

DIAGNÓSTICO ÓPTICO DE CIRROSE HEPÁTICA UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN DISPERSIVA E FT-RAMAN

*Anderson de Oliveira Lobo*¹, *Alexandre Pereira*¹, *Fernanda Maria Braga*¹, *Gabriela Ferreira*¹, *Thales Albuquerque*¹, *Antonio Balbin Villaverde*², *Anderson Eduardo Gui marães*³, *Janaína Duarte*³, *Marcos Tadeu Tavares Pacheco*³, *Airton Abrahão Martin*⁴

¹Grupo Laser, Graduação em Engenharia Biomédica. Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12244-000. Fone: +55 12 3947 9999, Fax: +55 12 3947 9999, anderson@univap.br

²Lab. de Instrumentação Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento(IP&D). Universidade do Vale do Paraíba (UniVap) Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12444-000. Fone: +55 3947 1120 Fax: +55 3947 1121, abv@univap.br.

³ Lab. de Espectroscopia Biomolecular, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D). Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12444-000. Fone: +55 3947 1120 Fax: +55 3947 1121, anders@univap.br

⁴Lab. de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&DII). Universidade do Vale do Paraíba (UniVap) Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12444-000. Fone: +55 3947 1120 Fax: +55 3947 1121, amartin@univap.br

Palavras-chave: Cirrose hepática, Tetracloreto de carbono, Espectroscopia Raman

Área de Conhecimento: III – ENGENHARIAS

Resumo - A cirrose ou hepatopatia, é uma doença que representa uma degeneração progressiva e inflamatória do fígado, sendo caracterizado por fibrose e formação de nódulos que altera a arquitetura do órgão. Cirurgias desnecessárias são feitas, devido a não diferenciação macroscópica de tecido fibroso e câncer. A espectroscopia Raman consiste em uma técnica que investiga os constituintes moleculares e estruturais, detectando modificações bioquímicas na morfologia e arquitetura celular. O objetivo deste trabalho foi comparar, tecidos hepáticos normais de cirróticos, utilizando a espectroscopia Raman dispersiva (785 nm) e Raman por transformada de Fourier (1064 nm). Utilizou-se o modelo experimental de cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCL₄) em 5 ratos machos Wistar. Houve aumento das intensidades relativas das bandas correspondentes aos aminoácidos, ácidos nucléicos, e proteínas. A espectroscopia Raman identifica alterações estruturais e metabólicas decorrentes do processo agudo de cirrose hepática.

Introdução

A função principal do fígado é a produção da bile, sendo que seus constituintes mais importantes são os ácidos biliares. O fígado funciona em muitas atividades que não estão diretamente relacionadas com o processo de digestão. Entre elas estão a produção e destruição de eritrócitos a partir da fase embrionária, removendo bactérias, através

de células de Kupffer. Este órgão também é responsável pela sintetização da protrombina, fibrinogênio e outros fatores de coagulação que são necessários para a coagulação do sangue.[1]

A cirrose ou hepatopatia, é uma doença que representa uma degeneração progressiva e inflamatória do fígado, sendo caracterizado por fibrose e formação de nódulos que altera a arquitetura do órgão. Esta alteração da morfologia do fígado bloqueia o fluxo do sangue que vem do intestino impedindo-o de atravessar o fígado e através das veias hepáticas atingir a veia cava superior e o coração, impedindo-o de fazer a síntese das proteínas [2]. As manifestações clínicas das hepatopatias levam à falência hepática dramática e rapidamente progressiva. A cirrose contabiliza cerca de 26.000 mortes por ano

Esses dados só reforçam a necessidade de um diagnóstico precoce.[3]

A espectroscopia Raman, consiste em uma técnica de biópsia óptica e apresenta várias aplicações, onde vem sendo amplamente utilizada para diagnósticos de câncer de mama, pulmão, bexiga, epiteliais, entre outros [7]. Visto que, a espectroscopia Raman investiga os constituintes moleculares e estruturais das amostras, esta técnica, permite detectar modificações bioquímicas na morfologia e arquitetura celular que ocorrem na presença de patologias. [4-6]. Já foram caracterizados hepatócitos normais e malignos utilizando a microespectroscopia Raman, detectou-se a presença de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, identificando diferenças espectrais referentes as intensidades. [8]

O tetracloreto de Carbono (CCl_4) é uma potente droga hepatóxica que ocasiona dano hepático por intermédio de radicais livres formados durante a sua metabolização – o triclorometil (CCl_3) e o triclorometilperóxil ($OOCCl_3$) [9]. Desta forma causa hepatopatias secundárias, levando à processos inflamatórios provenientes de liberação de produto pela atividade das células de Kupffer, ocorrendo o desenvolvimento de necrose e divisão significativa do aumento do número de células ED1, ED2 e TNF-alfa. Estas causas associam-se ao desenvolvimento de fibrose, levando a repetidos fenômenos necroinflamatórios no fígado. [8-12]

O objetivo deste trabalho foi a identificação de alterações hepáticas, *in vitro*, decorrentes da hepatopatia secundária, utilizando a técnica de espectroscopia Raman dispersiva e por transformada de Fourier.

Materiais e Métodos

Preparação das amostras

Utilizou-se 7 ratos machos da raça Wistar com peso aproximado de 250 g e 12 semanas de vida, divididos em dois grupos (cirróticos e normais). Para a obtenção do modelo experimental de hepatopatia, utilizou-se o tetracloreto de carbono, onde calculou-se a quantidade na proporção de 1ml/kg de peso [18]. Para o protocolo de indução, aplicou-se, via intramuscular, 0,4 ml de anestésico, Zoletil 50 (VIRBAC), no membro posterior de 5 animais (grupo cirrótico). Após

esta etapa, injetou-se via intraperitoneal, 0,15ml de tetracloreto de carbono. Após 24 horas os animais foram anestesiados e sacrificados com injeção intracardiaca Hipnol (0,4ml). Para a preparação das amostras, foram retirados aproximadamente 1 cm² do tecido hepático. Para o grupo controle utilizou-se 2 animais (normais).

Instrumentação Raman

Raman dispersivo 785 nm

O experimento foi realizado com o sistema de Espectroscopia Raman, montado em uma mesa ótica no Laboratório de Espectroscopia Biomolecular do IP&D (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento) da Universidade do Vale do Paraíba. Utiliza-se um laser de Argônio de 5W (Spectra Physics Modelo 2017-514,5 nm) para bombear um laser de estado sólido de Ti: Safira (Spectra Physics Modelo 3900S), sintonizado no comprimento de onda de 785nm na região do infravermelho próximo. Ajustou-se o equipamento a uma potência de saída do laser a 60 mW (Argônio 514 nm), onde conseguiu-se uma potência de 35 mW no porta amostra. Utilizou-se, como parâmetros de coleta, o tempo de exposição de 7 segundos, integrado a 30 acumulações consecutivas, totalizando 210 segundos de exposição da amostra ao laser. Como os espectros coletados se apresentaram em Pixels, formato não utilizado para análise, necessitou-se fazer a transformação de Pixels para Deslocamento Raman. [13]

FT-Raman 1064 nm

Utilizou-se o espectrômetro FT- Raman (BRUKER RFS/100), encontrado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Nesta técnica utiliza-se um laser de Nd:Yag com comprimento de onda de 1064 nm, e um interferograma para calcular a transformada de Fourier. Com a utilização de comprimentos de ondas maiores elimina-se a fluorescência presente em amostras biológicas.

Para a coleta dos espectros, as amostras foram posicionadas no porta amostra e o laser foi ajustado a uma potência de 100 mw de saída, registrando 77 mw na amostra.

Utilizou-se 250 scans, totalizando aproximadamente 5 minutos. Foram coletados 2 espectros por amostra, em diferentes pontos.

Resultados

Tratamento dos espectros

Para estudar os espectros coletados no sistema Raman dispersivo (785 nm), foram necessários fazer a retirada da banda de fluorescência, presente em tecidos biológicos (figura 2). Para o tratamento utilizou-se linha de correção (baseline correction) e filtro de grau 3 (smotting filter), utilizando o programa Origin 5.0. Para a análise dos espectros coletados pelo sistema FT-Raman não foram necessários tratamentos. Para as análises espectrais foram coletados dois espectros por amostra totalizando 10 espectros cirróticos e quatro espectros normais. Para a demonstração dos resultados foram calculadas as médias dos espectros.

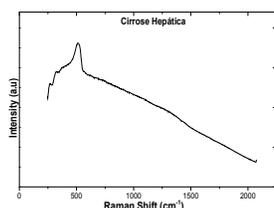


Figura 2 – Espectro original cirrótico obtido pelo sistema Raman dispersivo (785 nm).

Discussões

Para as discussões dos resultados serão apresentados os espectros, de tecidos cirróticos e normais, já tratados coletados pelo sistema FT-Raman (figura 3) e Raman dispersivo (figura 4).

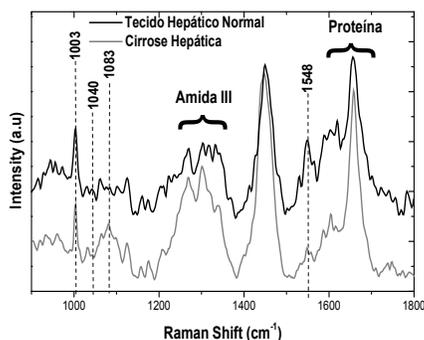


Figura 3 – Média dos Espectros Raman de tecido hepático Normal e Cirrótico, coletados pelo sistema FT-Raman.

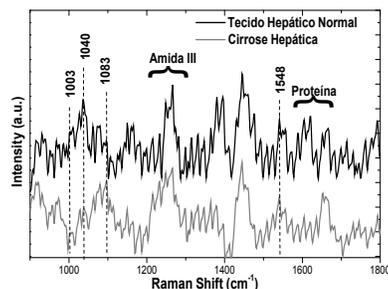


Figura 10 – Espectros Raman de cirrose hepática coletada pelo sistema Raman dispersivo.

A tabela 1 mostra os principais deslocamentos Raman referentes a compostos moleculares que sofreram alterações na região de interesse biológico.

Tabela 1 – Compostos moleculares com alteração em tecidos hepáticos normais e cirróticos.

Composto Molecular	Posição (cm ⁻¹)
Fenilalanina	1003
Resíduos de Fenilalanina	1040
DNA	1083
Lipídeos e Proteína	1122
Amida III	1200-1350
Triptofano	1548
Proteína	1600-1700

Comparando os espectros dos tecidos hepáticos normais e cirróticos, nota-se diferenças quanto às intensidades de compostos moleculares, como, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e aminoácidos. O deslocamento Raman referente a posição de 1083 cm⁻¹, está relacionado ao índice relativo de DNA. O aumento de intensidade relativo a esta faixa indica um aumento na massa de ácidos nucleicos, característicos de células neoplásicas. A perda da intensidade e ausência dos deslocamentos Raman, encontrados na região de Amida III (1200-1350 cm⁻¹) e proteínas (1600-1700 cm⁻¹), no espectro das amostras cirróticas, indicaria uma mudança na estrutura secundária da proteína ou da desordem do tecido devido a hepatopatia aguda [8]. As diferenças entre as intensidades dos aminoácidos, podem estar relacionados as diferenças do metabolismo, já que uma das causas desta patologia está relacionada a atividade enzimática. Quanto

as diferenças espectrais referentes aos sistemas Raman, podemos observar quando as amostras são excitadas no sistema Raman dispersivo (785 nm) apresentam-se espectros mais ruidosos, devido a maior absorção do tecido, se comparado ao sistema FT-Raman (1064 nm). Este efeito está relacionado ao comprimento de onda de excitação, inversamente proporcional a energia que excita as moléculas. Para amostras biológicas prefere-se utilizar comprimentos de onda maiores, pois desta forma diminuem as bandas de fluorescência, muita presentes em tecidos biológicos.

Conclusão

Com os resultados obtidos podemos concluir que o tetracloreto de carbono produz alterações fibróticas e necroinflamatórias no tecido hepático, e que a espectroscopia Raman se torna uma importante técnica de biópsia óptica, sendo capaz de identificar alterações estruturais e metabólicas decorrentes do processo agudo de cirrose hepática. Como trabalhos futuros as amostras coletadas serão enviadas para uma análise histológica e histopatológica para uma análise mais precisa das alterações. No futuro, pretende-se estudar a diferenciação entre cirrose, e câncer, pois a diferenças macroscópicas entre as duas disfunções se tornam muito semelhantes, onde desta forma poderia evitar cirurgias desnecessárias.

Referências

- [1] GRANT, A., NEUBERGER, J. GUIDELINES. On the use of liver biopsy in clinical practice. **Gut**, 45 (suppl IV), 1999;
- [2] JACOBS W. H., GOLDBERG, S. B. Statement on out-patient percutaneous liver biopsy. **Dig Dis Sci** 34:322-3, 1989;
- [3] SCHUT, T. C. B.; WOLTHUIS, R.; CASPERS, G. J. Real-time tissue characterization on the basis of in vivo Raman spectra. **J Raman Spectrosc**, v.33, n.7, p.580-585, 2002.
- [4] MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. Raman Spectroscopy for cancer detection: A review. Proceedings - **19th International Conference**, p.2722-2828, 1997.
- [5] SILVEIRA Jr. L. Correlação entre a técnica de espectroscopia raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas. 2001. 109 f. **Tese (Doutorado) - Departamento de Fisiopatologia Experimental - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP)**.

- [6] STONE, N. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. **J Raman Spectrosc**, v.33, 564-573, 2002.
- [7] Nunes, L.D.; Martin, A.A.; Silveira, L.; Zampieri, M. FT-Raman spectroscopy study for skin cancer diagnosis **SPECTROSCOPY INT. J.** 17 (2-3): 597-602 2003
- [8] HAWI S.H. ET AL. Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy. **Cancer Letters** 110 (1996) 35-
- [9] PROCTOR E, CHATAMRA K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. **Br J Exp Path** 1983;64:320-30.
- [10] SUEMATSU M, KATO S, ISHII H, ASAKO H, YANAGISAWA T, SUZUKI H, OSHIO C, TSUCHIYA M. Intralobular heterogeneity of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in perfused rat liver visualized by digital imaging fluorescence microscopy. **Lab Invest** 1991;64:167-73.
- [11] TSUKAMOTO H, MATSUOKA M, FRENCH SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. **Semin Liver Dis** 1990;10:56-63.
- [12] BERLOTTI, S.A., FERREIRA, R.A., SANTOS, R.M.M., SHIMADA, M.H.F., DUARTE, J.. Hepatopatia experimental em Coelho Analisada por Espectroscopia Raman. **IV Encontro de Iniciação Científica. UniVap**. São José dos Campos. 2000.
- [13] WOLLMAN, S.T.; BOHN, P.W.. "Evaluation of Polynomial Fitting Functions for Use with CCD Arrays in Raman Spectroscopy". **APPLIED SPECTROSCOPY**, volume 47, nº1, p125-126, 1993.