao PO₂ de ácidos nucleicos e outras duas bandas em 1209 e 1285 cm⁻¹ que é atribuída ao colágeno (principal componente do tecido conjuntivo); (c) a região de 1164 a 1172 cm⁻¹, atribuídos a ligação de C-OH, esta relacionado ao processo de fosforilação induzida pela carcinogênese, pois as mudanças de C-OH em C-PO diminuem o numero de pontes de hidrogênio que estabilizam os tecidos saudáveis do cólon e finalmente (d) as bandas relacionadas aos carboidratos em 1025 e 1045 cm⁻¹, cuja variação da absorção ou metabolismo dos carboidratos pode ser devido ao estágio avançado do câncer [LASCH, 2002; LASCH, 2005; CONTI, 2007; RAMESH, 2001].

Assim, além da possibilidade de correlação entre as estruturas morfológicas e imagens bioquímicas, a técnica de espectroscopia de infravermelho pode ainda ser aplicada na diferença tecidual, identificando diferentes tipos de patologias de tecidos de cólon humano. Podendo ser um novo método de auxílio aos patologistas.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Colo-Retal

O câncer de colo-retal abrange tumores que atingem o cólon (intestino grosso) e o reto. Tanto homens como mulheres são igualmente afetados, sendo uma doença tratável e frequentemente curável quando localizada no intestino (sem extensão para outros órgãos). O câncer de colo-retal é a terceira causa mais comum de morte por câncer no mundo. [INCA Estimativa 2010]

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. Estima-se que o câncer de cólon e reto atingirá aproximadamente 28 mil indivíduos, sendo 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres (figura 1) [INCA Estimativa 2010].

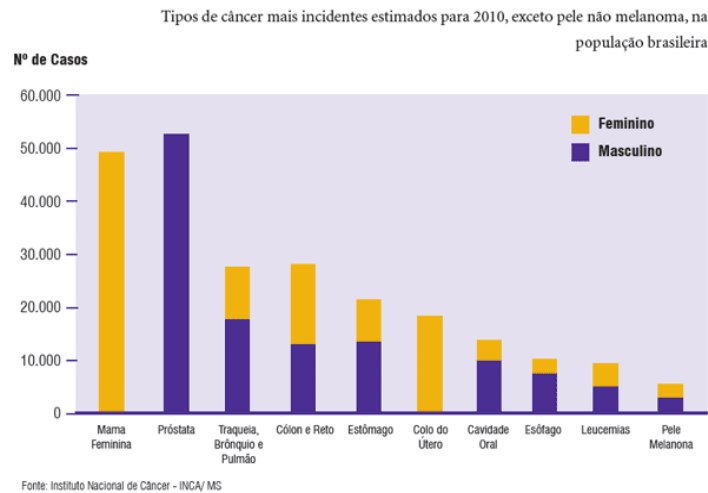


Figura 1 Tipos de câncer mais incidentes, Estimativa 2010 Fonte: INCA, 2010

Usualmente, o diagnóstico da doença de pólipos adenomatosos colo-retais (precursores do câncer de cólon e reto) e de cânceres localizados é possível pela pesquisa de sangue oculto nas fezes e através de métodos endoscópicos. Entretanto, mesmo em países com recursos abundantes, como os EUA, têm se encontrado dificuldades na realização de avaliação diagnóstica por exames endoscópicos em pacientes com presença de sangue oculto nas fezes, impossibilitando a implantação de rastreamento populacional [INCA Estimativa 2010]. Além disso, destaca-se a demora na obtenção de resultados e possíveis alterações dos resultados induzidos pelo armazenamento inadequado do tecido. O método de exame histopatológico é inadequado, pois depende da experiência e habilidade do patologista [STONE et al. 2003].

1.2 Biopsia Óptica: Espectroscopia de Infravermelho Próximo (FT-IR)

1.2.1 Princípios

Dentre as inúmeras técnicas de biópsia óptica destacam-se a Espectroscopia de Infravermelho [NAUMANN, 2000]. Esta técnica estuda a interação de radiação eletromagnética com a matéria, determinando os níveis de energia de átomos e moléculas [SALA, 1995]. Como essas diferenças de energia são na ordem de 0,5 a 0,005 eV, a luz com comprimento de onda maior que 2,5 μm , que é a luz infravermelha (IR), é suficiente para induzir as transições vibracionais. Assim, a espectroscopia vibracional que é baseada na absorção direta de um quantum de luz, é denominada absorção IR ou espectroscopia IR [MAQUELIN, 2002].

Os níveis de energia principais são determinados pelas possíveis distribuições espaciais dos elétrons e são chamados níveis eletrônicos de energia, sobre estes existem os níveis vibracionais, que indicam as várias modalidades de vibração da molécula. Todos estes níveis são

geralmente descritos por um diagrama de níveis de energia. O primeiro nível eletrônico é chamado de estado fundamental e os demais são estados excitados [WARTEWIG, 2003].

O método fornece um espectro de absorção bioquímica devido às vibrações de ligações químicas de componentes celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídio [BALDAUF, 2007; AMIALI, 2007].

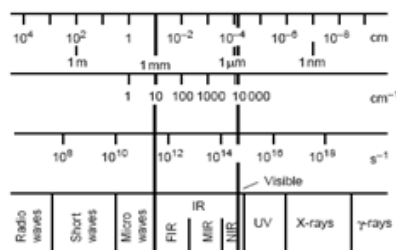


Figura 2 – Espectro eletromagnético. Fonte: NAUMANN, 2000.

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga) (figura 3).

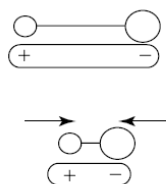


Figura 3- Variação do momento dipolar. Fonte: STUART, 2004.

A grande maioria das moléculas tem bandas de infravermelho na faixa espectral entre 400 e 4000 cm^{-1} (MIR), isso se deve, principalmente, ao fato de nessa região ocorrerem, essencialmente, transições fundamentais e à existência de uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital. Nessa região, pequenas alterações na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção do espectro, que são relacionados com a estrutura da molécula [NAUMANN, 2000; WARTEWIG, 2003].

1.2.2 Vibrações Moleculares

Uma molécula não é uma associação rígida de átomos. Uma molécula pode ser comparada a um sistema de massas variáveis, correspondentes aos átomos da molécula, e molas de diversos comprimentos, correspondente às ligações químicas da molécula. A espectroscopia vibracional analisa as vibrações periódicas dos átomos dentro de uma molécula. Essas vibrações não

ocorrem aleatoriamente, mas de uma forma rigorosamente definida. As vibrações moleculares podem ir desde simples movimentos associados de dois átomos em uma molécula diatômica a movimentos mais complexos de cada átomo em uma grande molécula poliatômica. As ligações covalentes que constituem as moléculas orgânicas estão em constantes movimentos axiais e angulares [SIEBERT, 2008; HILDEBRANDT, 2008; GRIFFITHS, 2007; HASETH, 2007].

Toda a molécula possui movimentos ordenados e bem específicos, elas possuem o que chamamos de graus de liberdade que correspondem aos diferentes modos normais de vibração de uma molécula. Um dos modos normais de vibração é aquele em que cada núcleo realiza uma oscilação harmônica simples em torno de sua posição de equilíbrio, todos os núcleos se movem com a mesma frequência e em fase, e o centro de gravidade da molécula permanece inalterado.

Existem dois modos fundamentais de vibração de moléculas: estiramento ou deformação axial, em que a distância entre dois átomos aumenta ou diminui, mas os átomos permanecem no mesmo eixo de ligação; e deformação angular, em que a posição do átomo muda em relação ao eixo original da ligação. Vibrações de estiramentos podem ocorrer em fase (estiramento simétrico) ou fora de fase (estiramento assimétrico). Vibrações de deformação podem ocorrer no plano (tesoura e balanço) ou fora do plano (sacudida e torção) (figura 4) [SIEBERT, 2008; HILDEBRANDT, 2008; STUART, 2004].

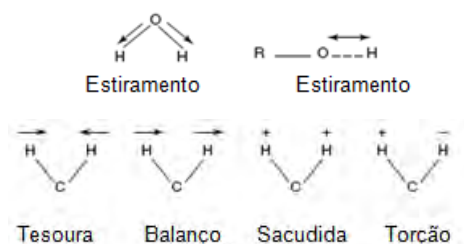


Figura 4 – Vibrações de um grupo de átomos (+ e – significam vibrações perpendiculares). Fonte: Stuart, 2004.

1.2.3 Modo Imagem

Para o tipo de amostra escolhido como estudo, basicamente existe dois tipos de modo de análise que podem ser feitos no microscópio (Spotlight 400 – Perkin-Elmer), o modo de ponto onde o espectro da amostra é a média de uma área de $100 \mu\text{m}^2$ e o modo de imagem no qual o espectro é o resultado de uma área de $6,25 \mu\text{m}^2$ (tamanho do pixel) (Figura 5).

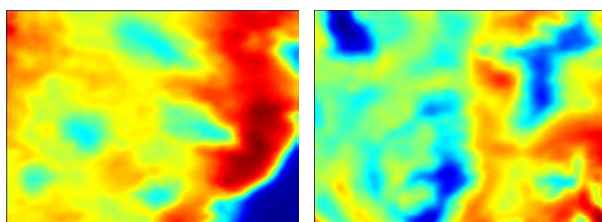


Figura 5 - Imagens Bioquímica de uma amostra de colón feita por FT-IR

2. OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi avaliar a potencialidade de diferenciação de tecidos saudáveis, pólipos e lesionados por meio do imageamento bioquímico por espectroscopia de infravermelho. Podendo observar as alterações morfológicas com as imagens bioquímicas de forma a facilitar a detecção precoce de câncer de colo-retal. Outro objetivo do presente projeto foi identificar os principais constituintes bioquímicos que se modificam a partir do processo de carcinogênese.

3. JUSTIFICATIVA

Com o aumento de casos de câncer no Brasil e no mundo, a técnica de imageamento bioquímico é uma excelente solução para um diagnóstico automatizado a fim de proceder a um tratamento mais rápido e eficaz, reduzindo danos ao paciente. Essa técnica pode ser de grande ajuda aos patologistas em laudos com maior dificuldade pela identificação morfológica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparação das Amostras

4.1.1 Coleta e Transporte

Para realização deste projeto, as amostras de tecidos saudáveis, pólipos e lesionados foram doadas pela Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima (UNICAMP), após ciência dos pacientes e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e aprovação do comitê de ética – número do protocolo L166/CEP2004. As mesmas foram armazenadas em tubos criogênicos (Nalgene® de 1,2 ml), identificadas e mantidas em um reservatório de nitrogênio líquido (-196 °C) visando a preservação e manutenção das mesmas até o momento do transporte e análises espectroscópicas.

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos/SP, após a aprovação pelo comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), com o número do protocolo L166/CEP2004.

Tanto as análises quanto o preparo das amostras foram realizados sob adequada paramentação, conforme as precauções universais e normas de biossegurança do Ministério da Saúde. Para a realização do trabalho será respeitada a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que estabelece as diretrizes e normas.

4.1.2 Corte das Amostras

Após o recebimento das amostras as mesmas foram marcadas e armazenadas em geladeira a (-85°C) para preservação, aguardando o processo de análise espectroscópica. As amostras foram cortadas utilizando um criostato modelo CM 1100 - LEICA (Figura 6), seguindo os parâmetros adequados do equipamento. Estes cortes foram realizados sequencialmente, sendo que o primeiro foi colocado na janela de CaF₂ e o segundo em uma lâmina histológica que posteriormente foi utilizada para a confirmação patológica por um especialista. Após esse processo de secção e separação, o restante da amostra foi novamente marcado, enumerado, guardado em tubos criogênicos e armazenado em geladeira a (-85 °C) para preservação.



Figura 6 - Criostato(CM 1100 - LEICA), vista externa e interna respectivamente

4.1.3 Coloração das Amostras

Tendo em vista que atualmente a histologia é o “padrão ouro” de diagnóstico, este método foi utilizado para comparação com a análise bioquímica obtida pelo equipamento de FT-IR. As mesmas passaram por um método de coloração de hematoxilina e eosina - HE (Figura 7). Este método consistiu das seguintes etapas realizadas no LEVB:



Figura 7 - Cubas de vidro para coloração HE

4.1.4 Preparação das janelas de CaF₂

Todas as secções para análise espectroscópica não necessitaram de qualquer tratamento prévio, as amostras apenas foram cortadas na espessura de 12 µm, e depositadas em uma janela CaF₂ (Figura 8) que serve de porta amostra e levadas para análise espectroscópica.



Figura 8 - Janelas de CaF₂

4.2. Espectroscopia no Infravermelho

4.2.1 Parâmetros de medida

As amostras em janela de CaF₂, foram mantidas em uma sala com baixa umidade por trinta minutos com a intenção remover o excesso de água presente na amostra após o processo de secção. As imagens bioquímicas foram obtidas em modo de imagem por transmitância, no intervalo de 4000-900 cm⁻¹, com 32 varreduras por pixel (6,25 μm²) e resolução de 4 cm⁻¹, através da microespectroscopia FT-IR utilizando o microscópio de imageamento (Spotlight 400 – Perkin-Elmer) equipado com detector MCT operando a temperatura do nitrogênio líquido, acoplado a um espectrômetro FT-IR (Spectrum 400 – Perkin-Elmer) (Figura 9).

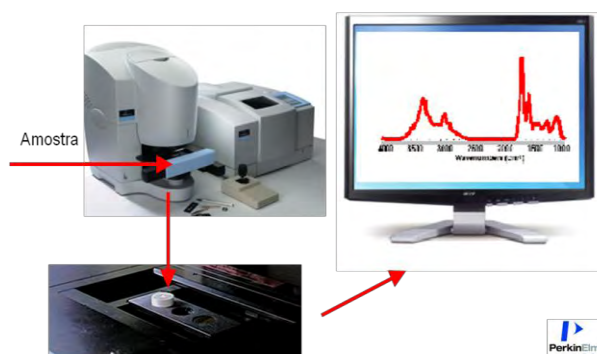


Figura 9 – Foto do FT-IR, porta amostra e espectros.

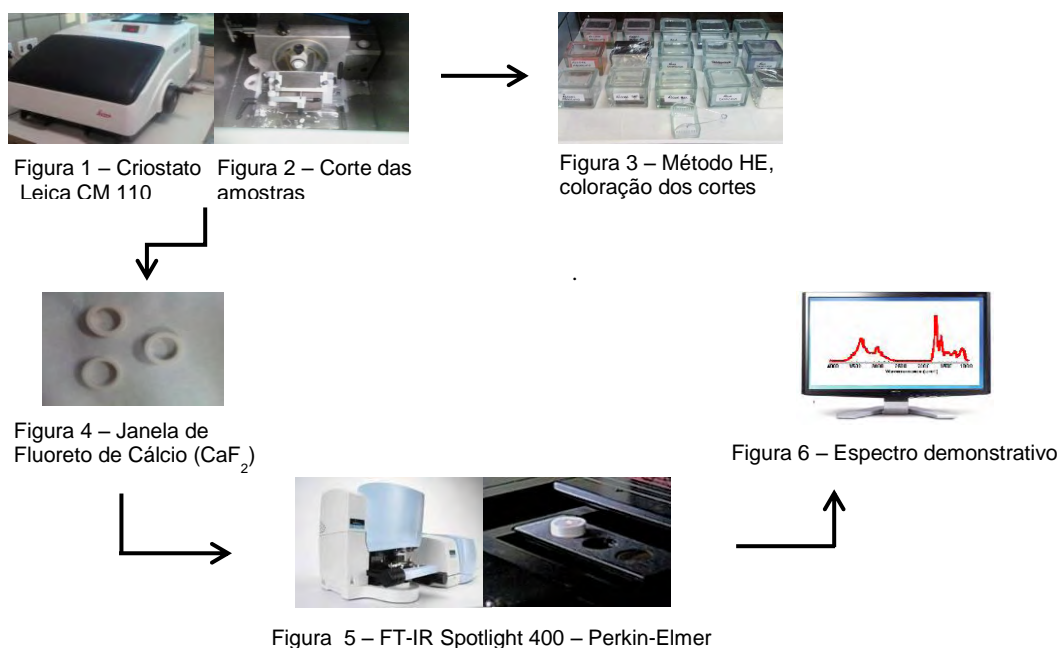


Figura 10 – Metodologia utilizada no projeto

Todo o processo de corte, coloração e análise espectroscópica podem ser mais bem entendido pela Figura 10, onde demonstra esquematicamente a metodologia utilizada para a obtenção dos resultados

4.3 Tratamento dos dados e análise estatística

Após as medidas das amostras no FT-IR, seus arquivos foram extraídos no programa Cytospec (versão 1.4.02) para análise dos espectros da matriz de imagem. Primeiramente esta análise traz algumas informações importantes como a absorção da amostra, visto que, após unidade 1,0 de absorção, o detector não é mais linear interferindo significativamente na análise estatística. Após a visualização dessas informações, foi iniciado o processo de tratamento estatístico para assim observar a formação de *cluster*. Essa formação consiste na separação bioquímica que o programa realiza utilizando os espectros pertencentes a matriz de imagem. Esta separação é de fundamental importância, a fim de determinar pequenas alterações entre as amostras. Para conseguir a separação bioquímica entre os espectros, primeiramente houve a necessidade de se calcular a primeira derivada com 9 pontos de suavização espectral, isso foi realizado para tornar visíveis as mínimas variações entre os espectros. Após a os cálculos foram utilizados dois métodos estatísticos, que classificaram os espectros contidos na imagem e assim criar um mapa de *clusters*. Com isso podemos confrontar os resultados obtidos por cada um dos métodos e obter maiores conclusões sobre os dados. Como região de interesse para o tratamento estatístico foi selecionado duas regiões discriminantes: 3000-2800 cm⁻¹ e 900-1500 cm⁻¹, essas regiões foram escolhidas por apresentarem maiores mudanças, podendo assim classificar o tipo de tecido que esta sendo estudado.

O primeiro método utilizado foi *Hierarchical cluster analysis* (HCA) ou Análise Hierárquica de Clusters (AHC), esse método utilizou-se do coeficiente de Person para o cálculo das distâncias espectrais entre dados analisados. Esse método baseia-se na covariância dos dados, medida através da variabilidade comum de duas variáveis (crescimento de ambas ao tempo do crescimento de uma e decréscimo da outra), sendo, no entanto, afetada pelas unidades em que cada variável é medida. Assim, é necessário definir uma medida da relação entre duas variáveis, e que não seja afetada pelas mudanças da unidade de medida.

Uma forma de conseguir isso é dividir a covariância pelo produto dos desvios padrão de cada variável, já que assim se obtém um coeficiente adimensional, (*r*), que se denomina coeficiente **de correlação linear de Pearson**:

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$$

Propriedades do Coeficiente de Correlação

- Carece de unidades de medida (adimensional).
- É invariante para as transformações lineares (mudança de origem e de escala) das variáveis.
- Só assume valores compreendidos entre (-1 e 1).
- Quando r está próximo de um valor, afirma-se que há uma *relação linear* muito forte entre as variáveis.
- Quando r aproximadamente é 0, pode-se afirmar que não há relação linear entre ambas as variáveis. Diz-se, nesse caso, que as variáveis são não-correlacionadas [DÍAZ, 2007].

Depois de efetuar o cálculo das distâncias espectrais foi empregado o algoritmo de Ward's, esse algoritmo produz grupos de dados buscando minimizar a soma das diferenças (heterogeneidade) entre os elementos de cada grupo e o valor médio do grupo, minimizando o desvio padrão entre os dados de cada grupo formado, construindo grupos mais homogêneos. Podendo assim gerar um mapa de *clusters* que representa a imagem morfológica.

O segundo método estático utilizado para se obter uma imagem de cluster e seus respectivos espectros foi o método K-means, esse método utilizou-se do Coeficiente de Pearson para calcular as distâncias espectrais. O cálculo das distâncias espectrais significa dizer o calcular o quão 'longe' uma ocorrência está da outra. O processamento para o agrupamento de dados utilizando o algoritmo K-means inicia-se por definir um certo número de centroides (k centroides) para uma determinada entrada. O próximo passo é associar cada dado da entrada ao centroide mais próximo. Quando todos os dados forem associados a um centroide é necessário recalculá-los tendo como base os dados agrupados. De posse destes novos valores de k , são recalculadas as relações entre k e cada dado associado anteriormente. Este processo é realizado em *loop* até que não exista mais movimentação de k . Basicamente o algoritmo *K-means* pode ser classificado em três passos [MACQUEEN, 1967].

1. Definir uma quantidade k de clusters e distribuir estes clusters de forma aleatória em um determinado conjunto de dados de entrada.
2. Apontar cada dado de entrada para o centroide mais próximo.
3. Recalcule as posições de k e repetir os procedimentos 2 e 3 até que não haja mais alteração das posições de k .

É importante ressaltar que, antes do tratamento estatístico, a imagem bioquímica não necessita de qualquer pré-tratamento, como por exemplo, normalização, remoção de fluorescência, remoção de *Spikes*.

Após a análise pelo programa Cytospec, foram obtidos espectros médios de cada amostra. Esses espectros representam os espectros de um mesmo grupo, ou seja, quando a imagem de cluster foi feita, ela foi demonstrada por regiões, essas regiões são classificadas por similaridade e cada região é atribuída uma cor, em cada região é calculado um espectro médio representante. Para melhor demonstração dos resultados foi utilizado o programa estatístico OPUS (versão 4.2, Bruker), esse software fez uma análise multivariada dos dados, para tal necessitou-se fazer uma normalização vetorial e a primeira derivada, também foi preciso aplicar a linha de base em todos os dados. Esses tratamentos foram necessários para padronização dos dados.

Após os tratamentos os espectros médios foram importados no software Origin (versão 8.0) para comparação dos mesmos e obtenção de resultados referentes aos picos de maior variação no processo de carcinogênese.

5. RESULTADOS

Os resultados são divididos em três fases, a primeira fase é a demonstração da potencialidade da técnica na correlação entre as lâminas histológicas e as análises bioquímicas, a segunda fase se tem como objetivo correlacionar os tipos de tecidos analisados anteriormente e classificá-los pelas mudanças bioquímicas que os mesmos apresentam devido ao processo de carcinogênese. A última fase é o estudo dos espectros de cada tipo de tecido, podendo verificar as regiões e os picos que sofrem maiores alterações durante o processo de carcinogênese e assim explicá-los.

Na figura 11 e 12 são apresentados os resultados obtidos pelo imageamento bioquímico de uma amostra de colón normal em janela de CaF_2 e sua correspondente imagem histológica, respectivamente. Observa-se claramente a semelhança entre as imagens em ambas as figuras, demonstrando assim, que a técnica de FT-IR consegue identificar os diferentes constituintes deste tecido.



Figura 11 - Janela de CaF_2 com amostra de colón normal

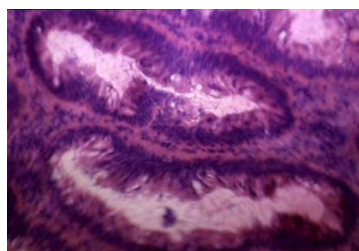


Figura 12 - Lamina histológica para análise espectroscópica

Esta correlação pode ser mais bem visualizada na Figura 13 e 14, que com o auxílio do programa Cytospec utilizando método HCA pode-se comparar a imagem da lâmina histológica com a imagem bioquímica. Observou-se que ambas as figuras foi possível visualizar a separação das diferentes estruturas celulares, um exemplo é a separação do tecido epitelial e conjuntivo a partir dos diferentes *clusters*.

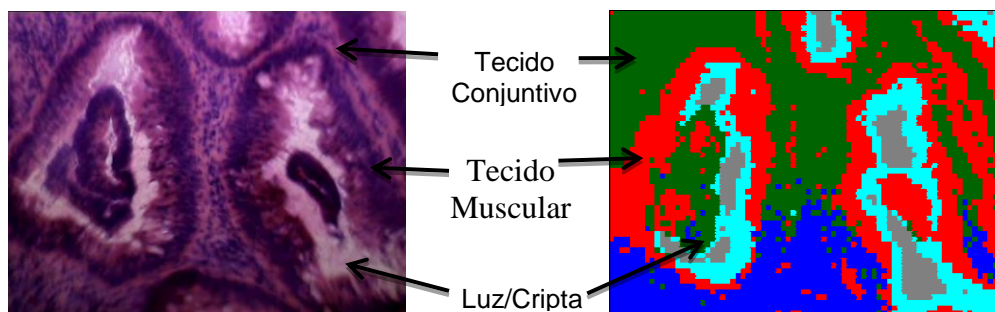


Figura 13 – Tecido pólipico em lamina histológica

Figura 14 – Mapa bioquímico de tecido pólipico

A mesma correlação foi feita utilizando o método estatístico K-means, foi observado que com esse método as imagens histológicas (Figura 15) também puderam ser correlacionadas com as imagens de *clusters* (Figura 16) mostrando que com diferentes métodos estatísticos é possível obter resultados satisfatórios.

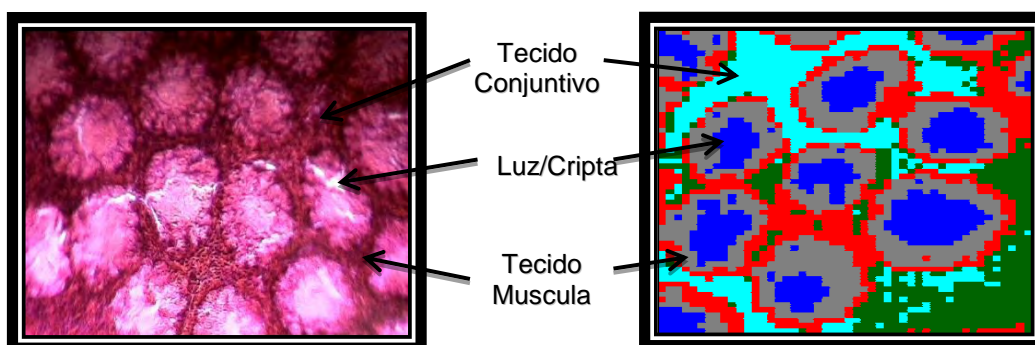


Figura 15 – Tecido normal em lamina histológica

Figura 16 – Mapa bioquímico de tecido normal

A mesma metodologia de análise e comparação foi realizada para um tecido de colón neoplásico. A imagem da lâmina histológica é mostrada na Figura 17 e seu correspondente mapa bioquímico gerado pelo programa Cytospec é mostrado na Figura 18. Neste caso, apesar da heterogeneidade do tecido biológico causada pelo câncer, não foi possível obter a mesma clareza de separação das estruturas celulares como as das amostras de tecido normal e pólipico. Entretanto, a separação entre os tipos de tecidos pode ser realizada com sucesso.

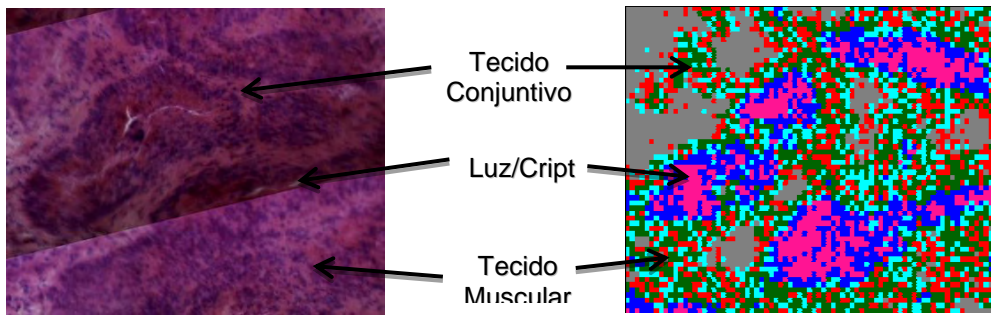


Figura 17 – Tecido carcinogênico em lamina histológica

Figura 18 – Mapa bioquímico de tecido carcinogênico

Tendo em vista o sucesso obtido com a utilização do programa Cytospec para a separação dos *clusters* para as diferentes estruturas celulares no tecido normal, pólipos e neoplásico. A fase seguinte foi sua utilização na tentativa de identificar e classificar as principais diferenças bioquímicas existentes entre os tecidos normais (Figura 19), pólipo (Figura 20) e neoplasia maligna (Figura 21).

Neste processo, foi observado que, em alguns casos, o tecido classificado como pólipo (Figura 20) apresenta algumas semelhanças morfológicas com o tecido normal (Figura 19) e com o tecido carcinogênico (Figura 21) as quais podem dificultar o parecer do histologista. Por sua vez, o tecido carcinogênico apresenta características distintas do tecido normal, facilitando assim a visualização e análise do histologista entre estes dois tipos de tecidos.

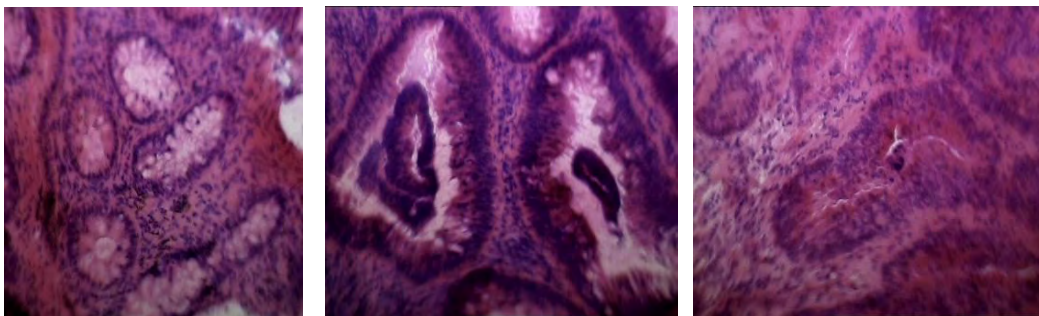


Figura 19- Tecido Normal

Figura 20- Tecido Pólipo

Figura 21- Tecido Carcinogênico

Com o intuito de se verificar a possibilidade de diferenciação bioquímica entre um tecido de pólipo do normal e do alterado, foram obtidas imagens bioquímicas destes tecidos. A fim de facilitar esta diferenciação, buscou-se identificar primeiramente as diferentes estruturas celulares e morfológicas que compõem cada tipo de tecido. Em cada amostra foram selecionadas aleatoriamente nove regiões distintas para a aquisição do mapa bioquímico e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 22 (a-c). O tempo de coleta de cada imagem foi de aproximadamente 75 minutos.

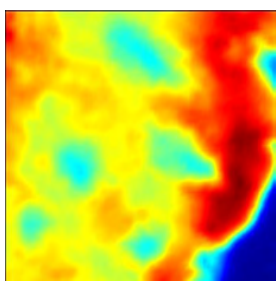


Figura 22 (a) - Tecido Normal

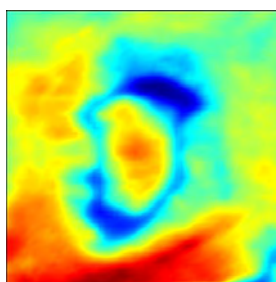


Figura 22 (b) - Tecido Pólipo

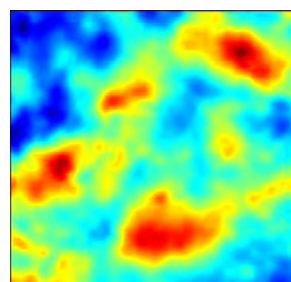


Figura 22 (c) - Tecido Carcinogênico

Os dados utilizados para a comparação tecidual foram os dados criados na fase anterior. Após a geração dos mapas de clusters (Figura 23) foram armazenados os espectros médios (Figura 24) que posteriormente serão utilizados na estatística pelo software OPUS.



Figura 23 - Mapa dos agrupamentos.

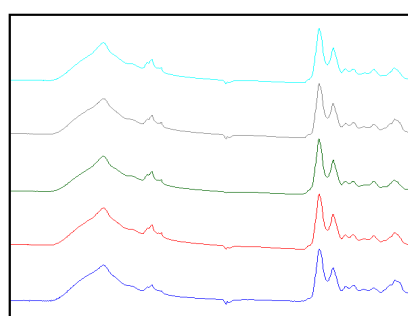


Figura 24 - Espectros médios.

Todos os espectros médios resultantes da primeira fase foram importados no software OPUS para análise estatística. O resultado obtido separa os dados por similaridade utilizando o algoritmo de Ward's (que consiste em agrupar os dados que tem características homogêneas) e são apresentados em forma de dendograma. No dendograma (Figura 25), foram excluídos da análise os espectros que não faziam parte das estruturas das amostras, como por exemplo, janela de CaF_2 , cola (utilizado no processo de corte), assim como, regiões contendo sinais de inflamações nos tecidos. Observa-se na Figura 25 uma diferenciação 100 % entre as imagens bioquímicas dos tecidos normais, pólipo e cancerígenos.

Analisando o dendograma observa-se que entre as amostras classificadas como normais dividem-se em subgrupos. A origem destes subgrupos pode ser devido a pequenas diferenças bioquímicas entre as mesmas, mas que não caracterizam significativas mudanças ao ponto de serem classificadas como outro tipo de tecido. Outro ponto importante a se salientar no dendograma é a formação de um grande subgrupo entre os tecidos pólipo e neoplásico, isso pode ser explicado pela grande similaridade que os tecidos possuem, já que o tecido pólipo em muitas vezes já está em processo de carcinogênese, o câncer já esta invadindo todo tecido saudável. Havendo assim grandes alterações bioquímicas.

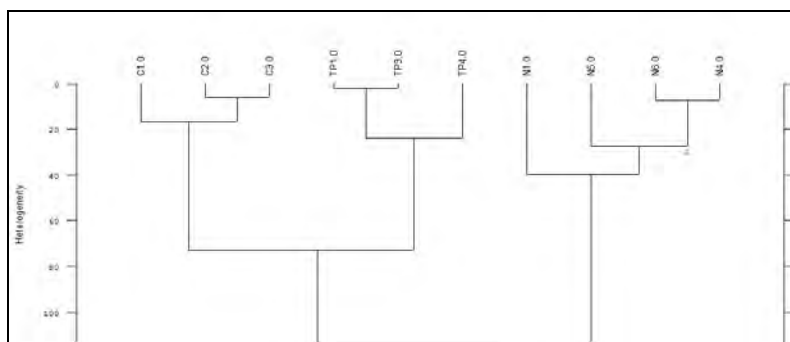


Figura 22 – Dendrograma de comparação dos tecidos N: normais, TP: pólipos e C: cancerígenos.

A terceira fase do projeto fase se baseia no estudo de todos os espectros coletados nas fases anteriores. Os espectros foram importados no software Origin para podermos compará-los, inicialmente foi visto as regiões espectrais (Figura 23) que podem caracterizar o tipo de tecido que está sendo analisado, foram demarcadas cinco regiões mais importantes neste estudo.

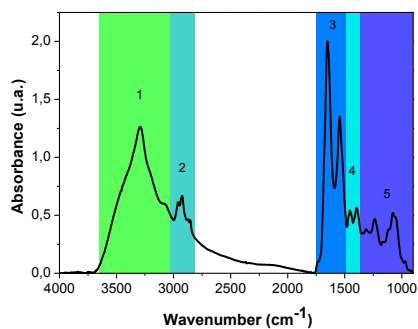


Figura 23 – Regiões espectrais escolhidas como alvo de estudo.

Para melhor visualização das diferenças espectrais entre cada tipo de tecido, foi feita uma sobreposição dos espectros do tecido normal, pólipo e tumor (Figura 24). Em cada estrutura analisada foi criada essa sobreposição, podendo assim melhor avaliar as diferenças que cada tipo de tecido possui em relação ao outro.

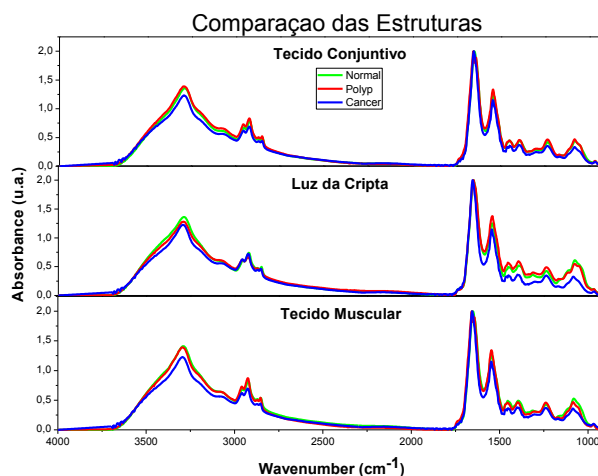


Figura 24 – Comparação dos espectros em cada estrutura do tecido.

Freq. Espectral (cm-1)	Modo Vibracional	Grupo Funcional	Tecido Normal			Tecido Polipo			Tecido Câncer		
			TC	TM	Luz	TC	TM	Luz	TC	TM	Luz
3300	vs (O-H) Hidroxila	Água	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↓	↓	↓
3200	vs (NH) Amida A	Proteínas	≈	↑	≈	≈	↑	≈	≈	↓	↓
2960	va (C-H) de -CH ₃	Lipídios/Proteínas	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓
2928	va (C-H) de -CH ₂	Lipídios/Proteínas/Carboidratos	↑	↑	≈	↑	↑	≈	↓	↓	≈
2872	vs (C-H) de -CH ₃	Lipídios/Proteínas	↑	↑	≈	↑	↑	≈	↓	↓	≈
2852	vs (C-H) de -CH ₂	Lipídios/Proteínas/Carboidratos	↑	↑	≈	↑	↑	≈	↓	↓	≈
1650	Amida I (α-hélice)	Proteínas	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
1546	Amida II (δs N-H e vs (C-N))	Proteínas	↑	↑	↑↑	↑	↑	↑↑	↓	↓	↓
1456	δa (CH ₃) e δs (CH ₂)	Proteínas/Carboidratos	↑	↑	↑↑	↑	↑	↑↑	↓	↓	↓
1400	vs (C=O), δs (CH ₃) e δa (CH ₂)	Proteínas/Carboidratos	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↑
1310-1240	Amida III	Proteínas	↑	↑	≈	↑	↑	≈	↓	↓	≈
1200-900	vs (C-O), vs (C-C), vs (C-O-C)	Carboidratos	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
1085	vs (P=O) PO ₂ ⁻	DNA/RNA/Lipídios	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑

Figura 25 – Tabela de atribuição de modos vibracionais.

Para melhor visualização das diferenças espectrais foi criado uma tabela onde contém os principais modos vibracionais envolvidos e suas respectivas atribuições, também é possível observar nesta tabela o quanto de cada tipo de ligação bioquímica está presente em cada tipo de tecido podendo assim estudar as possíveis alterações que acontecem durante o processo de carcinogênese.

Das regiões descritas acima se destaca: (a) o pico de CH₂ em 2849 e 2920 cm⁻¹, são mais intensos que os modos de CH₃ em 2960 e 2870 cm⁻¹, provavelmente devido a um processo de hipometilação durante a carcinogênese molecular; (b) Na avaliação do tecido conjuntivo foi possível observar três bandas agrupadas, uma em 1240 cm⁻¹ atribuída ao PO₂ de ácidos nucleicos e outras duas bandas em 1209 e 1285 cm⁻¹ que é atribuída ao colágeno (principal componente do tecido conjuntivo); (c) a região de 1164 a 1172 cm⁻¹, atribuídos a ligação de C-OH, esta relacionado ao processo de fosforilação induzida pela carcinogênese, pois as mudanças de C-OH em C-PO diminuem o número de pontes de hidrogênio que estabilizam os tecidos saudáveis do cólon e finalmente (d) as bandas relacionadas aos carboidratos em 1025 e 1045 cm⁻¹, cuja variação da absorção ou metabolismo dos carboidratos pode ser devido ao estágio avançado do câncer [LASCH, 2002; LASCH, 2005; CONTI, 2007; RAMESH, 2001].

Essas regiões e outras regiões são as que mais sofrem influencia do processo de carcinogênese celular. Com esses resultados, ainda que preliminares, é possível dizer que a técnica de FT-IR pode ser de grande ajuda aos patologistas em diagnósticos duvidosos e que esses resultados podem ser ainda mais estudados e aprofundados para que cada vez mais seja confiável e possa ajudar em outras pesquisas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram a potencialidade da utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho na detecção de mudanças bioquímicas que ocorrem nas células quando sofrem alterações de um estado normal para alterado. Este estudo conseguiu de maneira satisfatória correlacionar também os resultados da imagem de FT-IR com as estruturas celulares obtidas pela imagem morfológica. E que a alteração benigna sofrida pelo tecido biológico também pode ser diferenciado da alteração maligna por esta técnica. Neste trabalho também foi estudado alguns dos picos que sofrem variações de acordo com o estágio do câncer.

No futuro, pretendemos identificar mais bandas vibracionais que podem ser consideradas importantes para realizar este diagnóstico, assim como. Assim, nossos resultados preliminares mostram a potencialidade desta técnica para uma futura utilização clínica dando suporte aos patologistas em amostras de diagnósticos morfológicos duvidosos.

7. REFERÊNCIAS

- AMIALI, N. M.; Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy, 2007.
- BALDAUF, N. A.; Effect of selective growth media on the differentiation of Salmonella enterica serovars by Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy, 2007.
- CONTI, C., FERRARIS, P., VALAVANIS, C.; FT-IR microimaging spectroscopy: A comparison between healthy and neoplastic human colon tissues, 2007.
- CYTOSPEC, CytoSpec - an APPLICATION FOR HYPERSPECTRAL IMAGING. Banco de dados disponível em: <http://www.cytospec.com/index.html>.
- DÍAZ, F. R.; LÓPEZ, F. F. B. Bioestatística. ed. única São Paulo: Thomson, 57 p 2007.
- GRIFFITHS, P. R.; HASETH, J. A. Fourier Transform Infrared Spectrometry, 2. ed. Canadá: John Wiley & Sons, 529 p. 2007.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Incidência de câncer no Brasil- Estimativa/ 2010. Banco de dados disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acesso em: 25 de março. 2010.

KRAFFT, C., PELIZZO, G., SERGO, V.; Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study, 2008.

LASCH, P., HAENSCH, W., NAUMANN, D.; Characterization of Colorectal Adenocarcinoma Sections by Spatially Resolved FT-IR Microspectroscopy, 2002.

LASCH, P., NAUMANN, D., DIEM M.; Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis, 2004.

LASCH, P., NAUMANN, D., DIEM M.; Artificial neural networks as supervised techniques for FT-IR microspectroscopic imaging, 2005.

LASCH, P., NAUMANN, D.; Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues, 2006.

MACQUEEN, J.; Some Methods for Classification and Analysis of Multivariate Observations, 1967.

MAQUELIN, K., KIRSCHNER, C. L., CHOO-SMITH, N. P., VAN DEN BRAAK, H. PH. ENDTZ, NAUMANN, D., PUPPELS, G. J.; Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy, 2002.

NAUMANN, D.; Infrared Spectroscopy in Microbiology, 2000.

NAUMANN, D. Vibrational spectroscopy in microbiology and medical diagnostics. IN: LASCH, P.; KNEIPP, J. Biomedical Vibrational Spectroscopy, Canadá: John Wiley & Sons, 385 p. 2008.

RAMESH, J., SALMAN, A., MORDECHAI, S.; FTIR Microscopic Studies on Normal, Polyp, and Malignant Human Colonic Tissues, 2001.

SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. São Paulo: ED. UNESP, 244p. 1995.

SIEBERT, F.; HILDEBRANDT, P. Vibrational Spectroscopy in Life Science, Weinheim : WILEY-VCH, , 310 p. 2008.

STONE, S. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers Faraday Discuss, v.126, p.141-57. 2003.

STUART, B. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Inglaterra: John Wiley & Sons, 224 p. 2004.