

DIAGNÓSTICO DE TUMOR HEPÁTICO HUMANO UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN

Luis Gustavo Zamarrenho¹, Anderson de O. Lobo², Eduardo de S. Fernandes Martins³, Airton A. Martin², Marcos Tadeu T. Pacheco⁴

¹Graduação em Engenharia Biomédica. Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Av. Shishima Hifumi, 2.911–Urbanova, São José dos Campos–SP, Brasil, 12244-000, luis_sjc@yahoo.com.br

^{2,4}Lab. de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&DII). Universidade do Vale do Paraíba (Univap) Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12444-000. Fone: +55 3947 1165, amartin@univap.br

³Hospital Pio XII. R. Paraguassu, 51-Santana, São Jose dos Campos-SP-12212-110. Fone: 12 3928 3300

⁴Lab. de Espectroscopia Biomolecular, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D). Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Av. Shishima Hifumi, 2.911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil, 12444-000. Fone: +55 3947 1120, mtadeu@univap.br

Resumo- O hepatocarcinoma surge do processo de destruição e multiplicação de células do fígado. Quando encontrado na fase inicial, há uma sobrevida de oito meses e no estagio mais avançado, a previsão média é de três meses de vida. Desta forma é clara a necessidade de um diagnóstico precoce do hepatocarcinoma, quando este ainda tem boas opções de tratamento e chance de cura. A espectroscopia Raman consiste em uma técnica de biópsia óptica, sendo amplamente utilizada para diagnósticos de patologias. O objetivo deste trabalho foi identificação de alterações hepáticas, *in vitro*, utilizando a técnica de espectroscopia FT-Raman. Foram utilizadas três amostras (normal e leiomiocarcinoma) obtidas do Hospital Pio XII e coletados um total de 15 espectros pelo sistema FT-Raman (1064 nm). Notou-se diferenças entre os dois tipos de tecidos quanto às intensidades de compostos moleculares, como, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e aminoácidos (1272, 1321, 1030, 1083, 1660 cm^{-1}). A técnica de biópsia óptica de espectroscopia Raman pode ser aplicada para a identificação de alterações a nível biomolecular decorrentes de hepatocarcinomas.

Palavras-chave: Tecido Hepático, Hepatocarcinomas, Espectroscopia Raman

Área do Conhecimento: III - Engenharias

Introdução

As principais funções básicas do fígado são o metabolismo, vascularização para armazenamento e filtração do sangue, funções secretoras e excretoras, ambos responsáveis pela formação da bile que flui pelos ductos biliares para o tubo digestivo. O fígado funciona em muitas atividades que não estão diretamente relacionadas como processo de digestão. Entre elas estão a produção e destruição de eritrócitos a partir da fase embrionária, removendo bactérias, através de células de Kupffer. Este órgão também é responsável pela sintetização da protombina, fibrinogênio e outros fatores necessários para a coagulação do sangue [1].

O hepatocarcinoma surge do processo de destruição e multiplicação de células. Sendo um tumor altamente maligno, que dobra o seu volume a cada 180 dias em média. Quando encontrado na fase inicial, dá aos pacientes apenas oito meses de vida, e quando, no estagio mais avançado, a previsão média é de três meses de vida após o diagnóstico. Daí a necessidade do diagnóstico

precoce do hepatocarcinoma, quando este ainda tem boas opções de tratamento e chance de cura. Quando diagnosticado precocemente, apesar de ser muito agressivo, o transplante do fígado, onde o órgão doente é substituído por outro sadio é o melhor tratamento. Outra opção é a hepatectomia, cirurgia onde é retirada a porção do fígado onde esta localizado o tumor[2].

A espectroscopia Raman consiste em uma técnica de biópsia óptica e apresenta varias aplicabilidades, onde vem sendo amplamente utilizada para diagnósticos de câncer de mama, pulmão, fígado, bexiga, epiteliais, entre outros[3-7]. Já foram caracterizados hepatócitos normais e malignos utilizando a microespectroscopia Raman, detectou-se a presença de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, identificando diferenças espectrais referentes às intensidades [2]. Visto que a espectroscopia Raman investiga os constituintes moleculares e estruturais das amostras, esta técnica, permite detectar modificações bioquímicas na morfologia e arquitetura celular que ocorrem na presença de patologias [8-9].

O objetivo deste trabalho foi identificar alterações hepáticas, *in vitro*, decorrentes de modificações moleculares, utilizando a técnica de espectroscopia Raman por transformada de Fourier.

Materiais e Métodos

Preparação das amostras

As amostras de tecido hepático normal e tumoral (leiomioma primário do fígado) foram fornecidas pelo Hospital Pio XII de São José dos Campos pelo Dr. Eduardo de Sousa Fernandes Martins. O tecido hepático utilizado foi decorrente de uma cirurgia de uma paciente de 58 anos e 75 quilogramas e foi retirado 80% do mesmo e aproximadamente 1 quilograma. Utilizou-se uma mostra normal (controle) e duas amostras de tecido hepático patológico. As amostras foram coletadas e colocadas em Nalgene e armazenada em nitrogênio líquido (- 193 °C).

Para a realização do experimento as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e mantidas hidratadas em solução fisiológica 0,9%.

Instrumentação Raman (FT-Raman 1064 nm)

Utilizou-se o espectrômetro FT-Raman (Bruker RFS/100), encontrado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Nesta técnica utiliza-se um Laser de Nd: YAG com comprimento de onda de 1064 nm, e um interferograma para calcular a transformada de Fourier. Com a utilização de comprimentos de onda maiores elimina-se a fluorescência presente em amostras biológicas.

Para a coleta dos espectros, as amostras foram posicionadas no porta amostra e o ajustado a uma potência de 300 mW de saída, registrando 210 mW na amostra. Utilizou-se 300 scans e resolução de 4 cm^{-1} . Foram coletados cinco espectros por amostra em diferentes pontos, totalizando cinco espectros normais e 10 com tumor (leiomioma primário do fígado).

Resultados

Para a análise dos resultados foi realizada a média aritmética dos espectros coletados e identificados os principais modos vibracionais presentes na região de 800 a 1800 cm^{-1} (Figura 1).

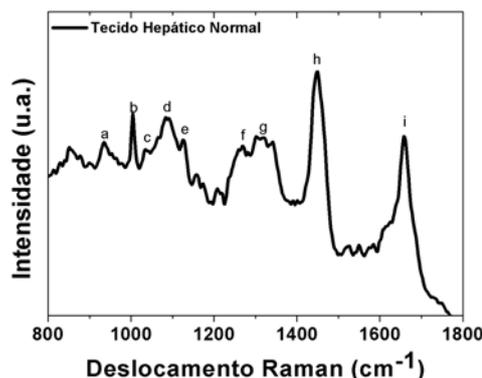


Figura 1: Espectro Raman de tecido hepático normal identificando os principais modos vibracionais.

A tabela 1 mostra os principais compostos moleculares identificados no espectro.

Tabela 1- Principais modos vibracionais relacionados à seus compostos moleculares[7-9].

Banda	Posição (cm^{-1})	Composto Molecular
a	860	Prolina e Valina
b	1004	Fenilalanina
c	1030	Fosfolipídeos
d	1083	DNA
e	1122	Lipídeos e Proteínas
f	1272	Amida III
g	1321	Lipídeos
h	1452	Lipídeos e Proteínas
i	1660	Amida I

Na figura 2 estão presentes a média dos espectros normais e tumorais com suas respectivas diferenças.

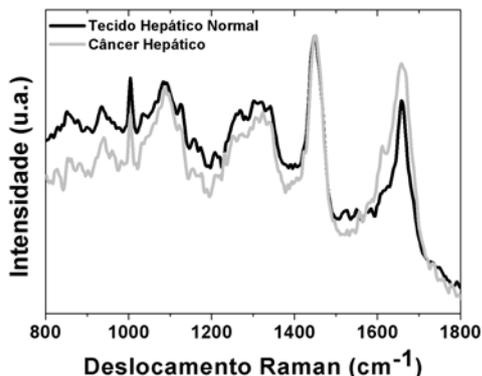


Figura 2: Media dos espectros Raman de tecido hepático normal e tumoral.

Discussões

Comparando os espectros dos tecidos hepáticos normais e tumorais, nota-se diferenças quanto às intensidades de compostos moleculares, como, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e aminoácidos. O deslocamento Raman referente a posição de 1083 cm^{-1} , esta relacionado ao índice de DNA. O aumento de intensidade relativo indica um aumento na massa de lipídeos e proteínas (1272 e 1321 cm^{-1}), aos fosfolipídeos e DNA (1030 e 1083 cm^{-1}) e também na região correspondente a amida I (1660 cm^{-1}), características de células neoplásicas. No espectro das amostras tumorais, indica uma mudança na estrutura secundária da proteína ou da desordem do tecido devido ao hepatocarcinoma (Leiomioma primário do fígado)[4].

Conclusão

Com o resultados preliminares obtidos podemos inferir que a técnica de biópsia óptica de espectroscopia Raman poderia ser aplicada para a identificação de alterações a nível biomolecular decorrentes de hepatocarcinomas. Como trabalhos futuros serão obtidas um maior número de amostras e espectros para a realização de um banco de dados e análises estatísticas para a possível aplicação desta técnica para o diagnóstico de hepatocarcinomas.

Referências

- [1] GRANT, A., NEUBERGER, J. GUIDELINES. On the use of liver biopsy in clinical practice. **Gut**, 45 (suppl IV), 1999;
- [2] HAWI S. H. ET AL. Characterization of normal and malignant human hepatocytes bu Raman microspectroscopy. **Cancer Letters** 110 (1996)

- [3] Nunes, L. D.; Martin, A. A.; Silveira, L.; Zampieri, M. FT-Raman spectroscopy study for skin cancer diagnosis **SPECTROSCOPY INT. J.** 17 (2-3): 597-602, 2003.
- [4] SCHUT, T. C. B.; WOLTHUIS, R.; CASPERS, G. J. **Real-time tissue characterization on the basis of in vivo Raman spectra.** *J Raman Spectrosc*, v.33, n.7, p.580-585, 2002.
- [5] MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. **Raman Spectroscopy for cancer detection: A review.** *Proceedings - 19th International Conference*, p.2722-2828, 1997.
- [6] SILVEIRA Jr. L. **Correlação entre a técnica de espectroscopia raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas.** 2001. 109 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Fisiopatologia Experimental - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).
- [7] STONE, N. **Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers.** *J Raman Spectrosc*, v.33, 564-573, 2002.
- [8] MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. **Raman Spectroscopy for cancer detection: A review.** *Pro eedings - 19th International Conference*, p.2722-2828, 1997.
- [9] STONE, N. **Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers.** *J Raman Spectrosc*, v.33, 564-573, 2002.