

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

RICK ROCHA

**“IDENTIFICAÇÃO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES
UTILIZANDO TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA”**

São José dos Campos - SP

2007

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Rick Rocha

**“Identificação das doenças cardiovasculares utilizando técnicas de
espectroscopia óptica”**

Tese defendida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof. Dr. Antonio G. J. Balbin Villaverde
Prof. Dr. Aldo Brugnera Junior

São José dos Campos - SP

2007

“Identificação das Doenças Cardiovasculares Utilizando Técnicas de Espectroscopia Óptica”

R576e

Rocha, Rick

Identificação das Doenças Cardiovasculares Utilizando Técnicas de Espectroscopia Óptica /Rick Rocha. São José dos Campos: Univap, 2007.
1 Disc Laser.: Color

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1.Doenças cardiovasculares 2. Análise espectral Raman 3. Fluorescência.
4.Reflectância I. Villaverde, Antonio Guillermo Jose Balbin ., Orient .II.;
Brugnera Jr, Aldo; Orient. III.Título.

CDU:543.42

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura do aluno:



Data: 10 de Dezembro de 2007

RICK ROCHA

**“IDENTIFICAÇÃO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES
UTILIZANDO TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **ALFEU SARAIVA RAMOS** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **ANTONIO G. J. BALBIN VILLAVARDE** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **ALDO BRUGNERA JUNIOR** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **ANTONIO WILSON SALLUM** (UNICAMP) _____

Prof. Dr. **JESUS DJALMA PÉCORÁ** (USP) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 10 de dezembro de 2007.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

*À meus filhos **Gabriela e Daniel**, verdadeiro*

presente de Deus em minha vida.

Com amor,

*A minha querida **Maricília**,*

Por fazer parte da minha vida em todos os momentos,

pelos ensinamentos valiosos na minha vida profissional e pessoal,

minha eterna gratidão como minha companheira

por todos esses nossos anos.

Com todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada teria acontecido em minha vida e esta não teria sentido.

Aos meus pais, exemplos fundamentais na minha vida, minha eterna gratidão a vocês!

Agradeço a Profa. Dra. Maricília Silvia Costa, que de forma inteligente e carinhosa soube ensinar e apoiar nos momentos mais difíceis, sua dedicação e atenção foram fundamentais, sem os quais eu não teria conseguido.

Ao Prof. Dr. Aldo Brugnera Junior, meus sinceros agradecimentos, pela ajuda, apoio e disposição nas horas mais importantes, além do seu exemplo profissional, pessoal, familiar e especialmente pela amizade, característica tão valorizada e demonstrada por este querido professor. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Antonio G. J. Balbin Villaverde por sua orientação, amizade, confiança em mim ao longo deste trabalho, meu sincero agradecimento. Ao Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior pela dedicação, conhecimento, competência e amizade, sendo uma parte importante na realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Baptista Gargione Filho, Reitor da Univap, e ao Prof. Dr. Marcos T. Tavares Pacheco, diretor do IP&D e Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro pela confiança depositada em mim tornando possível a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Cibelle B. Lopes, Ilene C. Rosia, Luís Eduardo Soares e Tatiana T. V. Mendez presentes em nesta longa caminhada, pelo carinho e amizade.

A Profa. Dra. Fátima Zanin pela amizade e colaboração prestada na realização deste trabalho, meu sincero agradecimento. Ao Prof. Dr. Antônio Pinheiro pela amizade e apoio e a coordenadora do curso de Odontologia Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau, amiga e exemplo de profissionalismo, aos amigos Antônio Jose G. Moreira, Rosângela e Rúbia pela amizade e apoio durante a execução deste trabalho.

A todos os professores do curso de Odontologia – UNIVAP: Vicente Prisco da Cunha, Jarbas Francisco, Vanderlei Goulart, Dirian Murgos e Albano Cunha Júnior pelo companheirismo e amizade.

"Temos o dom de atrair tudo o que queremos para nossas vidas, esse é o verdadeiro presente que recebemos quando nascemos".
Rhonda Byrne

“Identificação das Doenças Cardiovasculares Utilizando Técnicas de Espectroscopia Óptica”

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar e classificar as doenças cardiovasculares, utilizando diferentes técnicas de Espectroscopia Óptica: Espalhamento Raman no Infravermelho Próximo, Fluorescência e Refletância Óptica; com o auxílio da técnica estatística Análise de Componentes Principais (PCA), e utilizando a histopatologia como padrão ouro. Foram estudadas amostras de válvulas aórticas e artérias carótidas, retiradas de pacientes *pos mortem* do serviço de autópsia da Universidade de São Paulo (USP). No primeiro estudo foram analisados 88 segmentos de amostras de válvulas aórticas, sendo classificadas como normal ($n=70$) e calcificada ($n=18$) através da espectroscopia Raman e da histopatologia. Foi observado no espectro Raman diferenças no comportamento entre as válvulas cardíacas calcificadas quando comparadas com as normais. Em um outro estudo, foram analisados 57 segmentos de amostras de artérias carótidas. Foi identificada a presença de placas ateroscleróticas através da análise dos picos Raman em 961, 1071, 1451, 1439, 1655 e 1663 cm^{-1} . Nos tecidos não ateroscleróticos foram encontrados picos em 1451 e 1655 cm^{-1} , enquanto que picos em 1439 e 1663 cm^{-1} foram observados em placas ateromatosas. Essa diferença pode ser usada para separar os dois tipos de tecido de artéria. No terceiro estudo foram analisados 60 segmentos de amostras de artérias carótidas, sendo classificadas como normais ($n=42$) e patológicas ($n=18$), utilizadas as espectroscopias de fluorescência e refletância. Os resultados indicaram que com o auxílio do PCA foi possível diferenciar o tecido normal do tecido aterosclerótico com alta sensibilidade e especificidade, obtendo-se para fluorescência 81% de sensibilidade e 88% de especificidade, enquanto que para a refletância óptica foram encontrados 81% de sensibilidade e 91% de especificidade. Na avaliação dos resultados obtidos pode-se concluir que a espectroscopia óptica, tal como o espalhamento Raman, fluorescência e refletância, são técnicas promissoras para diferenciar os tecidos normais dos patológicos.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares, Espectroscopia Raman (ER-IP), Espectroscopia de Fluorescência, Refletância óptica, PCA.

“Identification of the cardiovascular disorders used of optical spectroscopy technique”

ABSTRACT

The aim of the present study was to identify and classify cardiovascular diseases through the use of different Optical Spectroscopy techniques: Near Infrared Raman scattering, Fluorescence and Optical Reflectance, with the aid of the statistical technique Principal Components Analysis (PCA) and employing the histopathology as the golden standard. *Post-mortem* samples of aortic valves and carotid artery fragments, obtained from the Autopsy Service at the University of São Paulo (São Paulo State University) (São Paulo, SP, Brazil) were studied. In the first study, the presence of calcifications in aortic valves was identified by the use of Raman spectroscopy and histopathology. Differences between Raman spectra of calcified cardiac valves and normal ones were observed. In another experiment, the presence of atherosclerotic plaques in carotid arteries was identified by means of the analysis of the Raman peaks at 961, 1071, 1451, 1439, 1655 e 1663 cm^{-1} . Spectra of normal non atherosclerotic tissues presented peaks at 1451 and 1655 cm^{-1} , whereas that for atherosclerotic plaques was found Raman peaks at 1439 and 1663 cm^{-1} . That different behavior allowed separating one tissue from the other. In the third study, fluorescence and reflectance spectroscopies were employed to analyze normal and pathologic carotid arteries. Results shown that by using PCA was possible to differentiate normal tissue from atherosclerotic with high sensitivity and specificity, obtaining 81% of sensitivity and 88% of specificity for fluorescence measurements, whereas for the reflectance technique were found 81% and 91%, respectively. It can be concluded that the optical spectroscopy, such as Raman scattering, fluorescence and reflectance, seems to be a promising technique for the differentiation between normal and pathologic tissues.

Key-words: Cardiovascular diseases, Near Infrared Raman spectroscopy, Fluorescence spectroscopy, Optical reflectance, PCA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Doenças Cardiovasculares	11
1.2 Associação entre doença periodontal e as doenças cardiovasculares	11
1.3 Aterosclerose	13
1.4 Válvulas Cardíacas	14
1.5 Métodos de diagnóstico	15
1.6 Espectroscopia Raman	16
1.7 Espectroscopia de Fluorescência	17
1.8 Espectroscopia de Refletância	18
1.9 Análise dos Componentes Principais	19
2 OBJETIVO	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 RESULTADOS	22
3.1 Artigo publicado	22
3.2 Artigo publicado	23
3.3 Artigo aceito para publicação	24
4 DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÃO	29
6 TRABALHOS FUTUROS	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

Com o aumento do número de pessoas que sobrevivem à sétima década de vida ou mais, é importante o conhecimento sobre as alterações no sistema cardiovascular que ocorrem frequentemente no idoso. As complicações clínicas associadas com as disfunções cardíacas são as principais causas por um grande número de mortes em todo o mundo. ¹ Dentre elas, a aterosclerose e as cardiopatias valvares são consideradas uma das principais causas de morte em nações industrializadas. ²

Os fatores de risco para alterações cardiovasculares como a hipertensão, dislipidemia e o fumo são responsáveis por dois terços da incidência das doenças que afetam o coração. É importante perceber que vários dos fatores de risco para alterações cardiovasculares também o são para a doença periodontal como idade avançada, fumo e diabetes. ³

Este fato fez com que a inter-relação entre a doença periodontal e as doenças cardiovasculares venham ser estudadas. Atualmente, com a publicação de estudos epidemiológicos com análises estatísticas ajustadas para estes fatores, como também estudos mais específicos enfocando elevação dos próprios fatores de risco clássicos das doenças cardiovasculares em indivíduos com doença periodontal, a inter-relação tem se concretizado como um fato. ⁴⁻⁶

1.2 Associação entre doença periodontal e as doenças cardiovasculares

A periodontite é uma reação inflamatória causada por bactérias predominantemente anaeróbias gram-negativas, com níveis de prevalência elevados. ⁷ Este processo culmina com a destruição dos componentes do periodonto, ou seja, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar. É crônico em natureza, progride lentamente, e normalmente não há nenhum sintoma. ⁸ Associada a diversas patologias pode interferir nas doenças e condições

sistêmicas tais como a gravidez, elevando o risco de parto prematuro de bebês de baixo peso⁹, doenças respiratórias¹⁰, diabetes¹¹ e doenças cardiovasculares.¹²

A teoria de que a aterosclerose passa por um processo inflamatório acentuou o interesse no papel que alguns agentes infecciosos possam ter no início ou mesmo na modelação da aterogênese. Vários estudos têm demonstrado uma relação entre as doenças periodontais e as doenças cardiovasculares. Alguns autores que defendem este elo de ligação baseiam-se, sobretudo, na detecção de material genético de bactérias periodontais em placas de ateroma (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*).^{13,14}

Uma outra teoria sugere que existe um mecanismo genético comum que estabelece a ligação entre a periodontite e a aterosclerose. É evidente que a expressão da doença periodontal não depende apenas do fator etiológico bacteriano, o que explica que pacientes com pouca placa bacteriana tenham formas graves da doença e vice-versa. Efetivamente, alguns pacientes apresentam uma resposta aumentada às infecções. Este fato parece estar relacionado com diferenças na resposta inflamatória/ imunológica, nomeadamente na capacidade de segregação de monócitos.¹⁵

A doença periodontal tem sido associada a um aumento dos níveis de marcadores pró-inflamatórios, que são indicadores de risco para as doenças cardiovasculares, tais como a proteína C-reativa, a IL-6, o fibrinogênio e contagem de leucócitos.¹⁶

Beck e Offenbacher¹⁷, no estudo da associação da doença periodontal e as doenças cardiovasculares, afirmam que de 44% a 57% dos adultos apresentam periodontite moderada, enquanto que 10% apresentam periodontite severa. O mecanismo proposto pelos autores para a ligação entre as duas doenças envolve a bacteremia pelos patógenos periodontais e seus antígenos, endotoxinas e a liberação de citocinas inflamatórias capazes de participar no processo da aterogênese e dos eventos tromboembólicos.

As calcificações na artéria carótida podem ser observadas em radiografias panorâmicas realizadas por indicação odontológica. Esses achados são considerados, portanto, acidentais e constituem-se em recurso adicional na prevenção de eventos cardiovasculares e vasculocerebrais.¹⁸ O conhecimento dos fatores de risco da doença cardiovasculares e sua relação com imagens sugestivas de ateromas calcificados na artéria carótida torna ainda mais importante o papel do cirurgião-dentista como profissional de saúde.

1.3 Aterosclerose

A patogenia mais encontrada das doenças cardiovasculares e cerebrovasculares é indiscutivelmente a aterosclerose.¹⁹ A aterosclerose é uma doença progressiva crônica dos vasos sangüíneos, com alterações celulares e metabólicas nas paredes arteriais.

As doenças cardiovasculares destacam-se, nos dias atuais, como a mais freqüente causa de óbito nos países desenvolvidos.²⁰ A patogenia mais encontrada das doenças cardiovasculares é, indiscutivelmente, a aterosclerose, que pode acometer, inclusive, pacientes jovens.^{21,22} A doença cardiovascular aterosclerótica é responsável por mais de 19 milhões de mortes anuais.²³ A aterosclerose da carótida representa ainda, 10 a 20% dos casos de acidente vascular cerebral²⁴, que constitui a terceira causa de mortalidade nos Estados Unidos.²⁵

A aterosclerose é um processo multifatorial, e quanto maior o número de fatores de risco, maior o grau e severidade da doença. Os fatores de risco que têm sido identificados são dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo e sedentarismo. A dislipidemia é alteração nos lipídeos sangüíneos, ou seja: colesterol total, HDL, LDL e triglicérides.²⁶

A aterosclerose é caracterizada por alterações da camada íntima, representada por acúmulo de lipídios, carboidratos complexos, componentes do sangue, células e material intercelular. Inicia-se com a migração de monócitos da corrente sangüínea (tipo de leucócito mononuclear) para se depositarem nas paredes arteriais, acumulando gorduras (principalmente colesterol) e formando as placas ateroscleróticas ou ateromas. Estas placas são escassamente distribuídas, mas à medida que a doença avança, elas resultam cada vez mais numerosas diminuindo o calibre das artérias e, por tanto, comprometendo o fluxo arterial, e ainda debilitando a parede arterial. Não está totalmente esclarecido se estes espessamentos representam o desenvolvimento da aterosclerose ou se estas regiões de espessamento são derivadas do estresse aumentado na parede da artéria, mas que não progridem para lesões avançadas de aterosclerose. Contudo, um aumento da espessura da íntima ocorre difusamente através das grades artérias como parte normal do envelhecimento. As artérias afetadas perdem elasticidade e se estreitam gradativamente, podendo se romper. O contato das substâncias do interior da placa com o sangue produz sua imediata coagulação e conseqüente obstrução total e súbita do vaso²⁷

Achados de autópsia mostram associação expressiva entre aterosclerose carotídea e coronariana. Estudos epidemiológicos demonstram associação entre o espessamento do complexo íntima-média das artérias carótidas e os fatores de risco cardiovasculares

conhecidos. A presença de aterosclerose carotídea pode propiciar também eventos como o acidente vascular cerebral e ataque isquêmico transitório.²⁸⁻³⁰

Como a aterosclerose avançada pode estar presente antes mesmo que apareçam os sintomas e, muitos pacientes morrem dentro das primeiras horas de infarto do miocárdio ou mesmo subitamente, a aterosclerose deve ser prevenida desde cedo na vida dos indivíduos³¹

Estudos têm demonstrado que o uso de drogas para redução de lipídios leva à redução da espessura da placa do complexo íntima-média, ressaltando o valor preventivo deste procedimento diagnóstico²⁹. Fazem-se necessários estudos que permitam a utilização da medida daquele espessamento e de sua progressão como indicadores de aterosclerose generalizada e preditores de doenças cerebrovasculares e cardiovasculares²⁷. É possível, assim, a identificação dos componentes e do volume das placas, o que ajuda na decisão clínica sobre o melhor método de tratamento em cada caso, com base na vulnerabilidade da lesão aterosclerótica.³²

1.4 Válvulas Cardíacas

As cardiopatias valvares são a terceira maior incidência das doenças cardiovasculares comum nos Estados Unidos, depois da hipertensão e da aterosclerose coronária. A prevalência aumenta com a idade, de tal forma que afeta cerca de 4% da população idosa.³³

As valvas aórticas estão sujeitas a intensos estresses mecânicos repetitivos, sobretudo nos pontos de dobradiças das cúspides e folhetos, devidos a 40 milhões ou mais de ciclos cardíacos por ano.^{34,35}

Dentre as várias causas de complicações valvares, uma das principais é a morte súbita devido à estenose aórtica (EA), a qual ocorre pela deposição de cálcio na válvula aórtica sobre o anel da válvula mitral. A calcificação da válvula mitral pode ser um indicativo de disfunção valvular.³⁶ A calcificação da válvula aórtica é comum tanto como doença congênita como adquirida, no entanto com diferentes etiologias.³⁷

As valvopatias calcificadas mais frequentes são: a estenose aórtica, a calcificação de valva aórtica e calcificação anular mitral. Cada uma delas exhibe calcificação primariamente

distrófica, com deposição menos proeminente de lipídios e proliferação celular, um processo distinto, porém com algumas características da aterosclerose.³⁸

Estudos demonstraram a existência de uma estreita interação de vários processos nas válvulas com EA, tendo surgido evidências de inflamação crônica³⁹, detecção de proteínas como a osteopontina implicadas na calcificação⁴⁰ e na detecção de calcificação em válvula cardíaca de células com atividades semelhantes às do osteoblasto.^{41,42}

1.5 Métodos de diagnóstico

Métodos tradicionais de diagnóstico para as doenças cardiovasculares como o ultra-som, é o exame mais disponível e barato. Apresenta boa sensibilidade e especificidade, torna-se o mais utilizado na detecção da estenose de carótida extracraniana. Entretanto, Qureshi et al.⁴³ observaram que o ultra-som apresentou falso positivo de 20% para estenoses em pacientes sintomáticos e falsos positivo de 41% para estenoses em pacientes assintomáticos. Assim, é recomendado, antes de tomar a devida conduta, realizar uma angiografia nos pacientes cujo ultra-som detectou estenose.⁴³

A angiografia é o melhor exame para estudo das carótidas, mas deve ser considerado como um método invasivo, caro e que traz consigo um risco em torno de 1% de complicações.⁴⁴

Um outro método considerado “padrão ouro” para a avaliação da placa de aterosclerose e sua classificação é o ecodoppler. É um método não invasivo, simples e de baixo custo, mas que depende de qualidades específicas do examinador.⁴⁵

Já as técnicas de espectroscopia óptica, tais como: a refletância, fluorescência, absorção no infravermelho e espalhamento Raman, podem proporcionar informações sobre a composição dos tecidos biológicos em nível molecular. Dentre estas técnicas, a de maior destaque pela sua especificidade molecular é a espectroscopia de espalhamento Raman, mais chamada de espectroscopia Raman.⁴⁶ Nesta técnica, os dados da patologia são coletados e analisados em frações de segundo, possibilitando resultados em tempo real. Apresenta ainda, a vantagem de não ser destrutiva, pois não requer um tratamento prévio das amostras e auxiliar na seleção do tratamento, no prognóstico do paciente e no mapeamento cirúrgico das lesões malignas confirmadas, visto que, as alterações bioquímicas precedem as morfológicas.⁴⁶⁻⁴⁸

1.6 Espectroscopia Raman

O efeito Raman é um processo fundamental em que energia é trocada entre luz e matéria. Quando a luz interage com a substância ela pode ser espalhada ou absorvida. Grande parte dessa luz é espalhada mantendo a mesma frequência da luz incidente (espalhamento elástico). Contudo, uma pequena fração da luz incidente poderá ser espalhada com frequências diferentes devido às energias vibracionais das moléculas no material. Visto que a energia é proporcional à frequência, a mudança na frequência da luz espalhada deve ser igual à frequência vibracional da molécula. Este processo de troca de energia entre vibrações moleculares e luz incidente é o efeito Raman.^{46,47}

O espectro Raman traz consigo informações das vibrações das ligações químicas dos diversos grupos moleculares. Como as bandas de vibração são únicas e específicas, estreitas e sensíveis à variação da estrutura molecular, diferenças que dependem do grupo molecular analisado podem ser facilmente identificadas. O espectro Raman é como uma impressão digital da molécula, fornecendo informação bioquímica específica, não encontrada em outras técnicas ópticas.⁴⁷

O espectro Raman de tecidos biológicos é composto de bandas relativamente estreitas, tipicamente entre 10 e 20 cm^{-1} de largura FWHM (Full Width at Half Maximum – máxima largura à meia intensidade), a qual exibe a presença de muitas moléculas bioquímicas. As contribuições relativas dessas moléculas bioquímicas para o espectro Raman do tecido são proporcionais à abundância relativa dessas moléculas presentes no tecido. Esta é a base para a quantificação da informação que a espectroscopia Raman pode prover para diagnóstico. A quantificação do espectro Raman, combinada com habilidade para prover uma única identificação das moléculas bioquímicas presentes nos tecidos, ilustra o potencial de espectroscopia Raman para informação de diagnóstico quantitativo para análise dos tecidos.⁴⁶

A espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IP) é uma técnica que permite investigar diversos materiais e substâncias. Vem obtendo um grande progresso em diversos campos de atuação na área de saúde, tais como: detecção de ácido láctico intramuscular⁴⁹, diagnóstico de aterosclerose in vitro^{50,51} e na análise da calcificação de válvulas cardíacas.⁵²

A espectroscopia Raman é uma técnica promissora que pode ser usada para caracterizar a composição química de tecido biológico. Um espectro Raman de uma determinada molécula apresenta bandas específicas dos grupos moleculares presentes, o que

faz da técnica ideal para descobrir, identificar e diagnosticar doenças que envolvem mudanças de substâncias químicas em tecido, como aterosclerose.⁵³

Van de Poll et al.⁵⁴ avaliaram a sensibilidade e especificidade da técnica Raman para detectar colesterol e calcificação em artérias coronárias e aorta. Num total de 13 amostras, foram avaliados 114 locais aleatórios onde verificaram a presença de colesterol e calcificação. Os autores concluíram que a técnica Raman apresentou uma alta especificidade e sensibilidade na identificação do colesterol e calcificação em placas ateroscleróticas.

A ER-IP pode proporcionar informações sobre a composição química da parede arterial. Salenius et al.⁵⁵ estudaram 167 segmentos de artéria carótida e femoral em vários estágios patológicos e encontraram uma forte correlação entre a análise histopatológica e os espectros Raman. Concluíram que a espectroscopia Raman pode fornecer informações seguras sobre a composição química das artérias coronárias e femorais. A identificação dos componentes das placas ajudou na decisão clínica sobre o melhor método de tratamento com base na vulnerabilidade da lesão aterosclerótica.

1.7 Espectroscopia de Fluorescência

A Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (EFIL) vem se mostrando bastante promissora na diferenciação entre tecidos normais e patológicos.^{56,57}

A técnica de espectroscopia de fluorescência baseia-se na excitação da amostra por radiação em comprimentos de onda curtos (ultravioleta-visível) e a observação da resposta luminescente da amostra em comprimentos de onda longos (visível). No processo de fluorescência a energia absorvida é sempre maior do que a emitida.^{56,58} Desta forma obtêm-se a caracterização das propriedades autofluorescentes dos cromóforos presentes nas amostras, tanto através dos espectros de excitação (variação do comprimento de onda de excitação) como os espectros de emissão.⁵⁶ Em outras palavras, a emissão da fluorescência nos tecidos ocorre quando um fóton é absorvido por uma molécula e os elétrons dessas moléculas são excitados, passando do estado fundamental para um estado de maior energia. Como os elétrons não possuem tendência em permanecer neste estado de excitação, a relaxação ocorre quase que imediatamente e esta energia que foi absorvida é irradiada na forma de luz (emissão de fótons).⁵⁸ O grupo molecular no qual estas transações eletrônicas são possíveis é chamado de cromóforo e o grupo molecular que resulta em fluorescência é chamado de fluoróforo⁵⁶.

Os fluoróforos são elementos associados com a matriz estrutural dos tecidos como o colágeno e a elastina, ou estão envolvidos nos processos metabólicos celulares como a NADH e as flavinas, além dos aminoácidos aromáticos (triptofano e fenilalanina) e várias porfirinas ⁵⁸.

A faixa de comprimentos de onda, localização de picos, intensidade e tempo de decaimento desta autofluorescência auxiliam na determinação dos componentes bioquímicos da amostra. ⁵⁶

Esta técnica vem sendo usada como ferramenta de diagnóstico de alguns tipos de câncer: pulmão, bexiga, esôfago, pele e cólon ⁵⁷ e lesões ateroscleróticas. ⁵⁹ Apresenta como vantagem o fato de ser mais rápida e mais sensível quando comparada ao estudo histológico para avaliar lesões causadas por raios UV. ⁶⁰

Estudos recentes demonstraram o potencial de LIFS para caracterizar a parede da arterial normal e alguns tipos de lesões ateroscleróticas: fibrose, ateroma e placas calcificadas. ^{61,62}

1.8 Espectroscopia de Refletância

A espectroscopia de refletância é um método ótico que fornece a medida direta da luz absorvida e espalhada da amostra. A radiação refletida de uma superfície depende mais diretamente da natureza das partículas do meio sob consideração. A radiação refletida de tal meio é usualmente considerada como consistindo de duas partes distintas: a primeira é a reflexão especular, caracterizada pela radiação que é refletida da superfície da amostra com o mesmo ângulo de incidência. A segunda é a reflexão difusa e se faz através da penetração de uma porção do fluxo incidente no interior da amostra. Essa radiação retorna à superfície da amostra, após absorção parcial de múltiplos espalhamentos nas interfaces de partículas individuais das quais a amostra é composta. ^{63,64}

As espectroscopias de fluorescência e refletância possibilitam avaliar a estrutura e o metabolismo do tecido *in-vivo*, em tempo real, fornecendo um diagnóstico melhor das lesões iniciais de câncer. A Espectroscopia de refletância pode examinar mudanças nos núcleos epiteliais que são importantes na detecção das lesões iniciais de câncer. ⁶⁵

Estudos utilizando a espectroscopia da refletância indicam um sucesso no diagnóstico de neoplasias na bexiga ⁶⁶, cérvico-uterino ⁶⁷ e tratogastrointestinal ⁶⁸.

Estudos recentes com a espectroscopia de refletância avaliaram a sensibilidade e especificidade de lipídios em placas de ateroma. Foram observadas uma sensibilidade de 88% e uma especificidade de 94%.⁶⁹

A refletância difusa também foi utilizada para estudar as características e as propriedades do beta-caroteno no diagnóstico de placas ateroscleróticas em modelo animal.⁷⁰

1.9 Análise dos Componentes Principais

A análise estatística é atualmente uma ferramenta de maior uso para classificar espectros. Entre as técnicas da análise multivariada, o método de análise dos componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*) vem sendo empregado com sucesso nas análises espectroscópicas e tem permitido a identificação das alterações patológicas, assim como a determinação de parâmetros ópticos dos tecidos normais.⁷¹⁻⁷³

A vantagem da utilização de técnicas de análises estatísticas multivariadas baseadas no PCA é a possibilidade de classificação das amostras em categorias bem definidas, baseadas em um conjunto de espectros obtidos das amostras com características semelhantes, sem necessidade de conhecimento prévio da composição bioquímica das mesmas.^{74,75} Isto é importante porque nem sempre se tem a informação completa da composição de um determinado material, pois apenas parte dos constituintes são conhecidos.

A técnica de PCA utiliza um conjunto de espectros de treinamento, os descompõe em espectros matemáticos, chamados de fatores ou componentes principais (PC), que representam as variâncias que mais ocorrem em todos os espectros. Um conjunto de coeficientes de escala, os escores (ES), são calculados para cada componente principal. Quando os componentes principais são multiplicados pelos escores e então somados, temos a reconstrução do espectro original. Por tanto, conhecendo os vetores dos componentes principais, podemos estabelecer a importância de cada um deles na formação do espectro de uma amostra desconhecida que se queira classificar. Podemos, logo, utilizar esta informação para a classificação dos espectros dentro de categorias pré-determinadas.⁷²⁻⁷⁴

Existe uma variedade de algoritmos para calcular os PC e os ES. Os dois algoritmos mais utilizados são: a decomposição de valores singulares (SVD – Singular Value Decomposition) e o NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares).⁷⁶ Neste trabalho, a técnica PCA será aplicada com a utilização do programa de computador Software Matlab

usando o algoritmo NIPALS. Este algoritmo extrai os componentes principais na ordem de sua contribuição à variância do conjunto de espectros (A) utilizados no modelamento. Após a determinação do primeiro PC, o mesmo é subtraído de cada um dos espectros, e o processo é repetido até o número de componentes desejados. Para cada PC calculado, o valor do ES, a projeção ou “peso” de cada componente em cada espectro é determinado. Podemos escrever que:

$$A = ES \times PC \quad (1)$$

onde a variável A é uma matriz n por m dos espectros obtidos (m= número de onda, n = número de espectros) , ES é uma matriz n por n dos escores de reconstrução dos espectros originais e PC é uma matriz n por m dos componentes principais do conjunto de dados.

Desde que os ES são os “pesos” de cada componente principal na formação do espectro original, este parâmetro apresenta informação sobre tendências e características da estrutura dos dados, tais como agrupamentos e amostras que não se encaixam no modelo (outliers); podendo ser utilizado para a implementação de um algoritmo de classificação, que relaciona os resultados histopatológicos com os “pesos” dos primeiros componentes principais.⁷²⁻⁷⁴

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral a identificação e classificação de doenças cardiovasculares “*in vitro*”, utilizando as diferentes técnicas de Espectroscopia óptica: Raman, fluorescência e refletância, auxiliadas por técnicas estatísticas e utilizando a histopatologia como padrão ouro.

2.2 Objetivos específicos

O objetivo do primeiro estudo foi avaliar a eficiência da espectroscopia Raman, na região do infravermelho próximo (ER-IP), para detectar a presença de calcificações em válvulas aórticas, comparando com a análise histopatológica tradicional (padrão ouro).

O objetivo do segundo estudo foi identificar através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IP) a presença de placas ateroscleróticas em artérias carótidas, baseado nos picos bioquímicos (Raman) presentes em cada tecido, comparando com a análise histopatológica tradicional (padrão ouro).

O objetivo do terceiro estudo foi avaliar a possibilidade da utilização das técnicas de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL) e refletância, na identificação da placa aterosclerótica em artérias carótidas humanas *post mortem*, utilizando as diferenças espectrais que ocorrem entre a artéria normal e as patológicas identificadas pela técnica estatística multivariada PCA, comparando com a análise histopatológica tradicional (padrão ouro).

3 RESULTADOS

3.1 Artigo publicado

ROCHA, R. et al. Identification of Calcifications in Cardiac Valves by Near Infrared Raman Spectroscopy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n. 4, p. 287–290, 2007. DOI: 10.1089/pho.2007.2100.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de calcificações em válvulas cardíacas, utilizando a espectroscopia Raman, na região do infravermelho próximo (ER-IP). Um laser de argônio de 5 W foi utilizado para bombear um laser de estado sólido de Ti:Safira com comprimento de onda de 830 nm para a excitação das amostras. O espalhamento Raman foi detectado por um espectrômetro ótico com um detector CCD refrigerado por nitrogênio líquido. Neste estudo foram analisados 88 segmentos de amostras de válvulas cardíacas, sendo classificadas como normal (n=70) e calcificada (n=18) através da espectroscopia Raman e da histopatologia. Foi observado no espectro Raman diferenças no comportamento entre as válvulas cardíacas calcificadas quando comparadas com as normais. Observou-se que o espectro Raman de válvulas cardíacas calcificadas apresentou comportamento diferente quando comparado com as válvulas normais. As diferenças foram observadas na intensidade dos picos em 960, 1260, 1452, e 1660 cm^{-1} . Estes resultados sugerem que esta técnica é eficaz para detectar a deposição de fosfato de cálcio nas válvulas cardíacas.

3.2 Artigo publicado

ROCHA, R. et al. Use of Near-Infrared Raman Spectroscopy for Identification of Atherosclerotic Plaques in the Carotid Artery. **Photomedicine and Laser Surgery**, v 25, n.6, p 480-484, 2007.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ERIVP) a presença de placas ateroscleróticas em artérias carótidas. Um laser de argônio de 5 W foi utilizado para bombear um laser de estado sólido de Ti:Safira com comprimento de onda de 830 nm para a excitação das amostras. O espalhamento Raman foi detectado por um espectrômetro ótico com um detector CCD refrigerado por nitrogênio líquido. Neste estudo foram analisados 57 segmentos de amostras de artéria carótida através da espectroscopia Raman e da histopatologia, sendo classificadas como: normal (n=09), espessamento (n=12), placa gordurosa (n=21), placa fibrogordurosa (n=13) e placa fibrocalcificada (n=2). Foi observado no espectro Raman diferenças no comportamento entre as placas ateromatosas quando comparadas com tecido normal. O espectro Raman da placa ateromatosa mostra os picos em 1439 e 1663 cm^{-1} , referentes à presença de colesterol e dos ésteres de colesterol. Os picos em 960 e 1071 cm^{-1} podem ser utilizados como marcadores para indicar a presença de hidroxiapatita de cálcio e apatitas de carbonato na placa aterosclerótica calcificada. Os picos em 1439 e 1663 cm^{-1} podem ser utilizados como indicadores da presença da placa aterosclerótica e os picos 1451 e 1655 cm^{-1} estão relacionados ao tecido arterial carótido não-patológico. Os resultados indicam que esta técnica pode ser usada para detectar a presença de placa aterosclerótica na artéria carótida.

3.3 Artigo aceito para publicação

ROCHA, R. et al. Fluorescence and Reflectance Spectroscopy for Identification of Atherosclerosis in Human Carotid Arteries using Principal Components Analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v 26, 2008.[in print].

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a diferença entre o tecido normal e patológico em artérias carótidas humanas, utilização as técnicas de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL) e refletância em um comprimento de onda entre 400-700nm na caracterização espectral e por meio da análise dos componentes principais (PCA). Neste estudo foram analisados 60 segmentos de amostras de artéria carótida *post mortem*, sendo classificadas como não-aterosclerótica (n=26) e aterosclerótica não calcificada (n=34). A radiação da excitação consistiu em um laser de argônio de 488nm. Duas fibras óticas com núcleo de 600µm foram usadas para a excitação e coleta da radiação da fluorescência das amostras, respectivamente. O sistema de refletância foi composto por uma lâmpada halógena (5mW) acoplada a uma fibra de excitação posicionada dentro da esfera integradora. O sinal da foto-refletância foi acoplado a um espectrômetro de 1/4m usando uma fibra ótica. A distância euclidiana foi usada para classificar cada contagem do componente principal do tecido normal e do aterosclerótico, para a fluorescência e refletância. Foram observadas uma sensibilidade de 81% e uma especificidade de 88% para a classificação da fluorescência e uma sensibilidade de 81% e 91% de especificidade para refletância. Os resultados mostraram que a análise dos componentes principais poderia ser aplicada para diferenciar tecido normal e aterosclerótico com uma elevada sensibilidade e especificidade.

4 DISCUSSÃO

Este estudo foi baseado na grande preocupação da área biomédica em aumentar o conhecimento sobre as alterações cardiovasculares, uma vez que estas oferecem grande risco de morte a população mundial.¹ Ainda, sabe-se que o fumo, diabetes e as alterações cardiovasculares são fatores de risco para o desenvolvimento de doença periodontal, conseqüentemente, esse problema afeta também a saúde bucal da população.³

Estudos demonstraram a existência de uma estreita interação de vários processos nas válvulas com EA, a detecção de proteínas como a osteopontina, implicadas na calcificação⁴⁰, e a detecção de células com atividades semelhantes às do osteoblasto nas válvulas calcificadas.^{41,42} As valvopatias calcificadas é processo distinto, porém com algumas características da aterosclerose.³⁸

Estudos demonstram que a estenose aórtica é a causa mais freqüente da calcificação progressiva e da degeneração das cúspides aórticas^{77,78}. Diversos estudos têm revelado que o grau de calcificação da válvula aórtica é um forte prognóstico da boa progressão como do resultado da estenose aórtica.^{79,80-82}

Os mecanismos patológicos comuns da estenose da válvula aórtica e da aterosclerose têm sido descritos, e vários estudos têm demonstrado a influência dos fatores de risco cardiovascular, na progressão e no resultado da estenose da válvula aórtica. Todavia, os resultados têm sido inconsistentes com relação à importância relativa desses fatores de risco específicos.^{81,82}

As técnicas convencionais de diagnóstico têm sido comumente utilizadas em alterações cardiovasculares. Assim, este estudo mostra-se bastante relevante em relação à utilização de novas técnicas de diagnóstico; a biópsia óptica, capaz de fornecer informações valiosas no diagnosticar de doenças, tais como aquelas encontradas em válvulas cardíacas.⁴⁶

Os métodos tradicionais de diagnóstico para as doenças cardiovasculares tais como, ultra-som⁴³, angiografia⁴⁴ e ecodoppler⁴⁵ são achados de imagem, podendo ocorrer exames de pobre qualidade técnica, com transdutores de baixa freqüência ou profissionais não habilitados e exames incompletos, podendo levar a um diagnóstico falso-negativo.

Para a realização do diagnóstico óptico (espectroscopia Raman, refletância e fluorescência) é necessário o mínimo de preparo do tecido a ser analisado, ao contrário das técnicas convencionais, como a histopatologia. Estas técnicas convencionais são demoradas e

necessitam da remoção e do preparo da amostra. Outra vantagem do diagnóstico óptico está na coleta dos dados, podendo ocorrer diretamente no tecido através do uso de fibras ópticas, cateteres, cânulas e endoscópios, oferecendo, dessa forma, informações quantitativas e não destrutivas sobre a composição dos tecidos biológicos em nível molecular. ^{46-48,50,51}

No primeiro e no segundo artigos, a espectroscopia Raman demonstrou ser esta uma técnica promissora na caracterização dos componentes químicos encontrados nos tecidos biológicos. ^{46,83,84} O uso da espectroscopia Raman como ferramenta diagnóstica para alterações patológicas se baseia no fato de ser único o espectro Raman de uma determinada molécula. ^{47,48,50,51} Uma importante característica da espectroscopia Raman é a possibilidade de se coletar o espectro do tecido *in situ*, podendo ser processado para fornecer informação quantitativa sobre a composição química da parede arterial de uma forma não destrutiva. Tem sido demonstrado que a espectroscopia Raman pode ser aplicada para quantificar as quantidades relativas de proteína, colesterol, gordura adventícia, e sais de cálcio na parede arterial coronária. ^{53,54,55}

No primeiro estudo (artigo 1), nossos resultados demonstraram que a espectroscopia Raman parece ser um método promissor na determinação da presença de calcificação nas válvulas aórticas. Tem sido demonstrado que os picos em 960 e 1071 cm^{-1} podem ser utilizados como marcadores para indicar a presença de hidroxiapatita de cálcio e apatitas de carbonato. ^{46,52,71-73,85} A banda relativamente menos intensa em 1452 cm^{-1} revela a presença de componentes fibrosos misturados ao tecido calcificado. ⁴⁷ Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que a intensidade do pico obtido em 960 cm^{-1} pode ser utilizada como um indicador da presença de calcificação no tecido valvular. Assim, nossos resultados sugerem que a espectroscopia Raman apresenta grande potencial para ser utilizada, no futuro, como uma importante ferramenta no diagnóstico da calcificação da válvula.

No segundo estudo (artigo 2), com o emprego da espectroscopia Raman, foi possível identificar grupos moleculares presentes no tecido da artéria carótida. A presença dos picos em 960 e 1071 cm^{-1} podem ser utilizados como marcadores para indicar a presença de hidroxiapatita de cálcio e apatitas de carbonato na placa aterosclerótica calcificada, sendo, os mesmos, encontrados nas valvas cardíacas calcificadas. ^{46,51,52,83,85} Foi observado um pico em 1528 cm^{-1} , relacionado ao acúmulo de beta-caroteno presente na placa fibrogordurosa. O beta-caroteno causa um intenso espalhamento Raman e, às vezes, também contribui com os traços espectrais da artéria coronária, embora, presentes apenas em pequenas quantidades. ⁸⁶ O espectro Raman observado da placa ateromatosa mostra os picos em 1439 e 1663 cm^{-1} , referentes à presença de colesterol e dos ésteres de colesterol. ^{51,71,73}

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que os picos em 1439 e 1663 cm^{-1} podem ser utilizados como indicadores da presença da placa aterosclerótica em tecido arterial carótido, separando dos tecidos não-patológicos. Isso sugere a possibilidade de que a espectroscopia Raman possa ser utilizada no futuro como uma importante ferramenta na detecção e no diagnóstico da placa aterosclerótica, quando implementada com um aparelho *in vivo*.^{47,50,51} A caracterização das placas ateroscleróticas apresenta grande importância na determinação do risco de eventos cardiovasculares, podendo ser utilizada para orientar intervenções locais futuras *in vivo* para a identificação da placa e do tratamento adequado.

No terceiro estudo (artigo 3), os resultados demonstraram que a utilização da espectroscopia de fluorescência e de refletância parece ser uma ferramenta promissora na diferenciação entre tecidos normais e patológicos.^{56,57,65,67,87} A intensidade na fluorescência no tecido normal foi 62% maior do que para o tecido patológico, devido à presença da fibra colágena, que é altamente fluorescente.

Filippidis et al.⁸⁸ e Angheloiu et al.⁸⁹, demonstraram a presença de um pico na faixa 550 nm, com uma excitação em 488 nm, característico da presença de flavinas, elastina e colágeno. Estes trabalhos estão de acordo com o nosso estudo.

A intensidade da refletância no tecido aterosclerótico foi maior que no tecido normal. Esta maior intensidade deve-se à presença dos lipídios e do colesterol na artéria aterosclerótica. De acordo com Rodrigues et al.⁹⁰ a refletância dos tecidos fibrosos e calcificados é mais intensa do que para o tecido normal, devido à presença de colágeno nas células lisas do tecido valvar. As moléculas de lipídios e colesterol presentes na parede arterial patológica são centros espalhadores que não estão presentes no tecido normal, evidenciando a diferença de intensidade observada nos resultados com fluorescência.

Neste estudo foi demonstrado que a análise dos componentes principais e a distância Euclidiana podem ser aplicadas para a diferenciação do tecido normal e do aterosclerótico. Foram observadas uma sensibilidade de 81% e uma especificidade de 88% para a classificação da fluorescência. Para a classificação de refletância, foi observada uma sensibilidade de 81% e 91% de especificidade, valores estes próximos aos encontrados por Lilledahl et al.⁶⁹

A refletância explora algumas características óticas dos tecidos, assim como a espectroscopia da fluorescência. Suas similaridades mais notáveis são os cromóforos biológicos que resultam na absorção, tal como a hemoglobina oxigenada e deoxigenada e o beta-caroteno e as propriedades de difusão de tecido. O espectro da refletância poderia também ser utilizado para determinar a fluorescência intrínseca, modelando e subtraindo a

contribuição da absorção sanguínea com a fluorescência emitida, coletada com uma geometria de excitação-coleta de 180° por meio de cateteres de fibra ótica.²⁷

As espectroscopias de fluorescência e refletância são potencialmente seletivas, bem como sensíveis em relação à captação de vários tipos de tecido *in vitro* e *in vivo*^{57,59,60-64}, podendo ser utilizadas em aparelhos diagnósticos médicos minimamente invasivos, com o auxílio de fibras ópticas, cateteres, cânulas e endoscópios em ambiente hospitalar. A vantagem primária do uso da refletância difusa está no fato de que esta pode ser realizada com uma fração do custo da espectroscopia da fluorescência. Já o espectro Raman funciona como uma impressão digital da molécula, fornecendo informações bioquímicas específicas, não encontradas em outras técnicas ópticas.⁴⁴

5 CONCLUSÃO

- A espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IP) pode ser uma técnica eficaz para detectar a deposição de fosfato de cálcio nas válvulas aórticas e fornecer o grau de comprometimento destes tecidos.
- A espectroscopia Raman no infravermelho próximo (ER-IP) pode ser usada para detectar a presença de placa aterosclerótica na artéria carótida, e pode distingui-la do tecido arterial não patológico usando as diferenças espectrais da proteína e da gordura.
- As espectroscopias de fluorescência e refletância são capazes de detectar as alterações que ocorrem dentro da carótida humana normal e ateromatosa *in vitro*, e ambas as técnicas promovem uma forma de identificar a doença, como uma possível ferramenta de diagnóstico clínico.

6 TRABALHOS FUTUROS

- Pesquisar aplicabilidade da espectroscopia óptica através de fibras ópticas, cateteres, cânulas e endoscópio, possibilitando resultados *in vivo* em tempo real.
- Pesquisar se espectroscopia Raman pode atuar como instrumento para monitorar a progressão de doenças *in vivo* em modelos experimentais, novos estudos serão necessários para validar este método e avaliar sua sensibilidade bem como sua especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) KAMPSCHULTE, A. et al. Differentiation of Intraplaque Versus Juxtaluminal Hemorrhage/Thrombus in Advanced Human Carotid Atherosclerotic Lesions by In Vivo Magnetic Resonance Imaging. **Circulation**, 110, p. 3239-3244, 2004.
- (2) STOCK, S. R. et al. Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. **Circulation**, v.107, p. 2181-2184. 2003
- (3) OFFENBACHER S.; BECK J. D. A perspective on the potential cardioprotective benefits of periodontal therapy. **American Heart Journal**, v. 149, n. 6, p. 950-954, 2005.
- (4) WU, T. et al. Examination of the relation between periodontal health status and cardiovascular risk factors: serum total and high density lipoprotein cholesterol, C-reactive protein, and plasma fibrinogen. **American Journal of Epidemiology**; v.71, p.1528–1534, 2000.
- (5) LALLA, E. et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, p.1405–1411, 2003.
- (6) CUETO, A. et al. Periodontitis as risk factor for acute myocardial infarction. A case control study of Spanish adults. **Journal of Periodontal Research**, v.40, n.1, p. 36–42, 2005.
- (7) PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **Journal Periodontology**, v.76, n.12, p. 2187-2193, 2005.
- (8) BECK, J. D. et al. Dental infections and atherosclerosis. **American Heart Journal**, v.138, n. 5, p. S 528-S 533, 1999.
- (9) JEFFCOAT, M.K. et al. Periodontal disease and preterm birth: results of a pilot intervention study. **Journal Periodontology**, v.74, n. 8, p. 1214-8, 2003.
- (10) TERPENNING, M.S. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. **Journal of the American Geriatrics Society**, v.49, n.5, p. 557-63, 2001.
- (11) TAYLOR, G.W. Bidirectional interrelationships between Diabetes and periodontal diseases: An epidemiological perspective. **Ann. Periodontology**, v. 6, n.1, p. 99-112, 2001.
- (12) JANKET, S.J. et al. Asymptomatic Dental score and prevalent coronary heart disease. **Circulation**, v.109, n.9, p. 1095-1100, 2004.
- (13) HARASZTHY, V.I. et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **Journal Periodontology**, v.71, n.10, p. 1554-1560, 2000.
- (14) TAYLOR-ROBINSON, D. et al. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.21, n.10, p. 755-757, 2002.

- (15) KORNMAN, S.K.; PAGE, R.C. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontology** 2000, v.14, p. 9-12, 1997.
- (16) LEIVADAROS, E. et al. A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. **Journal Periodontology**; v.76, n.1, p. 121-128, 2005.
- (17) BECK, J.D.; OFFENBACHER, S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the-science review. **Ann Periodontology**, v.6, p. 9-15, 2001.
- (18) ALMOG, D.M. et al. Correlating carotid artery stenosis detected by panoramic radiography with clinically relevant carotid artery stenosis determined by duplex ultrasound **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod (Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics)**, v. 94, p. 768-773, 2002.
- (19) SCANNAPIECO, F.A.; BUSH, R.B.; PAJU, S. Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke: a systematic review. **Ann Periodontology**, v.8, n.1, 38-53, 2003.
- (20) SCHILLINGER, M. et al. Inflammation and Carotid Artery—Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS). **Circulation**, v.111, p. 2203-2209, 2005.
- (21) SALONEN, J.T. et al. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. **Circulation**, v. 95, p. 840-845, 1997.
- (22) CHU, B. et al. Determination of Carotid Artery Atherosclerotic Lesion Type and Distribution in Hypercholesterolemic Patients With Moderate Carotid Stenosis Using Non-invasive Magnetic Resonance Imaging. **Stroke**, v. 35, p. 2444-2448, 2004.
- (23) NAGHAVI, M. et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies. Part I. **Circulation**, v. 108, p. 1664-1672, 2003.
- (24) SACCO, R.L. Extracranial carotid stenosis. **The New England Journal of Medicine**. v. 345, p. 1113-1118, 2001.
- (25) GOLDENSTEIN, L. B. et al. Primary prevention of ischemic stroke. **Circulation**, v. 103, p. 163-82, 2001.
- (26) GRUNDY, S.M. et al. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. **Circulation**, v. 100, p. 1481-92, 1999.
- (27) BOTS, M. L. et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. **Circulation**, v. 96, p. 1432-7, 1997.
- (28) KHOURY, Z. et al. Relation of coronary artery disease to atherosclerotic disease in the aorta, carotid, and femoral arteries evaluated by ultrasound. **The American Journal of Cardiology**, v.80, p.1429-1433, 1997.

- (29) NAGAI, Y. et al. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. **Circulation**, v.98, p.1504-1509, 1998.
- (30) FAYAD, Z.A.; FUSTER, V. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. **Circulation Research**, v.89, p.305-316, 2001.
- (31) STARY, H.C. et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, v. 92, p.1355-1373, 1995.
- (32) WASSERMAN, B.A. et al. Carotid artery atherosclerosis: in vivo morphologic characterization with gadolinium-enhanced double-oblique MR imaging-initial results. **Radiology**, v. 223, p. 566-573, 2002.
- (33) STOCK, R. et al. Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. **Circulation**; v 107, p. 2181-2184, 2003.
- (34) CHRISTENSEN G. Cardiovascular and renal effects of atrial natriuretic factor. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 53, p. 203-7,1993.
- (35) PETERS, N.S. et al. Cardiac arrhythmogenesis and the gap junction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 27, p. 37-40, 1995.
- (36) BRAUNWALD, E. Valvulopatias. In: BRAUNWALD, E. **Tratado de Medicina Cardiovascular**. São Paulo: Roca, p 1075-1081, 1999.
- (37) COTRAN, R.S.; KUMAR, V; COLLINS, T. O coração. In: SCHOEN, FJ. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p. 488-510.
- (38) FREEMAN, R.V., OTTO, C.M. Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease. Pathogenesis, Disease Progression, and Treatment Strategies. **Circulation**, v. 111, p.3316-3326, 2005.
- (39) WARREN, B.A., YONG, J.L.C. Calcification of the aortic valve: its progression and grading. **Pathology**, v. 29, p. 360-368, 1997.
- (40) O'BRIEN, K.D. et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. **Circulation**, v. 92, p. 2163-2168, 1995.
- (41) MOLER, E.R. III. et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. **Journal of Heart Valve Disease**, v. 8, p. 254-260, 1999.
- (42) PARHAMI, F. et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation: a possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.17, p. 680-687, 1997.

- (43) QURESHI, A.I. et al. Role of conventional angiography in evaluation of patients with carotid artery stenosis demonstrated by Doppler ultrasound in general practice. **Stroke**, v. 32, p. 2287-2291, 2001.
- (44) GOLLEDGE, J. et al. Selection of patients for carotid endarterectomy. **Journal of Vascular Surgery**, v. 30, p. 122-130, 1999.
- (45) WESTERBAND, H. et al. Do ultrasonographic surface characteristics of carotid plaque correlate with intraoperative findings? **Journal of Vascular Technology**, v. 22, p. 193-197, 1998.
- (46) HANLON, E.B. et al. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, v.45, p. R1-R59, 2000.
- (47) SILVEIRA, L. Jr., et al. Correlation between nearinfrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers in Medical Science**, v. 4, p. 290–297, 2002.
- (48) OTERO E.U. et al. Raman spectroscopy for diagnosis of calcification in human heart valves. **Spectroscopy: An. International Journal**, v.18, p.75-84, 2004.
- (49) PILOTTO, S. et al. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. **Lasers in Medical Science**, v. 16, n.1, p. 2-9, 2001.
- (50) SILVEIRA, L.Jr. et al. Near infrared Raman spectroscopy of Human coronary arteries: Histopathological classification based on Mahalanobis distance. **Journal of Clinical Laser medicine and Surgery**, v 21, p. 203-208, 2003.
- (51) NOGUEIRA, G.V. et al. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. **Journal of Biomedical Optics**, v. 10, p. 031117- 031124, 2005.
- (52) ROCHA, R. et al. Near Infrared Raman Spectroscopy to detect the calcification of the annular mitral valve. **Proc. of SPIE**, v. 5622, p. 62-66, 2004.
- (53) RÖMER, T.J. et al. Intravascular ultrasound combined with Raman spectroscopy to localize and quantify cholesterol and calcium salts in atherosclerotic coronary arteries. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, p.478–483, 2000.
- (54) VAN DE POLL, S.W. et al. On-line detection of cholesterol and calcification by catheter based Raman spectroscopy in human atherosclerotic plaque ex vivo. **Heart**, v. 89, p. 1078–1082, 2003.
- (55) SALENIUS, J.P. et al. Biochemical composition of human peripheral arteries examined withnear-infrared Raman spectroscopy. **Journal of Vascular Surgery**, v. 27, p.710-719, 1998.
- (56) SILVEIRA Jr., L. **Projeto de Desenvolvimento de um Espectrofluorímetro e Obtenção de Matrizes de Excitação/Emissão**, São José dos Campos, 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP.

- (57) RAMANUJAM N. Fluorescence Spectroscopy of Neoplastic and Non-Neoplastic Tissues. **Neoplasia**, v. 2, p. 89–117, 2000.
- (58) WEST, M., HOLLER, F.J. Molecular Fluorescence Spectroscopy. In: SKOOG, D.A, West, D.M., HOLLER, F.J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**, v. 7, p. 601-610, 1997.
- (59) ARAKAWA, K et al. Fluorescence Analysis of Biochemical Constituents Identifies Atherosclerotic Plaque With a Thin Fibrous Cap. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, p. 1002-1007, 2002.
- (60) TIAN, W.D. et al. Aging and effects of ultraviolet an exposure may be quantified by fluorescence excitation spectroscopy in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, p. 840-845, 2001.
- (61) MARCU, L. et al. Discrimination of Human Coronary Artery Atherosclerotic Lipid-Rich Lesions by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, p. 1244-1250, 2001.
- (62) ANDERSSON-ENGELS, S., JOHANSSON, J., SVANBERG, S. The use of time-resolved fluorescence for diagnosis of atherosclerotic plaque and malignant tumors. **Spectrochimica Acta**, v.40, p.1203–1210, 1990.
- (63) MIRABAL, Y.N., et al. Reflectance spectroscopy for *in vivo* detection of cervical precancer. **Journal of Biomedical Optics**, v 7, p. 587–594, 2002.
- (64) BRESLIN, T .M. et al. Autofluorescence and Diffuse Reflectance Properties of Malignant and Benign Breast Tissues. **Annals of Surgical Oncology**, v. 11, p. 65-70, 2004.
- (65) SOKOLOV, K., FOLLEN, M., KORTUM, R.R. Optical spectroscopy for detection of neoplasia. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p.651-658, 2002.
- (66) BIGIO, I. J. et al. Spectroscopic diagnosis of bladder cancer with elastic light scattering, **Lasers Surgery Medical**, v. 17, p. 350-357, 1995.
- (67) COPPLESON, M. et al. An electronic approach to the detection of precancer and cancer of the uterine cervix: A preliminary evaluation of polar probe, **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 4, p. 79-93, 1994.
- (68) MOURANT, J.R. et al. Detection of GI cancer by elastic scattering spectroscopy, **Journal of Biomedical Optics**, v. 1, p. 192-199, 1996.
- (69) LILLEDAHL, M.B. et al. Reflection spectroscopy of atherosclerotic plaque. **Journal Biomedical Optics**, v. 11, p. 021005-021012, 2006.
- (70) YE, B., ABELA, G.S. Beta-carotene enhances plaque detection by fluorescence attenuation in an atherosclerotic rabbit model. **Lasers in Surgery and Medical**, v. 13, p. 393–404, 1993.

- (71) SILVEIRA, L. JR. et al. Correlation between nearinfrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers Surgery Medical**, v. 30, p. 290–297, 2002.
- (72) OTERO, E.U. et al. Raman spectroscopy for diagnosis of calcification in human heart valves. **Spectroscopy: An International Journal**, v. 18, p. 75–84, 2004.
- (73) NOGUEIRA, G.V. et al. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. **Journal of Biomedical Optics**, v. 10, n.3, p. 031117–7, 2005.
- (74) BROWN, S.D. Chemical systems under indirect observation: Latent properties and chemometrics. **Applied Spectroscopy**, v.49, p.14A–31A, 1995.
- (75) FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, p.742–753, 2002.
- (76) GELADI, P., KOWALSKI, B.R. Partial least square regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v.186, p. 1–17, 1986.
- (77) OTTO, C.M. et al. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis: clinical, echocardiography, and exercise predictors of outcome. **Circulation**, v 95, p. 2262–2270, 1997.
- (78) LINDROOS, M. et al. Factors associated with calcific aortic valve degeneration in the elderly. **European Heart Journal**, v.15, p. 865–870, 1994.
- (79) ROSENHEK, R. et al. Predictors of outcome in severe asymptomatic aortic stenosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 611–617, 2000.
- (80) OTTO, C.M. Timing of aortic valve surgery. **Heart**, v. 84, p. 211–218, 2000.
- (81) NGO, M.V. et al. Smoking and obesity are associated with the progression of aortic stenosis. **American Journal of Geriatric Cardiology**, v. 10, p. 86–90, 2001.
- (82) POHLE, K. et al. Progression of aortic valve calcification association with coronary Atherosclerosis and cardiovascular risk factors. **Circulation**, v. 104, p. 1927–1932, 2001.
- (83) ROCHA, R. et al. Identification of Calcifications in Cardiac Valves by Near Infrared Raman Spectroscopy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n. 4, p. 287–290, 2007.
- (84) ROCHA, R. et al Use of Near-Infrared Raman Spectroscopy for Identification of Atherosclerotic Plaques in the Carotid Artery. **Photomedicine and Laser Surgery**, v 25, n.6, p 480–484, 2007.
- (85) OTERO, E.U. et al. Raman spectroscopy for diagnosis of calcification in human heart valves. **Spectroscopy: An International Journal**, v. 18, p. 75–84, 2004.
- (86) RÖMER, T.J. et al. Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman spectroscopy. **Circulation**, v. 97, p. 878–885, 1998.

(87) ROCHA, R. et al. Fluorescence and Reflectance Spectroscopy for Identification of Atherosclerosis in Human Carotid Arteries using Principal Components Analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v 26, 2008.[in print].

(88) FILIPPIDIS et al. (2000) Single and double wavelength excitation of laser-induced fluorescence of normal and atherosclerotic peripheral vascular tissue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 56, p. 163–171.

(89) ANGHELOIU, G.O. et al. (2006) Intrinsic Fluorescence and Diffuse Reflectance Spectroscopy Identify Superficial Foam Cells in Coronary Plaques Prone to Erosion. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, p. 1594-1600.

(90) RODRIGUES, K.C. et al. (2007) Study of normal, fibrous and calcified aortic valve tissue by Raman and reflectance spectroscopy. **Photonic Therapeutics and Diagnosis III SPIE**, 6424, 64241U-8.

ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º H326/CEP/2007, sobre *“Estudo das doenças cardiovasculares utilizando técnicas de espectroscopia óptica”*, sob a responsabilidade da Prof. Dr. **Antonio G. Balbin Villaverde**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, conforme Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 21 de setembro de 2007.



PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap