

# ANÁLISE DO TECIDO DA GLÂNDULA TIREÓIDE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

**Caroline Silveira Barros Teixeira<sup>1</sup>, André Bandieira de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Marco Aurélio Vamondes Kulcsar<sup>1</sup>, Celso Ubirajara Moretto Friguglietti<sup>1</sup>, Herculano S. Martinho<sup>1</sup>, Airton A. Martin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Av. Shishima Hifumi 2911 Urbanova CEP 12244-000 São José dos Campos Fone +55 12 3947-1165, [carolsbt@uol.com.br](mailto:carolsbt@uol.com.br), [andre\\_bandieira@yahoo.com.br](mailto:andre_bandieira@yahoo.com.br), [kulcsar@uol.com.br](mailto:kulcsar@uol.com.br), [frigugli@uol.com.br](mailto:frigugli@uol.com.br), [hmartinho@univap.br](mailto:hmartinho@univap.br), [amartin@univap.br](mailto:amartin@univap.br)

**Resumo-** O diagnóstico definitivo das lesões que acometem o tecido da glândula Tireóide geralmente é realizado por punção aspirativa por agulha fina (PAAF). O objetivo deste trabalho é demonstrar a viabilidade de diagnóstico de câncer de tireóide pela técnica de Espectroscopia Raman. Neste piloto, foram analisadas duas amostras com tecido normal da Tireóide e duas amostras de carcinoma Folicular tipo insular. Os resultados preliminares mostraram que existe a possibilidade de diferenciar estes dois tipos de tecidos através da Espectroscopia Raman. Análise da intensidade relativa dos picos vibracionais de cada componente químico foi realizada e observou-se que o carcinoma Folicular apresentou maior intensidade na banda formada por Cisteína, PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Amida I ao passo que o tecido normal da Tireóide obteve maior intensidade na banda de Amida III.

**Palavras-chave:** Câncer de Tireóide; Punção Aspirativa por Agulha Fina; Espectroscopia Raman

**Área do Conhecimento:** Engenharia Biomédica

## Introdução

A tireóide é considerada o órgão de maior função endócrina. A secreção dos hormônios tireóideos exerce importante função para o crescimento e desenvolvimento normais, além de contribuir na homeostasia, produção de calor e energia. Alterações na síntese e secreção dos hormônios tireóideos podem acarretar retardo no crescimento, doenças vasculares, disfunções pulmonares e renais, constipação crônica, alterações no sistema neuromuscular, sintomas referentes ao sistema nervoso central, anemia, entre outras patologias associadas. Dentre as lesões que acometem este órgão, o câncer tem se destacado como um dos problemas mais importantes e de difícil diagnóstico.

O câncer da glândula tireóide é a neoplasia mais comum do sistema endócrino. Estas lesões são classificadas em diferenciadas (papilífero e folicular), não diferenciadas (anaplásicos) e medulares, sendo os carcinomas papilíferos os mais frequentemente observados, seguidos pelos foliculares. Em apenas 10% dos casos de carcinomas diferenciados de baixo risco ocorre recidiva tumoral e 2% das pessoas podem vir a falecer. Já os casos de alto risco permitem sobrevivência de 10 anos, variando de 0% a 60%, são os carcinomas indiferenciados, que pode ter consequência de doença incontrolável no pescoço com invasão de estruturas nobres, e ocorre frequentemente pouco tempo após o diagnóstico.

O câncer de tireóide corresponde a cerca de 1% de todas as neoplasias humanas. Em 2001,

19.500 novos casos de carcinoma da tireóide foram diagnosticados nos Estados Unidos. No Brasil, o câncer de tireóide representa 4,5% das neoplasias nas mulheres e 0,9% no sexo masculino. A incidência de câncer de tireóide tem aumentado nos últimos anos, principalmente pelo diagnóstico precoce.

Um estudo feito pela Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2005 avaliou a incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil calculadas dentro de um período de 20 anos (1980-1999). Analisando sete cidades do Brasil verificou-se que o primeiro grupo formado por Belém, Porto Alegre, Recife e Salvador, apresentavam menores taxas de incidência. São Paulo e Distrito Federal se destacam por apresentarem as maiores taxas. Goiânia apresentou um valor situado entre esses dois grupos extremos. A variabilidade das taxas de incidência entre locais deve estar relacionada a variações na cobertura dos Registros de Câncer de Base Populacional, assim como na disponibilidade e acesso a recursos diagnósticos e terapêuticos.

A melhora nos métodos de imagem nos últimos anos, é um fator importante devido ao aumento do diagnóstico de nódulos tireoidiano. Como consequência, está cada vez mais comum o diagnóstico de nódulos pequenos, não evidentes ao exame clínico.

Geralmente, procedimentos invasivos como a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), Core Biopsy® ou biópsias cirúrgicas são implementadas para promover diagnóstico definitivo das lesões do

tecido da glândula Tireóide, porém em 80% dos casos estas biópsias são realizadas em tecidos com alterações benignas que geralmente não possuem características morfológicas malignas. O número médio recomendado de procedimentos de PAAF para se obter amostra adequada de nódulos palpáveis tem sido três vezes de diferentes áreas da lesão, mas ocasionalmente, até seis punções podem ser necessárias.

Assim, a eficácia da PAAF depende da experiência em selecionar e aspirar nódulos palpáveis para se obter esfregaços com celularidade representativa, preparação adequada dos esfregaços, como fixação e coloração e finalmente, conhecimento e familiaridade com a histopatologia de lesões tireoidianas.

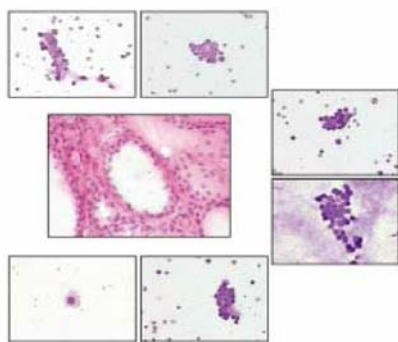


Figura 1- Imagens do tecido da tireóide para diagnóstico histopatológico (SCHULTZ,2002)

A figura 1 demonstra imagens do tecido intacto da tireóide material extraído da glândula por PAAF e uma imagem grande do câncer celular. É possível verificar claramente a dificuldade de se determinar as anormalidades morfológicas do tecido pelo exame citopatológico, o patologista precisa ter muita experiência para rastrear e diferenciar as estruturas observadas.

O texto exposto acima, ressalta mais uma vez a importância dos meios de diagnóstico tanto no período pré-operatório como no pós-operatório, fator este de grande influência para se determinar condutas e prognósticos, sujeitos freqüentes de controvérsias quanto à abordagem clínica. Devido a todos estes inconvenientes fica evidente a necessidade de se desenvolver um novo método de diagnóstico.

Todas as doenças, sem exceção, são causadas por mudanças na bioquímica celular e/ou dos tecidos. O corrente desafio da medicina moderna é o de encontrar uma técnica analítica que investigue estas alterações por métodos minimamente invasivos e não-destrutivos. Poucos métodos analíticos satisfazem esses requerimentos e são sensíveis o suficiente para revelar detalhes de composição e estrutura. Dentre as novas técnicas que se tem recentemente sido apresentadas, a Espectroscopia Raman é uma das mais

promissoras, visto que alterações microscópicas podem ser detectadas por espectroscopia óptica pelos sinais característicos da doença.

KRAFFT C. et al. elaborou um artigo descrevendo diferentes aplicações biomédicas utilizando FT-Raman na última década. Os espectros vibracionais com focos de imagens e métodos foram discutidos neste estudo em tecidos mineralizados (ossos, dentes), pele, tecidos cerebrais, trato gastrointestinal (boca, esôfago, cólon), tórax, artérias, cartilagens, colo do útero, trato urinário, próstata, bexiga, tecido ocular, fígado, coração e baço. Foi possível demonstrar as possibilidades e perspectiva destes métodos com vasto campo para biodiagnósticos, detectando e caracterizando doenças, tumores e outras patologias.

Estudo realizado por NUNES et al. 2003, demonstrou que a espectroscopia FT-Raman é adequada para aplicações em peles humanas. Foram analisadas 39 amostras de pele, dentre elas, 18 amostras diagnosticadas como peles normais e 21 amostras diagnosticadas como malignas e observou-se diferenças espectrais entre os tecidos normais e malignos pela intensidade dos modos vibracionais (picos) com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 83% (6). Em outro estudo realizado por BITAR et al. 2005, avaliou o diagnóstico vibracional molecular de doenças mamárias, com um total de 859 espectros, incluindo diagnósticos como tecido mamário normal, alterações funcionais benignas da mama (AFBM), fibroadenoma (FBD), neoplasia intra-epitelial ductal e diferentes tipos de carcinomas mamários.

Um estudo prático realizado na China por LIU et al. 2005, investigou tecidos da tireóide, pulmão, ovário, cervical e tecido uterino. A Tireóide e o tecido uterino exibem maior número de bandas Raman que os demais tecidos analisados, enquanto o tecido pulmonar e cervical não demonstrou nenhuma banda. Consideráveis diferenças foram percebidas entre o tecido normal da Tireóide e o câncer folicular com picos de  $1.585$  e  $1.634 \text{ cm}^{-1}$ . Entretanto, outras lesões de tireóide não foram estudadas como, por exemplo, as lesões benignas.

Tendo em vista a alta aplicabilidade de espectroscopia Raman no diagnóstico de doenças humanas assim como, a necessidade de complementar os estudos de Tireóide existentes na literatura, o objetivo deste piloto é demonstrar a viabilidade de diagnóstico das lesões malignas e benignas da Tireóide pela técnica de Espectroscopia Raman.

## Metodologia

Para este estudo piloto, foram coletadas duas amostras de tecidos da tireóide após procedimento

cirúrgico (Tireodectomia) contendo: tecido normal da Tireóide e carcinoma Folicular tipo insular (NºH281/CEP/2007).

Após a remoção cirúrgica, as amostras ficaram armazenadas em tubos criogênicos Nalgene® mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento da análise pelo espectrômetro FT-Raman no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) em São José dos Campos, São Paulo.

Antes da análise espectral, as amostras foram descongeladas em soro fisiológico (0,9%) em temperatura ambiente. Depois cortada em fragmentos utilizando o bisturi lâmina número 15 e posicionada na porção central do porta-amostra de alumínio para proceder a leitura no espectrômetro. O laser Nd:YAG em 1064nm foi utilizado como energia de excitação no espectrômetro FT-Raman. Obteve-se 6 espectros, 3 espectros referentes ao tecido normal da Tireóide e 3 referentes ao carcinoma Folicular. Os espectros foram submetidos à “clusterização”, através do software MINITAB® Release 14.20, as medidas espectrais foram então normalizadas pelo pico de 1.462  $\text{cm}^{-1}$ . Em seguida foram analisados os componentes principais dos espectros, para determinar o potencial discriminativo dos sinais Raman coletados.

## Resultados

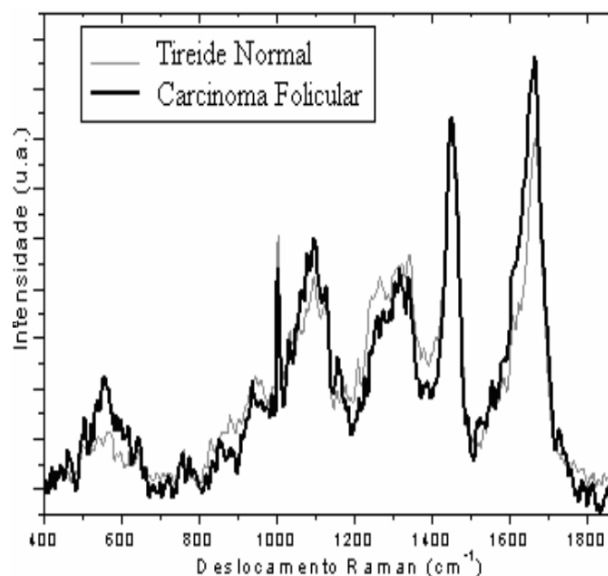


Figura 2 – Espectro Raman do tecido da Tireóide normal e carcinoma Folicular. Linha cinza representa o espectro da Tireóide normal e linha preta carcinoma Folicular.

Na tabela 1, associamos a frequência vibracional dos modos Raman e suas respectivas identificações.

Tabela 1- Espectro FT-Raman e sua especificação biológica.

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Interações
520 -540	S-S
1102	$> \text{PO}_2^-$
1230 - 1295	Amida III
1440 - 1460	C-H def
1650-1680	Amida I

Pela análise dos Espectros Raman obtidos na figura 2, verifica-se que o pico formado pela banda de 520 à 540  $\text{cm}^{-1}$ , apresentou-se com maior intensidade no carcinoma Folicular que no tecido normal da Tireóide. Outra região importante é o pico formado por carbono peptídeo (vibrações amida III) entre 1230 à 1295  $\text{cm}^{-1}$  com maior intensidade no tecido normal da Tireóide que no carcinoma Folicular. A banda de 1650 à 1680  $\text{cm}^{-1}$  forma outra ligação carbono peptídeo (Amida I) com menor intensidade no tecido normal se comparado com carcinoma Folicular. Ou seja, através da análise dos compostos bioquímicos e a intensidade contida em cada lesão representada no espectro. Observa-se a existência de diferenças espectrais entre os dois tipos de tecidos.

## Discussão

Os resultados da comparação da intensidade relativa dos modos vibracionais entre tecido normal de Tireóide e o carcinoma Folicular tipo insular mostram importantes diferenças que podem ser associadas a alterações bioquímicas do tecido. Na região, por exemplo, de 510 à 550  $\text{cm}^{-1}$  correspondente as ligações químicas de dissulfeto (Cisteína) o espectro Raman do carcinoma Folicular apresenta-se com maior intensidade. Entretanto, fica evidente que uma melhor separação se dará através de análises multivariadas de vários espectros Raman dos dois tecidos de diferentes pacientes. A identificação de algum marcador bioquímico poderá ser identificada por esta técnica. Uma análise dos modos vibracionais do DNA poderá ser suficiente para fornecer uma boa separação entre os diferentes tipos de lesões de tireóide.

Claramente, observa-se que na comparação da Figura 1 com a Figura 2 o diagnóstico por biópsia óptica seria mais simples, e acima de tudo, menos propenso a erro humano sendo capaz de fornecer grandes dados na identificação dos compostos químicos do tecido.

## Conclusão

Foi possível discriminar pela Espectroscopia Raman o tecido normal da Tireóide e carcinoma Folicular tipo insular pela análise da intensidade dos picos vibracionais de cada substância ou agrupamento químico, o carcinoma Folicular apresentou maior intensidade na banda formada por Cisteína, PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Amida I e o tecido normal da Tireóide teve uma maior intensidade na banda de Amida III.

Como foi possível discriminar o carcinoma Folicular do tecido normal da Tireóide futuramente será realizado um novo estudo para diferenciar os demais tipos de câncer que acometem a Tireóide. Também se prevê que, com auxílio da fibra óptica de forma minimamente invasiva, o estudo do tecido da tireóide possa ser feito rapidamente com alta confiabilidade sem necessidade da remoção da estrutura analisada.

O avanço da medicina está diretamente relacionado com a diminuição da incidência e mortalidade das doenças e quanto mais preciso e precoce for o diagnóstico, melhor será a condição de tratamento e cura.

## Referências

- BITAR, R.A. **Estudo de Tecido Mamário Humano por Espectroscopia FT-Raman**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.

- KRAFFT, C et al. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. **Spectroscopy-an International Journal**, v.20, nº 5-6, p.195-218, 2006.

- LIU, G et al. Raman spectroscopic study of human tissues. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v.25, nº5, p.723-725, 2005.

- NUNES, L.O. **Estudo do carcinoma basocelular ex vivo por espectroscopia FT-Raman**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.

- SCHULTZ, C.P. The potential role of fourier transform infrared spectroscopy and imaging in cancer diagnosis incorporating complex mathematical methods. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v.1, nº2, p.95-104,2002.