

ESTUDO DO CÂNCER DE COLO RETAL POR ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN

P. O. Andrade¹, K. Yassoyama², R. A. Bitar³, H. Martinho⁴, A. M. E. Santo⁵, P. M. Bruno⁶ e A. A. Martin⁷

^{1,2,3,4,5,7}Universidade do Vale do Paraíba -Univap / Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica,
⁶Hospital Vivalle / Departamento de Gastrologia
patriciaoandrade@yahoo.com.br

Resumo - FT-Raman spectroscopy was employed to study (*in-vitro*) normal and neoplastic human colorectal tissues aiming to evaluate their spectral differences. The samples were collected from 59 patients, adding 227 spectra for the statistical analysis. The spectra were previously separated in clusters by Cluster analysis and compared to the histopathological diagnosis in order to calculate the averaged spectrum of each group. The spectra from tissues characterized as epithelial within the normal (62) and neoplastic (35) samples were chosen in order to compare their spectral features. It was possible to differentiate normal from cancer tissues by Cluster analysis with 100% of separation. This study is relevant for future applications on optical biopsy and pathological diagnosis of human colorectal tissues.

Palavras-chave: FT-Raman, Colo retal, Câncer.

Área do Conhecimento: Engenharia

Introdução

O câncer de intestino grosso persiste como uma das neoplasias malignas de maior incidência no mundo ocidental, atingindo em maior proporção, as populações dos países em desenvolvimento. Estimativas apontam que há maior incidência deste tipo de câncer nos países em desenvolvimento. Atualmente, no Brasil, o câncer colo-retal está entre as cinco causas mais comuns de morte por câncer, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA 2006).

Entre os procedimentos para o diagnóstico de câncer de colo-retal, incluem-se o exame físico completo e cuidadoso, o toque retal, a anuscopia, a retossigmoidoscopia, o exame radiológico contrastado do intestino grosso (edema opaco), a biópsia via colonoscopia e o estudo histopatológico da lesão. Entretanto, a biópsia convencional apresenta, como principal desvantagem, a necessidade de remoção do tecido a ser analisado, o qual, por vezes, envolve riscos para o paciente. (Stone et al. 2003). Entre outras desvantagens, pode ser citado o longo tempo de análise e possíveis alterações dos resultados induzidos pelo armazenamento inadequado do tecido biopsado. O exame histopatológico é um método de julgamento subjetivo e depende, freqüentemente, do nível individual de experiência e habilidade do patologista (Stone et al. 2003).

A biópsia óptica surge como nova proposta para o diagnóstico de câncer. Dentre as técnicas ópticas, destaca-se a espectroscopia Raman, que é baseada no espalhamento inelástico da luz provocado pelas moléculas que constituem o tecido biológico estudado. Por meio desta técnica, podem-se obter informações bioquímicas e

estruturais da amostra sem a necessidade de sua remoção cirúrgica, possibilitando uma análise minimamente invasiva da lesão (Yamasaki et al.). Entre outras vantagens, destacam-se a ausência de qualquer tipo de preparação prévia do tecido a ser analisado, o diagnóstico pode ser obtido em tempo real, permitindo o início do tratamento terapêutico mais precocemente, e é uma técnica de análise não-destrutiva.

Ultimamente, vários trabalhos na área biomédica têm sido realizados utilizando-se a espectroscopia Raman como ferramenta para o diagnóstico de lesões tissulares, análise dos componentes sanguíneos, estudo de células, entre outros (Baena et al 2004 e Choo-Smith et al. 2001). O incremento no número de aplicações e publicações científicas nesta área tem sido promovido em função dos avanços tecnológicos em opto - eletrônica. No presente trabalho, foi utilizado a técnica de espectroscopia FT-Raman no estudo *ex vivo* de tecidos do intestino grosso humano neoplásico e normal. Este trabalho representa um estudo preliminar para a formação de um banco de dados espectrais para futura aplicação em biópsia óptica e diagnóstica de alterações em tecidos de colo-retal. Espera-se que, num futuro próximo, esta técnica possa ser utilizada como um importante instrumento de diagnóstico de doenças no corpo humano e contribua, de sobremaneira, na detecção precoce do câncer de intestino grosso.

Materiais e Métodos

Este estudo foi executado segundo os princípios éticos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução no 196/96 do

Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (CEP/UNIVAP). Todos os pacientes foram informados sobre a pesquisa e assinaram um termo de consentimento para utilização dos materiais colhidos como amostras para pesquisa científica

Coleta das amostras: As amostras de tecidos constituíram-se de fragmentos de mucosa colônica normal e alterada removidos de pacientes de ambos os sexos e de diversas etnias e faixas etárias. Estes pacientes foram submetidos à colonoscopia e cirurgia de ressecção em colaboração com instituições hospitalares. Foram coletadas 20 amostras de adenocarcinoma de cólon e 39 amostras de cólon humano normal para este estudo. Os elementos da biópsia foram seccionados em duas partes, sendo a primeira encaminhada para avaliação histopatológica e a segunda encaminhada aos ensaios de espectroscopia FT-Raman.

Armazenamento das amostras: As amostras encaminhadas à espectroscopia Raman foram devidamente limpas com soro fisiológico a 0,9 % e armazenadas em frascos criogênicos Nalgene® de 1,2 ml imediatamente após a remoção cirúrgica. Os frascos foram enumerados e identificados de acordo com o protocolo da instituição doadora. Em seguida, foram armazenados em reservatório de nitrogênio líquido (- 196 °C) visando à preservação e manutenção de todas as estruturas teciduais do fragmento, até o momento da análise espectroscópica. Com a finalidade de prevenir a degradação dos espécimes biológicos quando expostos ao ambiente, o descongelamento das amostras foi feito em soro fisiológico a 0,9% e realizado somente no momento do experimento.

Espectroscopia FT-Raman: Foi utilizado o espectrômetro FT-Raman RFS 100, Bruker Inc., para aquisição dos espectros Raman das amostras. Este equipamento está instalado no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB) do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba (IP&D-Univap). As amostras foram excitadas por um laser Nd: YAG em 1064 nm, com potencia incidente de 270 mW na amostra. Os sinais Raman foram coletados por um detector de Germânio resfriado por nitrogênio líquido. Os espectros foram obtidos após 300 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹. Foram medidos de três a cinco pontos diferentes de cada amostra, totalizando 62 espectros de tecido colônico normal e 35 espectros de tecido neoplásico.

Os espectros FT-Raman obtidos foram tratados utilizando-se o software MINITAB VS. 14.20 e o software OPUS® VS. 4.2. Utilizando-se as ferramentas estatísticas de ambos os softwares, foi então realizado, inicialmente, um tratamento dos espectros por linha de base e normalização na

região de 1445 cm⁻¹. Esta banda corresponde ao modo de deformação da ligação do grupo metileno (C-H). Após este tratamento foi feita a separação estatística dos espectros por meio da clusterização por *Average Linkage*. As análises estatísticas foram baseadas nas variações de intensidade, deslocamento da posição e surgimento de novas bandas nos espectros de tecidos normais e alterados. Os resultados espectrais e histopatológico foram confrontados para realizar o agrupamento das amostras

Resultados

Os espectros de tecidos normais foram agrupados em três grandes grupos - normal 1, normal 2 e normal 3, que foram caracterizados histopatologicamente, como se podem verificar pelo dendograma da Figura 1. Os espectros que compõem o Grupo Normal 1 (um) são provenientes amostras de tecido adiposo e conjuntivo frouxo. Os espectros que compõem o Grupo Normal 2 (dois) são provenientes de tecido epitelial normal do colo-retal e tecido conjuntivo interpapilar. Já os espectros que compõem o Grupo Normal 3 (três) apresentaram tecidos de epitélio papilar e conjuntivo adjacente, mais tecido muscular liso.

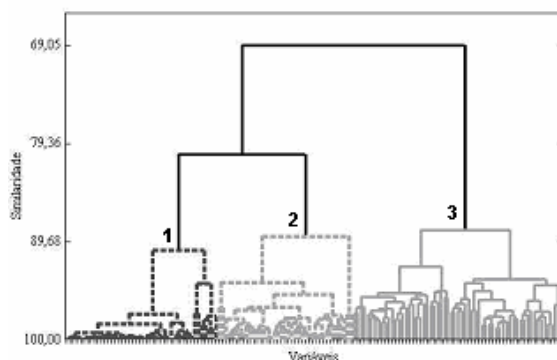


Figura 1: Dendograma representativo da Clusterização por Average Linkage dos espectros de colo normal

O estudo para a determinação do espectro FT-Raman característico do tecido de colo-retal normal para cada grupo foi feito previamente por Andrade et. al 2006. Para o presente estudo, foram escolhidos os espectros integrantes do grupo normal 2 (dois), ou seja, majoritariamente tecido normal epitelial (Figura 2) para análise comparativa com o tecido alterado.

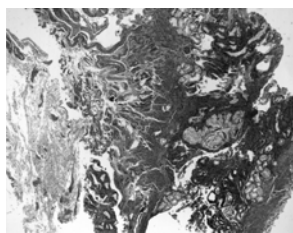


Figura 2: Lâminas histológicas do grupo normal 2 com diferentes aumentos, respectivamente de 5X e de 40x .

Da mesma forma, foram realizadas análises estatísticas para a caracterização dos tecidos diagnosticados como adenocarcinoma. O dendograma da Figura 3 mostra a separação dos espectros destes tecidos em vários subgrupos. O grupo que melhor representa o tecido epitelial, mostrado na Figura 4, foi o grupo Adenocarcinoma 1 (um).

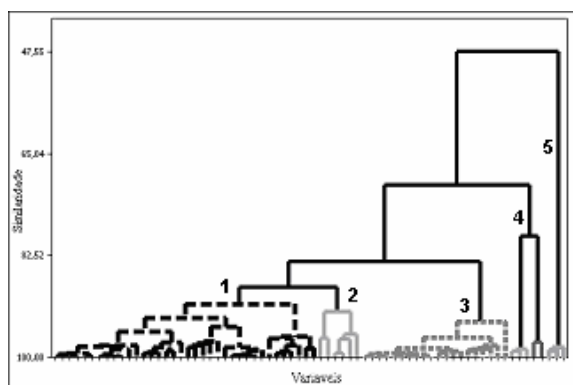


Figura 3: Dendograma representativo da Clusterização por Avarage Linkange dos espectros de adenocarcinoma.

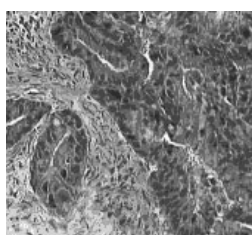


Figura 4: Lâmina histológica do grupo adenocarcinoma 2, tecido epitelial neoplásico abundante.

É importante ressaltar que, para cada subgrupo normal e adenocarcinoma encontrado, foram descritos diferentes tipos de tecidos.

Os espectros do grupo normal 2 (dois) e do grupo adenocarcinoma 1 (um) considerados mais característicos para o estudo, foram então analisados estatisticamente e agrupados por meio de diagrama de clusters a fim de se avaliar a variação espectral encontrada entre esses espectros. Foi utilizado o mesmo método de

separação feito anteriormente para os tecidos normais. A distância espectral foi determinada pela distância euclidiana.

Os espectros foram separados em dois grupos principais como apresentado no dendograma da Fig 5.

Foram excluídos dos agrupamentos, os espectros que apresentaram distância espectral superior a 0,35, considerados provenientes da variação tecidual entre os indivíduos, porém não aceitáveis para a construção de um banco de dados espectrais de determinado tipo de estrutura histológica. Este valor representa um nível de similaridade de cerca de 85%, ou seja, foram excluídos dos agrupamentos espectrais os espectros com similaridade inferior a 85%. A média espectral foi, portanto, somente realizada após a exclusão destes espectros, obtendo-se um padrão espectral para as estruturas morfoquímicas do tecido. A figura 6 mostra o espectro médio das amostras de tecido de coloretal epitelial normal e neoplásico.

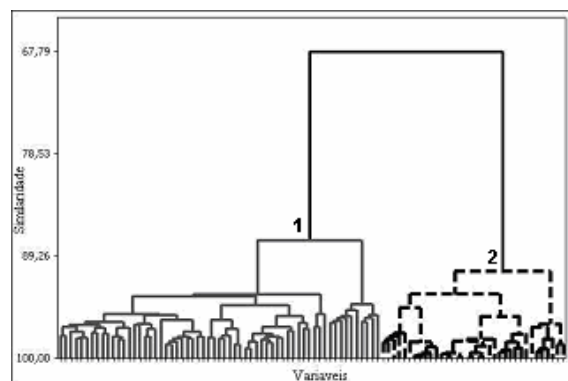


Figura 5: Dendograma representativo da Clusterização por Avarage Linkange do grupo normal 2 com o grupo adenocarcinoma 1.

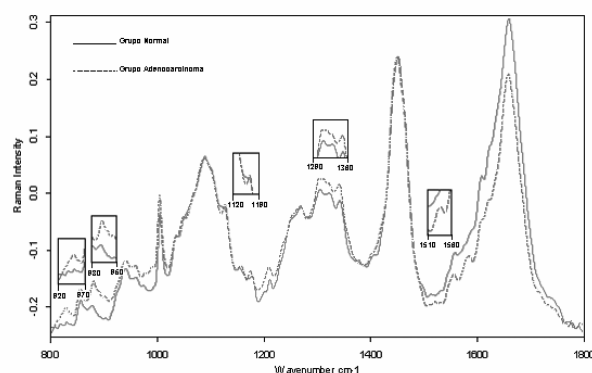


Figura 6: Espectros médios do grupo normal 2 e adenocarcinoma 1, ressaltando suas diferenças espectrais

Cada amostra analisada pela espectroscopia FT-Raman, neste estudo, foi, imediatamente após

a realização das medidas, fixada em solução de formaldeído 10% e enviada para análise histológica dos espécimes a fim de se obter uma descrição das estruturas teciduais predominantes.

Discussão

A Tabela 1 apresenta os modos vibracionais relacionados aos picos e bandas encontrados no tecido colônico. Pela observação desta tabela é possível entender as diferenças bioquímicas evidenciadas pelos espectros Raman em função do tipo tecidual analisado por estudo histopatológico.

Foi observado um pequeno deslocamento das intensidades e posições dos picos das componentes moleculares análogas às encontradas no tecido normal. Andrade e colaboradores (2006) caracterizaram e agruparam diferentes regiões teciduais do colo-normal por processos de clusterização evidenciando suas principais características morfoquímicas.

Tabela 1 – Posição dos picos e regiões correspondentes

Posição do Pico	Região correspondente
1657	Amida I e α - hélice
1449	$\delta(\text{CH}_2\text{-CH}_3)$
1338	$\delta(\text{CH}_2)$
1247	$\delta(\text{CH}_2)$
1209	Amida III
1126	Tyr, fosfolipídios.
1084	$\nu(\text{C-N})$
1053	$\nu(\text{C-N})$
1032	Fosfolipídios $\nu(\text{C-H})$
1003	Fosfolipídios $\nu(\text{C-C})$ simétricos
937	$\nu(\text{C-C})$ cadeia α - hélice

A mesma abordagem de estudo em outros tipos de tecido foi realizada por Huang e colaboradores (2003) que estudaram carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas de tecidos bronquiais. Os autores observaram grande diferenciação entre tecidos normais e neoplásico. Bitar e colaboradores (2006) identificaram diferenças espectrais significativas em 9 tipos de tecidos neoplásicos mamários e demonstraram que é possível separar lesões benignas dos carcinomas intraductais e lobulares. Yamasaki (2004) e colaboradores demonstraram que esta técnica apresenta 91% de sensibilidade e 97% de especificidade na detecção de câncer de pulmão.

Conclusão

Comparando-se as diferenças espectrais destes tecidos, foi possível evidenciar as principais diferenças espectrais do tecido de colo retal humano. Este estudo permite considerar a

espectroscopia Raman como um importante instrumento de diagnóstico rápido e não-invasivo na detecção do tipo tecidual analisado, podendo ser uma importante ferramenta na detecção precoce do câncer de colo-retal

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e à Fapesp pelo suporte financeiro, agradecem também o Hospital Vivalle pelo fornecimento das amostras.

Referências

1. P. O. ANDRADE. Study of Non-Altered Colorectal Tissue by FT-Raman Spectroscopy, q-bio.TO/0607001. Disponível em <http://arxiv.org>, Acesso em: 15 Agosto. 2006
2. BAENA J.R, LENDI, B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p.534-39. 2004
3. BITAR, R.A. Biochemical analysis of human breast tissues using FT-Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, accepted "in press" (q-bio.TO/0603037). 2006
4. CHOO-SMITH. Medical applications of Raman spectroscopy: From proof of principle to clinical implementation. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, v. 67, n. 1,p.1-9. 2001
5. HUANG, Z. "Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues" **International Journal of Oncology**, v. 23, p.649-55. 2003
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Secretaria Nacional de Assistência a Saúde, Instituto Nacional do Câncer – INCA (2006), "Câncer de colo-retal". Disponível em <http://www.inca.org.br>. Acesso em: 28 abril 2006.
7. MONTGOMERY, E. Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: A reaffirmation **Human Pathology**, v. 32, n. 4, p. 368-78. 2001
8. STONE, S. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers **Farady Discuss**, v.126, p.141-57. 2003
9. YAMASAKI, H. The diagnosis of lung cancer using 1064-nm excited near-infrared multichannel Raman spectroscopy **Radiation Medicine**, v. 21, n. 1, p.1-6. 2003