

## ANÁLISE DE CÓLON POR IMAGEAMENTO NO INFRAVERMELHO

**J. L. Rangel<sup>1</sup>, L. Raniero<sup>1</sup>, C. S. P. Lima<sup>2</sup>, C. Oliveira<sup>2</sup>, R. A. Canevari<sup>1</sup>, J. Ferreira<sup>1</sup>, J. A. A. C. Piva<sup>1</sup>, A. A. Martin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UNIVAP/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, Brasil

<sup>2</sup>UNICAMP/Departamento de Clínica Médica, Campinas, Brasil

**Resumo-** O cólon é a maior porção do intestino grosso sendo responsável pela absorção da água das fezes, tornando-as consistente. Este órgão pode ser alvo de várias doenças como adenomas, adenocarcinomas, diverticulose e colite ulcerosa, entre outras. Atualmente existem alguns tipos de diagnóstico, tais como: toque retal, colonoscopia e biópsia com o estudo histopatológico da lesão. Mas são métodos que além de demorados, são invasivos. A espectroscopia no infravermelho vêm como uma nova metodologia para detecção precoce com a vantagem de não ser invasiva.

**Palavras-chave:** Imageamento por Infravermelho, FT-IR, medicina moderna, técnicas ópticas

**Área do Conhecimento:** Engenharia Biomédica

### Introdução

O intestino grosso ou erroneamente chamado de *cólon* é a parte final do tubo digestivo. Nele distinguem-se três partes: o ceco, onde desemboca o intestino delgado e em que existe um prolongamento em forma de tubo chamado apêndice vermiforme; o cólon que se distingue em três partes: colo ascendente ou direito, o colo transverso, que atravessa a cavidade abdominal da direita para a esquerda, e o cólon descendente ou esquerdo e o reto, que se comunica com o exterior através do orifício anal, apresenta uma dilatação chamada ampola retal, cujo alargamento desencadeia o ato de defecação. O ânus encontra-se fechado por um músculo chamado esfíncter anal, situado à sua volta, em forma de anel. No intestino grosso os alimentos não digeríveis são acumulados, sendo-lhes absorvida a água. Também é aí que são armazenadas as fezes, antes de serem evacuadas. O cólon é a maior porção do intestino grosso sendo responsável pela absorção da água das fezes, tornando-as consistente. Este órgão pode ser alvo de várias doenças como adenomas, adenocarcinomas, diverticulose e colite ulcerosa, entre outras (INCA 2010).

Atualmente existem alguns tipos de diagnóstico, tais como: toque retal, exame radiológico contrastado com o intestino grosso, colonoscopia e biópsia com o estudo histopatológico da lesão. Esses métodos, porém, além de invasivos necessitam de vários dias para fornecerem os resultados, desta forma retardando o tratamento do indivíduo. A medicina moderna busca novas técnicas de diagnósticos que possam ser menos traumáticas para o paciente e com a possibilidade de fornecer o resultado em tempo real. Dentre as técnicas que estão sendo

estudadas, destaca-se a de espectroscopia óptica. Cujas principais vantagens quando comparada a histologia convencional, é a possibilidade de realizar uma análise bioquímica das alterações moleculares ao invés da análise morfológica. Dentre as técnicas ópticas aplicadas para este fim, a de imageamento por infravermelho próximo, tem recentemente sido utilizada com sucesso no estudo de várias lesões (KRAFFT, C., 2008; LASH, P., NAUMANN, ET AL., 2004; LASH, P., NAUMANN, D. 2006).

A técnica de absorção de infravermelho analisa a interação de radiação eletromagnética com a matéria, determinando os níveis de energia de átomos e moléculas (SALA, O., 1995). O método fornece um espectro de absorção bioquímica devido às vibrações de ligações químicas de componentes celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios (MAQUELIN, K., ET AL. 2002; BALDAUF, N. A., 2007; AMIALI, N. M., 2007). A grande maioria das moléculas tem bandas de infravermelho na faixa espectral entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$  (MIR), isso se deve, principalmente, ao fato de nessa região ocorrerem, essencialmente, transições fundamentais e há a existência de uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital. Nessa região, pequenas alterações na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção do espectro, que são relacionados com a estrutura da molécula (NAUMANN, D., 2000; WARTEWIG, S., 2003).

Assim, a fim de minimizar as desvantagens que ocorrem nos diagnósticos histológicos convencionais, o objetivo deste projeto é verificar a potencialidade da técnica de imageamento por infravermelho, como uma nova metodologia para análise de cólon.

## Metodologia

As amostras de tecidos estudadas foram coletadas no Hospital de Clínicas - UNICAMP, de acordo com as normas do comitê de ética e pesquisa, L166/CEP2004. As mesmas foram armazenadas em frascos criogênicos Nalgene® de 1,2 ml e identificadas, visando à preservação e manutenção de todas as amostras até o momento do transporte e análises espectroscópicas. O estudo foi conduzido no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos/SP.

As amostras foram seccionadas utilizando um Criostato modelo CM 1100, marca LEICA, mostrado na Figura 1, seguindo os parâmetros adequados do equipamento.

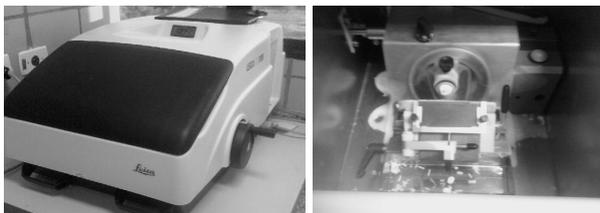


Figura 1: Criostato (CM 1100 - LEICA).

Os cortes foram realizados alternadamente sendo que o primeiro colocado na janela de  $\text{CaF}_2$  como demonstrado na Figura 2 e o segundo em uma lâmina histológica. As lâminas foram coradas utilizando os procedimentos padrões (Figura 3), e posteriormente utilizadas para a confirmação patológica por um especialista. Tendo em vista que atualmente a histologia é o “padrão ouro” de diagnóstico, este método foi utilizado para comparação com a análise bioquímica obtida pelo equipamento de FT-IR.

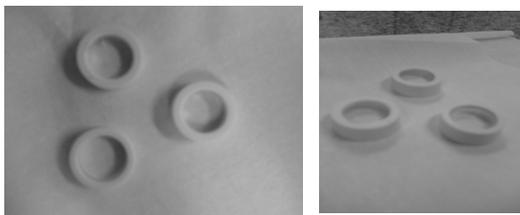


Figura 2: Janela de  $\text{CaF}_2$ .



Figura 3: Método de coloração de lâminas.

Para a análise espectroscópica não é necessário nenhum tratamento prévio, apenas foram cortadas na espessura de 12  $\mu\text{m}$ . A janela de  $\text{CaF}_2$  serve de porta amostra, pois não possui bandas na região de interesse. As amostras foram mantidas em uma sala com baixa umidade por trinta minutos com a intenção remover o excesso de água presente na amostra após a secção.

As imagens bioquímicas foram obtidas em modo de imagem por transmitância, no intervalo de 4000-900  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 varreduras por pixel ( $6,25 \mu\text{m}^2$ ) e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , através da microespectroscopia FT-IR utilizando o microscópio de imageamento (Spotlight 400 – Perkin-Elmer) equipado com detector MCT operando a temperatura do nitrogênio líquido, acoplado a um espectrômetro FT-IR (Spectrum 400 – Perkin-Elmer) como mostra a Figura 4.



Figura 4: Espectrômetro FT-IR.

Após as medidas das amostras no FT-IR, seus arquivos foram extraídos no programa Cytospec (versão 1.4.02) para análise dos espectros da matriz de imagem. Um parâmetro que deve ser avaliado é a formação de *cluster* na amostra. Essa formação consiste na separação bioquímica que o programa realiza utilizando os espectros pertencentes à matriz de imagem. Esta separação é de fundamental importância, a fim de determinar pequenas alterações entre as amostras. Após a análise pelo programa Cytospec, foram obtidos espectros médios de cada amostra. Esses espectros foram analisados observando as mínimas diferenças, a fim de determinar os picos de maior

interesse. Para o estudo foram selecionadas duas regiões espectrais discriminantes: a região de  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  e  $940-1500\text{ cm}^{-1}$ . Essas regiões foram escolhidas, pois apresentaram as maiores diferenças quando comparadas a outras regiões do espectro, caracterizando assim, as mínimas diferenças dos tecidos.

## Resultados

Os resultados espectrais foram correlacionados com lâminas histológicas. Sendo assim, é possível, estabelecer uma relação entre as estruturas morfológicas do cólon e a mudança química ocorrida.

A Figura 5 mostra a correlação da lâmina histológica (lado esquerdo) com o imageamento bioquímico. Nesta imagem é possível observar uma correlação entre a morfologia e as mudanças bioquímicas do tecido.

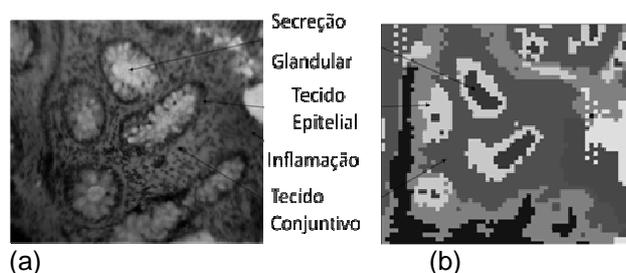


Figura 5: Correlação entre (a) lâmina histológica e (b) imageamento bioquímico e de uma amostra normal.

O mapa bioquímico mostrado na Figura 5 é uma mostra dos resultados obtidos. Entretanto, para comparar/separar os espectros entre as imagens, foi necessário fazer um espectro médio de cada *cluster*, ou seja, para cada grupo representado pelas mudanças de tom de cinzas, foi feito um espectro médio, como representado na Figura 6.

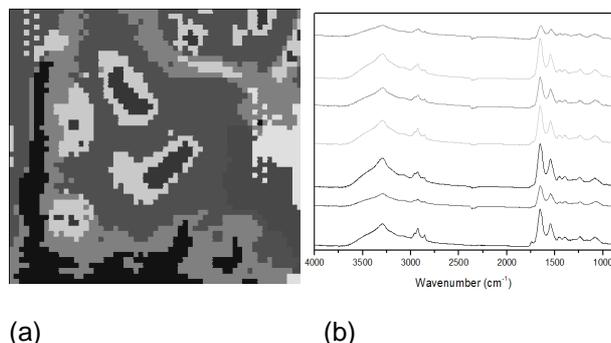


Figura 6 – Demonstração do (a) Imageamento bioquímico e seus (b) espectros médios.

Os espectros demonstram as pequenas variações bioquímicas identificadas no tecido em estudo.

## Discussão

Na mucosa do cólon, as células epiteliais formam uma camada de epitélio colunar com arquitetura bem preservada. Nas criptas (glândulas tubulares), estas células são organizadas juntamente com outros tipos de células epiteliais (células *goblet*, células basais e vários tipos de células endócrinas diferenciadas). A mucosa da lâmina própria, as criptas e a mucosa muscular, constituem a membrana mucosa do cólon.

A Figura 5 ilustra uma lâmina histopatológica representativa do conjunto de amostras estudadas. Nesta figura são mostradas as criptas seccionadas com as células epiteliais (colonócitos), células *goblet*, a mucosa da lâmina própria e a substância colóide secretada pelas glândulas com predomínio de muco e proteínas, também é ilustrado o tecido conjuntivo, onde existe um maior predomínio de fibras colágenas do tipo I e III, além de prolina e hidroxiprolina.

Após todo o estudo morfológico do tecido, foi possível analisar os picos gerados pela matriz bioquímica, e assim correlacionar às intensidades espectrais com as estruturas morfológicas.

Foi observado que os picos encontrados nos espectros mostram os constituintes da amostra de cólon. Juntamente com os estudos de Walsh e colaboradores (2009), que fizeram um rastreamento hierárquico da célula do intestino humano utilizando infravermelho. Foi notado que os espectros de IV, das regiões de ( $1800-900\text{ cm}^{-1}$ ) que são compostos por um número distinto de picos e que estão associados a determinadas entidades bioquímicas. Elas podem ser divididas em regiões de proteína ( $1800-1480\text{ cm}^{-1}$ ) e de DNA/RNA na região de ( $1425-900\text{ cm}^{-1}$ ). O componente principal da região de proteína são os picos de Amida I ( $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ ) e Amida II ( $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ ). A região de DNA/RNA consiste em uma série de espectros de absorvância com contribuintes principais de  $\nu_s\text{ PO}_2$  ( $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ ) e vibrações de estiramento assimétrico (fosfato) ( $\nu_{as}\text{ PO}_2$   $\sim 1225\text{ cm}^{-1}$ ). Os picos de absorção de ( $1121\text{ cm}^{-1}$  e  $1020\text{ cm}^{-1}$ ), têm sido associados com RNA/DNA, respectivamente. O pico ( $970\text{ cm}^{-1}$ ) tem sido relacionado com proteína e fosforilação de ácido nucléico. Na faixa de ( $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ ), é aonde encontramos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  de lipídios e proteínas. Demonstrando a capacidade da técnica.

## Conclusão

Os resultados preliminares apresentados neste estudo, demonstraram a potencialidade da utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho na detecção dos constituintes de um tecido. Este estudo conseguiu de maneira satisfatória correlacionar também os resultados da imagem de FT-IR com as estruturas celulares obtidas pela imagem morfológica. No futuro, pretendemos identificar as bandas vibracionais que podem ser consideradas como as mais importantes para realizar este diagnóstico. Assim, nossos resultados preliminares mostram a potencialidade desta técnica para uma futura utilização clínica na análise histopatológica de amostras com diagnóstico duvidoso.

## Referências

- INCA, Ministério da Saúde "Incidência de câncer no Brasil- Estimativa/ 2010". Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acesso em 25 mar. 2010.

- Krafft, C. "Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study", 2008.

- Lash, P., Naumann, D., Diem M. "Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis", 2004.

- Lash, P., Naumann, D. "Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues", 2006.

- Sala, O. "Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho". ED. UNESP/ São Paulo, p. 244, 1995.

- Maquelin, K., Naumann, D., Puppels, G. J. "Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy", 2002.

- Baldauf, N. A. "Effect of selective growth media on the differentiation of Salmonella enterica serovars by Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy", 2007.

- Amiali, N. M. "Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy", 2007.

- Naumann, D. "Infrared Spectroscopy in Microbiology", 2000.

- Walsh MJ, Hammiche A, Fellous TG, Nicholson JM, Cotte M, Susini J, Fullwood NJ, Martin-Hirsch PL, Alison MR, Martin FL. Tracking the cell hierarchy in the human intestine using biochemical signatures derived by mid-infrared microspectroscopy. Stem Cell Res, 2009.

- Wartewig, S. "IR and Raman Spectroscopy: Fundamental Processing", Alemanha: Wiley p 171, 2003.