

Estudo morfológico e bioquímico de tecido de cólon humano normal, adenoma e adenocarcinoma por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier XV INIC / XI EPG - UNIVAP 2011

Juliana Aparecida de Almeida Chaves Piva¹; Leandro José Raniero¹; Hélio Okamura³; Carmen Silvia Passos Lima²; Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa¹; Cláudio Saddy Rodrigues Coy²; Cristiane Oliveira²; Renata de Azevedo Canevari¹; Juliana Ferreira¹; João Lucas Rangel Silva¹; Airton Abrahão Martin^{1}*
1 Universidade do Vale do Paraíba- São José dos Campos - SP. Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB).

2 Universidade Estadual de Campinas- Campinas – SP. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM).

3 Cipax Medicina diagnóstica.

*Endereço para correspondência: Airton A. Martin, UNIVAP – IPD - LEVB - Av. Shishima Hifumi, 2.911 - Urbanova - São José dos Campos - SP - CEP: 12244-000.

Email: julichaves_dermato@hotmail.

Resumo- O câncer colorretal é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os gêneros e a segunda causa em países desenvolvidos, aproximadamente 9,4%, equivalendo a um milhão de casos novos. No Brasil o câncer colorretal é o quarto mais incidente entre todos os tumores malignos e a quarta causa mais comum de morte por câncer. Geralmente o diagnóstico de pólipos adenomatosos colorretais, é feito através de biópsia endoscópica com estudo histopatológico através da utilização de programas de rastreamento. Especialmente no Brasil, onde poucos têm acesso à saúde eficaz, eficiente e por assim dizer, efetiva, os resultados dos testes de rastreamento realizados pelo sistema único de saúde (SUS) podem levar de semanas a meses para serem obtidos. Estes fatos, acrescidos de pouca adesão por parte dos pacientes pode levar a uma demora na obtenção dos resultados, atrasando o início adequado do tratamento. Investimento em pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos vem sendo aplicado em todo o mundo. Portanto, neste estudo a técnica de imageamento espectroscópico no infravermelho por transformada de Fourier foi utilizada na análise de tecido colorretal visando estabelecer uma correlação entre as estruturas morfológicas e bioquímicas. Os dados obtidos neste estudo poderão integrar, no futuro, o banco de dados do software CytoSpec® (ou similar) com o propósito de promover um laudo automatizado de lâminas histológicas, a fim de minimizar as desvantagens que ocorrem na biópsia convencional.

Palavras- chave: Imageamento por espectroscopia de infravermelho; câncer de cólon; adenoma colorretal; adenocarcinoma colorretal cólon humano; FTIR
Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

Introdução

O câncer colorretal é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os gêneros e a segunda causa em países desenvolvidos, aproximadamente 9,4%, equivalendo a um milhão de casos novos. Segundo estimativas da American Cancer Society, 101.700 novos casos de câncer de cólon e 39.510 casos do câncer retal são esperados para ocorrer em 2011 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). No Brasil o câncer colorretal é o quarto mais incidente entre todos os tumores malignos e a quarta causa mais comum de morte por câncer. A estimativa de novos casos de câncer de cólon e reto no Brasil para 2011 é de 13.310 em homens e de 14.800 em mulheres (INCA, 2010). Geralmente o diagnóstico de pólipos adenomatosos colorretais, é feito através de biópsia endoscópica

com estudo histopatológico através da utilização de programas de rastreamento. A colonoscopia excede o objetivo do rastreamento na medida em que permite a remoção da lesão pré-maligna ou mesmo tratar definitivamente alguns casos de câncer precoce. Contudo, a avaliação da relação custo-benefício ainda é sensivelmente depreciada quando consideramos o rastreamento por exame colonoscópico frente a outros métodos como a pesquisa de sangue oculto nas fezes ou a sigmoidoscopia. Para indivíduos assintomáticos, o rastreamento empregando a colonoscopia como método isolado apresenta como problema central, a pouca adesão ou aceitação da população como resultado da necessidade de preparo intestinal, sedação, riscos de perfuração e custo do exame. (RANSOHOFF *et al*, 1991).

Rex *et al.*, (1991), em seus estudo relatam a oferta da colonoscopia como triagem de CCR para

um grupo constituído por 5.000 médicos, dentistas e seus cônjuges, assintomáticos. Mesmo fazendo parte de uma amostra da população determinada e consciente sobre cuidados preventivos de saúde, apenas 6% desses realizaram o exame. Assim sendo, além de não terem obtido evidência da eficiência do rastreamento, todos refletiram uma adesão limitada por parte da população. Tendo em vista que os estudos que se valerem da colonoscopia como método de triagem de indivíduos assintomáticos não utilizaram grupos-controle, há pouca evidência direta de real benefício oferecido à população rastreada. Em alguns casos, quando a biópsia indicar que as margens não estão livres, é preciso fazer um novo procedimento para retirada do tecido doente remanescente.

Torrington et al (2011) em um estudo clínico sobre a relação entre o intervalo de diagnóstico e mortalidade por câncer colorretal (CRC) observou que essa analogia não é clara. Esta associação foi analisada, levando-se em conta importantes fatores de conflito no momento da primeira apresentação de sintomas. Um total de 268 pacientes com CCR foram incluídas em um estudo prospectivo, de base populacional em um município dinamarquês. O intervalo de diagnóstico foi definido como o tempo da primeira apresentação dos sintomas até o diagnóstico. Em pacientes com sintomas sugestivos de câncer ou qualquer outra doença grave, o risco de morrer dentro de 3 anos diminuiu com intervalos de diagnóstico até 5 semanas e depois aumentou ($P = 0,002$). Em pacientes com sintomas imprecisos, a associação foi inversa, embora não seja estatisticamente significativa. Segundo o estudo a detecção de câncer dentro do sistema de atenção básica a saúde tem duas frentes que se destinam a acelerar o tratamento de pacientes doentes, evitando assim que pessoas saudáveis sejam encaminhadas aos hospitais. O intervalo de diagnóstico é uma variável altamente complexa que reflete a biologia do tumor, o comportamento do paciente, a via clínica e o funcionamento do sistema de saúde. O estudo mostrou o paradoxo do tempo de espera, juntamente com uma mortalidade crescente com intervalos mais longos para o diagnóstico do CRC em pacientes que apresentaram sinais ou sintomas graves. Assim, este estudo forneceu evidências para a hipótese de que a duração do intervalo de diagnóstico afeta a mortalidade de pacientes CRC.

Especialmente no Brasil, onde poucos têm acesso à saúde eficaz, eficiente e por assim dizer, efetiva, seja por questões de educação, seja pela alta demanda ou por questões sócio-econômicas, os resultados dos testes de rastreio realizados pelo sistema único de saúde (SUS) podem levar de semanas a meses para serem obtidos. Estes

fatos, acrescidos de pouca adesão por parte dos pacientes pode levar a uma demora na obtenção dos resultados, atrasando o início adequado do tratamento (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2009)

Investimento em pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos vem sendo aplicado em todo o mundo. Diversas técnicas biofísicas, como por exemplo, a espectroscopia vibracional, tem sido utilizada para analisar tecidos biológicos com o objetivo de detectar, entre outras doenças, o câncer (DIEM et al., 2004). A espectroscopia vibracional é extremamente sensível à composição bioquímica de uma amostra, bem como suas variações. A técnica de imageamento por espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR) permite a aquisição de milhares de espectros em poucos minutos revelando informações sobre a estrutura bioquímica do tecido e a distribuição de componentes celulares (DIEM et al., 2004).

O imageamento por infravermelho apresenta-se como um caminho potencial para um novo tipo de análise com base em exames ópticos e mais objetivo do que os métodos convencionais de coloração, uma vez que é possível proceder a uma "leitura" das alterações bioquímicas, ao invés de usar uma abordagem baseada em alterações morfológicas. Este método simplifica os procedimentos de preparação das amostras e minimiza possíveis modificações. Além disso, estando a técnica por FTIR baseada em análise computacional, o processo de avaliação do tecido pode ser automatizado. Com base em dados obtidos dos espectros vibracionais de uma dada amostra, é possível diagnosticar estados patológicos dos tecidos. Esta metodologia, independente da variabilidade intra-observador, vem demonstrando grande potencial de aplicações em medicina de diagnóstico de rotina. Esses avanços, sem dúvida, impulsionam técnicas de imagem vibracional em laboratórios biomédicos e demais centros de estudos biológicos por fornecer uma nova e valiosa visão sobre os processos bioquímicos na detecção de doença (LASH et al., 2004; FERNANDEZ, 2005; WOLTHUIS et al., 2008). Neste contexto, vários centros de pesquisa no mundo trabalham atualmente na construção de um banco de dados mais robusto vislumbrando a aplicação clínica da técnica de imageamento por FTIR.

Portanto, neste estudo a técnica de imageamento espectroscópico no infravermelho por transformada de Fourier foi utilizada na análise de tecido colorretal visando estabelecer uma correlação entre as estruturas morfológicas e bioquímicas, a fim de minimizar as desvantagens que ocorrem na biópsia convencional. Os dados obtidos neste estudo poderão integrar, no futuro, o

banco de dados do software CytoSpec® (ou similar) com o propósito de promover um laudo automatizado de lâminas histológicas.

Metodologia

Neste estudo foram utilizadas amostras originadas de biópsias de tecidos colorretais normais, pólipos e tumores de cólon de 12 pacientes atendidos no Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas ou Centro Cirúrgico do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, SP. Este estudo seguiu as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos conforme Resolução no 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, protocolo nº 1107/2009 (ANEXO A) e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba, protocolo nº H083/CEP/2009.

Pequenos fragmentos, medindo de 0,1 a 0,3 cm das amostras foram obtidas no momento da realização da colonoscopia ou da excisão cirúrgica do tumor no centro cirúrgico e encaminhados para o Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica - LEVB do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento - IP&D, UNIVAP.

As amostras foram então devidamente identificadas, e em seguida, armazenadas a -80°C , no Banco de Tumores do LEVB. Uma parte das amostras de pólipos e dos carcinomas colorretais foi encaminhada para o Laboratório do Departamento de Anatomia Patológica - UNICAMP para a confirmação do diagnóstico em cortes de fragmentos de tumor incluídas em parafina, conforme protocolo convencional. A confirmação histopatológica das lâminas coradas por HE foi realizada por histopatologista do Laboratório de Medicina Diagnóstica – CIPAX.

O seccionamento das amostras de tecidos colorretais normais, adenomatosos e com adenocarcinoma, foi realizado no Criostato (Leica CM 1100) à -23°C . As amostras foram então posicionadas, e cortes de $12\mu\text{m}$ foram realizados.

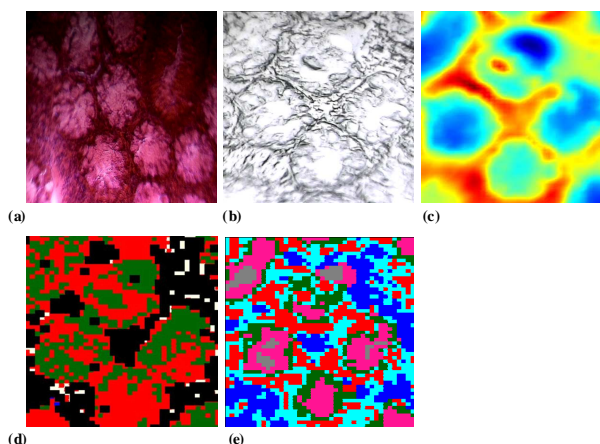
Vários cortes sequenciais foram obtidos para cada uma das amostras. A primeira seção do par foi utilizada para análise espectroscópica por FTIR e a seção subsequente do respectivo par foi utilizada para a caracterização histológica por coloração HE. As lâminas convencionais foram coradas utilizando o protocolo padrão de coloração por HE. As lâminas coradas com HE foram analisadas com o objetivo de identificar e classificar as estruturas presentes nas amostras de tecido normal, com adenoma e com adenocarcinoma (KIERNAN, 2008)

Para a análise espectroscópica, o primeiro fragmento de $12\mu\text{m}$ foi posicionado sobre uma lâmina circular de Fluoreto de Cálcio (CaF_2) com 5mm de espessura e 10mm de diâmetro (Figura 19), especificamente utilizada como porta amostra para espectroscopia óptica por ser transparente para a região do infravermelho do espectro de radiação. Esta lâmina foi previamente limpa e seca.

Imagens espectroscópicas vibracionais podem ser construídas de maneira univariada, onde os mapas químicos, com base nos picos, sua intensidade ou razões entre esses picos são gerados. Embora estes métodos forneçam informações sobre a distribuição e concentração relativa de um determinado grupo funcional e, portanto, características específicas de biomolécula, não são muito úteis em termos de classificação de características anatômicas e histopatológicas em seções de tecido, isso devido principalmente à forte sobreposição espectral de várias biomoléculas. A informação espectral, que normalmente é distribuída por uma ampla região espectral, pode ser utilizada de forma mais eficiente usando uma reconstrução da imagem multivariada.

Visto que a análise histológica é o “padrão ouro” de diagnóstico, este método foi utilizado para comparação com a análise bioquímica obtida pela análise de FTIR. Após a análise histológica e confirmação do diagnóstico do biópsia, foi realizada a identificação das estruturas celulares presentes em cada ponto da lâmina e posterior correlação.

Resultados



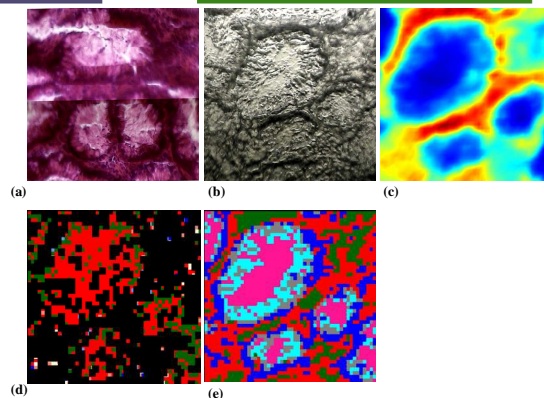
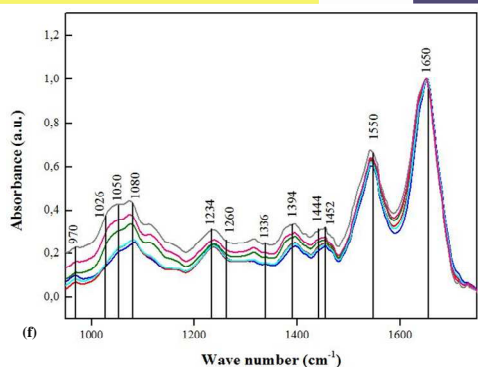


Figura 1: (a) Lâmina de tecido normal corada por HE, (b) Amostra em janela CaF₂; (c) Imagem bioquímica obtida por FT-IR; (d) Imagem processada obtida por ANN; (e) Imagem processada obtida por HCA; (f) Espectros médios do tecido colorretal normal.

Tabela 1: Correlação morfológica versus bioquímica obtida utilizando-se a rotina computacional de redes neurais

| COR | TIPO DE ESTRUTURA/TECIDO | PORCENTAGEM |
|---------------|--------------------------|----------------|
| Azul | Carcinoma | 0, 4% |
| Vermelho | Criptas | 45, 19% |
| Verde escuro | Mucina | 29, 51% |
| Salmão | Necrose | 0, 04% |
| Amarelo Claro | Lâmina Própria | 9, 79% |
| Preto | Não identificada | 15, 05% |
| Total | | 99, 98% |

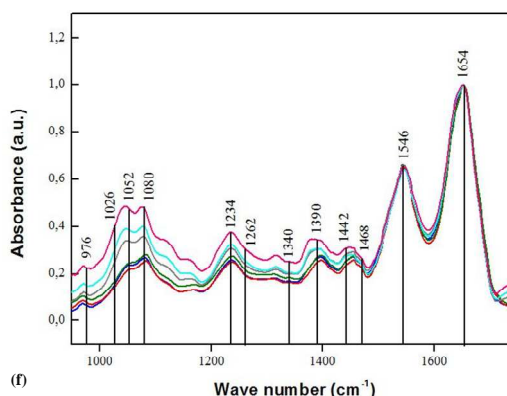


Figura 2: (a) Lâmina de tecido corada por HE, (b) Amostra em janela CaF₂; (c) Imagem bioquímica obtida por FT-IR; (d) Imagem processada obtida por ANN; (e) Imagem processada obtida por HCA; (f) Espectros médios do tecido com adenoma.

Tabela 2: Correlação morfológica versus bioquímica obtida utilizando-se a rotina computacional de redes neurais.

Nas figuras 2 (a) são apresentados os resultados obtidos da análise 2 lâminas coradas por HE de tecido de colón com adenoma. Na figura 2 (a) nota-se uma displasia leve, com padrão glandular atípico e espaço glandular reduzido. Nas Figuras 2 (b) e (c) apresentamos a amostra em janela de CaF₂ e a sua imagem bioquímica obtida por FTIR, respectivamente.

A Figura 2(d) e Tabelas 2, referem-se a classificação obtida por ANN e porcentagem de espectros de cada uma das diferentes estruturas. Na imagem processada obtida por ANN (Figura 2d e Tabela 2) a porcentagem de espectros correspondendo a carcinoma foi de 1,47% do tecido e a porcentagem corresponde aos tecidos não identificados foi de 29,26%.

A imagem processada obtida por HCA de 6 cluster é apresentada nas Figuras 2 (e). Na Figura 2 (e), identificou-se a lâmina própria da mucosa e estoque fibrovascular, as criptas, lúmen central das criptas e as camadas exteriores das células das criptas. Na Figura 2 (f) temos os espectros médios, referente a cada estrutura identificada pelo software.

| COR | TIPO DE ESTRUTURA/TECIDO | PORCENTAGEM |
|---------------|--------------------------|-------------|
| Azul | Carcinoma | 1,47% |
| Vermelho | Criptas | 43, 99% |
| Verde escuro | Mucina | 17, 23% |
| Cinza | Muscular da Mucosa | 0,12% |
| Salmão | Necrose | 2, 09% |
| Amarelo Claro | Lâmina Própria | 3, 85% |
| Azul Royal | Tecido conectivo | 2% |
| Preto | Não identificada | 29, 26% |
| Total | | 100% |

A Figura 3(a) mostra a lâmina corada por HE de tecido colorretal diagnosticada como adenocarcinoma. Observa-se uma arquitetura

desorganizada com tumor infiltrando a submucosa e glândulas atípicas. Há a diminuição da mucina intracelular com perda da diferenciação em células colunares e calciformes.

Nas Figuras 3(b) (c) temos a amostra em janela de CaF₂ e a sua imagem bioquímica por FTIR, respectivamente. Na Figura 3 (d) e Tabela 3, apresentamos os resultados, de acordo com a classificação obtida por ANN. A região classificada como adenocarcinoma correspondeu a 59,54%, ao passo que, 35,19% dos espectros não puderam ser identificados exemplificando a necessidade de implementação de maiores variabilidades espectrais a este software.

Na Figura 3(e), apresenta-se a imagem processada obtida por HCA. Identificou-se o parênquima neoplásico, que corresponde as células alteradas. Entretanto, para esta estrutura foi atribuída pelo software diferentes tonalidades de cores, o que pode sugerir que caracterizariam diferentes graus de diferenciação celular. Além disso, é característico das células neoplásicas invasão tecidual na forma de cordões ou ilhas celulares. Isso pode ser observado pela distribuição irregular das cores identificadas como de tecido neoplásico sobre o tecido estromal (conjuntivo) que aparece colorido em azul claro. Os limites glandulares foram perdidos tornando-se difícil identificar a lâmina basal, que se encontra rompida. Na Figura 3(f) temos os espectros médios do tecido colorretal adenocarcinoso.

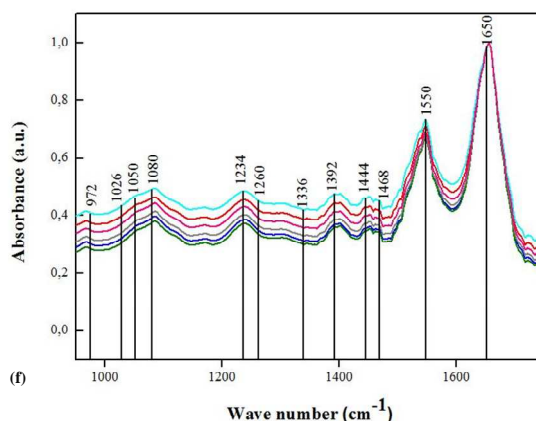
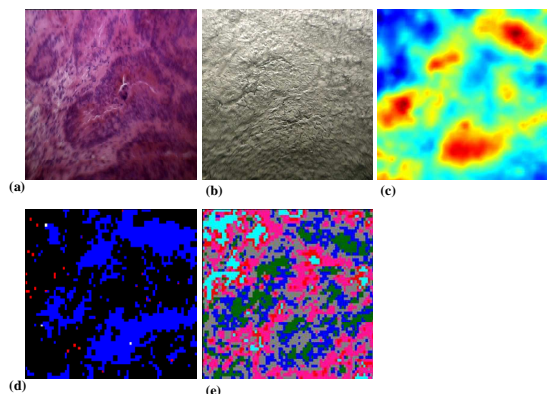


Figura 3: (a) Lâmina de tecido corada por HE, (b) Amostra em janela CaF₂; (c) Imagem bioquímica obtida por FT-IR; (d) Imagem processada obtida por ANN; (e) Imagem processada obtida por HCA; (f) Espectros médios do tecido com adenocarcinoma.

Tabela 3: Correlação morfológica versus bioquímica obtida utilizando-se a rotina computacional de redes neurais.

| COR | TIPO DE ESTRUTURA/TECIDO | PORCENTAGEM |
|---------------|--------------------------|-------------|
| Azul | Carcinoma | 59,54% |
| Vermelho | Criptas | 5,02% |
| Cinza | Muscular da Mucosa | 0,04% |
| Salmão | Necrose | 0,06% |
| Amarelo Claro | Lâmina Própria | 0,13% |
| Azul Royal | Tecido conectivo | 0,02% |
| Preto | Não identificada | 35,19% |
| Total | | 100% |

Imagens espectroscópicas vibracionais podem ser construídas de maneira univariada, onde os mapas químicos, com base nos picos, sua intensidade ou razões entre esses picos são gerados. Embora estes métodos forneçam informações sobre a distribuição e concentração relativa de um determinado grupo funcional e, portanto, características específicas de biomolécula, não são muito úteis em termos de classificação de características anatômicas e histopatológicas em seções de tecido, isso devido principalmente à forte sobreposição espectral de várias biomoléculas. A informação espectral, que normalmente é distribuída por uma ampla região espectral, pode ser utilizada de forma mais eficiente usando uma reconstrução da imagem multivariada.

Visto que a análise histológica é o “padrão ouro” de diagnóstico, este método foi utilizado para comparação com a análise bioquímica obtida pela análise de FTIR. Após a análise histológica e confirmação do diagnóstico da biópsia, foi

realizada a identificação das estruturas celulares presentes em cada ponto da lâmina e posterior correlação.

Nas figuras 1, 2, 3 (a) são apresentados os resultados obtidos da análise de três amostras de tecido de colón normal, com adenoma e com adenocarcinoma. A figura 1a corresponde à lâmina corada por HE da amostra de tecido da mucosa colônica normal. Correlacionando estes resultados com as características histológicas do cólon normal, observa-se claramente a estrutura regular das glândulas próximas umas das outras e ocupando a maior parte da área da mucosa. Como descrito anteriormente, estas glândulas são compostas por células colunares e caliciformes, indicando diferenciação em dois tipos celulares morfológica e funcionalmente distintos. As glândulas são constituídas por células caliciformes com núcleos regulares quanto à forma, tamanho e número. Nestas figuras, é possível também observar lâmina própria.

Nas Figuras 1, 2, 3 (b) e (c) apresentamos a imagem microscópica da amostra em janela de CaF_2 e a sua imagem bioquímica obtida por FTIR, respectivamente. Cada cor (nas figuras (c)) representa um espectro de FTIR característico daquela região, que pode estar associado com diferentes estruturas ou mesmo diferentes espessuras do tecido.

As Figuras 1, 2, 3 (d) referem-se a classificação realizada por ANN (redes neurais artificiais) da imagem bioquímica obtida por FTIR para as amostras de cólon analisadas neste trabalho. A imagem processada obtida por HCA é mostrada nas Figuras 1, 2, 3 (e), onde cada uma das cores representa uma estrutura identificada e classificada, segundo o banco de dados teciduais do software. Nestes casos, seis diferentes cores foram geradas pelo software CytoSpec®.

A figura 1,2,3 (e) e Tabelas 1,2,3 representam a análise pelo software CytoSpec®, o NeuroDeveloper, da imagem da figura 1,2,3 (d).

Das amostras de tecido normal foram produzidos seis diferentes códigos de cores correspondendo a diferentes estruturas ou constituintes do tecido. A maior quantidade de espectros foi classificada com sendo correspondente a cripta, seguido de mucina e lâmina própria. Uma pequena parte do tecido foi classificada erroneamente pelo software, como carcinoma correspondendo a 0,4% do tecido. Entretanto, o software foi capaz de realizar corretamente a identificação das criptas observada nesta região. O software também não foi capaz de classificar uma região correspondendo aproximadamente a 15% desta amostra.

A figura 1, 2,3(f) apresenta a média espectral de cada uma das diferentes regiões discriminadas na imagem processada pelo software Cystospec®, obtida por HCA, mostrando as bandas de

vibrações de ligações químicas dentro de todos os componentes bioquímicos das células (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos).

Discussão

A identificação de cada banda vibracional pode ser realizada utilizando-se a Tabela 2 da seção 5 neste trabalho. A região ($1750 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ dos ácidos nucleicos, amida I e amida II das proteínas, assim como, a quarta região entre $1500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ não apresentam diferenças espectrais relevante.

Quanto à análise de agrupamento HCA, os resultados do imageamento FTIR e microscopia de luz são altamente correlacionáveis. Na imagem clusterizada, os espectros de um cluster específico são codificados em uma cor exclusiva. Para montar as imagens infravermelhas, a cor atribuída a cada cluster espectral é exibida nas coordenadas em que cada pixel do espectro foi coletado. As imagens foram remontadas segundo uma codificação de 6 cores. Na Figura 1e, as cores azul claro e verde escuro refere-se a lâmina própria da mucosa e estoque fibrovascular, a cor vermelha as criptas, a cor magenta lúmen central das criptas, as camadas exteriores das células das criptas aparecem como as regiões em cinza e azul escuro. Na Figura 2e, as cores verde e vermelho referem-se a lâmina própria da mucosa e estoque fibrovascular, a cor azul claro as criptas, a cor magenta lúmen central das criptas, as camadas exteriores das células das criptas aparecem como as regiões em cinza e azul escuro.

Em se tratando dos adenocarcinomas foi possível notar a total desorganização tecidual característica da patologia, além das atípicas glandulares, rompimento de membrana basal entre outras alterações. Na Figura 3e, o parênquima neoplásico, que corresponde às células alteradas, foi colorido por magenta, vermelho, cinza, verde escuro e azul escuro, podendo se sugerir que caracterizariam diferentes graus de diferenciação celular. Além disso, é característica das células neoplásicas invasão tecidual na forma de cordões ou ilhas celulares. Isso pode ser observado pela distribuição irregular das cores identificadas como de tecido neoplásico sobre o tecido estromal (conjuntivo) que aparece colorido em azul claro. Os limites glandulares foram perdidos, dificultando identificação da lâmina basal que se encontra rompidos.

Os dados espectrais foram também analisados pela interface Synthon imaging da NeuroDeveloper (Synthon GmbH, Heidelberg, Alemanha). Enquanto CytoSpec® é um pacote de software projetado especificamente para a geração de imagens infravermelhas a partir do

mapeamento de grandes volumes de dados infravermelhos, o software NeuroDeveloper combina módulos para seleção de características espectrais, como o modelo de desenvolvimento de rede neural artificial ANN (artificial neural network) e o modelo de classificação (LASCH et al., 2006). Como observado na Figura 1, Tabelas 1, a amostra foi identificadas e classificadas com carcinoma na porcentagem de 0,4% para o tecido normal. O fato de ter sido identificado pelo programa uma porcentagem de carcinoma, na amostra de tecido normal, ainda que muito pequena, mostra a necessidade de implementação de maiores variabilidades espectrais a este software. Entretanto, os resultados exibidos nas Figuras 2d, Tabelas 2, onde a amostra foi identificada e classificada com carcinoma na porcentagem de 1,47%, para o tecido adenomatoso estão em razoável acordo com os dados histológicos.

Na Figura 3d, Tabela 3, a amostra foi identificada e classificada com carcinoma na porcentagem de 59,54, para o tecido adenocarcinoso. O fato da porcentagem das amostras de tecido normal e adenomatoso apresentarem carcinoma, contradiz os achados da análise por HE (figura 1,2 a), onde não foi possível visualizar a invasão do adenocarcinoma. Essa divergência de resultados apresentados pelas técnicas pode estar relacionada ao número de dados armazenados no software NeuroDeveloper, e que compõem o sistema. Por isso, faz-se necessário tornar o banco de dados mais robusto, ampliando-o através da inclusão de novos dados amostrais.

Contudo, em termos de critérios de classificação estatística, a sensibilidade do diagnóstico de carcinoma é bastante elevada, pois todos os espectros de carcinoma foram classificados como sendo carcinoma e o número de falsos negativos é quase nulo. Por outro lado, observam-se alguns possíveis falsos positivos, uma vez que muitos espectros de outras classes espectrais foram classificados como carcinoma, como observado nas Tabelas 3 e 4. A porcentagem mais elevada de espectros não classificados foram os das amostras de adenocarcinoma nas Tabelas 9 e 10, com 71,84% e 58,9% respectivamente. Esses últimos dados exemplificam a alta sensibilidade, e uma possível de baixa especificidade que poderá ser aprimorada ampliando-se o banco de dados, como já citado anteriormente. Entretanto, de um modo geral há uma correlação relativamente elevada entre o padrão-ouro da histopatologia e dos diagnósticos espectrais observada em todas as amostras.

Das amostras de tecido normal, foram gerados 2226 espectros totais, referentes a figura

1 (b); a partir destes, foram calculados, após análise estatística, os espectros médios apresentados nas Figuras 1 (f). Este processo se repetiu para as amostras de tecido adenomatoso e adenocarcinoso, onde foram gerados 2444 espectros totais, referentes a figura 2 (b), respectivamente; a partir destes, foram calculados, após análise estatística, os espectros médios das figuras 2 (f). Das amostras de tecido adenocarcinoso, foram gerados 4740 espectros totais, referentes a figura 3 (b); a partir destes, foram calculados, após análise estatística, os espectros médios, Figura 3 (f).

As Figuras 1,2,3 (f) mostram, portanto, os espectros médios típicos de absorção infravermelha de um tecido colorretal humano normal, adenomatoso e adenocarcinoso, no intervalo espectral de 950 - 1750 cm^{-1} .

Os espectros são formados por um número distinto de picos, que estão associados a certas ligações bioquímicas, podendo ser divididos em regiões de proteína (1750 cm^{-1} -1470 cm^{-1}) e regiões de DNA e RNA (1444 cm^{-1} -970 cm^{-1}). Os constituintes primários da região de proteína são os picos de Amida I (~1650 cm^{-1}) e Amida II (~1550 cm^{-1}). A região de DNA e RNA consiste de um número de espectros de absorbância com maior contribuição de ν s PO-2(~1080 cm^{-1}) e de vibrações de estiramento assimétrico do fosfato (ν as PO-2(~1234 cm^{-1}). Em ~1026 cm^{-1} glicogênio e o pico de ~970 cm^{-1} está associado com proteínas e fosforilação de ácido nucleico.

A amida I surge das vibrações de estiramento da ligação hidrogênio C=O, e a amida II do estiramento C-N e da vibração de flexão CNH. As diferenças de intensidade do tecido normal, adenomatoso e adenocarcinoso para a amida II, não foram significativas nos três casos.

Importantes características espectrais foram encontradas na região de DNA e RNA (serão discutidos mais a frente), e estão associadas com proteínas e fosforização de ácidos nucleicos (~970 cm^{-1}), ν s PO-2(~1080 cm^{-1}) e ν as PO-2(~1234 cm^{-1}); Amida I (~1650 cm^{-1}) e Amida II (~1550 cm^{-1}). A cadeia lateral mais fraca de aminoácidos, peptídeos e proteínas, em ~1444 cm^{-1} , está associada ao estiramento simétrico e assimétrico e da vibração de flexão CH₃ (FABIAN *et al.*, 2002). As regiões de ~1336 cm^{-1} (Amida III), e ~1453 cm^{-1} exibem as bandas de colágeno típico.

Os picos de absorção de ~1080 e ~1234 cm^{-1} são devido às vibrações de estiramento simétrico e assimétrico do PO-2, respectivamente. A absorção proveniente do tecido normal foi mais alta do que do pólipso e do canceroso em toda essa região do espectro e nas três situações. As bandas de ~1026 e ~1050 cm^{-1} do espectro infravermelho

são responsáveis pelos modos de vibração de estiramento dos grupos CH₂OH e C-O, acoplados com os grupos de flexão C-O e C-OH dos carboidratos. Diferentes padrões espectrais foram encontrados entre o normal, pólipos e o câncer na região de 1100 – 950 cm⁻¹ (PO-2 de ácidos nucleicos e carboidratos) com máxima de 1080 e 1052 cm⁻¹, respectivamente. LASCH et al., (2004;2006); LASH P; NAUMANN D (2007)

A intensidade da banda ~1050 cm⁻¹ dá uma estimativa dos níveis de carboidratos. O nível de carboidratos entre o normal e o câncer é maior à medida que há progressão da doença. Isso pode ser porque a absorção de carboidratos (ou o seu metabolismo) é afetada nos tecidos com câncer especialmente nos estágios mais avançados da doença. Nos estágios iniciais o teor de carboidratos calculado a partir dos espectros, foi menor do que no pólipos e isso se inverteu no câncer. Com isso foi possível estabelecer uma ótima correlação das análises espectrais, entre os tecidos normais e os cancerosos. Contudo a diferença entre os pólipos e os malignos não foram significativas.

As principais diferenças espectrais foram encontradas nas faixas de colágeno típico em ~1336 e ~1453 cm⁻¹. Curiosamente, os espectros obtidos a partir da parte central das criptas apresentam bandas de infravermelho muito característico também. Estas bandas são diferentes daqueles de colágeno e podem ser encontrados em 1080 cm⁻¹. A maioria dessas bandas pode ser atribuída à mucina, glicoproteína rica em cisteína. A mucina é conhecida por estar presente como um precursor em grânulos de secreção de células caliciformes maduras ou, após a sua secreção no lúmen das criptas. Devido à heterogeneidade dos diferentes tipos de mucina, a atribuição de banda é um pouco diferente na literatura. Para dar um exemplo, a posição do pico mais proeminente mucina foi encontrada entre 1035 e 1050 cm⁻¹. As diferenças espectrais entre as regiões ricas em mucina das criptas dos espectros das deste estudo são bastante pequenas. As mudanças espectrais mais relevantes foram encontrado em bandas de PO₂- em ~1080 e ~1234 cm⁻¹ (KRAFFT *et al*, 2008). Postulou-se que a intensidade das bandas de PO₂- podem estar relacionadas com o grau de atividade da divisão celular. Tendo em vista que nas células cancerosas a taxa de divisão é geralmente maior do que em células precursoras, o espectro médio do tecido com câncer deve diferir do tecido "normal" que apresenta menor índice mitótico. Os resultados experimentais do presente estudo confirmam estas conclusões. Sinais de uma maior atividade de divisão do carcinoma são verificados. Já nos tecidos de transição, adenomas, os espectros se misturam e

a diminuição progressiva do sinal de mucina também é observada. Isso pode ser justificado pelo processo inicial da perda das características da arquitetura típica do cólon que tem início nestas estruturas (FABIAN et al.; 2002)

Conclusão

Os resultados preliminares apresentados neste estudo demonstraram a potencialidade da utilização do imageamento FTIR na detecção de mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem nos tecidos quando estes sofrem alterações de um estado normal para alterado. Foi possível correlacionar os resultados obtidos no imageamento bioquímico comparado à fotomicrografia da respectiva amostra (corada por HE). Nas amostras normais, a análise de cluster das imagens bioquímicas identificou as seguintes estruturas: lâmina própria da mucosa, as glândulas (células epiteliais e células caliciformes), lúmen central da glândula, mucina e tecido conjuntivo. Nas amostras com alterações patológicas, além das estruturas morfológicas citadas, foi possível também identificar bioquimicamente as regiões alteradas com alta sensibilidade e especificidade. Nossos estudos demonstraram que a possibilidade da correlação da imagem morfológica com a imagem bioquímica é plausível. Entretanto, ficou claro neste estudo que o banco de dados comerciais disponíveis para este fim continua ainda incipiente e deve ser atualizado com novos dados a fim de se obter uma maior sensibilidade e especificidade. A combinação do imageamento espectroscópico com técnicas digitais de análise de imagem é uma técnica nova e poderosa que pode ser usada para re-montar imagens de cor de cortes histológicos. Assim, nossos resultados mostram a capacidade desta técnica para uma futura utilização clínica na análise histopatológica.

Referências

- AMERICAN CANCER SOCIETY Detailed Guide: Colon and Rectum Cancer. Atlanta: American Cancer Society, 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2010. Atlanta: American Cancer Society, 2011.
- DIEM M, et al. A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue. *Analyst*, v.129, 880 – 885, 2004.
- FERNANDEZ, D et al Infrared Spectroscopic imaging for hispathologic recognition. *Nature biotechnology*, v. 23, n.4, 2005.
- FABIAN H, LASCH P, BOESE M, HAENSCH W. *Biopolymers*, v. 67, p.354–357, 2002.

- KIERNAN JA Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. 4 ed. 4th ed. Bloxham, UK: Scion. Bloxham, UK: Scion, 2008.
- KRAFFT, C. et al. Raman mapping and FTIR imaging of lung tissue: congenital cystic adenomatoid malformation. *Analyst*, v.133, n.3, p.361-371, 2008.
- LASCH P; et al. Artificial neural networks as supervised techniques for FT-IR microspectroscopic imaging. *J. Chemometrics*; v.20, n.5. p. 209–220, 2006.
- LASCH P; et al. Imaging of colorectal adenocarcinoma using FTIR microspectroscopy and cluster analysis. *Biomchimica et Biophysica Acta*, v.1688, p.176-186, 2004.
- LASH P; NAUMANN D. Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v.1758, n.7, p 814-829, 2007.
- RANSOHOFF DF, LANG CA, KUO HS. Colonoscopic surveillance after polypectomy: considerations of cost-effectiveness. *Ann Intern Med*; 114:177-82; 1991.
- REX DK, LEHMAN GA, HAWES RH, ULBRIGHT TM, SMITH JJ. Screening colonoscopy in asymptomatic average-risk persons with negative fecal occult blood tests. *Gastroenterology* 100: 64-7;1991.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. A relevância do câncer colorretal. Colorectal cancer relevancy. Grupo Técnico de Avaliação e Informações de Saúde. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil, Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa) Agosto; 6(68) ISSN 1806-4272; 2009.
- TORRING ML, FRYDENBERG M, HANSEN RP, OLESEN F, HAMILTON W E VEDSTED P. Time to diagnosis and mortality in colorectal cancer: a cohort study in primary care. *British Journal of Cancer*; 104, 934-940. doi:10.1038/bjc.2011.60 www.bjcancer.com, 2011.
- WOLTHUIS R, TRAVO A, NICOLET C, NEUVILLE A, GAUB M-P, GUENOT D, LY E, MANFAIT M, JEANNESSON P, PIOT O. IR Spectral Imaging for Histopathological Characterization of Xenografted Human Colon Carcinomas. *Anal. Chem*, v. 80, p.8461–8469, 2008.