

DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA ENTRE TECIDOS DE CÓLON NORMAL, ADENOMA E ADENOCARCINOMA

J. L. Rangel¹, L. Raniero¹, E. A. L. Arisawa¹, J. Ferreira¹, R. A. Canevari¹, J. A. A. C. Piva¹, C. S. P. Lima², C. Oliveira², A. A. Martin¹

¹UNIVAP/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Avenida Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP, Brasil - CEP 12244-000

²UNICAMP/Departamento de Clínica Médica, Rua Vital Brasil, 251 Cidade Universitária Zeferino Vaz, Distrito de Barão Geraldo, Campinas/SP, Brasil - CEP: 13083-970

jlucasrangel@hotmail.com

Resumo- O câncer de colón é considerado o terceiro câncer com maior taxa de mortalidade no mundo. Atualmente exames como toque retal, anoscopia e biópsia com estudo histopatológico da lesão são utilizados para o diagnóstico da doença. Entretanto esses exames além de serem subjetivos, necessitam de um tempo elevado para se obter algum tipo de resultado. Assim, novas técnicas estão sendo estudadas no intuito de reduzir esta subjetividade, assim como, reduzir o tempo de obtenção de diagnóstico, contribuindo para a chance de cura do indivíduo. Dentre as técnicas recentemente estudadas, a de imageamento no infravermelho (FT-IR) tem se destacado como uma poderosa ferramenta de auxílio aos patologistas uma vez que caracteriza o tecido através de sua constituição bioquímica, eliminando-se assim a subjetividade do diagnóstico. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar por FT-IR os principais constituintes bioquímicos participantes do processo de carcinogênese em tecidos de colorretal com adenoma e adenocarcinoma. Neste estudo, analisamos 15 amostras de colón normais e alteradas. Também foi possível a identificação de algumas regiões características ao processo de carcinogênese celular.

Palavras-chave: Diferenciação Bioquímica, Imageamento 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 transversal, 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. O cólon é a maior porção do intestino grosso e pode ser alvo de várias doenças como adenomas, adenocarcinomas, diverticulose e colite ulcerosa, entre outras (INCA 2010).

Fatores como má-alimentação e uso de drogas aumentam a chance de manifestação desta doença. Hoje é classificado o terceiro câncer com maior taxa de mortalidade no mundo, e conseqüentemente, existem diversos tipos de diagnóstico, tais como: toque retal, exame radiológico contrastado com o intestino grosso, colonoscopia e biópsia com o estudo histopatológico da lesão. Entretanto, estes métodos possuem

duas grandes desvantagens; a subjetividade e o tempo necessário para se obter o diagnóstico, retardando o tratamento do indivíduo. A medicina moderna busca novas técnicas de diagnósticos que possam ser menos subjetivas e traumáticas para o paciente e com a possibilidade de fornecer resultado mais rápido, podendo assim iniciar precocemente o tratamento do indivíduo. Dentre as técnicas que estão sendo estudadas, destaca-se a de espectroscopia óptica. A principal vantagem da espectroscopia óptica, quando comparada à histologia convencional, é a possibilidade de realizar uma análise bioquímica das alterações moleculares ao invés da análise morfológica, podendo detectar as alterações bioquímicas antes das alterações morfológicas do tecido. 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 nucléicos, 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 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 convencionas o objetivo deste trabalho foi o de verificar a potencialidade da técnica de imageamento por infravermelho na identificação dos principais constituintes bioquímicos participantes do processo de carcinogênese em tecidos de cólon com adenoma e adenocarcinoma.

Metodologia

Para a realização deste projeto 15 amostras de tecidos de cólon foram utilizadas, sendo classificadas como: 5 saudáveis, 5 adenomas e 5 adenocarcinomas. As amostras foram coletadas no Hospital de Clínicas - UNICAMP, após ciência dos pacientes e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e aprovação 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.

Primeiramente as amostras foram seccionadas utilizando um Criostato modelo CM 1100, marca LEICA (Figura 1), seguindo os parâmetros adequados do equipamento.

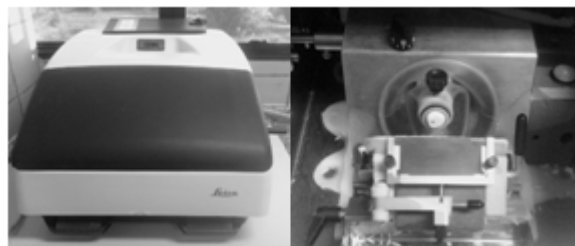


Figura 1: Criostato (CM 1100 - LEICA).

As secções foram realizadas alternadamente, a espessura dos cortes foi de 12 μm . Sendo que o primeiro corte foi depositado na janela de CaF_2 (Figura 2), para a análise por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e o segundo corte em uma lâmina histológica. As lâminas foram coradas utilizando os procedimentos padrões do protocolo de coloração H&E (Figura 3), as lâminas histológicas foram posteriormente enviadas para a confirmação histopatológica por um especialista, pois atualmente a histologia é o “padrão ouro” de diagnóstico. Esta confirmação a partir da lâmina histológica foi utilizada como método de comparação com a análise bioquímica obtida pelo equipamento de FT-IR, podendo assim validar nossos dados.

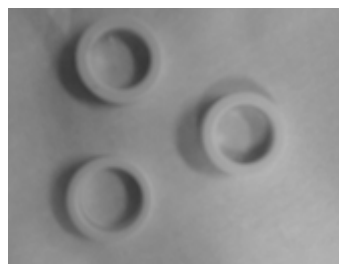


Figura 2: Janelas de CaF_2 .



Figura 3: Método de coloração de lâminas.

Para a análise espectroscópica não é necessário nenhum tratamento prévio. As amostras foram mantidas em uma sala com baixa umidade por trinta minutos antes da análise com a intenção de remover o excesso de água presente na amostra após a secção. A janela de CaF_2 serve

de porta amostra e são utilizadas também por não possuir bandas na região de interesse.

As imagens bioquímicas foram obtidas em modo de imagem por transmitância, no intervalo de $4000-900\text{ cm}^{-1}$, com 32 varreduras por pixel ($6,25\text{ }\mu\text{m}^2$) e resolução de 4 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. Cada amostra foi analisada em 3 diferentes pontos para obter a maior variabilidade e quantidade de dados sobre o tecido analisado.



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 evidenciar as pequenas alterações entre as amostras. Para obter esta separação necessita a aplicação de alguns processos estatísticos, dentre os quais, o coeficiente de Pearson e o algoritmo de Ward's. Outro método estatístico utilizado para classificação das imagens bioquímicas foi o K-Means. (DÍAZ, 2007; CYTOSPEC). Após a análise pelo programa Cytospec, foram obtidos espectros médios de cada amostra.

A segunda parte desta metodologia consistiu-se na análise estatística multivariada de todos os espectros médios contidos em cada imagem bioquímica gerada pela similaridade espectral. Assim, foi possível localizar os modos vibracionais que demonstram as pequenas diferenças entre os tecidos. Nesta análise, utilizou-se primeiramente o software OPUS (versão 4.2, Bruker), para normalização dos dados e subtração da linha de base. O software Origin (versão 8.0), foi utilizado em seguida para realizar a comparação dos modos vibracionais que demonstram as

diferenças. Duas regiões foram escolhidas para comparação tecidual; (a) a região de impressão digital da amostra ($1500-900\text{ cm}^{-1}$), onde se caracteriza pelas ligações de amida III, DNA, RNA, deformações de lipídeos e proteínas, entre outras e (b) a região de $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ que se caracterizam pelas ligações de CH_2 e CH_3 de lipídios, proteínas e carboidratos.

Resultados

Nossos resultados podem ser divididos em duas fases, a primeira fase consiste em demonstrar a potencialidade da técnica através da correlação da lâmina histológica com o mapa bioquímico reconstruído por software. A segunda fase é caracterizada pela análise espectral, onde foi possível verificar as regiões que sofrem maiores alterações durante o processo de carcinogênese.

A Figura 5 mostra a correlação da lâmina histológica (lado esquerdo) com o imageamento bioquímico. Nesta imagem é possível observar que em ambas as figuras foram possíveis visualizar a separação das diferentes estruturas celulares, um exemplo é a separação do tecido epitelial e conjuntivo a partir dos diferentes *clusters*. Demonstrando uma correlação entre a morfologia e as mudanças bioquímicas do tecido.

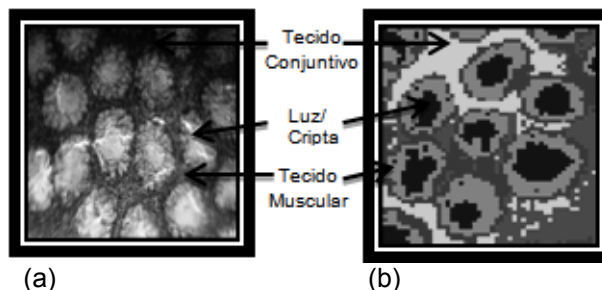
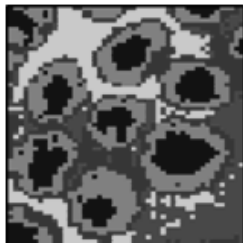
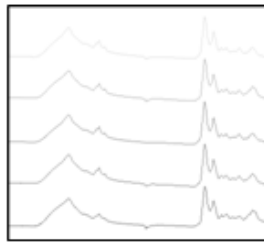


Figura 5: Correlação entre (a) lâmina histológica e (b) imageamento bioquímico e de uma amostra normal.

O mapa bioquímico apresentado na Figura 5 ilustra os 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 obtido um espectro médio, como representado na Figura 6. Os espectros médios demonstram as pequenas variações bioquímicas identificadas no tecido em estudo.



(a)



(b)

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

Após a obtenção dos espectros médios de cada amostra, os mesmos foram analisados estatisticamente através do software OPUS, onde todos os espectros foram normalizados pelo pico máximo e corrigido a linha de base. Utilizando o software Origin foi possível comparar os espectros obtidos, podendo assim estudar e identificar as regiões de maior variação entre cada tecido. Com isso foi possível criar uma tabela que demonstre as variações encontradas e em qual tipo de tecido e estrutura elas estão mais evidentes e assim correlacionar com os processos biológicos, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre os modos vibracionais de tecido normal, adenoma e adenocarcinoma.

Freq. Espectral (cm-1)	Modo Vibracional	Grupo Funcional	Tecido Normal			Tecido Polipo			Tecido Câncer		
			TC	TM	Luz	TC	TM	Luz	TC	TM	Luz
3300	ν_s (O-H) Hidroxila	Água	≈	↑↑	↑↑	≈	↓	↓	≈	↓	↑
3200	ν_s (NH) Amida A	Proteínas	≈	↑	↑	≈	↓	↓	≈	↓	↓
2960	ν_a (C-H) de -CH ₃	Lipídios/Proteínas	≈	↑	↑	≈	↓	↓	≈	↓	↓
2928	ν_a (C-H) de -CH ₂	Lipídios/Proteínas /Carboidratos	≈	↑↑	↑	≈	↓	↓	≈	↓	↓
2872	ν_s (C-H) de -CH ₃	Lipídios/Proteínas	≈	≈	↑	≈	≈	↓	≈	≈	↓
2852	ν_s (C-H) de -CH ₂	Lipídios/Proteínas /Carboidratos	≈	↑	↑	≈	↓	↓	≈	↓	↓
1650	Amida I (α -hélice)	Proteínas	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
1546	Amida II (δ_s N-H e ν_s C-N)	Proteínas	↓	↑↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↑
1456	δ_a (CH ₃) e δ_s (CH ₂)	Proteínas/Carboidratos	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑
1400	ν_s (C=O), δ_s (CH ₃) e δ_a (CH ₂)	Proteínas/Carboidratos	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑
1310-1240	Amida III	Proteínas	↓	↑	≈	↑	↑	≈	↑	↓	≈
1200-900	ν_s (C-O), ν_s (C-C), ν_s (C-O-C)	Carboidratos	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑
1085	ν_s (P=O) PO ₂ ⁻	DNA/RNA/Lipídios	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑↑	↓

Discussão

Primeiramente é importante entender como o tecido do cólon é constituído, basicamente 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 primeira parte da nossa metodologia foi de demonstrar a efetividade da técnica em distinção de diferentes constituintes dos tecidos biológicos.

Isto foi demonstrado pela Figura 5 que ilustra uma lâmina histopatológica representativa do conjunto de amostras estudadas. Nesta figura é possível correlacionar as principais estruturas que são visualizadas na lâmina histológica com o mapa reconstruído pelo software. Nesta imagem são observadas 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.

Para maiores comprovações da eficácia da técnica, foi feita uma comparação dos resultados

espectrais iniciais com outros artigos publicados na área. Pode-se observar alguns constituintes básicos que compõe o tecido de colón, como a proteína ($1800-1480\text{ cm}^{-1}$), sendo que seus principais componentes 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 serie de espectros de absorbância com contribuintes principais de $\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2$ ($\sim 1080\text{ cm}^{-1}$) e vibrações de estiramento assimétrico (fosfato) ($\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2 \sim 1225\text{ cm}^{-1}$). Os picos de absorção de (1121 cm^{-1} e 1020 cm^{-1}), foram associado com RNA/DNA. O pico (970 cm^{-1}) foi relacionado com proteína e fosforilação de acido nucléico. A faixa espectral de ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$), corresponde aos modos vibracionais de CH_2 e CH_3 de lipídios e proteínas. (WALSH, MJ, 2009)

A segunda parte foi o estudo estatístico dos espectros médios, que foram gerados a partir do mapa bioquímico. A partir destes espectros foi possível analisar e identificar os picos gerados pela matriz bioquímica que sofrem alterações em suas intensidades e em suas deformações espectrais, mostrando que estes picos estão diretamente envolvidos no processo de carcinogênese do tecido de colón.

Das regiões descritas na tabela acima destaca-se: (a) o pico de CH_2 em 2849 e 2920 cm^{-1} , são mais intensos que os modos de CH_3 em 2960 e 2870 cm^{-1} , provavelmente devido a um processo de hipometilação durante a carcinogênese molecular; (b) Na avaliação do tecido conjuntivo foi possível observar três bandas agrupadas, uma em 1240 cm^{-1} atribuída ao PO_2 de ácidos nucléicos e outras duas bandas em 1209 e 1285 cm^{-1} que é atribuída ao colágeno (principal componente do tecido conjuntivo); (c) a região de 1164 a 1172 cm^{-1} , atribuídos à ligação de C-OH, relacionado ao processo de fosforilação induzida pela carcinogênese, pois as mudanças de C-OH em C-PO diminuem o numero de pontes de hidrogênio que estabilizam os tecidos saudáveis do colón e finalmente (d) as bandas relacionadas aos carboidratos em 1025 e 1045 cm^{-1} , cuja variação da absorção ou metabolismo dos carboidratos pode ser devido ao estágio avançado do câncer [LASCH, 2002; LASCH, 2005; CONTI, 2007; RAMESH, 2001].

Conclusão

Com base em nossos resultados foi possível demonstrar a potencialidade da utilização da técnica de espectroscopia de infravermelho na detecção dos constituintes de um tecido. Também foi possível a identificação de algumas regiões características ao processo de carcinogênese celular. Com esses resultados, ainda que preliminares, é possível dizer que a técnica de FT-

IR pode ser de grande de grande valia aos patologistas em diagnósticos duvidosos.

Referências

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

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

CONTI, C., FERRARIS, P., VALAVANIS, C.; FT-IR microimaging spectroscopy: A comparison between healthy and neoplastic human colon tissues, 2007.

CYTOSPEC, CytoSpec - an APPLICATION FOR HYPERSPSPECTRAL IMAGING. Banco de dados disponível em: <http://www.cytospec.com/index.html>.

DÍAZ, F. R; LÓPEZ, F. F. B. Bioestatística. ed. unica São Paulo: Thomson, 57 p 2007.

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.

LASCH, P., HAENSCH, W., NAUMANN, D.; Characterization of Colorectal Adenocarcinoma Sections by Spatially Resolved FT-IR Microspectroscopy, 2002.

LASCH, P., NAUMANN, D., DIEM M.; Artificial neural networks as supervised techniques for FT-IR microspectroscopic imaging, 2005.

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

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

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

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

RAMESH, J., SALMAN, A., MORDECHAI, S.; FTIR Microscopic Studies on Normal, Polyp, and Malignant Human Colonic Tissues, 2001.

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

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.