

DISCRIMINAÇÃO DOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO ADENOCARCINOMA MAMÁRIO EM MODELO ANIMAL POR ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN E IMUNOHISTOQUÍMICA

Dayana Gonçalves Ribeiro¹, Renata Andrade Bitar², Mário Augusto Martins³, Edson Aparecido dos Santos⁴, Carolina Carvalho⁵, Leandra Náira Zambelli Ramalho⁶, Herculano da Silva Martinho⁷, Kumiko Koibuchi Sakane⁸, Airton Abrahão Martin⁹

¹ Faculdade de Ciências da Saúde, Biomedicina, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, 12.244-000, Fone/Fax: +55 12 3949 1165, dayanagoncalves@yahoo.com.br

^{2,3,4,5,9} Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, 12.244-000, Fone/Fax: +55 12 3947 1165

rabc@univap.br, marioaugustomartins@hotmail.com, amartin@univap.br

⁶ Departamento de Patologia, FMRP, Universidade de São Paulo – USP, Brasil, 14049-900, Fone: +55 16 3602 3122
lramalho@fmrp.usp.br

⁷ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC – UFABC, Brasil, 09090-400
herculano.martinho@ufabc.edu.br

⁸ Laboratório de Biofísica Teórica, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, 12.244-000, Fone/Fax: +55 12 3947 1141
kumiko@univap.br

Resumo - A tecnologia Raman vem sendo estudada desde a década de 90 com o objetivo de desenvolver um método de diagnóstico rápido confiável e não invasivo. Tendo em vista o índice de incidência do câncer de mama no mundo, a agressividade de alguns subtipos destas neoplasias e as técnicas de diagnóstico, surge o interesse de contribuir para o banco de dados de tal tecnologia. Atualmente, em pesquisas laboratoriais, a Espectroscopia Raman fornece um gráfico espectral do deslocamento do comprimento de onda incidente pelas moléculas constituintes da amostra, ou seja, uma espécie de impressão digital do tecido em estudo, possibilitando o diagnóstico. O objetivo do trabalho é analisar os espectros dos adenocarcinomas identificados histologicamente na tentativa de classificar as diferenças bioquímicas constituintes dos subtipos encontrados, e com o auxílio da técnica de imunohistoquímica classificar o grau de malignidade do tumor. O adenocarcinoma mamário foi induzido em ratos fêmea de acordo com BARROS et al. (2004). Os espectros Raman foram obtidos e analisados de acordo com PENTENADO et al. (2008). A análise dos espectros foi realizada pela PCA e CLA.

Palavras-chave: Análise Espectral Raman, Técnicas e Procedimentos de Laboratório, Análise Estatística.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum entre toda a população mundial, com um índice de sobrevivência média de 61 % após cinco anos. No Brasil há um risco estimado de 53 casos a cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2006). Atualmente para a confirmação diagnóstica utilizam-se métodos baseados em padrões morfológicos.

Na busca de novos métodos de diagnóstico Keller et. al. (2006) mostraram que a Espectroscopia Raman é uma ferramenta promissora para diagnóstico não invasivo por meio da aplicação da técnica no diagnóstico de quatro tipos de tecido: pele, mama, trato gastrointestinal e cérvix. Haka et. al. (2005) empregaram a espectroscopia Raman para diagnosticar lesões benignas e malignas de mama humana baseados na composição química, e os resultados demonstraram que a espectroscopia Raman tem o potencial para a aplicação *in vivo*.

Atualmente, na literatura, existem vários trabalhos que utilizam a espectroscopia óptica na análise *in vitro* de vários tipos de tecidos malignos e benignos. Entretanto experimentos Raman *in vivo* são mais escassos devido as grandes

dificuldades que a técnica impõe. Assim experimentos que utilizam modelos experimentais de indução de carcinogênese, são particularmente importantes para o estudo da aplicabilidade da espectroscopia óptica no diagnóstico de câncer. O modelo animal, parece ser uma forma cientificamente aceitável de se encarar os primeiros desafios a serem superados, visto que as glândulas mamárias dos ratos mimetizam as doenças mamárias humanas (RUSSO, 1996, COSTA, 2002).

Tendo em vista que os estudos de câncer de mama por Espectroscopia Raman em modelo animal sejam extremamente amplo, este estudo teve por objetivo avaliar e discriminar os subtipos histológicos do adenocarcinoma mamário em modelo animal por meio da espectroscopia FT-Raman associada a imunohistoquímica.

Metodologia

Vinte ratos fêmeas Sprague-Dawley foram utilizados neste estudo, sendo 5 ratos do grupo controle e 15 ratos do grupo experimento. No segundo grupo os tumores mamários foram induzidos por dose única de 50 mg de DMBA (7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene) como descrito

por BARROS et al. em 2004. Aproximadamente 10 semanas após a gavagem, foram encontradas lesões mamárias únicas ou múltiplas nas ratas submetidas à gavagem com DMBA e as medidas Raman foram iniciadas.

Primeiramente foram adquiridos espectros Raman *in vivo* (MARTINS, 2007). Em seguida os animais foram sacrificados e as glândulas mamárias, sadias e com tumores foram removidas, identificadas e guardadas em tubos criogênicos Nalgene Systems®, e armazenadas em Nitrogênio líquido (-196°C) para análise *ex vivo* pela técnica de espectroscopia FT-Raman. Todos os espectros Raman neste experimento foram obtidos por meio do software OPUS (Copyright® Bruker Optik GmbH 1997-2002) e também armazenados e convertidos para o formato ASCII para que os dados se tornassem compatíveis com os softwares Origin® 7.0 SR0 e Minitab® 15.1.0.0. I para realização do pré-processamento e análises matemáticas dos espectros (BITAR et al., 2006).

Todo fragmento utilizado para as medidas FT-Raman foram preparados para análise histopatológica por coloração HE. As amostras foram classificadas de acordo com a graduação Scarff-Bloom-Richardson (SBR) (COSTA et al., 2002). A análise imunohistoquímica foi realizada para caracterização da metaloproteínase MMP19 (Metalotioneína) segundo metodologia descrita por VENEZIANO et al. (2008).

Para o pré-processamento, todos os espectros foram submetidos à correção de linha de base e normalização vetorial (ANDRADE et al. 2007) Análise dos Componentes Principais (PCA) e a Análise de Cluster (CLA) foram aplicadas como algoritmo de classificação dos espectros Raman na região de deslocamento de 500 a 1800 cm^{-1} . (MARTINHO et al., *in press*).

Resultados e Discussão

Os estudos de espectroscopia vibracional dos tumores mamários de modelo animal atualmente baseiam seus resultados e desenvolvem sua metodologia de classificação dos espectros baseados no esquema modificado de Scarff-Bloom-Richardson. Como o intuito deste estudo foi desenvolver conhecimento para futura utilização da Espectroscopia Raman *in vivo* em humanos, optou-se por basear a classificação dos tumores de modelo animal apresentados no estudo de COSTA e colaboradores (2002). Por essa razão, após a indução por DMBA optou-se em comparar as lesões humanas e dos ratos simultaneamente, estabelecendo as similaridades e as diferenças entre estes, favorecendo a validação do modelo experimental para extrapolação dos resultados na carcinogênese mamária em humanos, sob uma perspectiva histológica.

A Mama Normal (Figura 1A) consiste em parênquima epitelial, suportado por elementos de estroma e tecido muscular, associados a tecido gorduroso, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. A Hiperplasia Mamária (Figura 1B) se caracteriza pela proliferação de células epiteliais acima da membrana basal para o interior de ductos mamários. A maioria dos Adenocarcinomas encontrados apresenta padrão arquitetural cribiforme (Figura 1C), papilar (Figura 1D) e sólido (Figura 1E), com padrão estrutural misto predominantemente papilar, mostrando uma aparência histológica complexa.

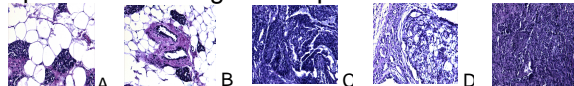


Figura 1(A-E). Fotomicrografia de fragmentos de mama. Coloração H&E. Aumento 20 vezes.

Os resultados ilustrados pela coloração da MMP19 nas amostras de Mama Normal, Hiperplasia Mamária, Adenocarcinoma Cribiforme, Papilar e Sólido (Tabela 1), mostram que esta proteína sem alterações está presente nos tecidos normais e na doença benigna da mama, e que as alterações começam a desaparecer nos estados patológicos malignos.

Tabela 1. Resultado a Imunohistoquímica (Coloração MMP 19)

Tipo Histológico	MMP 19
Mama Normal	+++
Hiperplasia Mamária	+++
Adenocarcinoma Cribiforme	++
Adenocarcinoma Papilar	+
Adenocarcinoma Sólido	+

Atualmente não há trabalhos em Espectroscopia Raman que tenham realizado estudos comparativos entre os resultados de um ensaio imunohistoquímico e as alterações características entre espectros Raman dos tecidos analisados. Neste estudo, com o objetivo de encontrar tais características nos espectros, estes foram divididos por meios do grupo histológico e graduação da marcação da MMP19, como descrito na tabela 1. Nestes grupos foram realizadas as médias dos espectros Raman onde os gráficos a seguir representam os dados espectrais das regiões de deslocamento Raman de 500 a 1800 cm^{-1} (Figura 2)

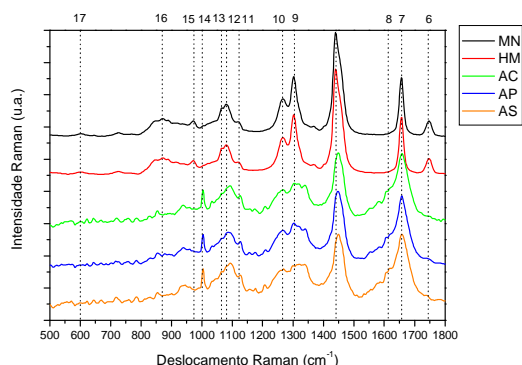


Figura 2. Médias dos espectros FT-Raman de Mama Normal (MN), Hiperplasia Mamária (HM), Adenocarcinoma Cribiforme (AC), Papilar (AP) e Sólido (AS) no deslocamento Raman de 500 a 1800 cm^{-1} . As linhas pontilhadas numeradas (1-17) auxiliam na identificação dos modos vibracionais relevante dos tecidos biológicos (Tabela 1).

Em primeira análise, foram observadas grandes diferenças entre os espectros de mama normal e a demais patologias: entre a região de 500 a 1800 cm^{-1} os espectros da mama normal se apresentam bem definidos, com alta intensidade, com os picos definidos e finos, mostrando que existem muitos modos vibracionais de estiramento, com liberdade de movimento. A essa característica pode ser aferido que as ligações expressas pelos modos vibracionais estão desimpedidas, favorecendo uma possível agregação com uma molécula mais estável.

Biologicamente, a mama normal é em sua maioria composta por tecido gorduroso, o que corrobora com os achados espectrais acima descritos. No processo de carcinogênese, uma das principais alterações encontradas, e espectralmente reconhecidas, é a reação desmoplásica, onde o tecido gorduroso é substituído por um estroma fibroso, com alto conteúdo de colágeno. Diversas outras alterações metabólicas podem ser descritas, como toda alteração protéica que interferem nas funções celulares conferindo a cada um dos tipos de doença características particulares de crescimento e agressividade. As alterações das funções protéicas no processo tumoral são amplamente estudadas por meio de ensaios de imunohistoquímica. Estes ensaios têm por objetivo particularizar as características de cada doença, para individualização do tratamento, melhorando o prognóstico do paciente. Os resultados imunohistoquímicos são realizados por meio da reação de uma única proteína, por ensaio, dificultando a observação do processo de alterações protéicas da doença como um todo. Encontrar características comuns a todas as alterações protéicas decorrentes das alterações no processo tumoral pode vir a ser uma alternativa complementar no entendimento deste processo. Desta forma, neste estudo, foram observadas diversas características nos espectros dos tecidos doentes que identificam as alterações protéicas que corroboram com o conhecimento biológico. Por meio da Tabela 2 podem ser observados os principais modos vibracionais encontrados para a Mama Normal, que corroboram com achados de outros estudos de espectroscopia Raman em tecido mamário, embora humano (BITAR et al., 2006). Ao atribuir as contribuições dos modos vibracionais ao espectro médio da Mama Normal, inicia-se o estudo sobre o padrão espectral padrão para mama de Sprague-Dawley. Esta etapa se mostrou relevante, pois a partir do entendimento do espectro "Normal" foi possível correlacionar as

alterações espectrais aos achados fisiopatológicos do processo de carcinogênese.

Tabela 2. Identificação dos modos vibracionais em função do deslocamento Raman para a Mama Normal no deslocamento Raman entre 500 a 1800 cm^{-1} .

Deslocamento Raman (cm^{-1})	
Mama Normal	Modos Vibracionais
~1746 w	$\nu\text{C}=\text{O}$ do grupo lipídio
~1656 s	$\nu\text{C}=\text{O}$ do grupo Amida I (proteínas) e/ou $\nu\text{C}=\text{C}$ do grupo lipídio
~1440 VS	$\delta_s\text{CH}$ do grupo $-\text{CH}_3$ e/ou $\delta_s\text{CH}$ do grupo $-\text{CH}_2$ (scissors)
~1303 s	Amida III (proteínas) e/ou $\delta_s\text{CH}$ (olefinas)
~1266 s	Amida III (proteínas) e/ou $\nu_s\text{PO}_2$ do grupo fosfato
~1120 s	$\nu\text{C}-\text{O}$ (Ribose - RNA)
~1080 s	$\nu_s\text{PO}_2$ do grupo fosfato
~1065 sh	$\nu_s\text{PO}_2$ do grupo fosfato e/ou $\nu\text{C}-\text{C}$ do grupo lipídio (tail)
~1004 w	$\nu\text{C}-\text{C}$ do anel aromático em ressonância com γCH da fenilalanina (somente em tecidos malignos)
~971 w	$\nu\text{C}-\text{C}$ do aminoácido prolina (colágeno)
~870 w	$\delta\text{C}-\text{H}$ do aminoácido hidroxiprolina (colágeno)
~600 vw	Pode trazer informações dos modos normais referentes ao DNA

A lesão benigna estudada, a hiperplasia mamária é uma alteração benigna da mama que dificilmente culminará em um tumor. Como pode ser observada nos espectros a característica de normalidade não se perdeu completamente. As diferenças podem ser encontradas como são observados os picos e neles se notam dubletes, tripletes ou mesmo multipletes, que identificam que conjugações com moléculas maiores estão ocorrendo, impedindo que os movimentos vibracionais sejam realizados com a amplitude nos espectros normais.

Grandes alterações nos espectros dos Adenocarcinomas podem ser observadas quando comparados os espectros ao tecido normal e à hiperplasia mamária. Nota-se, a primeira vista, a perda de características das bandas definidas, dando lugar a bandas mais largas formadas por vários picos. Essa grande alteração pode ser atribuída a alteração desmoplásica, sendo que nestes tecidos tumorais o colágeno aparece predominantemente. Desta forma, foi possível estabelecer, estatisticamente, as diferenças entre os espectros do tecido normal, de hiperplasia mamária e de adenocarcinoma. Entretanto, é muito importante que se estabeleça a diferença entre os tipos arquiteturais do adenocarcinomas encontrados neste estudo e identificar as atribuições dos modos vibracionais das lesões para inferir as alterações destes modos vibracionais, visando estabelecer uma descrição bioquímica sobre as alterações fisiopatológicas.

Para verificar a robustez das observações dos espectros inferidas aos espectros acima descritas e possibilitar a classificação dos espectros, foram realizadas análises estatísticas por meio de um algoritmo composto por ferramentas de análises multivariadas, sendo Análise de Cluster (CLA) com

90% de similaridade, a partir dos resultados da análise dos Componentes Principais (PCA). Foram obtidos três grupos distintos: Mama Normal (MN), Hiperplasia Mamária (HM) e Adenocarcinomas (A) (que não se distinguiram em seus subtipos). Como mostra o Dendrograma da Figura 3.

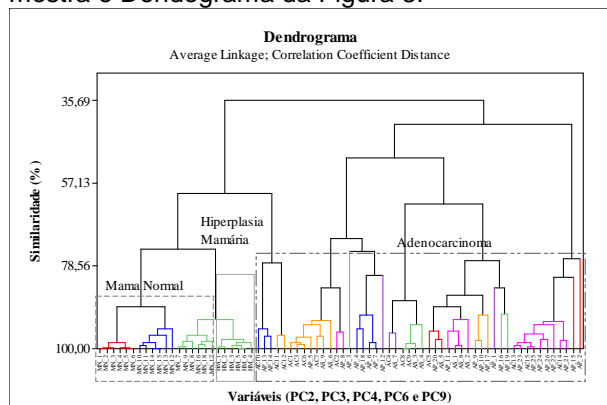


Figura 3. Dendrograma (CLA) dos espectros de MN, HM e AD (Cribiforme, Papilar e Sólido).

Por meio desta figura foi possível observar que os agrupamentos obtidos para mama normal e para hiperplasia mamária tiveram aproximadamente 70 % de similaridade, sendo que os espectros de HM foram agrupados juntamente com alguns dos espectros de MN, embora tenham sido agrupados juntos, favorecendo a classificação entre lesão benigna e mama normal. Os adenocarcinomas claramente foram separados outros dois grupos, embora não tivesse sido subclassificados corretamente. Isso pode estar relacionado ao fato de que a aplicação da PCA no conjunto total de espectros não tenha sido sensível para estabelecer os componentes principais que pudessem diferenciar estes subgrupos.

A classificação dos subgrupos de adenocarcinoma mamário é importante porque determina, em situações clínicas reais, o prognóstico do paciente. Transferindo essa situação para esse estudo, deve-se trabalhar com possibilidade de análise e classificação dos dados, pois ainda existem informações espectrais que não foram totalmente exploradas. Quando aplicado o algoritmo de classificação PCA e CLA, as características consideradas pertencem ao conjunto de dados analisados. Desta forma, quando foram comparados todo o conjunto de espectros (MN, HM, e AD) as diferenças que foram evidenciadas foram àquelas relacionadas aos aspectos de benignidade e malignidade, tornando ainda muito mais sutis as diferenças existentes entre os subtipos histológicos dos AD.

Conclusão

Considerando os relevantes achados acima descritos, por meio das primeiras impressões sobre das análises dos espectros FT-Raman das amostras *ex vivo* de tecido mamário de ratos, foi

possível afirmar que houve discriminação entre os espectros de mama normal e de hiperplasia dos espectros de adenocarcinoma mamário. Aparentemente, existem indícios estatísticos, resultantes das análises dos espectros, que favorecem a subdivisão dos tipos histológicos do adenocarcinoma. Esses indícios associados achados imunohistoquímicos (MMP19) poderão culminar na identificação de um padrão espectral que indique o grau de agressividade do tumor mamário em ratos. Por conseguinte, este trabalho poderá ser utilizado como referência metodológica para análise de variados tipos de tecido, possivelmente em humanos.

Referências

- ANDRADE, P. O, et al., "Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy", *Anal Bioanal Chem*, v.387, p.1643-1648, 2007.
- BARROS, A. S. D.; et al. "Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene", *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo* v. 59, n. 5, p. 257-261, 2004.- BITAR, R. A., H. D. S. Martinho, et al. "Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy", *Journal of Biomedical Optics*, v.11, n.5, Sep-Oct, p.8, 2006.
- COSTA, I., et al. "Histopathologic Characterization of Mammary Neoplastic Lesions Induced With 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene in the Rat", *Arch Pathol Lab Med*, v.126, August, p. 915-927, 2002.
- HAKA, A. S.; Shafer-Peltier, K. E; et al. "Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.35, Aug, p.12371-12376, 2005.
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – Estimativas|2006. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2005.
- KELLER, M. D.; Kanter, E. M.; et al., "Raman spectroscopy for cancer diagnosis", *Spectroscopy*, v.21, n.11, Nov, p.33-41, 2006.
- MARTINHO, H., et al., "Role of cervicitis in the Raman-based optical diagnosis of cervicalintraepithelial neoplasia", *J. Biomed. Opt.*, in press.
- MARTINS, M. A. S. "Espectroscopia Raman diferencial", *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, UNIVAP. 2008.
- PENTEADO, S. C. G., et al., "Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier transform-Raman spectroscopy", *J. Biomed. Opt.* v.13, p.014018, 2008.
- RUSSO, H. I., "Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies", *Environmental health perspective*, v.104, n.9, September, p.938-967, 1996.
- VENEZIANO, S. G. et al., "Effect of thalidomide on the healing of colonic anastomosis, in rats", *Acta Cir. Bras.*, v.23, n.1, p.17-23, 2008.