

ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN *IN VIVO* PARA ESTUDO DE LESÕES MAMÁRIAS EM MODELO ANIMAL.

**Carolina S. Carvalho¹, Bruno T. Gonçalves¹, Renata A. Bitar¹, Mário A. S. Martins¹
Dayana G. Ribeiro¹, Herculano da Silva Martinho¹, Airton. A. Martin^{1**}**

¹Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
UNIVAP - Universidade do Vale do Paraíba
Av. Shishima Hifumi, 2911 CEP: 12244-000 – São José dos Campos, SP, Brasil
Tel: (12) 3947-1165 Fax: (12) 3947-1165 e-mail: amartin@univap.br**

Resumo - Espectroscopia Raman foi utilizada na investigação e monitoramento dos compostos bioquímicos das glândulas mamárias no intuito de desenvolver um procedimento de diagnóstico clínico reprodutível e não-invasivo. Entretanto, apesar dos diversos avanços na área de espectroscopia óptica, ainda existe a necessidade de se obter um procedimento de avaliação de lesões cancerígenas sem a necessidade de remoção das mesmas, ou seja, *in vivo*. Este trabalho é um dos primeiros a utilizar a espectroscopia Raman para estudo de tecidos mamário *in vivo*, o qual pode levar a uma possível detecção de lesões em tempo-real de uma maneira não-invasiva. Neste piloto foram obtidos espectros Raman de tecido glandular mamário normal de um rato Wistar fêmea com auxílio de fibra óptica, de maneira transcutânea e diretamente na glândula. Observou-se similaridade dos espectros glândulares obtidos das duas formas, bem como sua correspondência bioquímica com os espectros de tecido glândular mamário humano sem alterações obtido *in vitro*. Estes resultados mostram o potencial desta técnica para futuras aplicações clínicas de diagnóstico *in vivo*.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, Mama, *Biópsia Óptica, In Vivo*.
Área do Conhecimento: Engenharias.

Introdução

A espectroscopia Vibracional tem sido utilizada cada vez mais no estudo de tecidos biológicos. Análises espectrais têm revelado importantes informações a níveis microestruturais e moleculares. A utilização da espectroscopia Raman *in vitro* e *ex vivo* tem mostrado o potencial desta técnica para detectar e diagnosticar diferentes tipos de lesões.

Recentemente, vários estudos tem sido publicados na tentativa de realizar, por espectroscopia Raman, o diagnóstico de lesões *in vivo* (HAKA AS et al. 2006; KRISHNA CM et al., 2006; MATOUSEK P et al. 2006; CHRIT L et al., 2006; MOTZ JT et al. 2005; L. CHRIT et al., 2005 J. T. MOTZ et al. 2004). O diagnóstico Raman *in vivo* permite uma análise não destrutiva, sendo que, a natureza aquosa do tecido não interfere nas medidas. As medidas não requerem preparação prévia das amostras, além de que, é uma técnica que pode fornecer o diagnóstico em tempo real. A aplicação clínica desta técnica possui grande relevância tecnológica e social podendo, inclusive, ser utilizado em ambientes cirúrgicos.

Atualmente a investigação da glândula mamária para existência de um tumor é realizada através de exames periódicos, como a palpação mensal, feita pela própria paciente e pela avaliação médica, através de exames físicos e principalmente através da mamografia. Visto que,

aproximadamente, 80 % das biópsias de mama confirmam um processo de patologias benignas, avanços técnicos que permitam um diagnóstico *in situ* minimamente invasivo e mais acurado são essenciais. Estes avanços técnicos poderiam, por exemplo, reduzir custos evitando cirurgias desnecessárias e minimizando danos físicos aos pacientes. Por essas razões, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se desenvolver um procedimento clínico eficiente, reprodutível e não-invasivo para investigação e monitoramento das glândulas mamárias. (BITAR *et al.*, 2006).

Neste desenvolvimento, a espectroscopia Raman tem se mostrado como uma ferramenta bastante importante para avaliação de tecidos neoplásicos. As informações obtidas por esta técnica são extremamente importantes para o desenvolvimento de uma biblioteca espectral e estudos para o desenvolvimento de algoritmos de análise para classificação diagnóstica. Porém, para utilização desta técnica na rotina clínica, diversas etapas de estudo devem ser cumpridas, afim que se desenvolva uma metodologia e equipamentos economicamente e tecnologicamente acessíveis.

A fim de atingir este objetivo realizamos o estudo piloto de medidas Raman *in vivo* em glândulas mamárias normais. Este procedimento teve por objetivo verificar a viabilidade de caracterização do espectro do tecido mamário

através da pele, viabilizando a metodologia de aquisição do sinal de maneira não-invasiva.

Materiais e Métodos

Para este estudo de espectroscopia Raman *in vivo*, foi utilizada uma rata albina (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem EPM-1 Wistar, pesando em torno de 280 g oriunda do Laboratório de Farmacodinâmica da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP. O animal foi mantido sob regime de alimentação (ração Nuvital CR-1) e água *ad libitum*. O animal foi anestesiado com mistura de xilazina com ketamina (Calmium® e Dopalen®) 0,1 ml de cada uma, por via intraperitoneal. O animal permaneceu anestesiado por todo o procedimento. Após a coleta dos sinais Raman, o animal foi sacrificado através de injeção intracardíaca de 3 ml de Cloreto de Potássio (KCl). Esta pesquisa teve aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) (A022/2006/CEP).

O equipamento utilizado para este procedimento foi o Espectrômetro FT-Raman RFS 100, Bruker Optics (Alemanha) acoplado o acessório *RamProbe*, necessário para as medidas *in vivo*, como pode ser observado nas Figuras 1 e 2.



Figura 1. Espectrômetro FT-Raman RFS 100 (Bruker Optics – Alemanha).



Figura 2. *RamProbe* para experimento *in vivo* e os óculos de proteção para infravermelho, indispensável para a proteção do operador.

Para a coleta das medidas espectrais da mama, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica,

imobilizado e a remoção dos pelos do animal na região mamária, foi realizada com auxílio de pinça, para que não houvesse influência dos mesmos, no espectro Raman obtido. Este processo não comprometeu o tecido cutâneo nem o mamilo do animal, e o sinal Raman foi obtido posicionando o *RamProbe* sobre a pele da mama, centralizando o foco do *RamProbe* no mamilo do animal obtendo desta forma, espectros Raman de quatro regiões diferentes da glândula mamária.

A seguir foi realizado um procedimento cirúrgico para exposição das glândulas mamárias. O sítio foi exposto através do rebatimento do retalho cutâneo, através de uma incisão inicial realizada medialmente em relação à mama, seguido de descolamento do mesmo até a exposição completa da glândula mamária. Expondo as glândulas mamárias, o *RamProbe* pôde coletar os espectros do tecido mamário sem interferência do sinal da pele de maneira similar ao procedimento transcutâneo.

Para aquisição dos espectros Raman *in vivo*, o *RamProbe* deve ser posicionado verticalmente em relação ao objeto a ser analisado. Ajustado a melhor posição do animal e operador para essa aquisição. Para os dois procedimentos, os parâmetros ajustados foram os mesmos, sendo potência do *laser* de Nd:YAG utilizada de 400 mW de saída do equipamento, chegando na amostra aproximadamente 175 mW focado e 300 varreduras, mantendo o *RamProbe* em contato direto com o tecido para melhor ajuste focal.

Para finalidade analítica, os dados tiveram a linha de base corrigida, em função da fluorescência e foram normalizados vetorialmente, através do software OPUS, próprio do sistema FT-Raman RFS 100, Bruker.

Resultados

A Figura 3 mostra o espectro Raman obtido *in vivo* de duas glândulas mamárias de rato Wistar fêmea, transcutâneamente e invasivamente sem nenhum pré-processamento. Observa-se nesta figura a existência de uma pequena auto-fluorescência proveniente do tecido biológico, a qual não chega a interferir na detecção e resolução das bandas Raman, mostrando a eficácia da radiação de 1064 nm em eliminar este efeito mesmo em experimentos *in vivo*. A fim de realizar um estudo comparativo entre as medidas transcutâneas e invasivas, a auto-fluorescência foi removida e os espectros resultantes normalizados vetorialmente (Figura 4). Observa-se a excelente razão sinal-ruído dos espectros obtidos nas duas condições. Apesar dos espectros transcutâneos apresentarem um nível de ruído maior que os obtidos invasivamente, a identificação dos picos não foi prejudicada.

Observa-se na Figura 4, a similaridade dos espectros Raman obtidos não invasivamente com os obtidos invasivamente. Este fato mostra que, devido à penetração do *laser* na pele do animal, o sinal Raman das glândulas mamárias sobrepõem-se aos emitidos pela pele do mesmo. Este resultado é importante, pois mostra a possibilidade de diagnóstico transcutâneo de lesões de uma maneira não-invasiva.

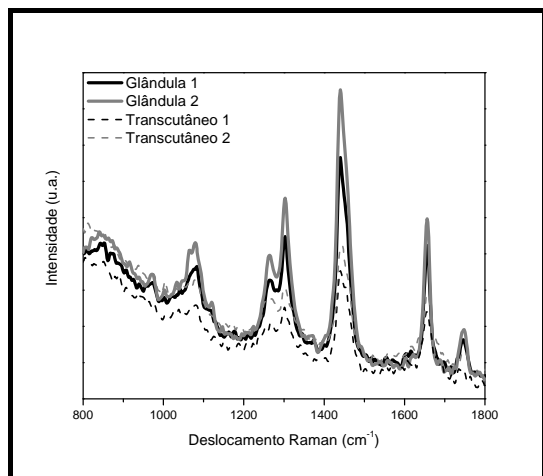


Figura 3. Espectros FT-Raman *in vivo* de tecido mamário de rato Wistar fêmea. Os espectros glandulares representam os dados obtidos diretamente sobre a glândula mamária, exposta cirurgicamente, e os espectros transcutâneos representam os dados obtidos do tecido mamário coletados de maneira não invasiva. Os espectros se apresentam sem nenhum pré-processamento.

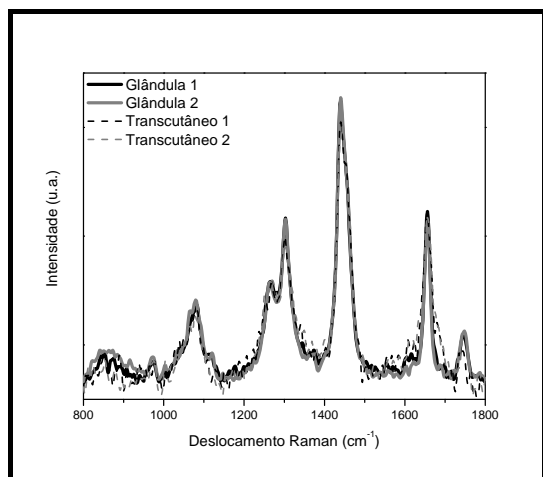


Figura 4. Espectros FT-Raman *in vivo* de tecido mamário de rato Wistar fêmea. Os espectros se apresentam com linha de base corrigida e normalizados vetorialmente, na região espectral de 800 a 1800 cm^{-1} .

A fim de comparação, mostramos na Figura 5 a média de trinta espectros Raman de tecido mamário humano normal obtido pelo mesmo sistema Raman (FT-Raman Bruker). Estes espectros foram coletados a partir de amostras *ex vivo* deste tecido obtidas de pacientes submetidas

a mamoplastia redutores. As amostras foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido até o momento da espectroscopia FT-Raman. As condições experimentais do espectrômetro ajustadas para a coleta deste espectros, foram bastante similares às condições ajustadas para o procedimento *in vivo*, sendo 300mW de potência de saída do *laser*, chegando na amostra aproximadamente 250mW, e 300 varreduras por ponto. Desta forma, os espectros podem ser comparados relacionando a similaridade bioquímica entre as diferentes glândulas mamárias.

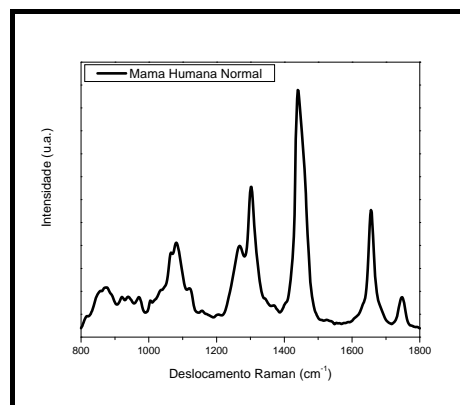


Figura 5. Espectro FT-Raman *ex vivo* de mama humana normal. Espectro se apresenta com linha de base corrigida e normalizada vetorialmente na região de 800 a 1800 cm^{-1} . Média de trinta espectros obtidos de biópsia de duas pacientes mulheres voluntárias.

Discussão

Comparando as bandas Raman de maior intensidade com a identificação apresentada na Tabela 1, observamos a predominância de lipídios presente nos tecidos mamários normais, como encontrado anteriormente nos resultados *ex vivo*. (Bitar *et al.* 2006) Este resultado esta de acordo com a constituição bioquímica predominante nos tecidos mamários normais de células contendo grande quantidade de gordura citoplasmática aliada ao fato de que, comparado com os outros constituintes bioquímicos da mama, os lipídios possuem um seção de espalhamento Raman maior. Na Figura 5, observa-se claramente que a relação sinal-ruído dos dados obtidos pelo sensor de fibra óptica é compatível com o obtido pelo sistema *ex vivo*, mostrando assim, a viabilidade técnica da utilização da espectroscopia Raman através de fibras ópticas.

Tabela 1 - Modos Vibracionais e Biomoléculas referentes picos Raman de tecido mamário.

Picos	Frequência (cm^{-1})	Modos Vibracionais	Biomoléculas
1	1060 - 1090	ν (C—C) ou ν (C—O), (—CH	Fosfolipídios, Carbohidratos

		OH)	
2	1270	ν (CN), δ (NH), Amida III, α -helix, (=C—H)	Colágeno, Triptofano, Lipídios
3	1304	δ (CH ₂), (δ CH ₃)	Colágeno, Fosfolipídios, Triglicérides
4	1446	δ (CH ₂), δ (CH ₃), (O—P—O)	Colágeno, Fosfolipídios, Desoxirribose, Carboidratos
5	1657	ν (C=O), Amida I, α -helix, (C=C)	Colágeno, Elastina, Lipídios
6	1747	ν (C=O)	Fosfolipídios

Conclusão

Neste estudo piloto, mostramos a possibilidade de utilizar a espectroscopia Raman de uma maneira não-invasiva para obter informações da estrutura bioquímica em tecidos mamários. Salientamos que este é um dos primeiros trabalhos a utilizar a espectroscopia Raman *in vivo* para estudo de tecidos mamários. A aquisição dos espectros Raman através dessa metodologia sugere o potencial de aplicação desta técnica para o uso clínico com possibilidade de detecção de lesões em tempo-real de uma maneira não-invasiva.

Observamos grande similaridade entre os componentes bioquímicos animais e humanos. Esta similaridade poderá ser utilizada na continuidade deste projeto. A indução de câncer de mama em modelo animal poderá fornecer conhecimento de como esta técnica poderá ser aplicada em um diagnóstico precoce de neoplasias mamárias.

Agradecimentos

AAM agradece à FAPESP (2001/14384-8) e ao CNPq (302393/2003-0) e RAB agradece à FAPESP (2005/58565-7) pelo suporte financeiro oferecido para desenvolvimento deste projeto e ao laboratório farmacodinâmico pela doação de animal.

Referências

Bitar R.A., Martinho, H., Tierra-Criollo, Carlos Julio, Ramalho, L. N. Z., Mourão Neto, M., Martin, A. A. Biochemical analysis of human breast tissues using FT-Raman spectroscopy. JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS. , 11 (5): Art. No. 054001 SEP-OCT 2006.

Chrit L, Bastien P, Sockalingum GD, et al. An *in vivo* randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: Assessment of a glycerol-based

hydration cream. SKIN PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY 19 (4): 207-215 2006.

Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, et al. *In vivo* margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. CANCER RESEARCH 66 (6): 3317-3322 MAR 15 2006.

J. T. Motz, M. Hunter, L. H. Galindo, J. A. Gardecki, J. R. Kramer, R. R. Dasari, M. S. Feld, Optical fiber probe for biomedical spectroscopy, APPLIED OPTICS, Vol: 43, no. 3, 2004.

Krishna CM, Prathima NB, Malini R, et al. Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix VIBRATIONAL SPECTROSCOPY 41 (1): 136-141 MAY 30 2006.

L. Chrit, C. Hadjur, S. Morel, G. Sockalingum, G. Lebourdon, F. Leroy, M. Manfait, *In vivo* chemical investigation of human using a confocal Raman fiber optic microprobe, J. BIOMED. OPT., Vol: 10, no. 4, 2005.

M. G. Shim, L. M. Wong Kee Song, N. E. Marcon, B. Wilson, *In vivo* near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy, PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG., Vol: 72, no. 1, pp. 146-150, 2000.

Matousek P, Draper ERC, Goodship AE, et al. Noninvasive Raman Spectroscopy of human tissue *in vivo* APPLIED SPECTROSCOPY 60 (7): 758-763 JUL 2006.

Motz JT, Gandhi SJ, Scepanovic OR, et al. Real-time Raman system for *in vivo* disease diagnosis. JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS 10 (3): Art. No. 031113 MAY-JUN 2005.