

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

Kiyoshi Yassoyama

**ESTUDO DO ADENOCARCINOMA DE CÓLON POR
ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN**

São José dos campos

2006

Kiyoshi Yassoyama

**ESTUDO DO ADENOCARCINOMA DE CÓLON POR
ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Bioengenharia,
como complementação dos créditos necessários
para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Biomédica.**

**Orientador: Prof.Dr. Airton Abrahão Martin
Co-orientadora: Prof. Dra. Emília Ângela
Loschiavo Arisawa**

São José dos Campos

2006

Ficha catalográfica

Y84e

Yassoyama, Kiyoshi

Estudo do adenocarcinoma de cólon por Espectroscopia FT
Raman / Kiyoshi Yassoyama, São José dos Campos:
UniVap, 2006.
1 disco laser, color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e
Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.
1. Adenocarcinoma 2. Cólon 3. Análise Espectral Raman
I. Martin, Airton Abrahão, Orient. I.Título

CDU: 616.34

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial
ou total desta Dissertação, desde que citada a fonte.

Aluno:

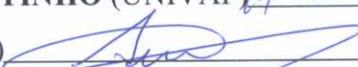
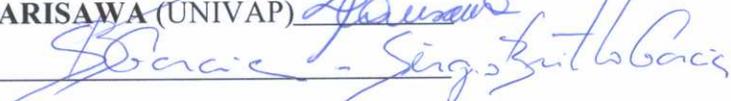
 23/11/2007

Dezembro/2006

“ESTUDO DO ADENOCARCINOMA DE CÓLON POR ESPECTROSCOPIA RAMAN”

Kiyoshi Yassoyama

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **HERCULANO DA SILVA MARTINHO** (UNIVAP) 
Prof. Dr. **AIRTON A. MARTIN** (UNIVAP) 
Prof.^a. Dra. **EMÍLIA ÂNGELA LOSCHIAVO ARISAWA** (UNIVAP) 
Prof. Dr. **SÉRGIO BRITTO GARCIA** (USP) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D – UniVap

Dedico este trabalho aos pacientes que cederam as amostras de câncer de cólon e a todos os pacientes acometidos e que lutam contra esta patologia.

Dedico também à minha querida mãe (*in memóriam*) que partiu há 35 anos vitimada por esta doença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me colocar neste caminho cansativo, desgastante, sofrido mas gratificante e permitir que eu concluísse mais uma etapa de sucesso na minha vida.

Agradeço ao meu Pai por tudo que sou, por ter me mostrado a verdadeira razão de viver mais por seus atos que pelas palavras.

Agradeço à minha esposa Christina pela paciência, compreensão, amor e companhia nos momentos de dificuldades e aos meus filhos Franco e Caio pela incentivo e apoio na elaboração deste trabalho.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Airton Abrahão Martin pelo incentivo, disponibilidade, paciência e pelo seu grande conhecimento que tornou sua orientação uma valiosa colaboração na elaboração deste trabalho.

Agradeço à Co-orientadora Prof.Dra. Emília Ângela Loschiavo Arisawa pelas correções que facilitaram a elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. João Gomes Netinho, chefe da do Disciplina de Coloproctologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; à Dra Geni Satomi Cunrath, Chefe do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto e a todos membros do Serviço de Coloproctologia pelo empenho na coleta das amostras.

Agradeço aos Dr Roberto Luiz Kaiser, Dr Roberto Luiz Kaiser Júnior do Serviço de Colonoscopia do Hospital da Beneficência Portuguesa de São José do Rio Preto, e às secretárias Vera Lúcia de Oliveira e Ana Carolina Martins de Medeiros pelo esforço e boa vontade na coleta de amostras.

Agradeço ao Prof. Dr. Dalísio De Santi Neto, Chefe do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pelo auxílio na análise das lâminas histológicas.

Agradeço à Renata Andrade Bitar Carter, Professora Ana Maria do Espírito Santo, Professor Herculano da Silva Martinho pelas importantes contribuições durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço as Secretárias Ivone Paranaíba Villela Monteiro e Valéria Maeda Alves da Silva e a todos os funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho.

Agradeço a bibliotecária Rosângela Regis Cavalcanti pelas correções finais desta Dissertação.

Agradeço aos colegas de turma Christina, Pablo, Maurício, José Martins, Karina, Karla, Leiry Maira, Henry, Silviani, Ovídio, Poliana e Nilton César por ter dividido comigo os momentos difíceis e cansativos das viagens e também pelos momentos de alegria durante esta jornada.

Agradeço ao colega e amigo Dr Vladimir Tarcísio Delfino de Oliveira pelo apoio irrestrito nos cuidados com os meus pacientes internados que precisei de deixá-los para poder viajar durante este período.

Agradeço profundamente a Patrícia Oliveira de Andrade pelo seu apoio, amizade, paciência, pela predisposição em estar junto e auxiliar em praticamente todos os momentos que estive no Laboratório de Espectroscopia desde o armazenamento das amostras, realização da espectroscopia, elaboração dos resultados até a conclusão deste trabalho e pelas palavras que me deram força para nunca desistir nos momentos difíceis desta jornada. À você Patrícia, que

mais do que parceira e amiga foi meu anjo da guarda, do fundo do meu coração:
Muito Obrigado!

ESTUDO DO ADENOCARCINOMA DE CÓLON POR ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN

RESUMO

Estimativas apontam aumento da incidência de câncer no Mundo. São esperados aproximadamente 10 milhões de novos casos nos próximos anos. Atualmente existem 2,4 milhões de pessoas acometidas por câncer do cólon diagnosticados nos últimos cinco anos. Esta patologia apresenta alta taxa de mortalidade que corresponde a 50% dos enfermos em cinco anos. Estes dados mostram a importância desta doença no contexto da luta da medicina no sentido de diminuir o número de pacientes que são acometidos e morrem todos os anos por esta patologia. As técnicas atualmente existentes para a detecção do adenocarcinoma de cólon são a pesquisa de marcadores sanguíneos, exames radiológicos contrastados do intestino grosso, exames visuais como a retossigmoidoscopia e colonoscopia com biópsia ou até mesmo com a retirada de lesões suspeitas de malignidade. Outras técnicas de diagnóstico têm sido estudadas como a colonoscopia virtual e a espectroscopia. Dentre as várias técnicas de espectroscopia podemos destacar a Espectroscopia Raman. Esta técnica não destrutiva pode ser utilizada para fornecer o resultado de uma análise em tempo real, além de transmitir informações sobre a estrutura molecular do tecido. O principal objetivo deste trabalho foi a de realizar um estudo do tecido normal e das lesões adenocarcinomas de cólon. Para este fim utilizamos o Espectrômetro RFS 100. O laser utilizado foi o Nd:YAG com potência máxima de 300mW com potência ajustada de 132 mW na amostra. Foram realizadas 300 “scans” ou varreduras em cada amostra, com resolução espectral de 4cm^{-1} . Obtivemos 144 espectros de tecido normal e 70 espectros de adenocarcinomas. Os espectros obtidos foram analisados pela Análise dos Componentes Principais (ACP) e agrupados através do diagrama de clusters que permitiu verificar as diferenças espectrais dentro dos tecidos normais e dos neoplásicos. Os espectros se distribuíram em três grupos distintos com similaridade de 90% para o tecido normal e acima de 82.5% para neoplásicos. Correlacionamos as diferenças espectrais entre estes grupos com as alterações vibracionais existentes nestes tecidos e analisamos as amplitudes de alguns picos importantes. Esta técnica mostrou-se adequada para estudo das diferenças em níveis moleculares e bioquímicos que ocorrem na intimidade destes tecidos. Mostrou, ainda, que a Espectroscopia Raman pode ser mais um importante instrumento de diagnóstico para esta patologia num futuro próximo.

Palavras chaves: Câncer coloretal, Adenocarcinoma de cólon, Espectroscopia Raman

A STUDY OF COLON ADENOCARCINOMA USING FT- RAMAN SPECTROSCOPY

ABSTRACT

Estimates point out an increase in the incidence of cancer around the world. Approximately 10 million new cases are expected to occur over the next year. Today, there are 2.4 million people diagnosed as having colon cancer in the last five years. This pathology shows a high mortality rate which corresponds to 50% of the patients in five years. These data show the importance of this disease in the context of the medicine fight to decrease the number of the patients who get sick and die because of this pathology every year. Nowadays, the colon adenocarcinoma diagnostic techniques are blood markers research, contrasting colon x-rays, visual exams as rectosigmoidoscopy and colonoscopy with biopsy or even to take out suspected lesions. Other diagnostic techniques have been studied such as virtual colonoscopy and spectroscopy. Among all spectroscopy techniques, Raman spectroscopy is a non-destructive technique that can be used to give an analysis result in real time and to transmit information about the tissues molecular structures. The main goal of this study was to analyze a normal tissue and a colon adenocarcinoma lesion. It was performed using the RFS 100 spectrometer. We used the Nd:YAG laser with maximum power of 300mW. In this study the potency used in the tissue sample was 132mW and 300 scan, with a spectral resolution of 4cm^{-1} , for in each sample. In the total 144 spectra of normal tissues and 70 spectra of adenocarcinoma were obtained. These spectra were analyzed by Principal Component Analysis (PCA) and organized into cluster diagrams which allowed us to see the spectral differences between the normal and neoplastic tissues. The spectra can be divided in three different groups with high similarities, to the normal tissue it was higher than 90% and to neoplastic tissues it was higher than 82,5%. We correlated the spectral differences among these groups with the vibration mode changes that exist in these tissues and we analyzed the amplitude of important peaks. This technique is appropriated to show the molecular and biochemical differences that exist in these tissues. This work also showed that Raman spectroscopy can be one more important diagnostic instrument to this disease in a near future.

Key words: colon cancer, adenocarcinoma, Raman spectroscopy

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura do intestino grosso.....	5
Figura 2 - Junção íleo-cecal, apêndice e ceco.....	7
Figura 3 - Desenho esquemático em corte transversal da porção distal do sigmóide, reto e canal anal.....	11
Figura 4 - Reprodução de um corte transversal da parede do intestino grosso.....	13
Figura 5 - Imagem colonoscópica de adenocarcinoma ulcerativo do cólon.....	17
Figura 6 - Adenocarcinoma polipóide de cólon.....	17
Figura 7 - Câncer estenosante de cólon.....	18
Figura 8 - Desenho esquemático de câncer infiltrativo de parede do cólon.....	18
Figura 9 - Enema baritado do cólon.....	22
Figura 10 - Desenho esquemático do procedimento da retosigmoidoscopia.....	23
Figura 11 - Desenho esquemático do procedimento da colonoscopia.....	24
Figura 12 - Aparelho para realização da colonoscopia virtual e imagem de pólipo captado pelo procedimento.....	24
Figura 13 - Modelo de massas pontuais para a vibração de uma molécula.....	28
Figura 14 - Desenho esquemático dos modos vibracionais dos átomos.....	29
Figura 15 - Desenho esquemático do ganho de energia.....	29
Figura 16 - Desenho esquemático do ganho maior de energia, quando E_f é maior que E_i	30
Figura 17 - Desenho esquemático do espalhamento Rayleigh (E_s).....	30
Figura 18 - Desenho esquemático do espalhamento Raman Stokes.....	31
Figura 19 - Desenho esquemático do espalhamento Raman Anti-stokes.....	31
Figura 20 - Desenho esquemático do Sistema FT-Raman.....	53
Figura 21 - Esquema representativo da fórmula básica do aminoácido.....	38

Figura 22 - Desenho esquemático do arranjo espacial das unidades peptídicas em conformação α -hélice.....	39
Figura 23 - Desenho representativo de duas cadeias peptídicas em conformação folha β pregueada.....	40
Figura 24 - Estrutura da lisozima do ovo, com segmentos em α -hélice e em folha β pregueada.....	40
Figura 25 - Desenho esquemático da estrutura quaternária da hemoglobina.....	41
Figura 26 - Esquema demonstrando a ligação de um grupo carboxila com um grupo Amino.....	42
Figura 27 - Desenho esquemático representando os modos vibracionais da Amida I e Amida III.....	42
Figura 28 - Representação da composição de um nucleotídeo.....	43
Figura 29 - Estruturas de alguns monossacarídeos.....	45
Figura 30 - Galões de nitrogênio.....	51
Figura 31 - Espectrômetro FT-Raman RFS 100	52
Figura 32 - Porta amostras com escavação central para recepção das amostras (A). Demonstração do posicionamento das amostras defronte à Lente objetiva para a irradiação e leitura dos espectros FT-Raman (B).....	53
Figura 33 - Dendograma representando o agrupamento sucessivo dos objetos.....	54
Figura 34 - Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros FT-Raman de amostras de tecidos normais.....	59
Figura 35 - Espectros FT-Raman das amostras que compõe o Grupo Normal 1.....	60
Figura 36 - Espectros FT-Raman das amostras que compõe o Grupo Normal 2.....	60
Figura 37 - Espectros FT-Raman das amostras que compõe o Grupo Normal 3.....	61
Figura 38 - Média dos espectros Raman do tecido normal.....	62
Figura 39 - Lâminas histológicas de tecido normal de cólon.....	63
Figura 40 - Espectros FT-Raman de todas as amostras de adenocarcinomas.....	63

Figura 41 - Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de adenocarcinoma.....	65
Figura 42 - Média dos espectros de adenocarcinoma com os espectros das amostras AD4.....	66
Figura 43 - Média de todos espectros de adenocarcinoma.....	67
Figura 44 - Lâminas histológicas de adenocarcinoma (ADC-1).....	68
Figura 45 - Lâminas histológicas de adenocarcinoma (ADC-2).....	68
Figura 46 - Lâminas histológicas de adenocarcinoma (ADC-3).....	68
Figura 47 - Lâminas histológicas de adenocarcinoma (AD-4).....	69
Figura 48 - Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de Adenocarcinoma.....	70
Figura 49 - Dispersão PC3 <i>versus</i> PC2 dos espectros de adenocarcinoma e tecido normal do cólon.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema para estadiamento do câncer colorretal de Dukes modificado por Astler- Coller

Tabela 2 - Estadiamento do câncer colorretal pelo sistema TNM

Tabela 3 - Posição de pico (cm^{-1}) e tipos de estruturas vibracionais das moléculas

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADC-1.....	Adenocarcinoma - Grupo 1
ADC-2.....	Adenocarcinoma - Grupo 2
ADC-3.....	Adenocarcinoma - Grupo 3
GN-1.....	Tecido de cólon normal - Grupo 1
GN-2.....	Tecido de cólon normal - Grupo 2
GN-3.....	Tecido de cólon normal - Grupo 3
IP&D.....	Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
IDC.....	Carcinoma Intraductal Infiltrante
IgG.....	Imunoglobulina G
IgM.....	Imuno globulina M
nm.....	Nanômetro = 1×10^{-9} metro
IR.....	. “ <i>Infrared</i> ”
FT.....	Transformada de Fourier
FT-IR.....	Transformada de Fourier no Infravermelho
CCD.....	“ <i>Charge Coupled Device</i> ” - Detector de Cargas Acopladas
DNA.....	Ácido Desoxirribonucleico
LEVB.....	Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
UniVap.....	.Universidade do Vale do Paraíba

CEP.....Comitê de Ética em Pesquisa

FUNFARME.....Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Nd.....Neodímio

YAG.....“*Yttrium - Aluminium – Garnet*”

Hz.....“*Hertz*”

He.....Hélio

Ne.....Neônio

FAMERP.....Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

ACP.....Análise dos Componentes Principais

DMBA.....Dimetil benza antracere

APUD.....“*Amine Precursor Uptake and Descarboxilation Cells*”

APCβ.....Gene da Adematose Poliposa do Cólon

UICC.....União Internacional Contra o Câncer

TNM.....Tumor Nódulo Metástase

CEA.....Antígeno Carcinoembrionário

CA 19.9.....Antígeno 19.9 do hidrato de carbono

μm^2Micrômetro ao quadrado

mW.....MiliWatts

?..... Dipolo Induzido

a..... Polarizabilidade

d..... Modo dobramento

?.....Estiramento

?.....Constante de Força
 μMassa Reduzida
 $m_1 - m_2$ Massa dos Átomos
?1.....Estiramento Simétrico
?2.....Dobramento
?3.....Estiramento Assimétrico
 E_0Estado Fundamental de energia da molécula
 E_1Nível de energia
 E_fEnergia do Fóton espalhado
 E_vNível de energia maior que E_i
 E_sEspalhamento Rayleigh
?.....Frequência vibracional

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução.....	2
2. Revisão da Literatura.....	5
2.1 Anatomia do Intestino Grosso.....	5
2.1.1 Ceco, apêndice vermiforme e junção íleo-cecal.....	6
2.1.2 Cólon Ascendente.....	8
2.1.3 Cólon Transverso.....	9
2.1.4 Cólon Descendente.....	10
2.1.5 Cólon Sigmóide.....	10
2.1.6 Reto.....	10
2.1.7 Canal anal e ânus.....	11
2.1.8 Estruturas da parede do Cólon.....	12
3. Características das Células normais e neoplásicas.....	12
4. Adenocarcinoma de Cólon.....	14
4.1 Carcinogênese coloretal.....	14
4.2 Classificação do adenocarcinoma de Cólon.....	16
4.3 Estadiamento do Câncer coloretal.....	18
4.4 Métodos Diagnósticos.....	20
4.4.1 Marcadores sanguíneos.....	20
4.4.2 Pesquisa de sangue oculto nas fezes.....	21
4.4.3 Enema baritado.....	21
4.4.4 Retosigmoidoscopia.....	22
4.4.5 Colonoscopia.....	23
4.4.6 Colonoscopia Virtual.....	24
4.4.7 Biópsia óptica.....	25
4.4.8 Espectroscopia Vibracional.....	25
5. Espectroscopia Raman.....	26
5.1 Histórico.....	26
5.2 Princípios da Espectroscopia Raman.....	27
5.3 Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier.....	32
5.4 Aplicações Biológicas e Biomédicas da Espectroscopia Raman.....	33
5.5 Espectros Raman de Moléculas que participam em neoplasias.....	38
5.5.1 Proteínas.....	38
5.5.2 Ácidos Nucleicos.....	43
5.5.3 Lipídeos.....	44
5.5.4 Carboidratos.....	44
5.6 Modos Vibracionais Raman de moléculas teciduais.....	46
6. Objetivos.....	48
7. Material e Métodos.....	50
7.1 Ética Médica.....	50

7.2	Obtenção das Amostras.....	50
7.3	Parâmetros do Equipamento.....	52
7.4	Realização da Espectroscopia Raman.....	52
7.5	Análise dos dados espectrais.....	53
7.6	Análise dos Componentes Principais.....	55
7.7	Estudo histológico.....	55
8.	Resultados.....	58
8.1	Espectros do tecido normal.....	58
8.2	Espectros do adenocarcinoma	63
8.3	Cluster dos espectros de adenocarcinoma x tecido normal.....	69
8.4	Dispersão entre espectros.....	70
9.	Discussão.....	73
9.1	Espectros do tecido normal.....	74
9.2	Espectros do adenocarcinoma.....	75
9.3	Espectros do adenocarcinoma x espectros tecido normal.....	78
10.	Conclusões.....	83
11.	Estudos futuros.....	85
	Referências.....	86
	Anexo A.....	96
	Anexo B.....	98
	Anexo C.....	100

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Estimativas apontam um aumento de ocorrência de câncer nos próximos anos, prevendo que haverá aproximadamente 10 milhões de novos casos de câncer no Mundo. Serão 945 mil novos casos de câncer de cólon e reto e existem aproximadamente 2,4 milhões de pessoas vivas com diagnóstico de câncer de cólon e reto nos últimos cinco anos. Observações apontam que a incidência é maior nos países desenvolvidos comparados aos países em desenvolvimento (INCA, 2005). Nos Estados Unidos e na Inglaterra, estas neoplasias ocupam o segundo lugar em frequência e o primeiro em mortalidade entre todas as enfermidades malignas. Nos Estados Unidos, de cada 20 pessoas, uma desenvolverá a doença, correspondendo a cerca de 150.000 casos novos por ano e a 15% de todas neoplasias malignas (CORDEIRO et al., 2000) .

Com relação as mortes por câncer no mundo, as neoplasias do intestino grosso ocupam o terceiro lugar no gênero masculino e o quarto no gênero feminino. No Brasil, está entre as cinco primeiras causas de mortalidade por câncer (CASTRO;COELHO, 2004). Apresentam ainda alta taxa de mortalidade em 5 anos, correspondendo a até 50% dos enfermos diagnosticados (CORDEIRO et al., 2000).

No Brasil, a importância do câncer coloretal é evidenciada pelos dados do Instituto Nacional do Câncer, do Ministério da Saúde, que mostra sua incidência e estimativa de ocorrência para o ano de 2006 como sendo a quarta entre todos os tumores malignos.

Cerca de 75% dos enfermos situam-se na faixa etária dos 45 aos 75 anos de idade, sendo discretamente mais frequente no gênero feminino que no masculino (CORDEIRO et al, 2000).

Os métodos diagnósticos para o câncer coloretal incluem a anamnese o exame físico completo e cuidadoso, o toque retal, a anoscopia, a retossigmoidoscopia, exame radiológico contrastado do intestino grosso, a colonoscopia e biópsia com o estudo histopatológico da

lesão. A colonoscopia virtual, nos casos em que a lesão tem aspecto polipóide, é utilizado como método para diagnóstico (CORDEIRO et al., 2000).

A biópsia da lesão é o procedimento “*Gold Standard*” (Padrão Ouro) para a confirmação do diagnóstico e classificação precisa da doença. Entretanto este procedimento apresenta desvantagens como a necessidade de remoção do tecido acometido, envolvendo algumas vezes riscos na remoção de áreas suspeitas, a demora para obtenção do resultado, atrasando assim o tratamento adequado do paciente; e por fim o armazenamento inadequado que pode induzir alterações no tecido biopsiado e alterar o resultado da análise (STONE et al., 2003).

Objetivando minimizar as desvantagens que ocorrem na biópsia convencional, neste trabalho utilizamos uma nova técnica de estudo das lesões neoplásicas do intestino grosso, conhecida como biópsia óptica ou Espectroscopia Raman. Esta técnica consistiu na utilização da luz do laser para obter informações morfológicas, estruturais e moleculares do tecido, sem a necessidade de remoção deste, possibilitando uma análise não invasiva da lesão.

REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da Literatura

2.1 Anatomia do Intestino Grosso

O intestino grosso compreende os cólons ascendente, transverso, descendente, o reto e o canal anal e está contido nas cavidades abdominal e pélvica. O intestino grosso se estende a partir do fim do íleo, porção terminal do intestino delgado e termina no ânus. O ceco é uma estrutura como uma bolsa dilatada e cega onde o íleo se esvazia na porção medial e posterior, originando assim a junção ileocecal (CASTRO;COELHO, 2004). O intestino grosso mede em torno de 1,5 metros, correspondendo à aproximadamente 1/5 de toda extensão do canal intestinal (Figura 1).

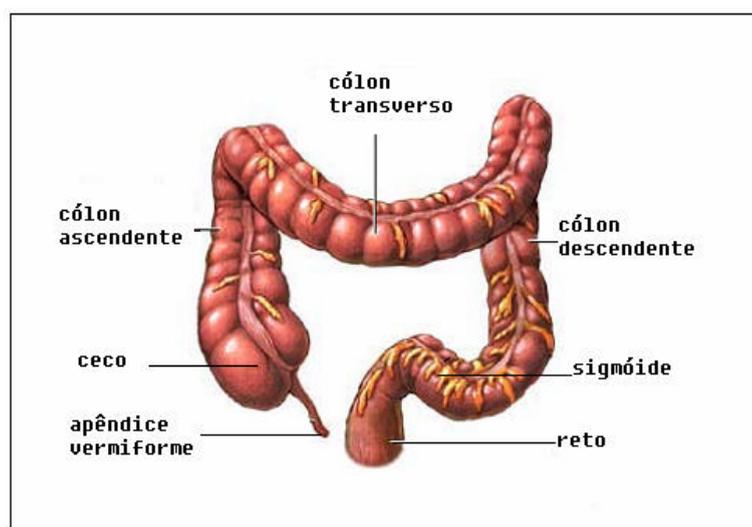


Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura do intestino grosso.(HEALTH, 2005)

O calibre é largo no seu início e gradualmente diminui em direção ao reto, onde há dilatação de considerável tamanho acima do canal anal. Difere do intestino delgado por ser mais calibroso, ter mais posições fixas, ter forma sacular, possuir apêndices na parede externa, denominados de apêndices epiplóicos e, por fim, a musculatura longitudinal não é contínua em torno do intestino, mas arranjada em três bandas longitudinais denominadas tênias longitudinais (GRAY, 2005). As tênias do cólon são faixas espessas de fibras

musculares longitudinais que medem 1cm de largura. Cada uma das tênias recebe uma denominação diferente: tênia mesocólica, que se localiza na fixação do mesocolo na parte póstero-medial dos cólons ascendente e descendente; tênia omental que é a tênia do cólon transverso, localizada na fixação do omento maior na parte póstero-medial do cólon; e tênia livre localizada entre a tênia mesocólica e a omental (FENEIS;DAUBER, 2000).

O intestino grosso, durante seu curso descreve um grande arco que circunda as convoluções do intestino delgado. Inicia-se na fossa ilíaca direita numa parte dilatada e denominada de ceco, ascende então para a região do hipocôndrio direito, abaixo do fígado, onde sofre uma dobra para à esquerda denominada flexura cólica direita e passa transversamente através do abdômen pela região epigástrica e periumbilical para a região do hipocôndrio esquerdo. Aqui sofre outra dobra, denominada de flexura cólica esquerda, e descende então pela região lombar esquerda para a região ilíaca da pélvis formando outra dobra denominada de flexura sigmóide e continua através da parede posterior da pélvis em direção ao ânus (GRAY, 2005).

Durante esse trajeto o intestino grosso sofre mais duas flexuras, a flexura sacral que é uma curvatura côncava que se adapta à curvatura do sacro, e a flexura anorretal, uma curvatura convexa na frente do reto, localizada imediatamente acima do ânus (FENEIS;DAUBER, 2000). Os apêndices epiplóicos existem em fileira dupla nos cólons ascendente e descendente e em fila única no cólon transverso e, aparentemente, tem como função primordial o depósito de células gordurosas (CASTRO;COELHO, 2004).

2.1.1 Ceco , apêndice vermiforme e junção íleo cecal

O ceco, segmento do intestino grosso que se projeta como uma bolsa em fundo cego abaixo da entrada do íleo, é um órgão sacular de 6 a 8 cm extensão (Figura 2). Habitualmente situado na fossa ilíaca direita acima da metade lateral do ligamento inguinal, repousa sobre o íliaco e o psoas maior. Geralmente está em contacto com a parede abdominal

anterior e, apesar de estar inteiramente coberto pelo peritônio, apresenta mobilidade limitada por pequeno mesoceco. Em torno de 5% dos casos este recobrimento não é completo e o ceco repousa diretamente sobre os músculos íliaco e psoas maior (COELHO, 2005).

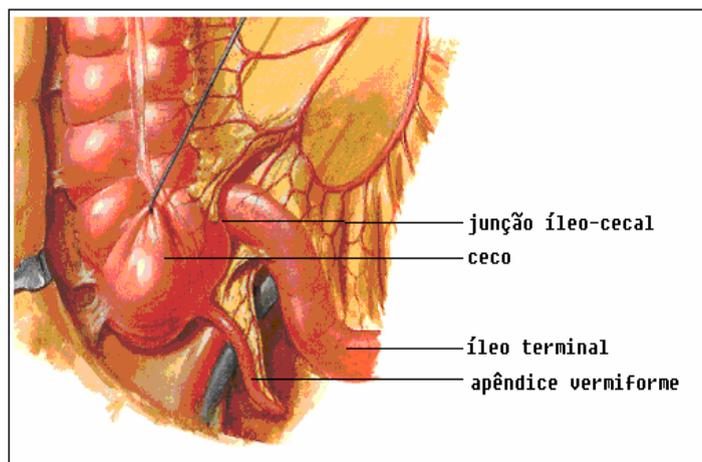


Figura 2 - Junção íleo-cecal, apêndice e ceco. (GRAY, 2005)

O apêndice é um órgão estreito oco, muscular de aspecto vermiforme (Figura 2). O seu comprimento varia de 2 a 20 cm com média de 8 a 10 cm (COELHO, 2005). É mantido nesta posição pela prega de peritônio derivado da dobra esquerda do mesentério. A forma da folha mesentérica é em geral triangular e de regra se alonga por toda a extensão do tubo apendicular. O canal do processo vermiforme se estende por toda extensão do tubo e se comunica com ceco através de abertura denominada óstio apendicular que se localiza abaixo e atrás da abertura da válvula íleo-cecal. As camadas do apêndice são as mesmas do intestino: serosa, muscular, submucosa e mucosa. A camada serosa reveste quase a totalidade do tubo com exceção de estreita linha de fixação desta no mesentério que corresponde aos 2/3 proximais. As fibras musculares longitudinais não formam as três bandas longitudinais como em grande parte do intestino grosso, mas revestem todo o órgão, com exceção em um ou dois pontos, onde tanto a musculatura longitudinal como a circular são deficientes, e então as camadas peritoneais e submucosas são contíguas nestas áreas. A camada da musculatura circular é mais espessa que as fibras longitudinais e separada por uma pequena quantidade de tecido. A camada submucosa é bem delimitada e contém grande

número de nódulos linfóides que fazem protuberância no lúmen e o tornam estreito e irregular. A camada mucosa é formada pelo epitélio colunar que relembra as outras partes do intestino, mas contém menor número glândulas intestinais do que o restante do intestino (GRAY, 2005).

O intestino delgado termina em uma abertura na porção medial e baixa do intestino grosso no ponto de junção do ceco com o cólon ascendente denominada válvula íleocecal. A abertura é protegida por uma válvula que consiste de dois lábios, que se projetam para dentro do lúmen do intestino grosso. O lábio superior que tem direção quase horizontal, é fixado na borda convexa da linha de junção do íleo com o cólon, o lábio inferior que é mais longo e mais côncavo, é fixado na linha de junção do íleo com o ceco. No final da abertura os dois lábios coalescem e continuam como um sulco membranoso estreito por curta distância, formando o frênulo da valva. Cada lábio da valva é formado pela reduplicação da membrana mucosa e das fibras circulares do intestino, fibras longitudinais e peritônio contíguos e ininterruptos do intestino delgado para o grosso (GRAY, 2005).

A válvula íleocecal não apresenta configuração anatômica de um esfíncter, porém do ponto de vista de função age como tal, porque evita o fluxo constante do conteúdo do íleo para o intestino grosso. Evita também o refluxo do ceco para o íleo constituindo uma barreira para passagem de bactérias do intestino grosso para o delgado, podendo ocorrer incompetência em 15% dos casos (CASTRO;COELHO, 2004).

2.1.2 Cólon Ascendente

O cólon ascendente é mais estreito que o ceco, onde se inicia e toma direção ascendente, estendendo-s até a flexura cólica direita ou flexura hepática, anteriormente ao rim direito e em contato com o lobo direito do fígado (Figura 4). Uma prega peritoreal, o ligamento frênico-cólico, estende-se da flexura hepática ao diafragma. O peritônio reveste o cólon ascendente nos contornos anterior, lateral e medial, mas não no posterior, isto é,

geralmente não há meso, o que faz com que a mobilidade desta parte do intestino grosso seja praticamente nula ou extremamente reduzida (DANGELO, 2006). Na porção mais cranial está intimamente relacionado com o duodeno em posição póstero-medial. Na altura da flexura hepática é sustentado pelo ligamento nefrocólico e em alguns casos pelo ligamento duodenocólico (CASTRO;COELHO, 2004).

2.1.3 Cólon transverso

O cólon transverso é a parte mais longa e a mais móvel do intestino. Esta parte do intestino tem a forma de um tubo irregular, com dimensões extremamente variáveis, com 50 a 60 cm de comprimento em média e calibre menor do que os cólons ascendente e descendente (PORTO, 2005). Atravessa o abdome descrevendo uma curva com convexidade para baixo, a partir hipocôndrio direito para o esquerdo, até abaixo da borda inferior do baço, onde sofre outra dobra formando a flexura cólica esquerda ou flexura esplênica. É coberto quase completamente pelo peritônio e conectado com a borda inferior do pâncreas por uma grande duplicação desta membrana denominada mesocólon transverso. Relaciona-se na sua superfície superior com o fígado e a vesícula biliar, com a grande curvatura do estômago e com a borda inferior do baço. A superfície inferior se relaciona com o intestino delgado, a superfície anterior se relaciona com o grande omento e a parede abdominal anterior, a superfície posterior da direita para esquerda se relaciona com a porção descendente do duodeno, cabeça do pâncreas, algumas convoluções do jejunum e íleo (GRAY, 2005). No nível do ângulo esplênico o cólon é bem fixo por ligamentos originados do diafragma denominado ligamento frenocólico. O cólon transverso e seu mesocólon separam a cavidade abdominal em duas partes distintas: o andar supramesocólico e andar inframesocólico. O cólon transverso está unido à grande curvatura do estômago através do grande omento que tem seu início na borda inferior do cólon (CASTRO;COELHO, 2004).

2.1.4 Cólon descendente

O cólon descendente estende-se da flexura lienal ou flexura esplênica em direção inferior através do hipocôndrio esquerdo e região lombar esquerda ao longo da borda lateral do rim esquerdo e desce em ângulo com o músculo psoas até a proximidade da abertura superior da pelve e onde se inicia o cólon sigmóide. O peritônio reveste seu contorno anterior, medial e lateral, sua superfície posterior está conectada por tecido areolar frouxo com a porção inferior e lateral do rim esquerdo (DANGELO, 2006).

2.1.5 Cólon sigmóide

O cólon sigmóide forma uma alça de aproximadamente 40 cm e por conta da sua liberdade de movimentos, pode ser deslocado dentro da cavidade abdominal. Começa na abertura superior da pequena pelve onde é contíguo com o cólon descendente e atravessa transversalmente na frente do sacro para o lado direito da pelve curva-se, então, em direção à esquerda até a linha média ao nível da terceira linha de fusão do sacro, onde se dobra para baixo em direção ao reto. O sigmóide é completamente recoberto pelo peritônio onde forma o mesocólon sigmóide (GRAY, 2005).

2.1.6 Reto

O reto é a parte final do intestino grosso, se estende da junção retossigmoidiana ao canal anal. Possui um comprimento que pode variar de 12 a 15 cm. É dividido em três porções: terço superior, médio e inferior. O terço superior tem localização intraperitoneal sendo recoberto anterior e lateralmente por peritônio. O reto médio atravessa o fundo de saco do peritônio pélvico, recoberto pelo peritônio apenas na sua parte anterior. O reto inferior tem localização extraperitoneal e é envolto apenas pela fáscia visceral pélvica. O reto possui um meso espesso e curto, denominado de mesoreto. Algumas diferenças em relação ao

restante do cólon são: a ausência apêndices epiplóicos e haustrações, maior diâmetro e camada longitudinal externa mais difusa e espessa e também não possui tênias. Na parte interna há três indentações denominadas valvas de Houston, formadas apenas por musculatura circular (Figura 3). A valva superior localiza-se a 4cm da junção retosigmoideana à esquerda, a valva média localiza-se na altura da reflexão peritoneal à direita e a valva inferior localiza-se a 2 a 3 cm acima da linha pectínea do lado esquerdo (CASTRO;COELHO, 2004).

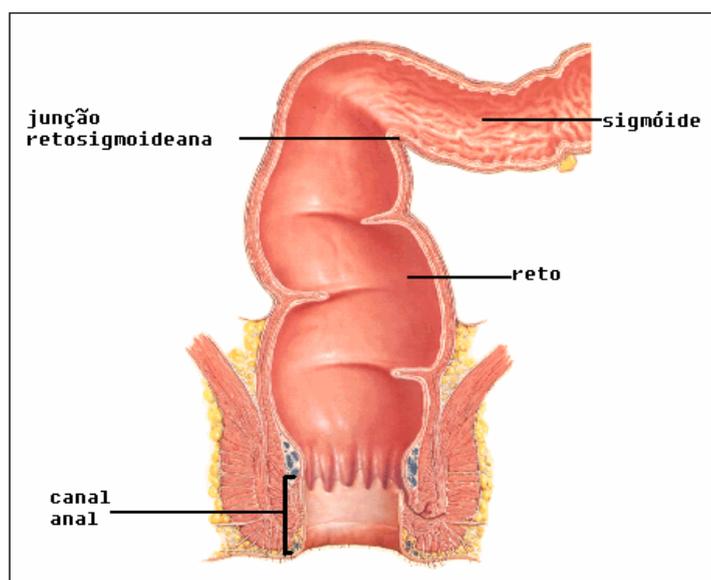


Figura 3 - Desenho esquemático em corte transversal da porção distal do sigmóide, reto e canal anal (GRAY, 2005).

2.1.7 Canal anal e Ânus

O ânus é a parte final do aparelho digestivo e mede aproximadamente 4 cm. Seu início se dá na altura da junção anorretal, que se localiza na margem superior do anel esfíncteriano anal. Alguns anatomistas consideram o canal anal como a parte que vai da linha pectínea à margem anal (CASTRO;COELHO, 2004). O canal anal, na sua metade superior, apresenta dobras verticais da mucosa conhecidas com colunas retais de Morgagni que terminam nas valvas retais onde, na altura da denominada linha pectínea, recebem a

desembocadura de seis a oito glândulas compostas de epitélio colunar estratificado e mucosecretoras (células de Globet) que na maioria das vezes se originam da submucosa (CASTRO;COELHO, 2004).

2.1.8 Estruturas da parede do cólon

A parede do cólon apresenta quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 4). A camada mais interna é denominada camada mucosa apresentando conformação colunar, e se divide em três subcamadas. A mais superficial corresponde ao epitélio glandular, que contém diversas criptas que possuem em suas bases células do sistema APUD (*Amine Precursor Uptake and Descarboxylation Cells*). A camada epitelial é separada da camada de tecido conjuntivo subjacente por uma membrana extracelular composta de glicopolissacárides. A próxima camada da mucosa é a lâmina própria, composta de tecido conjuntivo frouxo que contém capilares, células inflamatórias e folículos linfóides. A terceira camada é a muscular da mucosa que é uma fina camada de musculatura lisa. É uma camada importante porque é um limite importante quando avaliamos a propagação de carcinomas, que são considerados invasivos quando a ultrapassam. A próxima camada é a submucosa que possui rica rede de vasos sanguíneos, linfáticos e rica em colágeno. A camada abaixo da submucosa é a muscular própria, que se divide em circular e longitudinal. A circular forma um manguito ao redor de todo o intestino. Na sua superfície mais externa se localiza o plexo de Auerbach. A camada longitudinal condensa-se apenas nas três tênias, como já foi citado, enquanto que no reto forma uma camada contínua. A camada mais externa corresponde à serosa que é ausente na porção inferior do reto (CASTRO;COELHO, 2004).

3. Características das células normais e neoplásicas

As estruturas básicas das células compreendem: a membrana celular que é composta por dupla camada lipídica representadas pelos fosfolipídeos, colesterol e glicolipídeos. Esta

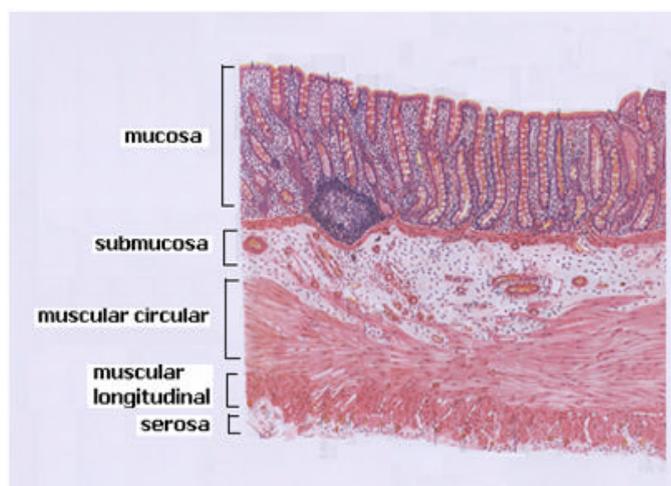


Figura 4 - Reprodução de um corte transversal da parede do intestino grosso.
(DI FIORE, 2003)

camada contém também proteínas especializadas em associação com carboidratos de superfície. O líquido intracelular, o citosol, que contém muitas enzimas essenciais e metabólitos, as organelas, o núcleo que contém o DNA que tem como estrutura básica os ácidos nucleicos e os nucleotídeos (STEVENS; LOWE, 2001).

As células neoplásicas caracterizam-se pelo incremento de material nuclear, aumento da relação núcleo-citoplasmática que pode chegar a 1:1 em vez do normal 1:4 ou 1:6, maior atividade mitótica, distribuição anormal de cromatina e falta da diferenciação celular. Ocorre também progressiva perda da maturação celular e a proliferação destas células indiferenciadas resulta em grande atividade metabólica. Histologicamente, são caracterizadas pelo agrupamento e desorganização celular (MAHADEVAN-JANSEN 1996; RICHARDS-KORTUM, 1996). No nível citoplasmático ocorrem modificações como o aumento da taxa metabólica, com conseqüente aumento da glicólise aeróbia e aumento do consumo de oxigênio. Ocorre também captação de grandes quantidades de aminoácidos, muito além das

necessidades das células normais. As perturbações em nível nuclear são as representadas pelas variedades de tamanho e forma dos núcleos devido a divisão poliplóide. A membrana citoplasmática apresenta uma estrutura química diferente, com modificações no teor de polissacarídeos provocando perturbações funcionais (DOUGLAS, 2000).

As características gerais do tecido neoplásico resultam portanto em mudanças específicas nos ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. Por exemplo células neoplásicas produzem mais lactato que o normal. Muitas oncoproteínas, que mimetizam atividades das proteínas citoplasmáticas normais, foram encontradas em células cancerosas. A interação DNA-proteína sofre interferências nas transformações malignas, portanto as proteínas nucleares que normalmente regulam a replicação do DNA ficam alteradas, resultando em proliferação celular. Carcinomas invasivos contém grande quantidade de collagenase tipo IV, a metaloproteinase. Outras proteínas em grande quantidade encontradas em tumores incluem a fibronectina, proteoglicanas, laminina, catepsin-D e a cisteína proteinase (MAHADEVAN-JANSEN, 1996-RICHARDS-KORTUM, 1996).

Em resumo, podemos afirmar que são múltiplos os marcadores moleculares, localizados na membrana, no citoplasma, núcleo e no espaço extracelular que podem ser usados como indicadores de neoplasia. As moléculas marcadoras incluem as proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos (MAHADEVAN-JANSEN 1996; RICHARDS-KORTUM, 1996.)

4. Adenocarcinoma de cólon

4.1 Carcinogênese coloretal

Do ponto de vista da genética e da biologia molecular, o câncer é um processo de múltiplas etapas, dirigido por alterações genéticas, terminando com o aparecimento de células com vantagens proliferativas sobre as demais. O ciclo biológico compreende a proliferação, a diferenciação, a migração e a morte celular, controlado pela constante ativação dos genes supressores de tumor e inibição da ativação dos oncogenes. Os oncogenes têm a capacidade de provocar alterações nas várias fases do ciclo celular. Alterações genéticas podem ocorrer através de mutações, que modificam o processo regulador do ciclo celular fundamental. Fatores dietéticos podem estar relacionados à carcinogênese. A teoria dietética mais popular relaciona a falta de ingestão de fibras com o risco aumentado de desenvolver câncer de cólon. Há evidências de que uma dieta rica em gordura animal também é um fator de risco importante (WAY; DOHERTY, 2003). Este conceito baseia-se na teoria de que a ingestão de alimentos com teor elevado de gordura favorece o desenvolvimento de flora bacteriana que contém microorganismos capazes de degradar os sais biliares em substratos carcinogênicos (KEIGHLEY; WILLIAMS, 1998). Outro possível mecanismo através do qual alimentos ricos em gordura animal poderiam promover o desenvolvimento do câncer coloretal, inclui alterações na imunidade, efeitos na peroxidação lipídica e modulação da síntese de prostaglandinas através do metabolismo do ácido aracônico (WAY; DOHERTY, 2003).

A carcinogênese coloretal é considerada como mutação fenotípica de múltiplas vias, de acordo com as principais escolas de patologistas. Atualmente acredita-se que existam duas vias protogeneticamente diferentes para o desenvolvimento do câncer do cólon. A primeira via, às vezes chamada via APC β -catepsina, caracteriza-se pela instabilidade cromossômica que resulta do acúmulo escalonado de mutações em uma série de oncogenes e genes supressores de tumor. A evolução molecular ocorre através de estágios perfeitamente identificáveis. Existe, inicialmente a proliferação de pequenos pólipos adenomatosos que

umentam progressivamente, tornam-se mais displásicos e, finalmente, cânceres invasivos. Esta via é denominada **Sequência Adenoma-Carcinoma** (TOWNSEND et al, 2005). Os carcinomas que se originam por esta via podem acontecer numa frequência que varia de 56 a 90% dos casos. São tumores mais frequentes nos idosos pois necessitam de um período de mais ou menos cinco anos para sofrer essa malignização. São conhecidos três variantes histológicas de adenomas. Os tubulares representam 75% a 87% dos pólipos e menos de 5% são malignos; os túbulo-vilosos representam 8% a 15% dos pólipos e tem malignidade em 20% a 25%; e os vilosos representam os 5% a 10% restante, porém com alta taxa de malignidade em torno de 35% a 45% (FEIG et al., 2000). A outra via da carcinogênese é a chamada via da **Instabilidade Microssatélite** e se caracteriza pela lesões ao DNA dos genes de reparo do malpareamento como consequência à perda do reparo de malpareamento ocorre o acúmulo de mutações nestes e em outros genes reguladores do crescimento, culminando com o surgimento dos carcinomas coloretais, em geral conhecidos como “câncer de novo”, isto é, câncer que se origina diretamente da mucosa coloretal, sem lesão poliposa prévia ou displásica. Estes tipos de tumores são mais frequentes nos pacientes jovens, com idade abaixo dos 40 anos (CORDEIRO et al, 2000).

Pode-se graduar histologicamente os adenocarcinomas de acordo com o grau de diferenciação e maturação destes tumores. Os tumores Grau I são bem diferenciados, com formação de glândulas que se infiltram abaixo da membrana basal, para o interior da submucosa, com evidências celulares de displasia; os tumores Grau II mostram maior celularidade dentro dos elementos glandulares que se infiltram por baixo da muscular da mucosa com figuras mitóticas mais irregulares e frequentes; os tumores Grau III são menos diferenciados, com acúmulo de células dentro dos elementos glandulares e arranjo irregular das estruturas glandulares; os tumores grau IV são totalmente anaplásicos, sem formação de glândulas e com infiltração de células isoladas através de toda parede do cólon (COELHO, 2006).

4.2. Classificação do adenocarcinoma de cólon

Há quatro tipos de câncer coloretal classificados quanto aos aspectos macroscópicos observados.

- Câncer ulcerativo: caracteriza-se como úlcera maligna típica com elevação de suas bordas, frequentemente com um centro necrótico. É uma lesão que costuma se infiltrar na parede do intestino grosso e portanto mais passível de perfuração que os outros tipos (Figura 5).



**Figura 5 – Imagem colonoscópica de adenocarcinoma ulcerativo de cólon .
(NCCS, 2006)**

- Câncer polipóide: é uma lesão proliferativa que protude na luz intestinal, e costuma não estar relacionado com infiltração da parede intestinal. Não é incomum que haja ulceração em partes de sua superfície (Figura 6).



Figura 6 - Adenocarcinoma polipóide de cólon. (MARY BIRD CANCER CENTER, 2005)

- Câncer estenosante ou anular: lesão que compromete circunferencialmente a luz do órgão, podendo estender-se longitudinalmente ao intestino. Este tipo de tumor obviamente é mais predisposto a causar obstrução do que os outros tipos (Figura 7).



Figura 7 - Câncer estenosante de cólon.

- Câncer infiltrativo: Apresenta-se usualmente como uma extensa lesão que infiltra a parede intestinal, por 5 a 8 cm (Figura 8). Neste tipo de tumor a mucosa normalmente permanece intacta apesar de eventualmente observar-se alguma região ulcerada (KEIGHILEY; WILLIAMS, 1998).



Figura 8 - Desenho esquemático de câncer infiltrativo de parede do cólon (NUCLEUS - Medical Art, 2006)

4.3 Estadiamento clínico do câncer coloretal

O estadiamento clínico determina o grau de invasão do câncer coloretal na parede intestinal, bem como a presença de metástases linfonodais à distância. Atualmente nenhuma classificação para o estadiamento é universalmente aceita. Dukes, em 1932, propôs uma classificação baseada no grau de penetração na parede e no comprometimento linfonodal:

- Estágio A: crescimento limitado à parede do reto, não havendo extensão aos tecidos extra-retais e sem metástases nos linfonodos.
- Estágio B: o crescimento se estende através da parede dos tecidos extra-retais, mas os linfonodos não estão comprometidos.
- Estágio C: Os linfonodos estão comprometidos com o tumor. Em casos classificados como C1 somente os linfonodos regionais estão comprometidos e C2 a disseminação linfonodal atinge o ponto proximal da ligadura vascular (KEIGHLEY; WILLIAMS, 1998).

Tabela 1 - Sistema para estadiamento do câncer coloretal de Dukes modificado por Astler-Coller (FORONES et al., 2005) .

Classificação/Estadiamento

A - tumor limitado à mucosa

B1 - tumor invade a *muscularis* própria

B2 - tumor invade todas as camadas do intestino

B3 - tumor invade órgãos adjacentes

C1 - tumor invade a *muscularis* própria com metástase linfonodal

C2 - tumor invade todas as camadas do intestino com metástase linfonodal

C3 - tumor invade órgãos adjacentes com metástase linfonodal

D - metástase a distância

Modificações feitas por Astler e Coller podem ser observadas na Tabela 1 e estão baseadas nos aspectos da anatomia patológica da peça ressecada (CASTRO;COELHO, 2004).

Em 1996, a União Internacional Contra o Câncer (UICC) propôs uma classificação baseada em parâmetros clínicos, cirúrgicos e histopatológicos conhecido como Sistema TNM, conforme mostrados na Tabela 2 (CASTRO; COELHO, 2004).

Tabela 2 - Estadiamento do câncer coloretal pelo sistema TNM - Tumor, Nódulo e Metástase - (FORONES et al., 2005).

Estádio /TNM

0	TisN0M0
I	T1N0M0 T2N0M0
II A	T3N0M0
II B	T4N0M0
III A	T1-2N1M0
III B	T3-4N1M0
III C	TqN2M0
IV	TqNqM1

Tis = tumor *in situ*

T1 = invasão de submucosa

T2 = invasão de mucosa própria

T3 = invasão de serosa ou gordura

N0 = sem metástase linfonodal

N1 = 1 a 3 linfonodos comprometidos

N2 = mais que 4 linfonodos comprometidos

N3 = linfonodos comprometidos ao longo de grandes vasos

T4 = invasão através da serosa para outros órgãos

M0 = sem metástases a distância

Tq = qualquer dos T

M1 = com metástases a distância

4.4 Métodos Diagnósticos

4.4.1 Marcadores sanguíneos

O mais familiar marcador químico para o câncer do intestino grosso é o “*Carcinoembriyogenic Antigen*”(CEA), ou antígeno carcinoembriogênico, uma glicoproteína encontrada nas membranas celulares de muitas células em vários tecidos, incluindo o tecido neoplásico coloretal. Alguns desses antígenos entram na corrente sanguínea e são detectadas por radioimunoensaio. O CEA pode ser detectado em outros fluídos orgânicos como urina e

fezes. O nível sérico do CEA está elevado em 70% dos pacientes com câncer coloretal, porém menos de 50% dos pacientes com câncer localizado são CEA-positivos. Outros marcadores tumorais incluem o CA 19.9, CA 72.4, a isoenzima K do lactato desidrogenase e prolactina plasmática, mas nenhum deles tem provado sua validade clínica (WAY;DOHERTY, 2003).

4.4.2 Pesquisa de sangue oculto na fezes

Baseado na premissa de que os cânceres do cólon sangram intermitentemente, nos últimos 15 anos um interesse considerável tem sido demonstrado na utilização deste método para a triagem, mas vários estudos demonstraram que ainda não é um método de diagnóstico seguro por apresentar alta taxa falso-negativos como quando o sangramento é menor que 20ml/dia e também porque nem todos os tumores sangram. As taxas de falso-positivos situam-se entre 2% a 5% e são decorrentes de causas como a detecção da hemoglobina de origem endógena, nas fezes por decorrências de úlceras, gastrites, colites hemorróidas ou exógena por ingestão de carne na dieta alimentar (KEIGHLEY;WILLIAMS, 1998).

4.4.3 Enema baritado

O enema baritado, que consiste na passagem de uma sonda retal e introdução de bário líquido no reto e intestino grosso, constitui o mais importante exame por radiologia no diagnóstico do câncer coloretal (Figura 9). O carcinoma do cólon esquerdo aparece como um defeito em afilamento e fixo, e usualmente medindo de 2 a 6 cm e com aspecto anular. Lesões do cólon direito apresentam imagem de constrição ou massa intraluminal e o intestino é inflexível no local da lesão. Importante é lembrar que estas imagens aparecem em fases avançadas do carcinoma, portanto nas fases iniciais o tumor muitas vezes mostra discretas alterações radiológicas que necessitam de investigação por outros meios como a colonoscopia. Outras vezes o tumor pode apresentar imagens de estreitamento tipo “corda” ou “anel de guardanapo”, ou de um grande defeito de preenchimento polipóide

(KEIGHLEY;WILLIANS, 1998). As duas principais desvantagens do enema baritado são a impossibilidade de fornecer o diagnóstico histológico e de excluir lesão neoplásica quando do mau preparo do intestino e nos espasmos intestinais (CASTRO; COELHO, 2004).

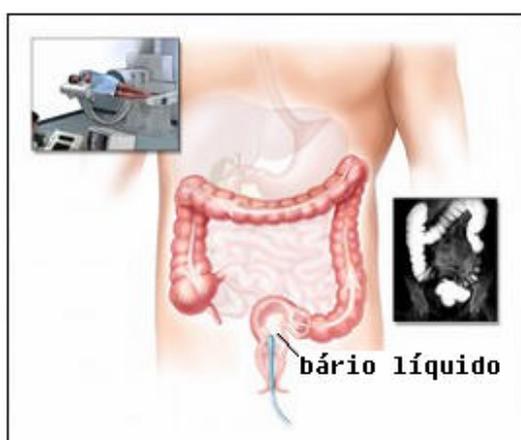


Figura 9 - Enema baritado do cólon. À direita ,imagem radiológica do procedimento (NCI, 2005).

4.4.4 Retosigmoidoscopia

É um exame que consiste na introdução via retal de um retosigmoidoscópio flexível de 60 cm de comprimento e procede-se o exame visual do segmento distal do intestino grosso (Figura 10). Aproximadamente 2/3 das neoplasias coloretais ocorrem nos 60 cm distais do intestino grosso (COELHO, 2005). Seu uso mais comum é para o rastreamento de neoplasias de pessoas assintomáticas, sendo possível examinar o reto e os segmentos distais do sigmóide. É um exame de alta sensibilidade e especificidade, porém apresenta a desvantagem de não possibilitar o exame completo do órgão (LOPES, 2006).

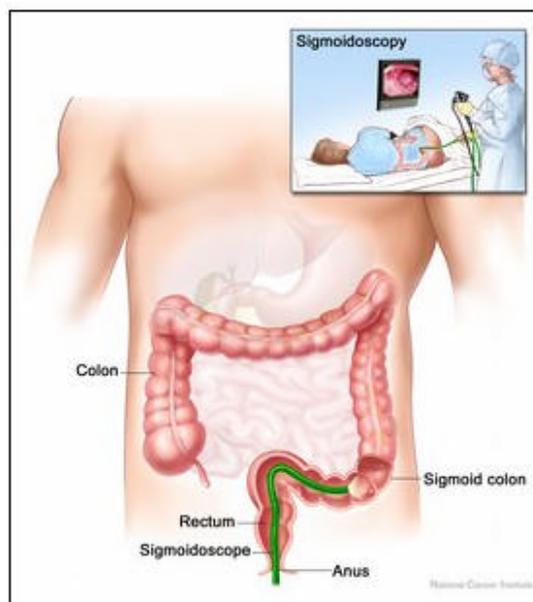


Figura 10- Desenho esquemático do procedimento da retossigmoidoscopia (NCI, 2005)

4.4.5 Colonoscopia

O exame colonoscópico é um procedimento que utiliza a introdução de uma fibra óptica através do ânus permitindo o exame do revestimento interno do intestino grosso após preparo prévio do cólon com lavagens (Figura 11). É mais confiável que o enema baritado porque permite o diagnóstico por visualização direta do tumor, permite a biópsia para estudo histológico e também a ressecção de tumores sincrônicos (CASTRO;COELHO, 2004). Possibilita o diagnóstico de enfermidades concomitantes e elucida os casos duvidosos ao enema baritado e, como contribuição importante, propicia ressecção de lesões, sendo portanto nestes casos, terapêutico (CORDEIRO et al., 2000).

A principal complicação consiste na perfuração da alça do intestino ainda que infrequente, apresenta incidência de 1:400 em exames diagnósticos (COELHO, 2005). Atualmente é considerado o exame “padrão ouro” para diagnóstico do carcinoma coloretal (CASTRO;COELHO, 2000).

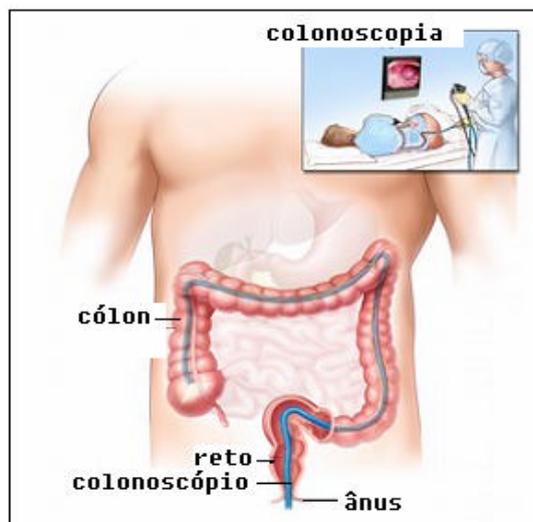


Figura 11 - Desenho esquemático do procedimento da colonoscopia. (NCI, 2005)

4.4.6 Colonoscopia virtual

É um exame que permite a visualização de todo cólon sem a necessidade de sedação do paciente e intubação do cólon. O preparo para o exame inclui a limpeza do órgão e insuflação de ar para provocar o pneumocólon e a disponibilização de aparelho de tomografia helicoidal de alta resolução (Figura 12). Após a aquisição das imagens é possível com auxílio de um *software* especial, navegar pela luz do cólon (CASTRO;COELHO, 2004).

(a)



(b)

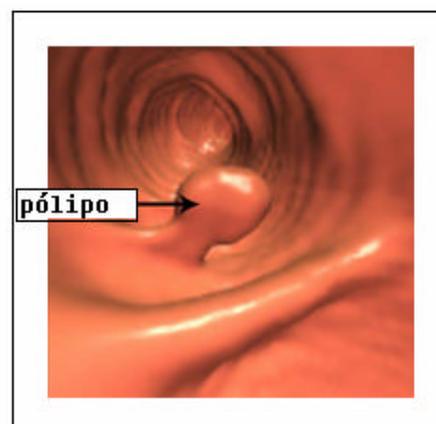


Figura 12 – a - Aparelho para realização da colonoscopia virtual (HARMONY IMAGE CENTER, 2006) e b- imagem de pólipso captado pelo procedimento (UW HEALTH, 2006).

4.4.7 Biópsia Óptica

A biópsia óptica é uma nova técnica de diagnóstico que envolve modalidades diferentes de análise de espectros de luz retroespalhados, a partir da simples iluminação do tecido suspeito com laser. Tem sido largamente estudado no mundo buscando, como objetivo, o seu aprimoramento para que possa ser empregada como eficiente método diagnóstico. Dentre a várias técnicas podemos citar a Espectroscopia Raman que se baseia no espalhamento inelástico de luz a partir das moléculas que constituem a amostra estudada provendo portanto informações a nível molecular, frequentemente denominado “*molecular fingerprints*” ou impressão digital molecular (YAMASAKI et al., 2003). Tem sido demonstrada constituir-se em um potencial método de diagnóstico de tumores. Huang et al. (2003) estudaram carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas de tecidos bronquiais e observaram grande diferenciação entre tecidos normais e neoplásicos. Bitar et al. (2005) identificou diferenças espectrais em 9 tipos de tecido neoplásicos mamários demonstrando que é possível diferenciar lesões benígnas dos carcinomas intraductais e lobulares. Yamasaki et al. (2003) demonstraram que esta técnica apresenta 91% de sensibilidade e especificidade de 97% na detecção de câncer de pulmão. A biópsia óptica apresenta vantagens em relação à biópsia convencional por não necessitar a remoção do tecido a ser analisado, a aquisição do diagnóstico ocorre em tempo real, possibilita a instituição da terapêutica curativa definitiva mais precocemente reduzindo assim custos e a ansiedade do paciente (STONE et al., 2003).

4.4.8 Espectroscopia Vibracional

A Espectroscopia vibracional é uma das várias técnicas disponíveis para o estudo da estrutura e interações moleculares. De acordo com a natureza da interação da radiação eletromagnética com a matéria, pode ser dividida em Espectroscopia de absorção no infravermelho e Espectroscopia Raman (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994). O principal objetivo desta técnica é a determinação dos níveis de energia entre átomos e

moléculas. As diferenças (transições) entre estes níveis são obtidas por esta técnica e a partir destas medidas são determinadas as posições relativas dos níveis energéticos. Nas moléculas a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos sejam eles eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Normalmente as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas (SALA., 1995).

5. Espectroscopia Raman

5.1 Histórico

Em 1800, o astrônomo Willian Herschel, utilizando radiação infravermelha emitida pela luz solar mediu pela primeira vez o espectro do infravermelho em amostras de água destilada. Tendo o sinal detectado por termômetros ordinários. Em 1905 William W. Coblantz et al. publicaram 131 espectros de compostos químicos simples. A ocorrência de fótons com frequências diferentes da radiação incidente, na radiação espalhada, foi teorizado por Smekal e subseqüentemente por Kramers and Heisenberg em 1925 e por Dirac em 1927. Chandrasekhara Venkata Raman demonstrou o fenômeno experimentalmente e portanto este é conhecido hoje como Efeito Raman (TWARDOWSKI;ANZENBACHER, 1994). O efeito despertou interesse entre os físicos que procuraram explicar seu mecanismo. Em 1934, Placzek publicou sua obra fundamental sobre a teoria do efeito Raman. Na década de 1940 os químicos já usavam a Espectroscopia Raman para obtenção de informações relativas à simetria e às ligações químicas (SALA, 1995). Com a introdução da radiação laser na década de 1960, a Espectroscopia Raman começou a ser utilizada em laboratórios para caracterização de materiais. Na década de 1980, a utilização do Raman no infravermelho próximo permitiu que esta técnica fosse utilizada em grande escala (PEREIRA, 2004). O advento de computadores trouxe valiosa contribuição à espectroscopia, tanto pela sua utilização direta nos instrumentos, com microcomputadores dedicados, como em cálculos. Os cálculos de coordenadas normais, por exemplo, só podiam ser efetuados para moléculas relativamente simples e eram extremamente morosos. Atualmente moléculas complicadas podem ser estudadas com grande rapidez e refinamento (SALA,1995).

5.2 Princípios da Espectroscopia Raman

Considerando que a Espectroscopia estuda a interação de radiação eletromagnética com a matéria, e sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos e moléculas (SALA,1995), podemos dizer que o efeito Raman é fundamentalmente o processo pelo qual a energia é trocada entre a luz e a matéria. Quando a luz incide numa substância ela pode ser absorvida ou espalhada. A maioria da luz espalhada ocorre sem mudança na frequência em relação à luz incidente, conhecida como espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh (HANLON et al., 2000). No entanto, uma fração muito pequena da luz incidente é espalhada inelasticamente de forma que a energia do fóton espalhado é diferente da energia do fóton incidente (DACOSTA et al., 2002). Este processo de mudança da energia do fóton entre a luz incidente e a espalhada é conhecido como o efeito Raman(HANLON et al., 2000).

Os sistemas biológicos consistem da interação dos componentes químicos e a mais importante regra estrutural e funcional é ditada pelas moléculas. Muitas delas são de considerável tamanho, formadas por subunidades moleculares, sendo denominadas de macromoléculas. Tal como no sistema atômico as moléculas estão sujeitas às vibrações, sendo que o total de vibrações pode ser calculado pela fórmula: $3N-6$, para moléculas não lineares e $3N-5$ para as lineares, onde N é número de átomos. Pode-se citar como exemplo que a molécula de água possui três átomos H_2O . Aplicando a fórmula : $V= 3N-6$? $V= 3(3)-6$? $V= 3$, portanto a molécula de água possui um total de três modos de vibrações (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

O modelo mais simples para o estudo das vibrações de uma molécula é o de massas pontuais, correspondentes aos núcleos atômicos, ligadas por molas com massa desprezível que correspondem às ligações químicas. Considerando-se o modelo de uma molécula diatômica constituída por duas massas pontuais m_a e m_b , ligadas por uma mola de constante k , observa-se através da Figura 13 que as partículas se deslocam em direções opostas com amplitudes inversamente proporcionais às suas massas, ou seja, executam movimento de vibração, cuja frequência vibracional é dada pela formula:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}}$$

Onde : κ é a constante de força e μ é a massa reduzida, definida como:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

Onde : m_1 e m_2 são as massas dos átomos.

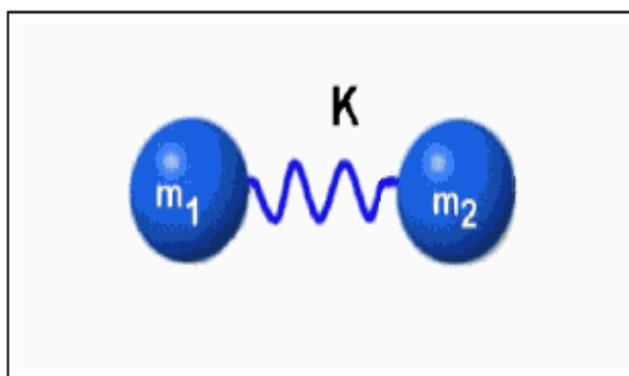


Figura 13 - Modelo de massas pontuais para a vibração de uma molécula (TWARDOWSKI; ANZENBACHER,1994).

O número de vibrações de uma molécula depende do número de átomos que esta molécula contém, porém em função da simetria e das propriedades moleculares podem apresentar três tipos básicos de vibrações: estiramento simétrico, estiramento assimétrico e dobramento (Figura 14).

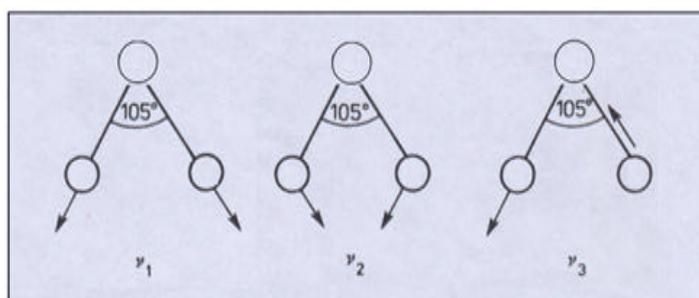


Figura 14 - Desenho esquemático dos modos vibracionais dos átomos.
 ?1= estiramento simétrico, ?2= dobramento e ?3= estiramento
 assimétrico (TWARDOWSKI ; ANZENBACHER, 1994).

Para entendermos como a luz interage com as vibrações moleculares representa-se esquematicamente as energias dos estados de vibração com um diagrama de níveis, supondo que cada modo normal de vibração só tem dois estados ou níveis de energia possíveis. O mais baixo corresponde a uma molécula, com energia E_0 denominado estado fundamental. O outro nível correspondendo à energia E_1 (representado na figura 15) que a molécula adquire quando em vibração em um de seus modos normais e denominado de estado excitado. Para que isto ocorra é necessário que haja excitação desta molécula, ou seja, a molécula precisa de ganho de energia E_f .

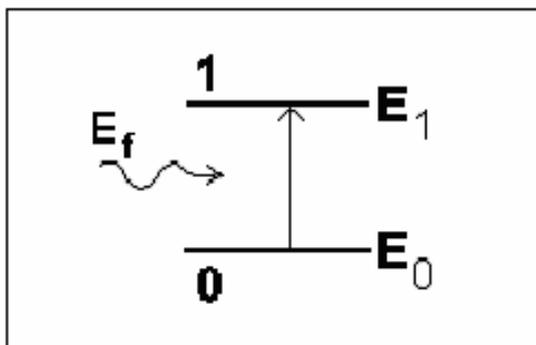


Figura 15 – Desenho esquemático do ganho de energia (E_f = energia de fóton).
 (UFC, 2005)

Quando o fóton incidente possui energia E_f maior que a energia E_1 do modo normal a molécula é excitada a um nível de energia E_v , maior que a energia E_1 do modo vibracional (Figura 16).

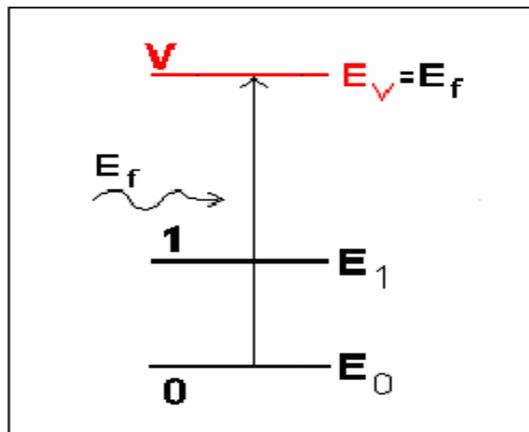


Figura 16 - Desenho esquemático do ganho maior de energia , quando E_f é maior que E_1 (UFC, 2005).

A molécula volta então ao estado fundamental E_0 , reemitindo um fóton com a mesma energia do fóton incidente, neste caso, o fóton foi simplesmente espalhado sem perda da sua energia inicial, denominado então Espalhamento elástico ou Rayleigh (figura 17).

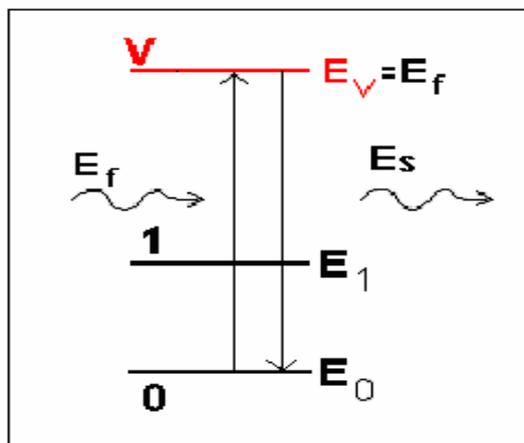


Figura17 - Desenho esquemático do espalhamento Rayleigh E_s (UFC, 2005).

Ao decair a molécula pode ficar no estado vibracional com energia E_1 , emitindo então um fóton com energia menor ($E_f < E_1$), e a este processo denomina-se espalhamento inelástico Raman Stokes (Figura 18).

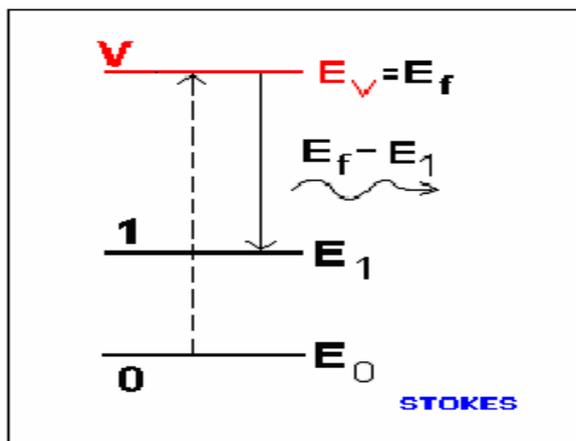


Figura 18 - Desenho esquemático do espalhamento Raman Stokes. ($E_f < E_1$)
(UFC, 2005)

Por outro lado se a molécula está vibrando em E_1 , recebe energia de um fóton levando-a a uma energia maior E_V e decai para o estado fundamental E_0 , o fóton emitido possui energia maior ($E_f > E_1$), e neste caso denominamos espalhamento inelástico Raman anti-Stokes (Figura 19).

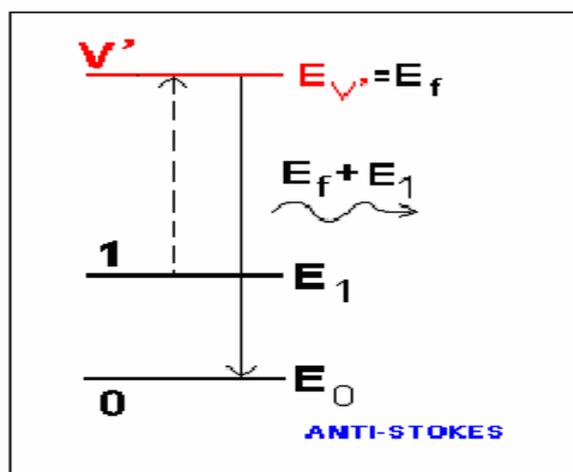


Figura 19 - Desenho esquemático do espalhamento Raman Anti-stokes ($E_f > E_1$)
(UFC, 2005)

Na espectroscopia Raman, a amostra a ser estudada recebe radiação eletromagnética proveniente de um laser caracterizado por um comprimento de onda ? (em nm) e por uma

frequência ν (medido por Hz ou sec^{-1}) sendo sua velocidade no vácuo de 299.792.458 m/s Risiene et al, *apud* (COLTHUP,1990).

5.3 Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

Foi demonstrado em 1986 que espectros Raman excitados com lasers de Nd-YAG (Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada) podem ser coletados sem fluorescência da amostra com instrumentos FT-IR (Transformada de Fourier no Infravermelho) (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994). Os sinais Raman obtidos a partir de amostras biológicas são extremamente fracos, e a emissão de fluorescência acaba sendo o maior problema para as coletas dos sinais Raman (ALCÂNTARA, 2002).

A instrumentação FT-Raman utiliza como energia de excitação um laser com comprimento de onda de 1064nm, um interferômetro de alta sensibilidade e detector de germânio. Utilizando laser com maior comprimento de onda, menor energia fornecida à amostra, logo, o estado virtual (E^*) terá menor energia reduzindo a possibilidade de sobreposição de um estado eletrônico superior, conseqüentemente eliminando a interferência da fluorescência (Riziene, 2004). Como técnica para aplicações biológicas e biomédicas a excitação, utilizando laser no infravermelho próximo, tem sido superior à excitação com luz visível. Isto ocorre porque a fluorescência é reduzida e também porque a luz no infravermelho próximo penetra mais profundamente no tecido, na ordem de milímetros, criando a denominada “janela diagnóstica” dentro do tecido devido à mínima absorção (HANLON et al, 2000).

O sistema FT-Raman utiliza um interferômetro que agrupa as frequências do espalhamento Raman em um único sinal, utiliza também um separador de feixes, possui um sistema de lentes, espelhos e prismas e um detector de germânio refrigerado por nitrogênio líquido (Figura 20). As frequências são decodificadas pelo emprego da expressão matemática denominada de Transformada de Fourier, realizada por software e os espectros são apresentados em forma de picos (RIZIENE, 2004).

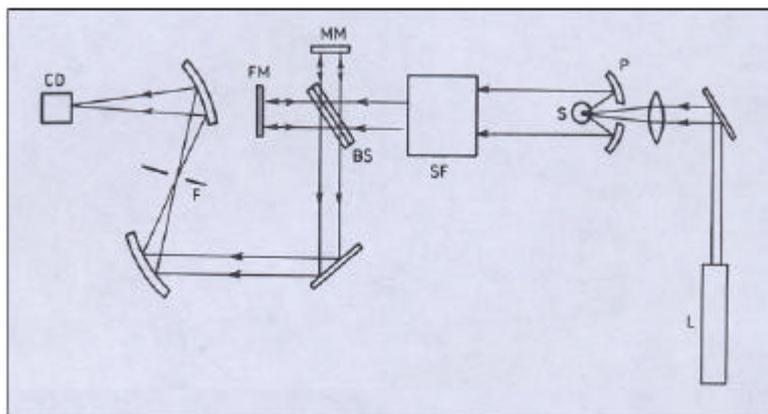


Figura 20 - Desenho esquemático do sistema FT-Raman : L – laser Nd: YAG, P- espelho parabólico de coleta , S - amostra , SF- filtro secundário , BS- divisor de raios , MM – espelho móvel , FM - espelho fixo , F- filtro espacial , CD- detector de Germânio refrigerado (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

5.4 Aplicações biológicas e biomédicas da Espectroscopia Raman

Embora efeito Raman tenha sido descoberto há mais 70 anos, a espectroscopia Raman não era empregada como instrumento de análise até a invenção do laser. Os primeiros espectros Raman de materiais biológicos foram medidos com excitação à laser no visível, primariamente utilizando lasers à gás. O primeiro espectro Raman interpretável de proteína nativa, lisozima foi obtido por Lord e Yu, em 1970, no laboratório de Espectroscopia do MIT, utilizando como fonte de excitação um laser de He-Ne (HANLON; MANOHARAN, 2000). Nessa época eram dispendidas horas para a coleta de sinais bem purificados de Raman em soluções concentradas de biomoléculas. Desde então essa coleta tem sido cada vez mais rápido e atualmente são necessários apenas alguns minutos para a obtenção de sinais espectrais de alta qualidade em pequenas colônias de células e alguns segundos para a obtenção de sinais *in vivo* (MANOHARAN; WANG, 1996).

Recentemente observou-se uma explosão na utilização da Espectroscopia Raman com o propósito de diagnosticar lesões teciduais, análises dos componentes sanguíneos e para estudo das estruturas celulares entre outras (BAENA; LENDI, 2004). O incremento no número de aplicações e no número de grupos ativos nesta área tem sido facilitado em função

dos avanços tecnológicos em lasers, detectores CCD (*Charge Coupled Device*), e fibras ópticas. Do ponto de vista de análises em medicina, o potencial da técnica de Espectroscopia Raman promete ser um novo instrumento para diagnóstico de doenças no corpo humano (CHOO-SMITH et al., 2002).

A grande vantagem da espectroscopia Raman é ser utilizada *in vivo* e possibilitar o diagnóstico em tempo real. Um instrumento diagnóstico *in vivo* é muito útil na área médica porque evita procedimentos que requeiram a remoção de tecido suspeito e também evita demora na avaliação diagnóstica. Algumas dessas áreas requerem monitorização contínua de pacientes como por exemplo as análises sanguíneas, intervenções guiadas e monitorização de efeitos de terapias (CHOO-SMITH et al., 2004).

A Espectroscopia Raman é uma técnica capaz de prover detalhes da composição química das estruturas moleculares e a suas interações nas células e tecidos. Como as doenças levam as mudanças na composição molecular dos tecidos afetados, essas mudanças refletem nos espectros, e a princípio, se essas mudanças forem específicas para um determinado *status* de alteração tecidual, podem então ser empregados como marcadores fenotípicos das doenças (CHOO-SMITH et al., 2002).

Inúmeras são as aplicações desta técnica no campo da biologia e da medicina, e a maioria ocorre em função do interesse em explorar as aplicabilidades do Raman em diagnóstico de doenças. Abaixo descreveremos brevemente algumas dessas aplicações.

Barry et al. (1992) realizaram estudo comparativo entre Espectroscopia por Transformada de Fourier no infravermelho próximo (FTIR) e Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier (FT-Raman) em estrato córneo de pele humana e demonstraram que a FT-Raman apresenta mais vantagens sobre a FTIR para o estudo da pele humana.

Mizuno et al. (1994) investigaram tumores cerebrais de pacientes submetidos a neurocirurgia, diagnosticados como glioma grau I, glioma grau II, neurinoma e neurocitoma

de plexo coróide, e concluíram que a espectroscopia Raman pode ser usada para o diagnóstico diferencial de vários tipos de tumores cerebrais.

Frank e Mcckeery. (1995) realizaram Espectroscopia Raman em lesões neoplásicas e tecidos normais de mama humana e observaram que as diferenças espectrais entre as condições benígnas (fibrocísticas) e malignas (carcinoma ductal infiltrante – IDC) eram pequenas em relação as comparações destes com os espectros de tecidos normais.

Schrader et al. (1995) realizaram experiências em diferentes partes de adenocarcinoma de pulmão de ratos e grupos de culturas de células de epiteloma e sarcomas, visando detectar diferenças espectrais entre estes tumores, concluindo que a técnica permite discriminação rápida e segura destes diferentes tecidos.

Mahadevan et al. (1996) revisaram os recentes avanços na tentativa no desenvolvimento de técnicas diagnósticas de cânceres e pré-cânceres baseados na espectroscopia Raman, concluindo que a aplicação clínica desta técnica é iminente e espera-se que promova mudança na detecção do câncer num futuro próximo.

Shim e Wilson. (1996) constataram que tecidos preparados com formalina não apresentavam alterações significantes no espectro e concluiu que amostras de tecidos armazenados para estudos histológicos podem ser estudados por espectroscopia Raman.

Gniadeka et al. (1997) investigaram por espectros Raman amostras de pele normal, lesões benígnas como tatuagens, dermatofibromas, queratose actínica, queratoacantoma e lesões malignas como carcinoma basocelular, carcinoma espinocelulares e lentigo maligno objetivando comparar as estruturas moleculares destas lesões e concluíram que tumores malignos de diferentes tecidos não demonstram nenhuma mudança molecular em comum.

Lawson et al. (1997) realizaram uma revisão das aplicações biomédicas da espectroscopia Raman e mostraram que a técnica está sendo empregada no estudo das

artérias humanas, especialmente na aorta com a finalidade de detectar aterosclerose, em tumores de cérebro e pulmão, em cálculos biliares e renais, em cabelos e unhas, implantes e próteses, dentes, olhos, até mesmo na Doença de Alzheimer.

Gniadeka et al. (1997) utilizaram a espectroscopia Raman de pele normal comparada com carcinoma basocelular e obtiveram completa separação espectral entre estes dois tipos de tecidos.

Martin et al. (2003) aplicaram a técnica de PCA em espectros Raman de carcinomas basocelulares e tecidos normais e concluíram que a técnica é capaz de separar os tipos teciduais com 83% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Molckovsky et al. (2003) demonstraram pela primeira vez o potencial da espectroscopia Raman para diferenciação de pólipos colônicos durante um exame endoscópico. O estudo *in vivo* permitiu distinguir os adenomas (n=10) dos pólipos hiperplásicos (n=9) com 100% de sensibilidade e 89% de especificidade.

Oliveira et al. (2004) estudaram fragmentos de carcinomas espinocelulares quimicamente induzidas por carcinógeno 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno (DMBA) em mucosa oral de ratos. Os espectros Raman foram obtidos e submetidos à Análise dos Principais Componentes (PCA) observando que a técnica pode ser muito útil na detecção de lesões orais malignas.

Pereira et al. (2004) fizeram estudo espectral comparativo entre carcinoma espinocelular e pele normal e encontraram significativas diferenças espectrais entre estes tipos de tecidos.

Nogueira et al. (2004) empregaram a espectroscopia Raman em fragmentos de artérias carótidas humanas com objetivo de obter informações químicas para o diagnóstico de placas ateroscleróticas com sensibilidade e especificidade de 89% e 100% respectivamente e para placas calcificadas com 100% de sensibilidade e 98% de especificidade.

Bitar et al (2004) estudaram amostras de fibroadenoma, carcinoma intraductal e tecidos mamários normais e demonstraram que a espectroscopia Raman é uma técnica que possibilita o diagnóstico diferencial entre essas patologias.

Chen et al. (2006) avaliaram culturas de células de adenocarcinoma de cólon e constataram que células cancerosas apresentam concentração mais alta de proteínas e ácidos nucléicos que as demais células normais e concluíram que a técnica pode ser útil na detecção de câncer através de células esfoliadas do aparelho digestivo.

Podemos ainda citar outros estudos que tiveram como objetivo a aplicabilidade da espectroscopia Raman na biologia e medicina, como o estudo espectral de colágeno, gelatina e elastina por (FRUSHOUR ;KONIG, 1975), para desenvolvimento de fibra óptica para o diagnóstico clínico de lesões pré-cancerosas cervicais por (MAHADEVAN-JANSEN et al, 1998), para identificação de cálculos renais de ácido úrico por (KODATI et al., 1990), em estudo de displasia induzida em palato de ratos com 1-óxido 4- nitroquinolona por (SCHUT et al., 2000), com a finalidade de identificar lesões pré-cancerosas em colo uterino por (UTZINGER et al; 2001), demarcação de bordas de lesão carcinomatosa de pele por (NIJSSENet al., 2002), em glioblastoma cerebral visando diferenciar tecido necrótico permitindo o desenvolvimento da biópsia em tempo-real e guiando o procedimento de ressecção do tumor por (KOLJENOVIC et al, 2002), em soro sanguíneo de gatos para detecção de anticorpos IgG e IgM de toxoplasmose por (DUARTE et al, 2002), para o diagnóstico de câncer de pulmão por (HUANG et al., 2003); (KAMINAKA; ITO, 2002) e (YAMASKI et al, 2003), para valiação dos efeitos da fixação por formalina em amostras de tecido neoplásico de brônquio humano por (HUANG et al., 2003), para identificação de cânceres epiteliais do esôfago, cólon próstata e pulmão por (STONE et al, 2004) e em bexiga para o estudo de cistites, carcinoma *in situ* e adenocarcinoma por (CROW et al., 2004).

5.5 Espectros Raman das principais moléculas

5.5.1 Proteínas

Constituem o componente celular mais abundante, e são as moléculas mais diversificadas quanto à sua função e forma, desempenhando funções estruturais e dinâmicas. Participam na composição do esqueleto celular e das estruturas de sustentação como, por exemplo, o colágeno e a elastina. Participam dos processos biológicos, como enzimas, catalizando as milhares de reações químicas no organismo (MARZZOCO;TORRES, 1999). Assim como as demais macromoléculas biológicas, são constituídas por unidades menores que polimerizam para formarem as estruturas mais complexas que existem nas células. No caso das proteínas, a unidade mais simples é o aminoácido e existem 20 tipos diferentes na natureza (VIEIRA et al, 1999). Os aminoácidos são compostos que contém na sua molécula um grupo amino (H_3N^+) e um grupo carboxila (COO^-), com exceção da prolina que contém um grupo imino (NH) no lugar do grupo amino. A fórmula básica comum consiste de grupos amino e carboxila ligados ao carbono α , ao qual também se liga um átomo de hidrogênio e um grupo variável chamado cadeia lateral ou grupo R e pode ser observado na figura 21 (MARZZOCO; TORRES, 1999).

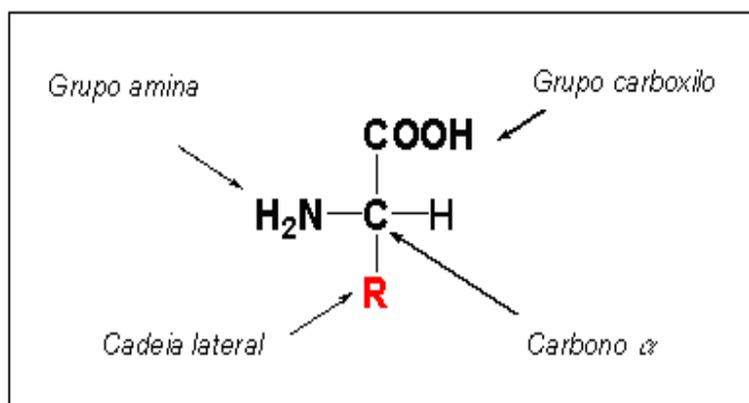


Figura 21 - Esquema representativo da fórmula básica do aminoácido. (UFSC-2).

Podemos descrever a estrutura das proteínas em quatro níveis a saber:

-**Estrutura Primária:** A qual é determinada pela seqüência de aminoácidos, que é específica para cada proteína.

-**Estrutura Secundária:** descreve as estruturas regulares bidimensionais por segmentos da cadeia polipeptídica. São conhecidas duas conformações, a α -hélice e folha β pregueada. Na conformação α -hélice ocorre um enrolamento da cadeia ao redor de um eixo. A α -hélice (Figura 22) e folha β pregueada (Figura 23) estabilizam-se por pontes de hidrogênio entre os nitrogênio e o oxigênio dos grupos NH e $-C=O$, constituintes das unidades peptídicas (MARZZOCO;TORRES, 1999).

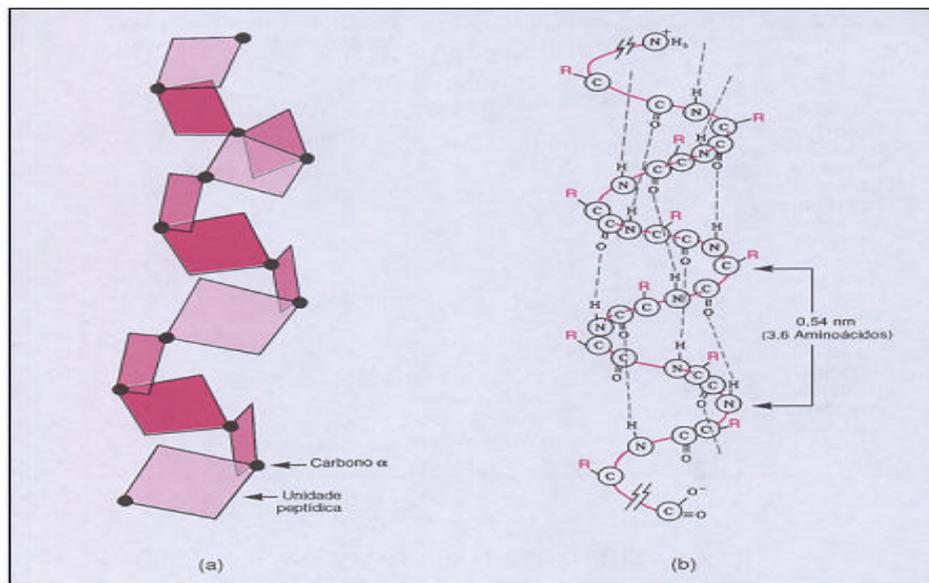


Figura 22 - Desenho esquemático do arranjo espacial das unidades peptídicas em conformação α -hélice. (MARZZOCO;TORRES, 1999).

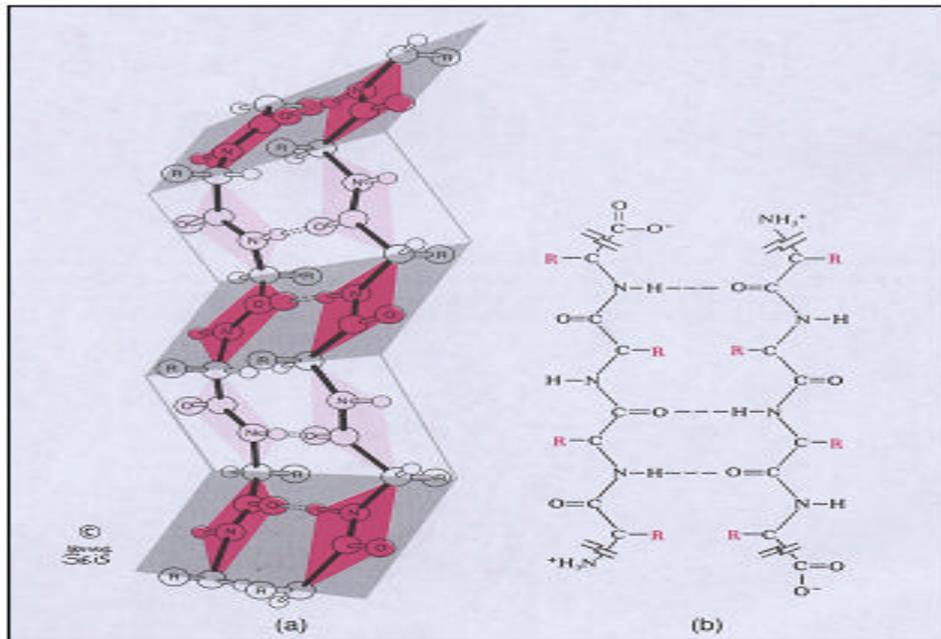


Figura 23 - Desenho representativo de duas cadeias peptídicas em conformação folha β pregueada (MARZZOCO;TORRES, 1999).

-**Estrutura Terciária:** A qual descreve o dobramento final da cadeia polipeptídica por interação de regiões com estrutura regular de α -hélice e folha β pregueada ou de regiões sem estrutura definida (Figura 24).

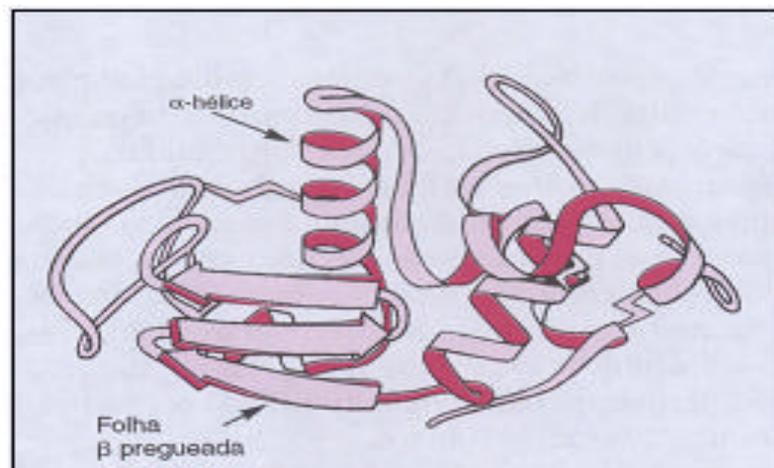


Figura 24 - Estrutura da lisozima do ovo, com segmentos em α -hélice e em Folha β pregueada (MARZZOCO TORRES, 1999).

-Estrutura Quaternária: descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas para compor uma proteína funcional, mantidas por ligações não-covalentes entre as subunidades observadas na figura 25 (MARZZOCO;TORRES, 1999).

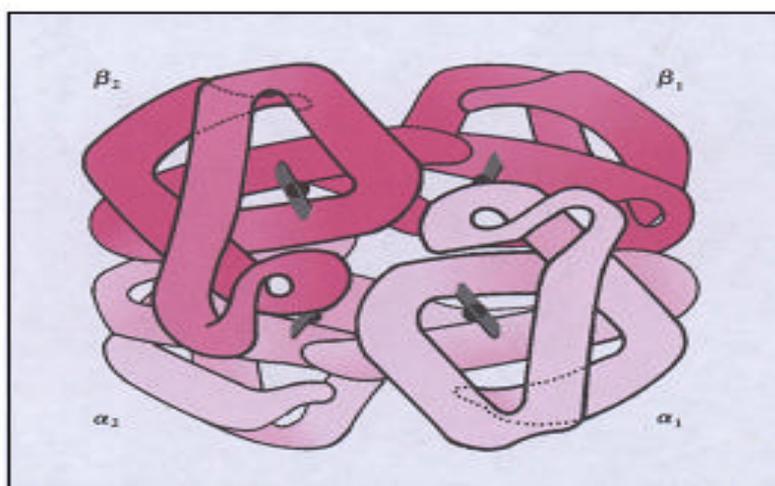


Figura 25 - Desenho esquemático da estrutura quaternária da hemoglobina. (MARZZOCO;TORRES,1999).

O espectro Raman contém informações sobre as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas. Vários aminoácidos, importantes na estrutura primária, podem ser caracterizados pelos seus espectros vibracionais, incluindo a tirosina com picos em 643, 645, 830, 850, 859, 1183, 1206, 1210, 1603, 1616, 1620 cm^{-1} , o triptofano com picos em 570, 757, 881, 1014, 1338, 1361, 1414, 1553 e 1582 cm^{-1} , a fenilalanina com picos em 622, 1006, 1035, 1183, 1207, 1585, 1605 cm^{-1} e a histidina com picos em 623, 985, 1204, 1265 e 1282 cm^{-1} (MAHADEVAN-JANSEN;RICHARDS-KORTUM, 1996; TWARDOWSKI;ANZENBACHER,1994; STONE et al., 2004).

As ligações peptídicas dos aminoácidos de ligação do grupo carboxila (-COOH-) com um grupo amino (NH₂) apresentam 7 tipos de vibrações, denominadas de amida I, II, III, IV, V, VI e VII e são utilizados na espectroscopia para identificação das estruturas secundárias das proteínas (Figura 26). As bandas amida I e III são estudadas pela

espectroscopia Raman as demais vibrações não são detectadas porque não apresentam atividade Raman (TWARDOWSK;ANZENBACHER, 1994).

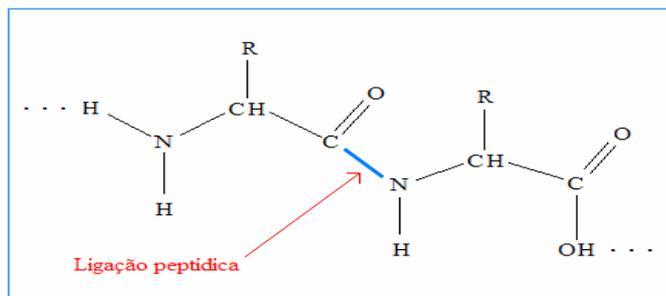


Figura 26 - Esquema demonstrando a ligação de um grupo carboxila com um grupo Amino.

O modo vibracional amida I corresponde ao estiramento da ligação C=O (Figura 27a) e adquirem posições de picos no deslocamento Raman de acordo com as estruturas secundárias envolvidas. Na conformação α -hélice a posição de vibração encontra-se em $1654\text{-}1662\text{ cm}^{-1}$ e na conformação folha β pregueada encontra-se em $1665\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994). O modo de vibração da amida III corresponde ao estiramento da ligação (C=N) e o dobramento no plano da ligação (N-H) observados na Figura 27 b. Na conformação de α -hélice ocupam posições no deslocamento Raman em $1258\text{-}1304\text{ cm}^{-1}$ e na conformação folha β pregueada correspondem a $1227\text{-}1247\text{ cm}^{-1}$ (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1994).

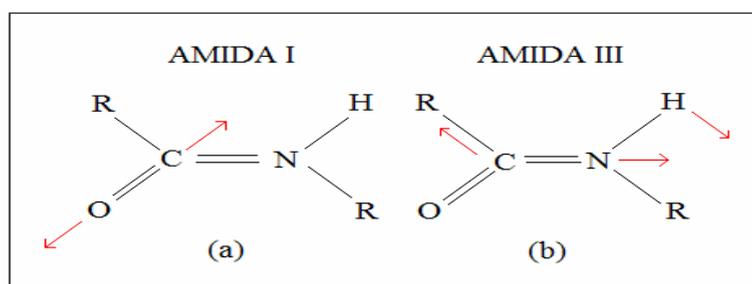


Figura 27 - Desenho esquemático representando os modos vibracionais: (a) Amida I e (b) Amida III (TWARDOWSKI;ANZENBACHER, 1994).

5.5.2 Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos pertencem a classe das macromoléculas e, da mesma forma que os polissacarídeos e as proteínas, são formados por unidades mais simples que se unem para formar molécula mais complexa. A figura 28 apresenta uma unidade básica que é o nucleotídeo, que, por sua vez, é composto de três moléculas ainda mais simples: uma base nitrogenada, uma pentose e ácido fosfórico VIEIRA, 1999).

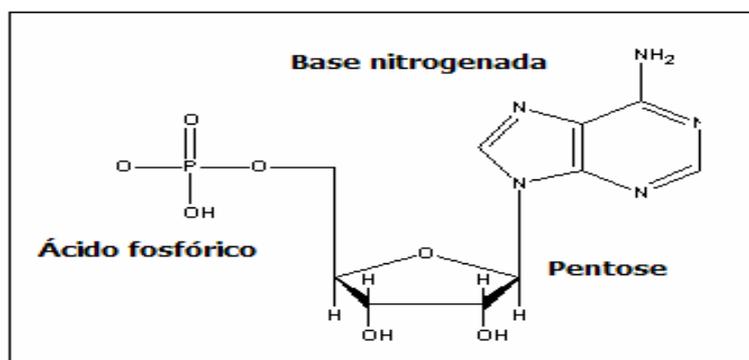


Figura 28 - Representação da composição de um nucleotídeo. (UFSC-1)

Os três componentes dos nucleotídeos são Raman ativos. Na região entre $500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ aparecem vibrações dos anéis heterocíclicos das bases nitrogenadas com forte pico em 770 cm^{-1} devido à vibração do anel aromático das bases pirimídicas citosina e timina e também uma linha de moderada intensidade em 670 cm^{-1} devido às bases purínicas adenina e guanina. A região entre $1100\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ é também rica em bandas devidas às vibrações das bases nitrogenadas. As bases pirimídicas apresentam vibrações características em 1240 cm^{-1} , enquanto que as purinas têm vibrações em 1480 e 1580 cm^{-1} . A vibração de estiramento da ligação (O-P-O) está localizada próximo a 800 cm^{-1} . As pentoses contribuem com bandas fracas entre $800\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ assim como a vibração da pentose que ocorre em 1460 pela deformação da ligação CH_2 (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS KORTUM, 1996).

5.5.3 Lipídeos

Os lipídeos constituem uma classe de compostos com estrutura bastante variada, caracterizados por sua baixa solubilidade em água. São representados pelos ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, os esteróides e os esfingolipídeos. Exercem diversas funções biológicas como, componentes de membranas, isolantes térmicos e reserva de energia, exercendo também a função de hormônios e vitaminas (MARZZOCO;TORRES, 1999). Os fosfolipídeos ou esfingolipídeos são os principais componentes das membranas celulares. Contendo cada molécula desta de fosfolipídeo contém uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica (MAHADEVAN-JANSEN;RICHARDS-KORTUM, 1996).

Os espectros Raman dos fosfolipídeos contém vibrações de ambas as partes, embora a maioria dos picos seja relativa à parte hidrofóbica. A cabeça hidrofílica apresenta pico em 720 cm^{-1} decorrente da vibração da ligação (C-N), enquanto a parte hidrofóbica apresenta vibrações das ligações (C-C) entre 1000 e 1150 cm^{-1} . O estiramento assimétrico (C-H) ocorre em 2880 cm^{-1} , enquanto o estiramento simétrico ocorre em 2850 cm^{-1} . A intensidade desses dois picos é sensível à densidade do agrupamento lateral das cadeias hidrofóbicas e também são afetadas pela mobilidade da cadeia. A deformação da ligação (CH₂) possui pico Raman em 1303 cm^{-1} , enquanto a deformação (=C-H) contribui com pico em 1267 cm^{-1} . Os modos vibracionais dos isômeros *cis* e *trans* da ligação (C=C) da cadeia dos ácidos graxos ocorrem em 1650 - 1666 cm^{-1} , respectivamente (MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM, 1996).

5.5.4 Carboidratos

Os carboidratos são compostos que, em geral, apresentam a fórmula empírica (CH₂O)_n como pode ser observado na figura 29. São poliidroxiáldeídos, ou

poliidroxicetonas. O tipo mais simples é constituído pelos monossacarídeos, chamados de aldoses ou cetoses, segundo o grupo funcional que apresentam, aldeído ou cetona. Os oligossacarídeos são carboidratos formados por pequeno número de monossacarídeos. Entre os oligossacarídeos os mais comuns são os dissacarídeos, que incluem a sacarose e a lactose. Os polissacarídeos são polímeros de centenas ou milhares de monossacarídeos, como exemplo citaremos a celulose, o glicogênio e o amido (MARZZOCO;TORRES, 1999). Os carboidratos são componentes importante na matéria viva, por estarem envolvidos na utilização da energia solar através da fotossíntese, participar da formação dos ácidos nucléicos, compor a parede celular e constituírem reserva energética (TWARDOWSKI;ANZENBACHER, 1994).

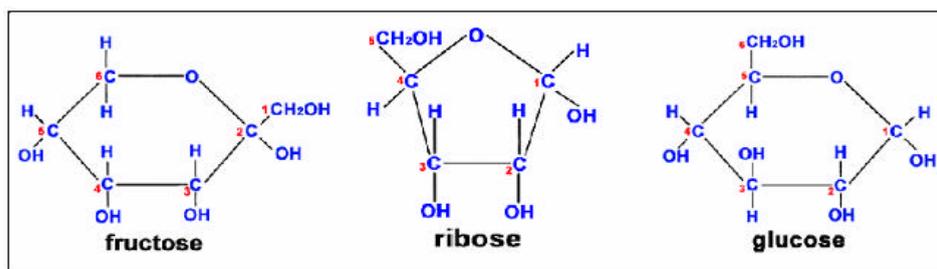


Figura 29 - Estruturas de alguns monossacarídeos (UFSC-3).

A interpretação dos espectros vibracionais dos carboidratos é difícil porque os mesmos possuem estruturas similares do ponto de vista químico, além disso os modos vibracionais frequentemente estão acoplados. O maior problema do estudo estrutural dos carboidratos é a determinação da configuração do primeiro átomo de carbono nas formas cíclicas. O grupo OH deste átomo pode orientar-se para cima ou para baixo em relação ao anel carbônico, gerando bandas espectrais em pontos diferentes do deslocamento Raman. São conhecidas três bandas Raman ativas entre 600 e 1800 cm^{-1} . A primeira é observada em torno de 770 cm^{-1} devido ao dobramento simétrico do anel de carbono, a segunda em torno de 840-890 cm^{-1} devido ao tipo de deformação de $\text{C}_{(1)}\text{-H}$ e a terceira em 915 cm^{-1} atribuída à vibração antissimétrica do anel de carbono (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

5.6 Modos vibracionais Raman de moléculas teciduais

A tabela 3 apresenta as posições de pico (em cm^{-1}) dos espectros Raman das estruturas que promovem a vibração e as respectivas moléculas. Onde d = modo dobramento e ? = estiramento.

Tabela-3 Modos vibracionais das moléculas teciduais

Posição do pico (cm^{-1})	Tipo de estrutura	Compostos Moleculares	Referências
853	?(C-C) d anel	Anel prolina Tirosina	a,b,c a,b,c
859	-	Tirosina /colágeno	a
877	?(C-C)	Hidroxiprolina	a
879 - 881	-	Tryptofano	e
920	?(C-C)	Prolina,glicose ,ácido láctico	a,c
932	(C-C)	a-hélice proteínas	a,b
935	?(C-C)	prolina , valina,a-hélice Glicogênio	a,d a,d
1001	d ? anel	Fenilalanina	a,b,c,d
1083	? (C-N)	Proteínas	a
1087-1090	? (C-C), ?(O-P-O)	-	a,d
1091-1095-1099	?(O-P-O)	Ácidos nucleicos	e
1155	? (C-C) e(C-N)	Proteínas	a,b
1243	Amida III	-	a,b,c,d
1258	Amida III	-	a,d
1260	Amida III	-	a,d
1264	d (=C-H) ?(C-N)	Lipídeos Proteínas(conformação a)	a a
1279	Amida III: a-helix	-	a,b
1299-1300	d (CH ₂)	Lipídeos	a,b
1304	d (CH ₂)	Lipídeos/adenina/guanina	a
1335-1345	d (CH ₃ CH ₂)	Colágeno	a
1336	-	DNA- Bases purinas	a
1446	d (CH ₂)	Proteínas	a
1654-1655	Amida I ? (C=O)	- Proteínas(a- helice)	a,c,d a,c,d

(a) Stone et al. (2004) (b) Barry et al. (1992) (c) Frushour et al. (1975)

(d)Mahadevan-Jansen;Richards- Kortum. (1996) (e) Twardowski; Anzenbacher. (1994)

OBJETIVOS

6. Objetivos

Tendo em vista as vantagens da espectroscopia Raman e a importância que esta técnica trará futuramente para a clínica médica, este trabalho tem como objetivos:

- Obter os espectros Raman da mucosa normal de cólon e das lesões neoplásicas visando avaliar as características espectrais destes dois tipos de tecidos.
- Associar os modos vibracionais aos compostos moleculares e estruturas bioquímicas responsáveis pela vibração.
- Analisar estatisticamente as alterações encontradas nos modos vibracionais
- Diferenciar estatisticamente tecidos normais de tecidos de adenocarcinoma

MATERIAL E MÉTODOS

7. Material e métodos

7.1 Ética Médica

Este estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVAP, sob protocolo nºL166/2004/CEP, conforme Resolução nº196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) FAMERP, protocolo nº0855/2005 (ANEXO B).

Os pacientes que cederam o material biológico para realização deste estudo foram previamente informados da finalidade desta pesquisa através de um formulário de consentimento contendo informações básicas sobre a técnica de Espectroscopia FT-Raman. Neste formulário são descritas a importância desta nova técnica de estudo diagnóstico que poderá ser utilizada nos consultórios clínicos, relatando a ausência de riscos adicionais no tratamento ou no procedimento cirúrgico. Foi exposto ao paciente, ainda, que não haveria interferência no aumento de tempo do procedimento da colonoscopia e da cirurgia, alertando-se sobre a ausência de quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Esclareceu-se que se não concordarem com a pesquisa, sua decisão não influenciaria no seu tratamento.

Os pacientes que concordaram em doar o material para este estudo científico, assinaram uma declaração autorizando a retirada do tecido, informando a sua aceitação em participar do mesmo. O documento original foi arquivado no prontuário do paciente e este recebeu uma cópia (ANEXO C).

7.2 Obtenção das amostras

As amostras de tecidos para realização da parte experimental eram lesões poliposas com suspeita de adenocarcinoma, obtidas de pacientes submetidos à colonoscopia, com a

colaboração dos Doutores Roberto Luiz Kaiser e Roberto Luiz Kaiser Jr. do Serviço de Colonoscopia do Hospital da Beneficência Portuguesa de São José do Rio Preto-SP. Foram também coletadas amostras de cólon de pacientes submetidos à cirurgia com diagnóstico já confirmado de adenocarcinoma, obtidas com a colaboração do Departamento de Coloproctologia da Fundação Faculdade Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME) sendo as cirurgias realizadas no Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP. Estas amostras eram constituídas de fragmentos da lesão neoplásica e fragmentos de tecido normal de cólon, coletados a uma distância não inferior à 10 cm das margens livres da região do tumor. Foram coletadas amostras e 39 pacientes, de ambos sexos, de diversas etnias e faixas etárias (41 a 77 anos – masculino) e (55 a 81 anos – feminino). As peças de biópsia de colonoscopia foram hemiseccionadas, sendo uma delas encaminhadas para estudo histopatológico para a confirmação diagnóstica das lesões e a outra imediatamente armazenada em tubos criogênicos de 1,2 ml de nalgene®. Estes foram devidamente identificados e numerados, mantendo a identidade do paciente em sigilo. As amostras foram imediatamente congeladas em galão de nitrogênio líquido numa temperatura de -196°C (Figura 30), visando a preservação e manutenção de todas as estruturas teciduais do fragmento até a realização da leitura experimental. As amostras foram transportadas até ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVb), no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UniVap - São José dos Campos-SP, onde foi realizada a espectroscopia Raman.



Figura 30 - Galões de nitrogênio.

7.3 Parâmetros do Equipamento

A partir do software instalado no Espectrômetro FT-Raman RFS 100, OPUS versão 4.2 Copyright® Bruker Optik GmHb 1997-2002, foram ajustados todos os parâmetros do equipamento, como potência do laser, diâmetro do feixe, ajuste na transformada de Fourier, auxílio durante a aquisição dos espectros, armazenamento e manipulação dos dados espectrais, gráficos em três dimensões (3D), análises quantitativas e armazenamento dos dados em forma de bibliotecas.

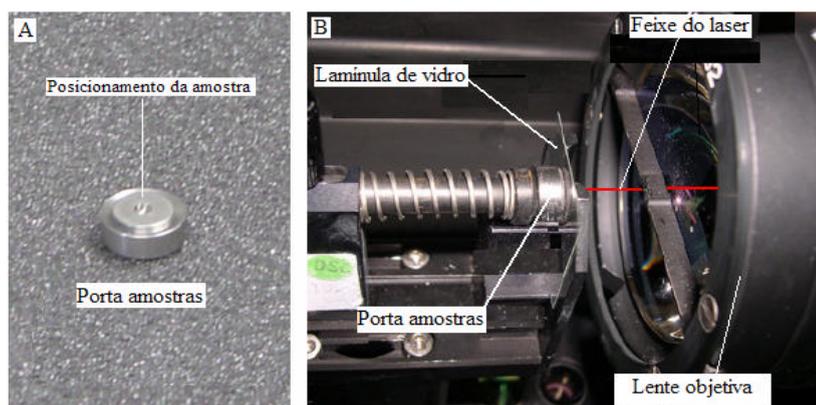
7.4 Espectroscopia FT- Raman

O aparelho de Espectroscopia Raman utilizado foi do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB) do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (IP&D-UniVap). O equipamento utilizado para aquisição dos espectros das amostras de cólon foi o Espectrômetro RFS 100 (Figura 31). O laser utilizado foi o Nd:YAG (Neodímio: Ítrio Alumínio Granada) e emite alta intensidade de radiação em 1064 nm. A potência máxima do laser é de 300mW. Foram realizadas 300 “scans” ou varreduras em cada ponto amostra, com resolução espectral de 4 cm^{-1} e o diâmetro do feixe do laser na amostra foi de 100μ . A potência ajustada para o laser foi de 132mW, potência máxima ajustada para a coleta dos sinais com melhor razão sinal/ruído, sem que houvesse aquecimento ou degradação das mesmas.



Figura31 - Espectrômetro FT-Raman RFS 100, Bruker.

Antes da análise espectroscópica as amostras foram descongeladas individualmente. Empregamos solução de soro fisiológico 0,9% para que a amostra atingisse a temperatura ambiente e se mantivesse úmido durante a realização da leitura espectroscópica, evitando assim a desidratação ou degradação das mesmas. As amostras foram fixadas em portas amostras de aço de 1cm de diâmetro com porção central escavada de 1,5mm, receptora das amostras (Figura 32-A), pressionadas com lamínulas de vidro e posicionadas frontalmente à saída do feixe de laser (Figura 32-B) coletando-se os espectros FT-Raman pela lente objetiva. Os espectros foram colhidos em três a cinco pontos diferentes de acordo com o tamanho das amostras. O tempo médio de aquisição dos espectros foi de 600s por amostra, obtendo-se um total de 214 espectros, sendo 144 espectros de cólon normal e 70 espectros de adenocarcinomas.



**Figura 32- A: Porta amostras com escavação central para recepção das amostras
B: Demonstração do posicionamento das amostras defronte à Lente objetiva para a irradiação e leitura dos espectros FT- Raman.**

7.5 Análise dos dados espectrais

A avaliação dos resultados espectrais pode ser realizada de duas formas: com um dendrograma (análise de *clustering*) ou com um teste de identidade. Optou-se pela primeira forma de análise por ser um método de simples compreensão. A análise de *clustering* é realizada quando se possui n itens (objetos/variáveis), estruturando uma matriz de distâncias

entre os elementos e é usada para estabelecer similaridades. Os dois elementos mais próximos, de menor distância, são unificados formando uma nova matriz [dimensões $(n-1) \times (n-1)$] e com isso gera um novo objeto ou grupo. Isso se repete até formar um diagrama em forma de um grupo somente e todas as etapas são registradas pela construção de um dendograma, que é árvore, bastante usada pelos taxonomistas (MILLIGAN; COOPER, 1988)

O dendograma é apresentado graficamente com uma raiz principal formada pela união de dois grupos principais que por sua vez foram formados por outros dois e assim por diante. Apresenta uma escala de distâncias que indica o nível em que dois grupos tornam-se um (Figura33)

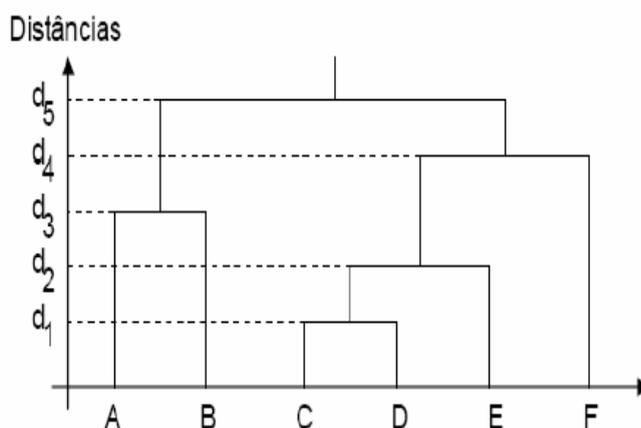


Figura 33 - Dendograma representando o agrupamento sucessivo dos objetos A,B,C,D,E e F. Notar que as distâncias d_1, d_2, d_3, d_4 e d_5 representam os pontos em que os agrupamentos foram formados.

Dependendo do nível de agrupamento e quantidade de *clusters* desejada, pode-se tornar um determinado valor para se estabelecer a resposta de quais objetos estão contidos em quais *clusters*. Por exemplo, um valor entre d_1 e d_2 na figura 32, apresentará dois *clusters* (C, D) e (E). Com isso, devem ser medidas a distância entre dois objetos individuais e a distância entre dois grupos de objetos. O grau de diferença entre dois grupos, medido através de sua distância, sugere algum tipo de média das distâncias individuais ou soma das distâncias entre os centros dos conglomerados.

Os espectros FT-Raman de tecidos normais e neoplásicos de cólon foram tratados utilizando-se o software OPUS[®] versão 4.2. A clusterização foi realizada utilizando-se as ferramentas estatísticas deste software. As análises foram baseadas nas variações de intensidade, deslocamento dos picos e surgimento de novas bandas entre os espectros de tecidos normais através da associação dos espectros e os dados da análise histopatológica.

7.6 Análise dos Componentes Principais

A Análise dos Componentes Principais (ACP) é utilizada para reduzir dimensionalmente uma quantia de dados através da análise de covariância. A covariância é sempre medida entre dois fatores. Quando mais de dois fatores são envolvidos, os valores de covariância podem ser colocados em uma matriz. É quando a ACP torna-se útil. Assim grande quantidade de dados como resultante de um estudo de expressão gênica, por exemplo, pode ser organizada em pequenos grupos de componentes semelhantes dentro da amostra (SMITH, 2002)

A classificação dos espectros Raman de tecidos neoplásicos e normais é o ponto importante porque evidencia o potencial discriminativo e a especificidade dos espectros Raman coletados. Desta maneira os espectros a serem classificados foram submetidos à ACP através do Software MINITAB[®] Release 12.20. Foram relacionados os Componentes Principais PC3 *versus* PC2 de cada agrupamento espectral através da construção de gráficos de Dispersão, onde foi obtida a classificação dos espectros, utilizando o software ORIGIN 7.0.

7.7 Estudo histopatológico

Após a coleta dos espectros Raman das amostras, os fragmentos dos tecidos analisados foram imersos em tubos plásticos contendo formol a 10%. Os frascos contendo as

amostras foram devidamente identificados e enviados para análise histopatológica de confirmação diagnóstica no Laboratório Pathus de São Paulo.

RESULTADOS



8. Resultados

8.1 Espectros de tecido normal

Os espectros de tecido de cólon normal foram analisados pela Análise dos Componentes Principais (ACP) e agrupados através do diagrama de clusters, com o objetivo e analisar a variação espectral entre esses dados. O dendograma mostrado na figura 34 separou os espectros FT-Raman de tecidos normais (144 espectros) em três subgrupos com distância espectral inferior a 0.2 correspondendo à similaridade espectral superior a 90% e denominados: Grupo Normal 1 (GN-1), Grupo Normal 2 (GN-2) e Grupo Normal 3 (GN-3).

As figuras 35, 36 e 37 mostram os espectros Raman de tecidos normais de cólon dos grupos: (GN-1) - com 37 espectros, (GN-2) - com 63 espectros e (GN-3) - com 44 espectros respectivamente, obtidos com energia de excitação de 1064 nm e potência de 132 mW. Todos os espectros foram normalizados vetorialmente no intervalo de frequência de 800 a 1800 cm^{-1} . Foi definida esta região porque bandas espectrais deste intervalo podem ser utilizadas para estudar os principais constituintes moleculares do tecido colônico. Nenhuma correção ou subtração do sinal de fluorescência foi necessário, mostrando assim, a eficiência da energia de excitação de 1064 nm em suprimir este tipo de excitação eletrônica.

Podemos observar visualmente na figura 35 que houve maior dispersão espectral do GN-1, apesar de que não muito intensa, seguida do GN-2 (Figura-36) e menor dispersão nos espectros do GN-3 (Figura 37), indicando que houve maior homogeneidade tecidual nas amostras deste grupo.

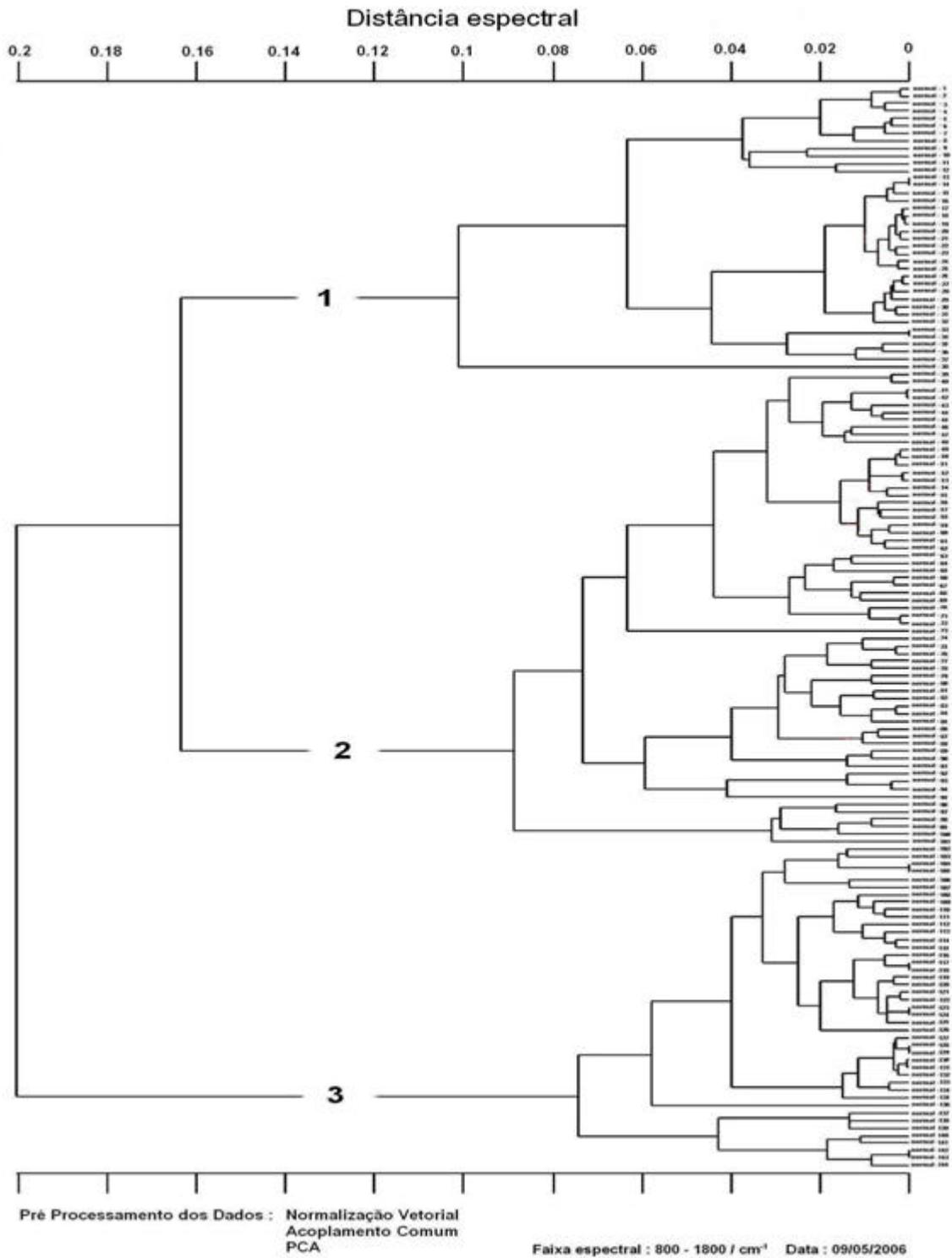


Figura 34 - Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros FT-Raman de amostras de tecidos normais de intestino grosso (144 espectros)

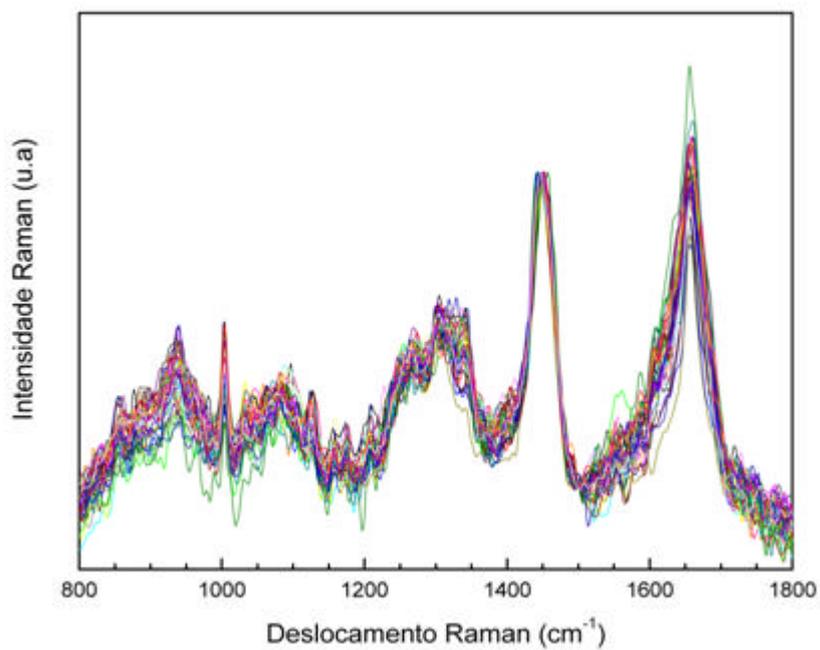


Figura 35 - Espectros FT- Raman das amostras que compõe o Grupo Normal -1 (GN-1)

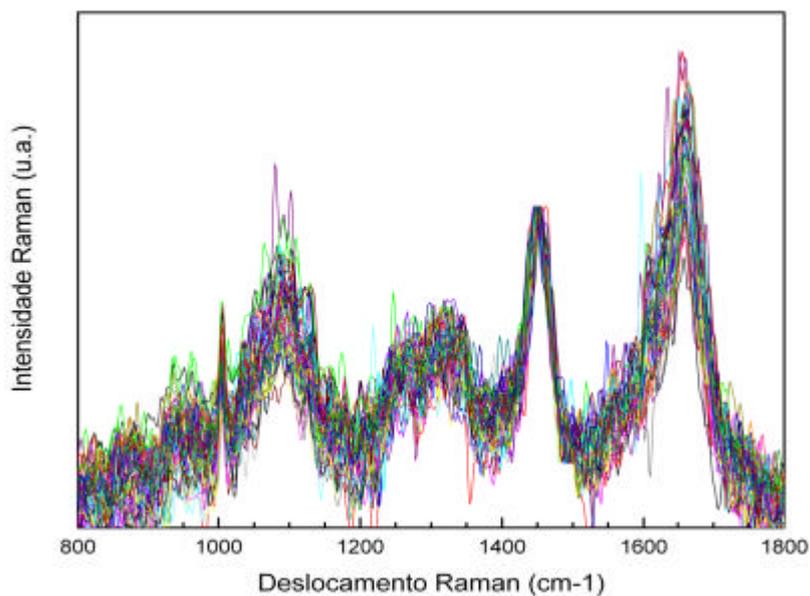


Figura 36 - Espectros FT- Raman das amostras que compõe o Grupo Normal -2 (GN-2)

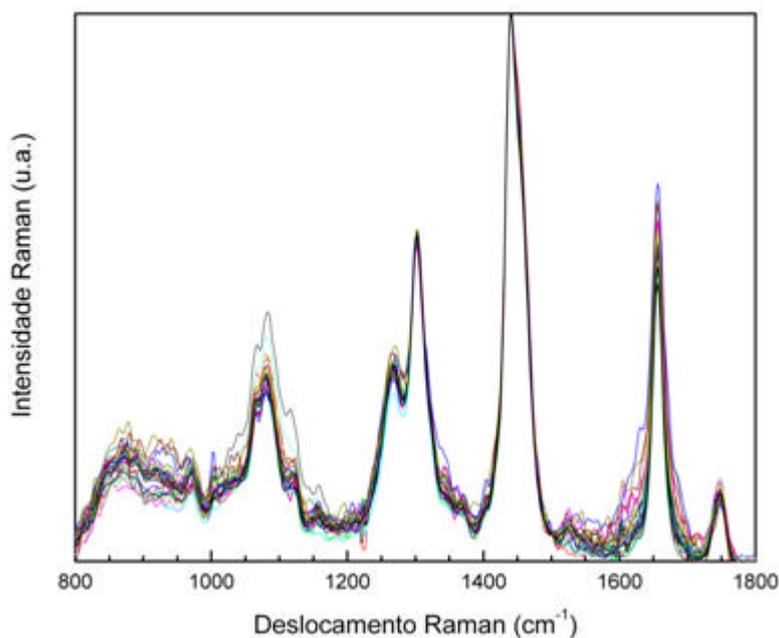


Figura 37 - Espectros FT- Raman das amostras que compõe o Grupo Normal -3 (GN-3)

Objetivando estabelecer as características espectrais Raman de cada grupo calculamos a média espectral e o desvio padrão que apresentaram níveis de similaridade de 95% em cada grupo. Os resultados são apresentados na figura 38. As linhas escuras representam as médias espectrais enquanto que as linhas em cinza representam o desvio padrão.

Cada amostra analisada pela Espectroscopia FT-Raman foi enviada para análise histológica a fim de se obter uma descrição das estruturas teciduais predominantes. Para cada subgrupo encontrado (GN-1, GN-2 e GN-3), foram constatados diferentes tipos de tecidos.

As amostras que compõe o GN-1 apresentaram o tecido muscular liso e pouco tecido epitelial (Figura 39-A). As amostras que compõe o GN-2 apresentam histologicamente tecido

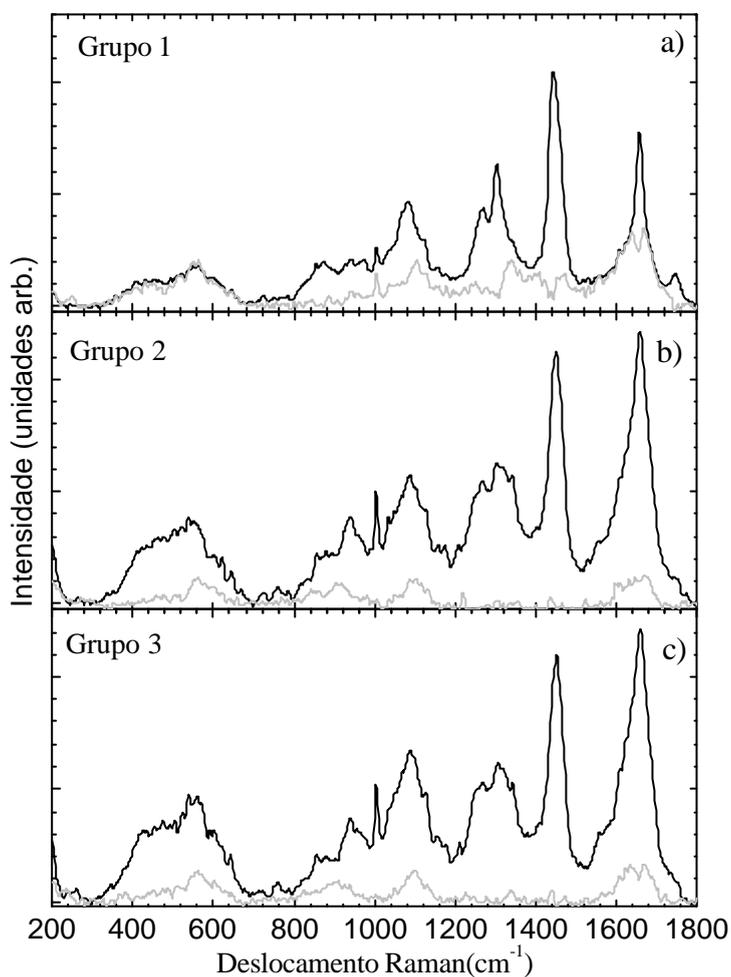


Figura 38 - Média dos espectros Raman: a - Grupo normal 1 , b- Grupo normal 2 e c - Grupo Normal 3. Em cinza: Desvio Padrão

epitelial normal do cólon e tecido conjuntivo (Figura39-B). As amostras de tecidos que compõe o GN-3 apresentaram um predomínio de tecido conjuntivo e tecido adiposo, como podemos constatar na Figura 39-C, devido a aquisição destes espécimes ter ocorrido em uma parte mais externa da peça.

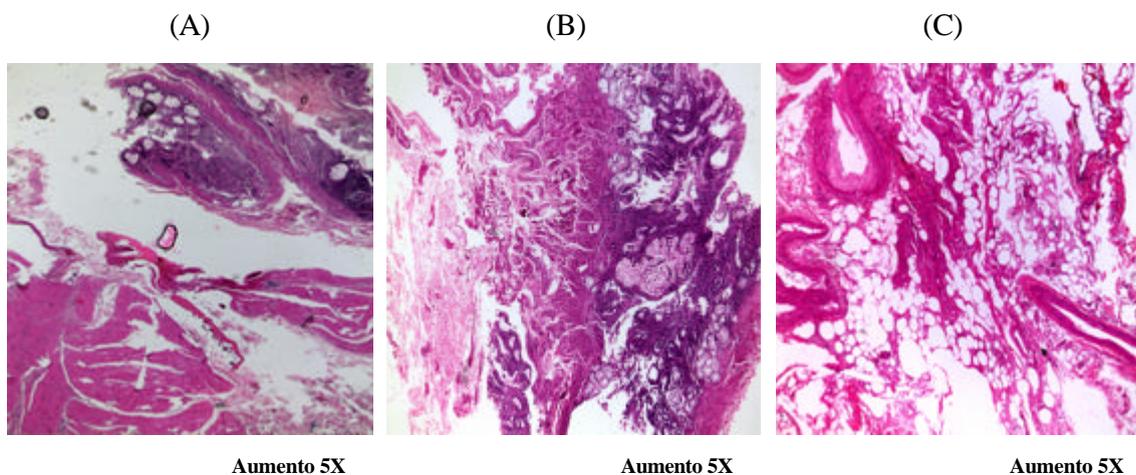


Figura 39 - Lâminas histológicas de tecido normal de cólon. A: GN-1, tecido epitelial escasso, tecido conjuntivo e tecido muscular liso. : GN- 2, tecido conjuntivo frouxo e tecido epitelial glandular predominante. C: GN- 3, tecido conjuntivo e adiposo

8.2 Espectros de adenocarcinoma

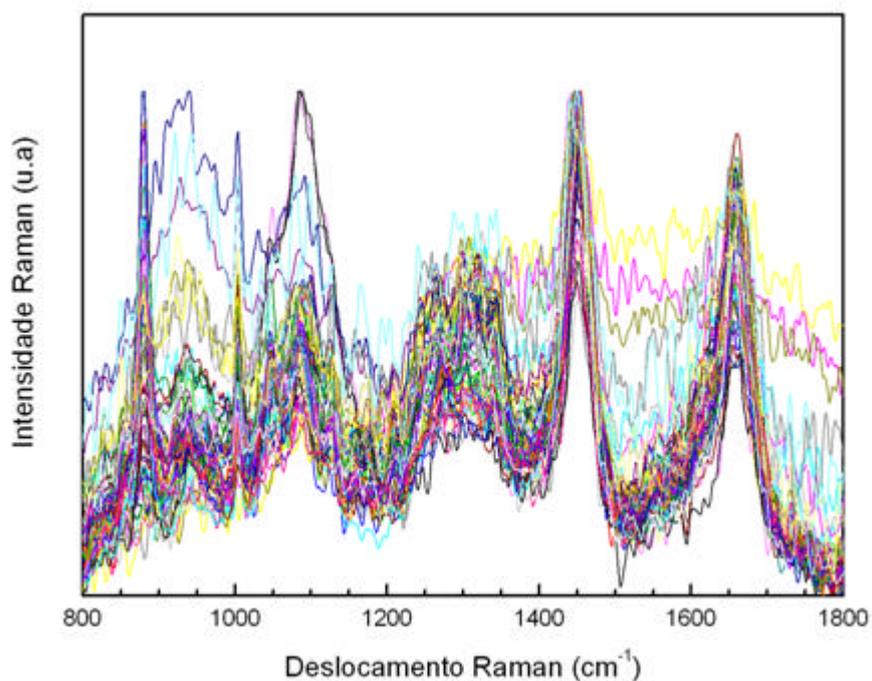


Figura40 - Espectros FT- Raman de todas as amostras de adenocarcinomas

A figura 40 mostra os 70 espectros de todas as amostras de adenocarcinoma, obtidas no intervalo de 800 a 1800 cm^{-1} com energia de excitação de 1064 nm e potência de 132 mW. Observamos dispersão espectral no conjunto das amostras indicando que podemos encontrar variâncias significativas no tecido neoplásico.

Os espectros de adenocarcinoma foram estudados pela Análise dos Componentes Principais (ACP) e agrupados através do diagrama de clusters, objetivando a análise da variação espectral encontrada entre esses espectros.

Os espectros agruparam-se em três subgrupos denominados de: Grupo adenocarcinoma 1 (ADC-1), Grupo adenocarcinoma 2 (ADC-2) e Grupo adenocarcinoma 3 (ADC-3). O Dendograma de separação em clusters dos espectros FT-Raman é mostrado na figura 41.

Verificou-se após a Clusterização, que espectros de três amostras de adenocarcinomas (68, 69 e 70) se agruparam formando um pequeno conjunto espectral com distância espectral maior que 0.35 ou similaridade espectral abaixo de 82.5% (em vermelho na figura 41) e portanto foram excluídas do grupo para a elaboração da média dos grupos para efeito de estudo entre estas três variâncias espectrais observadas no tecidos neoplásico. Na figura 42 podemos observar os espectros das amostras excluídas (em azul) comparado com as médias espectrais dos grupo adenocarcinoma 1, 2 e 3. Observa-se neste grupo houve maior intensidade espectral no intervalo que vai de 1015 a 1175 cm^{-1} .

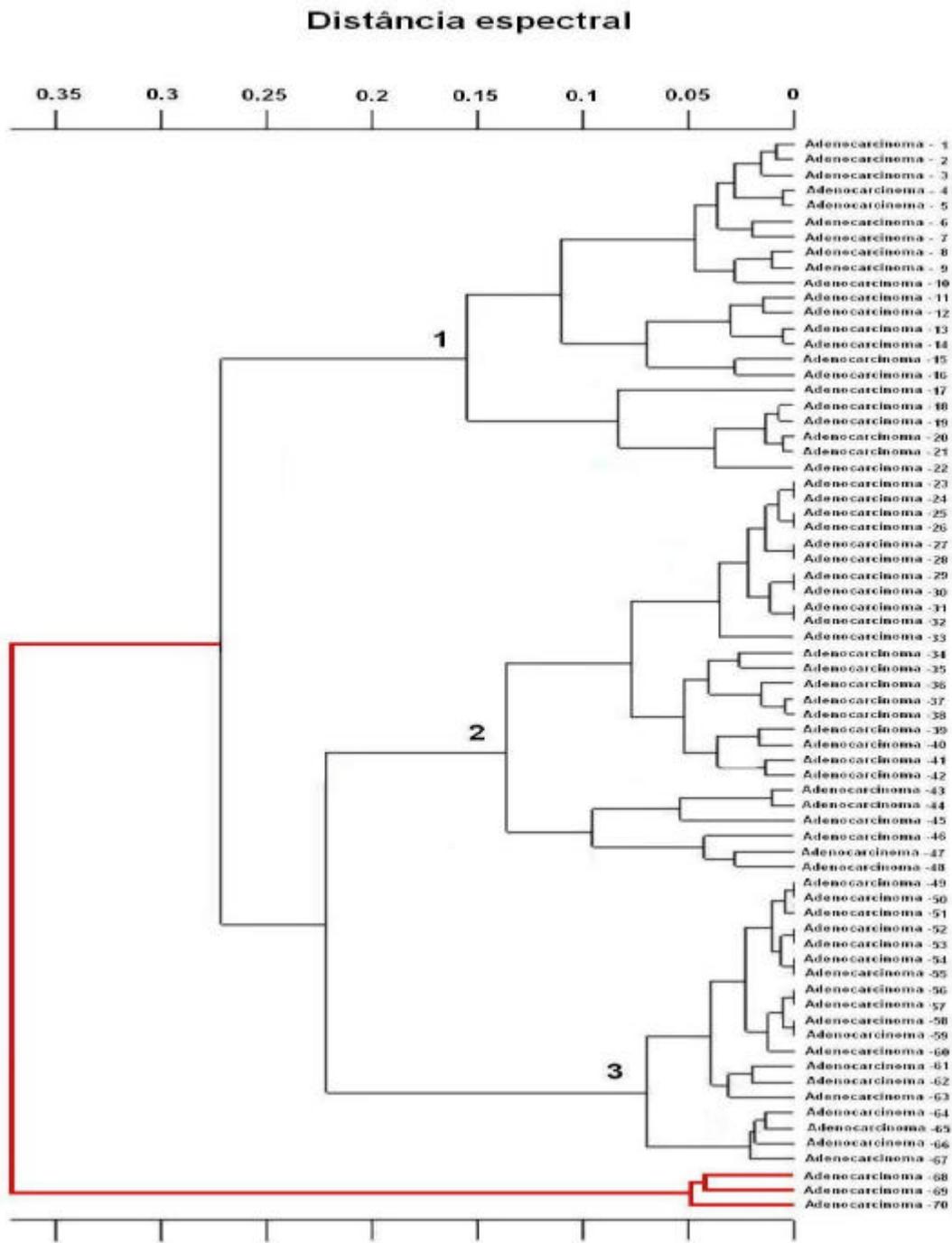


Figura 41 - Dendrograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de adenocarcinomas (70 espectros).

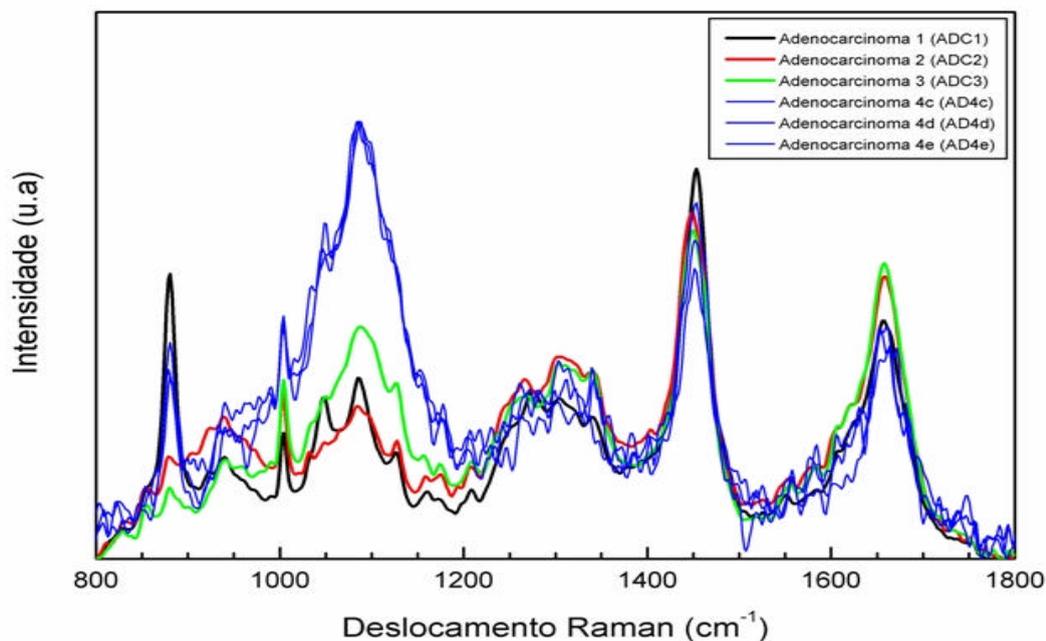


Figura 42 - Média dos espectros de adenocarcinoma. ADC- 1(em preto), ADC- 2 (em vermelho), ADC-3 (em verde). Espectro das três amostras adenocarcinomas excluídas (em azul)

A seguir, para fins de comparação entre os grupos de espectros de adenocarcinoma foram obtidas as médias dos espectros FT-Raman dos 3 grupos. Estes espectros foram normalizados vetorialmente no intervalo de 800 a 1800 cm^{-1} , e a identificação de cada modo vibracional está apresentada na Tabela 3 da seção 5.6. Nota-se que nítidas diferenças espectrais entre estes grupos podem ser observados na figura 43.

Nesta figura, observa-se que em algumas regiões há grandes diferenças entre os três grupos espectrais. Estas diferenças são bem evidentes nos intervalos de 845 a 920 cm^{-1} (Figura 43) com intenso pico do ADC-1 que corresponde aos aminoácidos prolina, valina, ácido láctico, α -hélice proteínas e glicogênio cujas estruturas responsáveis pela vibração são os estiramentos ν (C-C) e (C-C) (STONE et al., 2004; BARRY et al., 1992; MAHADEVAN-JANSEN; RICHARDS-KORTUM., 1996). Outras regiões em que observamos pico com maior intensidade espectral do ADC-1 são 1047 cm^{-1} e 1273 cm^{-1} .

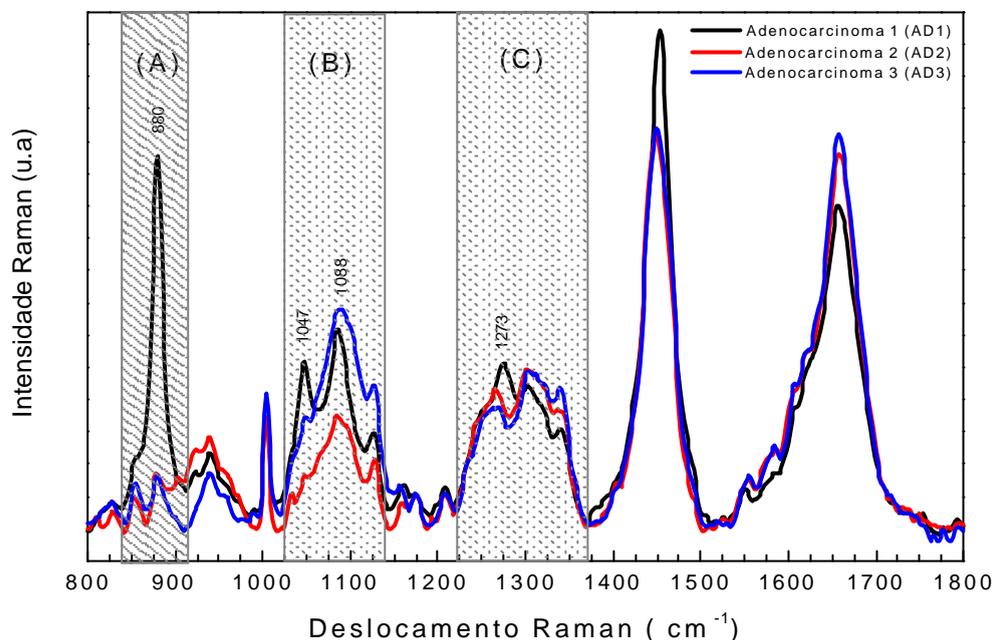
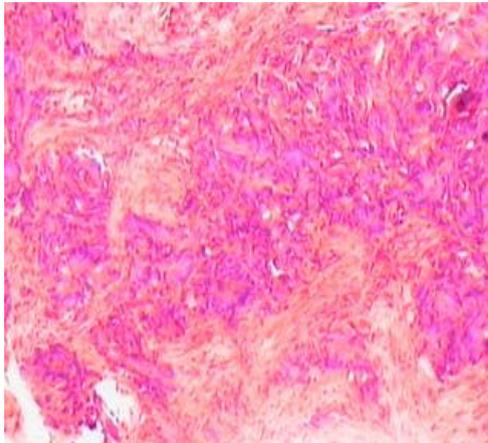


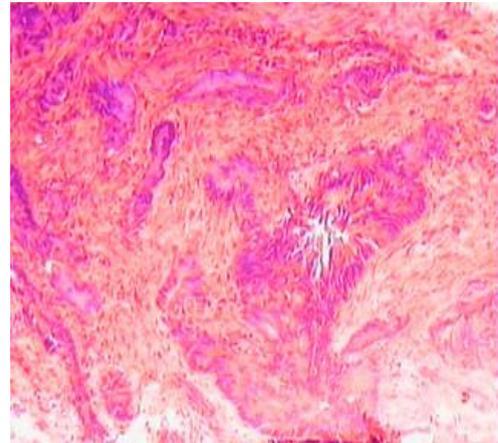
Figura 43 - Média de todos os espectros de adenocarcinoma (ADC-1) : em preto ; (ADC-2):em vermelho; (ADC-3): em azul. As regiões demarcadas apresentam diferenças espectrais evidentes entre estes três tipos de tecidos.

Nas regiões espectrais da Amida III, entre 1250 a 1300 cm^{-1} , há decréscimo de intensidade espectral dos grupos ADC- 2 e ADC-3. No intervalo de 1310 a 1360 cm^{-1} correspondentes aos modos vibracionais $d(\text{CH}_2)$ e $d(\text{CH}_3 \text{ CH}_2)$ dos lipídeos, do colágeno, e das bases purínicas do DNA (STONE et al.,2004; FRUSHOUR et al.,1975) as diferenças espectrais se caracterizam pela intensidade maior do espectro do ADC-3.

Os espectros que compõe o Grupo I Adenocarcinoma são de amostras de tecido neoplásico moderadamente diferenciado, com desaparecimento do padrão tubular e com tecido fibroconjuntivo caracterizado por desmoplasia, como podem observados na figura 44. Os espectros que compões o ADC-2 são de amostras de tecidos neoplásicos, de padrão tubuliforme, com menor concentração de tecido epitelial neoplásico quando comparados com o ADC-3 como podemos constatar na figura 45.

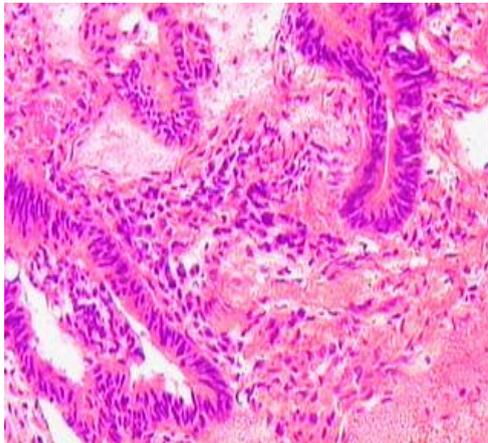


Aumento: 100x

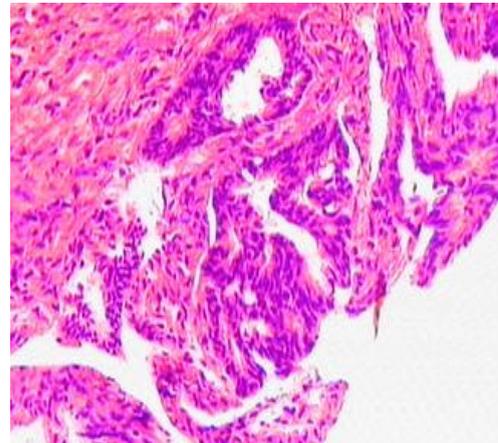


Aumento: 100x

Figura 44 - Lâminas histológicas de adenocarcinoma (ADC-1)

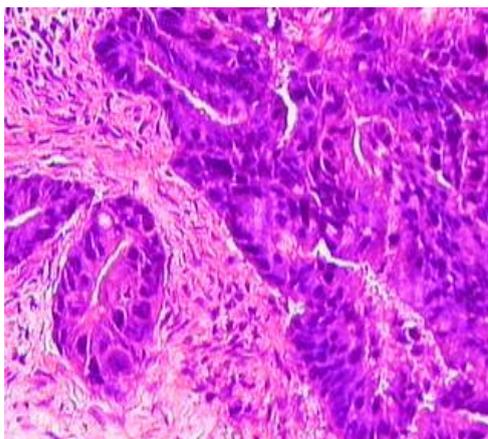


Aumento: 100x

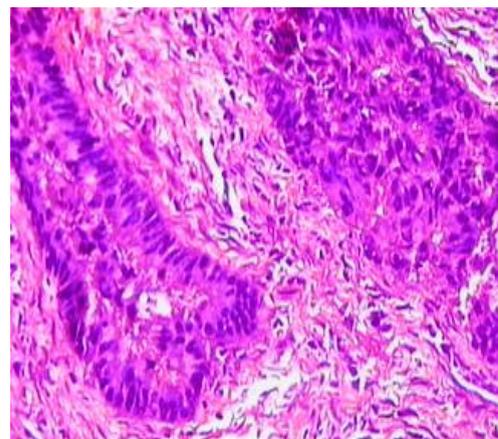


Aumento: 100x

Figura 45 - Lâminas histológicas de adenocarcinoma (ADC-2)



Aumento: 400x

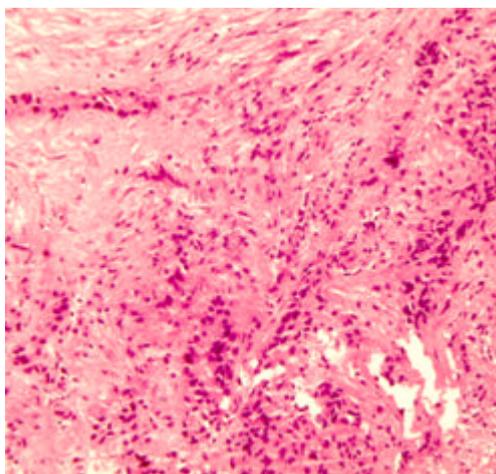


Aumento: 400x

Figura 46 - Lâminas histológicas de adenocarcinoma (ADC-3)

Os espectros do ADC-3 são de amostras de lesões neoplásicas, de padrão tubular com menor concentração de tecido fibroconjuntivo e predomínio de tecido glandular neoplásico que pode ser observado na figura 46. Estes espectros representam melhor o câncer do cólon, e podemos denominá-los de espectros “padrão ouro” por se tratar de amostra com abundante tecido epitelial neoplásico, uma vez que os adenocarcinomas tem sua origem no epitélio glandular.

A lâmina histológica da amostra que foi excluída do grupo de estudo se caracteriza por apresentar maior grau de indiferenciação como observamos na figura 47.



Aumento: 20X

Figura 47 - Lâmina histológica de adenocarcinoma (AD-4)

8.3 Cluster dos espectros de adenocarcinoma x do tecido normal

Os espectros de adenocarcinoma ADC-3 considerados como melhor grupo para o estudo comparativo pelo conteúdo maior de tecido glandular neoplásico e os espectros de tecidos normais GN-2 “padrão ouro espectral” pela presença abundante de tecido epitelial glandular foram submetidos à Clusterização. Podemos observar na figura 48 a separação destes dois grupos de espectros.

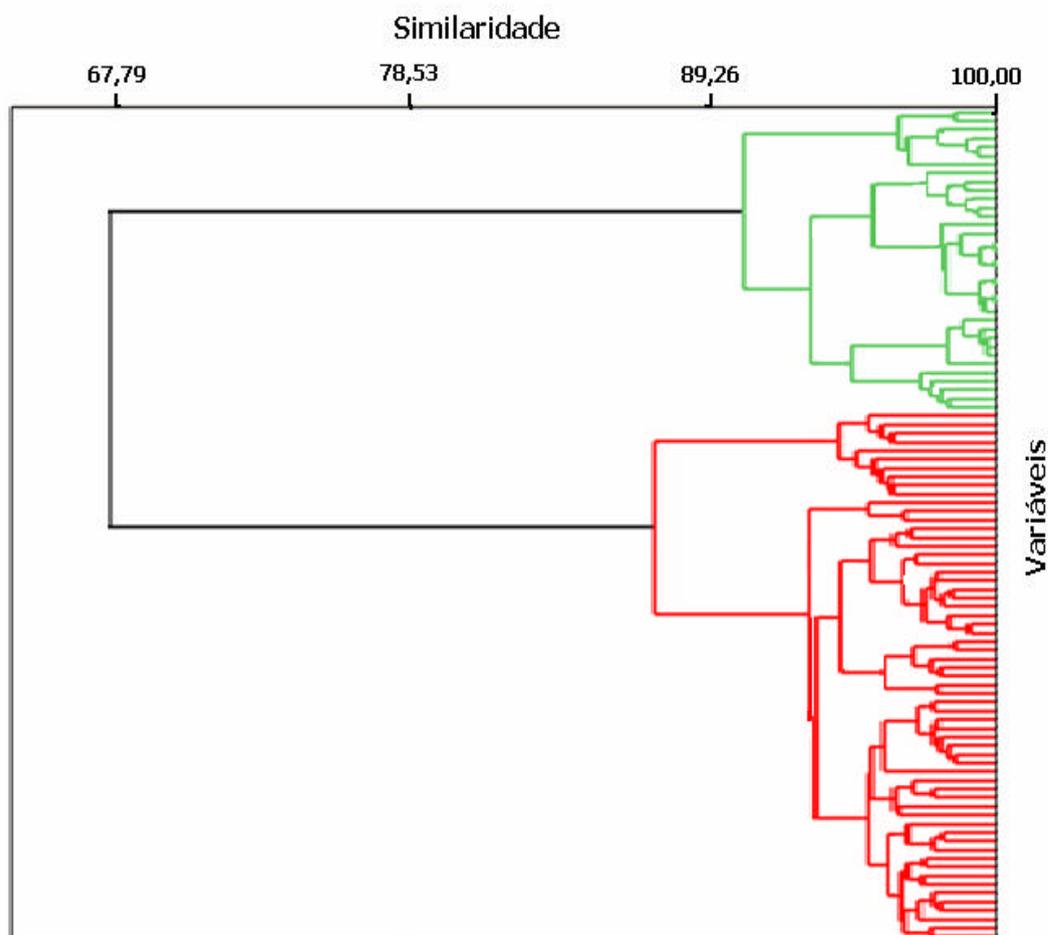


Figura 48 - Dendograma representativo do cálculo do coeficiente de correlação entre os espectros de adenocarcinoma ADC-3 (em verde) e espectros de tecido normal - GN2 (em vermelho)

8.4 Dispersão entre espectros

Com a finalidade de automatizar o processo de avaliação dos espectros, e seguindo um protocolo sistemático de coleta, foram obtidos resultados da ACP e dispersão entre PC3 *versus* PC2, para evidenciar o potencial discriminativo. Os grupos escolhidos para realização da análise foram propositalmente selecionados devido à importância da diferenciação clínica

entre os mesmos e agrupados em diagramas de dispersão, conforme especificado no item 7.6 desta dissertação.

Na figura 49 observamos que houve dispersão nos dois grupos com separação visual dos espectros de adenocarcinoma e de tecidos normais. A sensibilidade e especificidade da Espectroscopia FT-Raman para diferenciar estes dois tecidos foi de 100%. Este dado era esperado porque os aspectos histopatológicos destes dois tipos de tecidos possuem características específicas, que serão discutidos adiante.

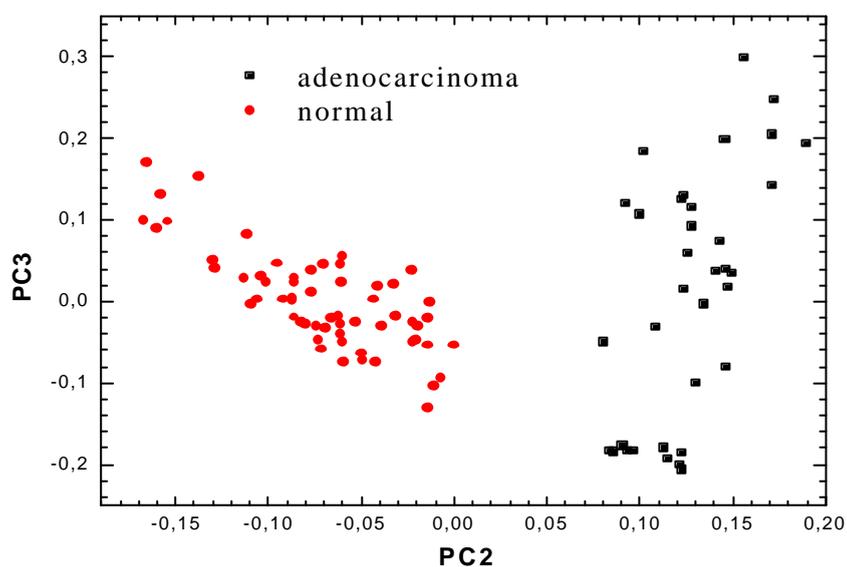


Figura 49 - Dispersão PC3 *versus* PC2 dos espectros de adenocarcinoma e tecido normal do cólon.

DISCUSSÃO

9. Discussão

Este estudo demonstrou que é possível a obtenção de espectros FT-Raman de ótima qualidade de mucosa normal e de adenocarcinoma de cólon humano utilizando energia de excitação de 1064 nm. As bandas que dominam o espectro Raman basicamente correspondem às vibrações dos aminoácidos, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas cujas bandas e suas identificações estão listadas na Tabela 3.

Os resultados mostraram que mesmo dentro de um padrão de tecido colônico normal ou patológico os espectros se agruparam em três conjuntos de semelhanças espectrais, com similaridade acima de 90 % para mucosa normal e acima de 82.5% para os tecidos neoplásicos. Neste estudo constatamos uma variância evidente quando se estuda estes tecidos por FT-Raman indicando que o conteúdo dos constituintes moleculares teciduais apresentam variações de indivíduo para indivíduo, indicando variações biológicas intrínsecas para um mesmo tipo de tecido. Estes dados diferem de outros trabalhos como o de Mahadevan-Jansen et al., em 1998 e Stone et al, em 2003, que estudaram cânceres e pré-cânceres do cérebro, pulmão, bexiga e cólon e relataram um padrão único de tecido tanto para amostras de tecido normal como nos neoplásicos.

As amostras de tecidos normais quando analisadas pelas lâminas histopatológicas e visualizadas nas Figuras 39 (A, B e C), observam-se nítidas diferenças estruturais dos tecidos, por serem retiradas de diferentes regiões da parede do órgão. Nas amostras de adenocarcinoma é possível observar, histologicamente, diferenças morfológicas entre os agrupamentos espectrais. O grupo ADC-1 são constituídos de tecido neoplásico moderadamente diferenciado, com desaparecimento do padrão tubular e com tecido fibroconjuntivo. O grupo ADC-2 são de amostras de tecidos neoplásicos, de padrão tubuliforme, com menor concentração de tecido epitelial neoplásico, e o ADC-3 é formado predominantemente por tecido epitelial glandular neoplásico. Estas diferenças estruturais são detectadas pelos com os agrupamentos espectrais observados pela Espectroscopia FT-Raman.

9.1 Espectros do tecido normal

A fim de verificar se estes grupos espectrais apresentavam algum significado biológico foram histologicamente comparadas. As lâminas histológicas de cada amostra foram analisadas em busca de características similares. Observamos que as amostras do GN-1 (Figura39–A) provêm das camadas intermediárias que constituem a camada muscular da parede do cólon, enquanto as amostras do GN-3 (Figura 39-C) são providas predominantemente da camada mais externa com conteúdo maior de tecido gorduroso e pouco tecido conjuntivo, e o GN-2 (Figura39-B) são oriundas predominantemente da parte mais interna (mucosa) do órgão e sob o aspecto histológico representa melhor o tecido colônico normal porque são amostras com tecido epitelial. Considerando que a biópsia óptica estuda o tecido a partir de sua superfície, somente o grupo de espectros do GN-2 podem ser considerados como “padrão espectral” para o tecido normal do cólon (Figura 4).

A partir destes resultados fica claro que a clusterização apresentado na figura 34 mostra que o processo de coleta das amostras de fragmentos de cólon variou com a profundidade da coleta. Considerando que a biópsia óptica estuda o tecido a partir da superfície epitelial, somente os espectros do grupo 2 são aceitáveis com o “grupo espectral padrão” de tecido normal do cólon.

A grande semelhança espectral entre os GN-1(Figura 38 a) e GN-2 (Figura38 b) mostrados também nas análises histopatológicas, é bem clara. No entanto o GN-1 apresenta grande variabilidade porque na região de 200 a 600 cm^{-1} e 1500 a 1800 cm^{-1} mostra desvio padrão maior que 50%. A primeira região corresponde às bandas das cisteínas, componentes do colágeno tipo III. Este tipo de colágeno ocorre no sistema cardiovascular e sua presença também é relatada em fragmentos profundos da parede do cólon. A última região espectral corresponde às vibrações das proteínas que fazem parte da composição dos tecidos musculares, conforme discutimos acima. As bandas dos aminoácidos, proteínas, colágenos e lipídeos apresentam similiaridades espectrais entre estes grupos. O GN-3 apresenta decréscimo espectral global (Figura 38c) indicando menor conteúdo de moléculas teciduais.

que compõem as camadas mais internas do órgão. A variação espectral dos GN-2 e GN-3 como visto pelo desvio padrão foram menores que 10% nos picos mais intensos.

Podemos observar na figura 37 que a dispersão espectral do GN-3 entre as diversas amostras estudadas foi pequena, ou praticamente inexistente, mostrando assim a possível homogeneidade das amostras deste grupo.

9.2 Espectros do adenocarcinoma

Os tumores malignos do cólon podem variar desde bem diferenciados até indiferenciados. A diferenciação se refere à extensão com que células neoplásicas lembram células normais comparadas tanto morfológica com funcionalmente, à falta de diferenciação denominamos de anaplasia. As amostras de adenocarcinoma deste estudo são de tumores moderadamente diferenciados com formações glanduliformes que lembram o tecido normal o que explica a alta similaridade espectral entre estes três tipos de tecidos. As diferenças espectrais observadas demonstram variâncias espectrais dentro de um mesmo tipo de tecido, variâncias estas, evidentes através da análise histopatológica das amostras. O ADC-3 é o que representa melhor a neoplasia maligna do colo por caracterizar-se pela presença abundante de tecido glandular neoplásico

As médias dos três grupos espectrais de adenocarcinoma revelaram que há uma região com grande diferença e observada no intervalo 850 a 930 cm^{-1} e mais precisamente em 880 m^{-1} com intenso pico do ADC-1. Este pico corresponde ao modo vibracional do tryptofano¹. Na literatura pesquisada não relaciona composto molecular com o tecido colônico e tampouco com o crescimento neoplásico. A atividade peristáltica do cólon, responsável pela condução do conteúdo intestinal no sentido aboral está intimamente relacionada com um neurotransmissor, a serotonina. Portanto, um aumento do teor deste composto molecular poderia justificar a ocorrência deste intenso pico no ADC-1.

O aumento dos modos vibracionais no intervalo 850 a 930 cm^{-1} correspondem aos modos vibracionais $\nu(\text{C-C})$ do anel prolina e δ do anel tirosina e ao estiramento (C-C) em 874 cm^{-1} . Estes dados são concordantes com os obtidos por Stone et al., 2004, que constatou espectros com intensidade maior no tecido neoplásico na região de 935 cm^{-1} correspondente à $\nu(\text{C-C})$ da prolina e valina. O colágeno tipo I não-fibrilar é o principal componente da membrana basal das mucosas, ricas em prolina, hidroxiprolina e lisina. Outros tipos de colágeno também podem formar redes e atuar como âncoras na junção epiderme-derme e parede dos vasos sanguíneos. Ohtani et al., 1983, demonstraram, através de estudo morfométrico por microscopia eletrônica, que no estroma do adenocarcinoma de cólon ocorre também a ativação de fibroblastos em repouso sugerindo que estes fibroblastos ativados aumentem a produção de colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo. Visser et al., 1993, estudando padrão e composição de membrana basal de mucosas normais e de adenocarcinomas de cólon por imunohistoquímica constataram a presença de colágenos tipo VI e VII e em mucosas normais apenas o colágeno do tipo VI, sugerindo incremento na produção de colágeno em tecidos neoplásicos. O ADC-3 apresentou menor sinal Raman neste intervalo indicando que a proliferação predominante de tecido neoplásico glandular não é acompanhada do aumento destas proteínas, uma vez que neste tipo de diferenciação tumoral há invasão do tecido conjuntivo adjacente pelo tecido glandular e conseqüentemente menor conteúdo de colágeno. (BARRY et al., 1992; FRUSHOUR et al., 1975; MAHADEVAN-JANSEN; RICHARD-KORTUM, 1996)

¹O triptofano é um aminoácido aromático, essencial, que precisa ser obtido através da alimentação. Possui um anel indólico ligado a um grupamento metileno. A cadeia lateral indol incomum do triptofano é também o núcleo do importante neurotransmissor serotonina, que é biossintetizado a partir do triptofano. A porção aromática do triptofano serve como um marcador ultravioleta para a detecção deste aminoácido tanto de forma separada, ou incorporado em proteínas e enzimas, através de espectro-fotometria ultravioleta. O triptofano representa cerca de 1% dos aminoácidos das proteínas de nosso organismo: é o mais raro dos aminoácidos na seqüência primária de nossas proteínas. (GERBRAS - Química Farmacêutica).

No intervalo de 1025 a 1135 cm^{-1} há diferenças de intensidade nos três grupos, sendo maior no ADC-3 seguida pelo ADC-1 e, com menor intensidade, o ADC-2. Neste intervalo ocorrem as vibrações de ácidos nucleicos $\nu(\text{PO}_2^-)$ em 1091, 1095 e 1098 cm^{-1} . Observa-se também intensidade espectral maior deste tecido em outra região do deslocamento mais precisamente em 1335 cm^{-1} onde ocorrem as vibrações das bases purínicas do DNA. Nas amostras de ADC-3 a concentração de núcleos é maior comparado aos outros grupos com diferentes graus de diferenciação. O aumento do número de núcleos decorrente da multiplicação das células neoplásicas e também células com mais de um núcleo, provocando aumento na relação núcleo-citoplasmática, como já reportados por Keller et al., 1994 e por Chen et al., 2006, indicando que o aumento do DNA em tecidos neoplásicos em consequente aumento de ácidos nucleicos, oferece uma das possibilidades de distinção entre tecido normal e neoplásico pela Espectroscopia Raman.

Aproximadamente 10% dos adenocarcinomas de cólon são secretores de mucina², denominados de adenocarcinomas mucinosos ou colóides e são de pior prognóstico. O ADC-1 apresenta pico de intensidade maior em 1047 cm^{-1} que pode estar relacionado com este composto molecular. Estudos com neoplasia de cólon com FT-IR como o de (LASCH et al., 2002) indicam bandas de absorção deste composto na região de 1035 e 1072 cm^{-1} .

O intervalo do deslocamento de 1250 a 1300 cm^{-1} , que corresponde à banda espectral Amida III, envolve dois tipos de vibração: (a) a vibração de dobramento da ligação dos átomos de nitrogênio com hidrogênio, $\delta(\text{N-H})$ e (b) vibração de estiramento correspondente à ligação dos átomos de carbono e nitrogênio, ou seja, $\nu(\text{C-N})$. O espectro do ADC-1 se manifesta com pico de intensidade maior em 1273 cm^{-1} indicando maior concentração de proteínas na conformação α -hélice. Mahadevan-Jansen; Richards-Kortum., 1996, estudaram

² A mucina é uma glicoproteína composta aproximadamente com 50% de carboidrato e ligado ao aminoácido serina e tironina. São normalmente secretadas pelas glândulas do cólon e cuja função é a de lubrificar a mucosa colônica e de promover a proteção contra substâncias químicas e patógenos. (Wanebo, 1993)

a participação das proteínas na biologia do câncer e detectaram em tecidos neoplásicos muitas oncoproteínas que mimetizam a função de proteínas normais. Relataram que tumores secretam enzimas proteolíticas como a serina, a cisteína e as metaloproteinases. Outras proteínas encontrados em tumores, em níveis elevados, incluem a fibronectina, lamininas, e as proteoglicanas. A alfafetoproteína é uma glicoproteína que pode também ser encontrado nos adenocarcinomas de cólon. O tecido neoplásico fibroconjuntivo está associado à proliferação desordenada do estroma do cólon e formado principalmente por fibroproteínas representadas pelo colágeno e fibronectinas. Por estas razões e, pela concentração maior de tecido desmoplásico nas amostras de ADC-1, justifica o comportamento espectral deste grupo em 1273cm^{-1} .

Os diferentes graus de diferenciação das amostras de adenocarcinoma observados pela histopatologia explicam as variâncias espectrais observadas entre os três agrupamentos espectrais e o quarto grupo de três espectros AD4. A avaliação das lâminas histológicas deste grupo revelaram tratar-se de amostras de adenocarcinoma com grau maior de indiferenciação, sem formação de glandular e com infiltração de células nas camadas do cólon com tendência à formação de tecido anaplásico (Figura 45).

9.3 Espectros do adenocarcinoma x espectros de tecidos normais

Atualmente são utilizados vários métodos diagnósticos para o rastreamento do adenocarcinoma de cólon. O exame mais empregado no momento é a pesquisa de sangue oculto nas fezes por ser de baixo custo e possibilita a implementação de triagens de grande número de pessoa até mesmo de populações inteiras com risco elevado no desenvolvimento desta patologia. Entretanto as altas taxas de falso negativo, tornam este, um método diagnóstico não seguro, porque nem todos os adenocarcinoma apresentam sangramento e, se sangram, é necessário que o sangramento seja superior a 20 ml/dia para a positividade do exame. As taxas falso positivo podem ocorrer quando ocorrem sangramentos digestivos por outras causas como gastrites, úlceras, por ingestão de carnes e até mesmo pelo uso oral de

ácido ascórbico (KEIGHLEY;WILLIANS, 1998). A técnica de enema baritado constitui o exame radiológico mais importante na detecção do câncer coloretal , porém apresenta desvantagens por não detectar a doença nos estágios iniciais, não diagnosticar a lesão neoplásica quando do mau preparo do intestino com lavagens, nos espasmos intestinais e por não fornecer o diagnóstico histológico da lesão (CASTRO;COELHO, 2004). A sigmoidoscopia apresenta a desvantagem de não poder avaliar o cólon na sua totalidade em busca de tumores sincrônicos. A colonoscopia virtual é uma técnica que apresenta a vantagem da não necessidade de “entubação” do cólon, mas necessita da disponibilização de tomografia helicoidal de alta resolução e a impossibilidade de biópsia, limitam ainda uso rotineiro da técnica. O exame colonoscópico é o exame “padrão ouro” porque permite o diagnóstico por visualização direta do tumor, permite a biópsia para estudo histológico, propicia ressecção de lesões, sendo nestes casos, terapêutico (CORDEIRO et al., 2000). A principal complicação consiste na perfuração da alça do intestino, ainda que infrequente, apresenta incidência de 1:400 em exames para fins diagnósticos (COELHO, 2005).

Com a possibilidade de utilização de métodos espectrais vibracionais moleculares para análise de componentes biológicos, a Espectroscopia FT-Raman vem sendo estudada como método diagnóstico em várias áreas da Medicina. A grande vantagem da técnica é a possibilidade de ser realizado *in vivo* e fornecer o diagnóstico em tempo real, evitando o procedimento de remoção da lesão suspeita, evitando o risco de perfuração do órgão e também evita demora na avaliação diagnóstica. A técnica apresenta ainda a vantagem adicional de facilitar o seguimento “*Follow up*” de pacientes submetido à cirurgia de ressecção de tumor no órgão e também de pacientes que tiveram lesões polipóides suspeitas e/ou confirmadas como adenocarcinomas ressecados por colonoscopia e, por fim, a técnica possibilita uma “varredura” na mucosa colônica em busca das lesões neoplásicas que tem origem pela via da **Instabilidade Microsatélite** conhecidos como “câncer de novo”, isto é, cânceres que se originam diretamente da mucosa colônica, sem lesão poliposa prévia. Este tipo de adenocarcinoma é de difícil avaliação diagnóstica nas fases precoces porque pode passar despercebido à avaliação visual do colonoscopista.

Na figura 46 pode ser observado o dendograma representando o cálculo do coeficiente de correlação dos espectros das amostras diagnosticadas como tecido normal (em vermelho) e amostras de adenocarcinoma (em verde). Os dois maiores *clusters* encontrados através do índice de correlação acabaram separando os dois grupos espectrais. O grupo de espectros utilizado neste cálculo foi o GN-2 porque foi o grupo de tecido colônico normal que apresentou maior porcentagem de tecido epitelial glandular. O grupo de espectros de adenocarcinoma que foram selecionados para serem os representantes o grupo para o diagnóstico diferencial foi o ADC-3 porque consideramos que era o grupo com “padrão espectral” para esta comparação em função da concentração maior de tecido neoplásico glanduliforme neste grupo.

Devido ao fato das amostras medidas, serem provenientes de diferentes pacientes, e com diferentes características biológicas como gênero, idade, etnia, peso, verificamos diversidade espectral tanto nos tecidos normais com nos tecidos neoplásicos. Histologicamente, essa variabilidade pode ser explicada em termos da porcentagem de tecido epitelial, muscular, adiposo e conjuntivo presentes nas amostras de tecido normal. As amostras de adenocarcinoma apresentavam variações nos conteúdos de tecidos epitelial glanduliforme bem diferenciados, nos níveis de diferenciação como a reação desmoplásica com proliferação de tecido fibroconjuntivo e até mesmo uma leve indiferenciação como pudemos observar no ADC-1.

Na dispersão entre os espectros do tecido de cólon normal e adenocarcinoma de cólon (Figura 47), foi possível observar uma sensibilidade e especificidade de 100% na diferenciação destes tecidos. Os agrupamentos espectrais observados à clusterização dos tecidos normais refletiram as diferenças na composição biológica das amostras que foram analisadas histopatologicamente, e observado que as amostras foram retiradas de profundidades diferentes. As amostras do GN-2 foram consideradas “padrão espectral” por apresentar maior conteúdo de tecido epitelial. Os espectros de adenocarcinoma também refletiram as alterações moleculares e histológicas que ocorrem no adenocarcinoma porém com uma similaridade espectral um pouco menor que os tecidos normais. Isto se deve ao

fato de que o tecido neoplásico se caracteriza pelo crescimento desordenado de células com atipias em vários níveis, com diferentes graus de diferenciação. Muitas oncoproteínas, que mimetizam atividades das proteínas citoplasmáticas normais, são encontradas em células cancerosas que não ocorrem tecidos normais como a fibronectina, proteoglicanas, lamininas, catepsinas, e outras proteinases.

A Espectroscopia FT-Raman detectou alterações em nível molecular entre os 6 tipos diferentes de tecidos. Apesar da alta similaridade observada com relação ao tecidos colônicos normais (acima de 90% de similaridade) e nos neoplásicos (acima de 82.5% de similaridade). Foi possível através do agrupamento dos espectros em diagramas de dispersão, que avalia o potencial discriminativo, separar o adenocarcinoma do tecido normal e possibilitou também uma correta correlação “anátomo-espectral” destes tecidos, ou seja, as diferenças sutis observadas à histotologia foram detectadas pela técnica que pode contribuir para diferenciar a gradação das alterações observados nestes tecidos

Os resultados deste estudo permitiram um melhor conhecimento da composição biomolecular da mucosa normal e do adenocarcinoma do cólon e reto, comparando as possíveis alterações nas composições e concentrações moleculares teciduais. Esperamos e acreditamos que num futuro bem próximo a Espectroscopia FT-Raman seja utilizado como importante instrumento de diagnóstico do câncer coloretal.

CONCLUSÃO

10. Conclusões

Ao finalizar este trabalho concluímos que:

- 1- A Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier mostrou ser uma técnica sensível e eficiente na reprodução de espectros de tecido colônico normal e de adenocarcinomas.
- 2 - Os resultados apresentados neste estudo indicam que podemos estabelecer três bem definidos grupos espectroscópicos de tecidos normal do cólon e três distintos grupos espectroscópicos de adenocarcinoma de cólon.
- 3 - A frequência das bandas espectrais de cada tipo e tecido foram correlacionadas com o composto molecular e estruturas bioquímicas responsáveis pela vibração.
- 4 –A Espectroscopia FT- Raman mostrou ser técnica capaz de fazer o diagnóstico diferencial entre o tecido normal e o adenocarcinoma de cólon.

ESTUDOS FUTUROS

11. Estudos Futuros

Ao concluirmos este trabalho com tecidos normais e neoplásicos, podemos sugerir para estudos futuros:

- 1- Realização de estudo com maior número de amostras de adenocarcinoma de cólon e tecido normal objetivando o diagnóstico diferencial entre o adenocarcinoma e tecido normal do cólon.
- 2- Realizar estudos comparativos com amostras de lesões benignas adenomatosas e adenocarcinomas, porque mais de 90% das lesões malignas do cólon se originam de lesões adenomatosas.
- 3- Realizar estudos comparativos entre adenomas tubulares, vilosos e túbulo-vilosos porque são considerados lesões colônicas benignas com potencial de transformação maligna ao longo do tempo.
- 4- Elaborar um sistema de Espectroscopia Raman acoplado à fibra ótica para o estudo diagnóstico das lesões da mucosa do cólon possa realizar-se *in vivo*, durante o exame colonoscópico.

REFERÊNCIAS

Referências

ALCÂNTARA, P. **Espectroscopia Molecular**. Belém, Pa.: Universidade Federal do Pará / Departamento de Física , Centro de Ciências Exatas e naturais, Curso Física Moderna II. p.1-5, 2002.

BAENA J,R.; LENDI,B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.8, p.534-539, 2004.

BARRY,B,M.; EDWARDS,H,G,M.;WILLIAMS,A,C. Fourier Transform Raman and Infrared Vibrational Study of Human Skin: Assignment of Spectral Bands. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 23, p. 641-645, 1992.

BARRYSHU. **Sigmoid colon cancer image**. Disponível em:<<http://barryhsu.com/images/Sigmoid%20colon%20cancer.jpg>> Acesso em: 21 Abr. 2006.

BITTAR,R,A.; MARTIN,A,A.; MOURÃO NETO,M.; SOARES,F,A. FT-Raman spectroscopy study of human breast tissue. **Biomedical Vibrational Spectroscopy**, v.5321, n.7, p.190-195, 2005.

BRUINING,H,A.; CHOO-SMITH,L,P.; EDWARDS,H,G,M.; ENDTZ,H,P.; HEULE,F. BARR,H.; KROS,J,M.; PUPPELS,G,J.; ROBINSON,RJ,S,JR. Medical Applications of Raman Spectroscopy: From Proof of Principle to Clinical Implementation. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, v. 67, p.1-9, 2002.

CASTRO,L,P.; COELHO,L,G. **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica , 2004. v 2, p.1339-1407.

CHEN,K.; QIN,Y.; ZHENG,F.Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells. **Optics Letters**,v.31,n.13,2006.

COELHO,J,C,U. **Aparelho Digestivo: Clínica e cirurgia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu., 2005.v.1, p. 837.

COLTHUP,N.B. **Introduction Infrared and Raman Spectroscopy**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1990. 547p.

CORDEIRO,F.T.M.et al. **Endoscopia Digestiva**, Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda., 2000. p,554-555.

CROW,P.; UFF,J,A.; WRIGHT,M,P.; STONE,N. The use of Raman Spectroscopy to identify and characterize transicional cell carcinoma in vitro. **BJU International**. v.93, p.1232-1236, 2004

DACOSTA,R,S.; WILSON,B,C.; MARCON,N,E. New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions. **Journal of gastroenterology and hepatology** . v.17, p.85, 2002.

DANGELO,J,G. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 2.ed. São Paulo: Ateneu. 2006.p. 583.

DI FIORE. **Histologia- Texto e Atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.,2003. p.24-59.

DOE REPORT.**Cancer Medical Illustration**. Disponível em: <http://lpig.doereport.com/categories.php?P=3&TL=4294967295&F=279&CatID=002&A=65077>> Acesso em: 21 abr. 2006.

DOUGLAS,C,R. **Patofisiologia Geral**. São Paulo: Robe, 2000.p.1110-1125.

DUARTE,J. et al. Use of Near-Infrared Raman spectroscopy to detect IgG and IgM antibodies against *Toxoplasma Gondii* in serium samples of domestic cats. **Cellular and Molecular Biology**,v.48, n.5, p.585-589, 2002.

FRANK,C,J; MCCREERY,R,L. Raman spectroscopy of Normal and Diseased Human Brest Tissue. **Analytical Chemistry**, v.67, n.5, p.777-783, 1995.

FEIG,B,W.; BERGER,D,H.; FUHRMAN,G,M. **M.D. Anderson Oncologia**. 2.ed. Madri,: Marban. 2000. p.179.

FENEIS, H.; DAUBER, W. **Atlas de Bolso de Anatomia Humana**. 4.ed. São Paulo: Manole, 2000. p.126.

FORONES, N.M.; FILHO, R.J.G.; TAKODOR, H.; FREIRE, C.A.R. **Oncologia**. São Paulo: Manole, 2005. 444p.

FRUSHOUR, B.G.; KOENIG, J.L. **Raman scattering of collagen, gelatin and Elastin. Biopolymers**, v.14, p.379-391, 1975.

GERBRAS – **Química Farmacêutica**. Disponível em:
http://www.gerbras.com.br/acervo/amino_pricipais.asp. Acesso em: 18 nov.2006.

GRAY, H. **Anatomy of the Human Body - The large Intestine**. Disponível em:
<http://www.bartleby.com/107/>. Acesso em: 13 mar. 2005.

GNIADKA, M.; GULF, H.C.; NIELSEN, O.F.; CHRISTENTENSEN, H.; HERCOGOVA, J. Distinctive Molecular Abnormalities in Benign and malignant skin lesions: Studies by Raman Spectroscopy. **Photochemistry and Photobiology**. v.66, n. 4, p. 418-423, 1997.

GNIADKA, M.; WULF, H.C.; MORTENSEN, N. Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman Spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, p.125-128, 1997.

HANLON, E.B.; MANOHARAN, R.; KOO, T.W.; SHAFERT, K.E.; MOTZ, J.T.; FRITZMAN, R.; KOO, T.W.; SHAFERT, K.E.; MOTZ, J.T.; FRITZMAURICE, M.; KRAMER, J.R.; ITZKAN, I.; DASSARI, R.R.; FELD, M.S. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. **Phys. Med. Biol.**, v.45, R1-R59, 2000.

HARMONY IMAGE CENTER. **Diagnostic and Therapeutic Radiology**. Disponível em: http://www.harmonyimaging.com/virtual_colonoscopy.html Acesso em: 5 Jul. 2005.

HUANG, Z.; McWILLIAMS, A.; LAM, S.; ENGLISH, J.; McLEAN, D. LUI, H.; ZENG, H. Effect of formalin fixation on the Near-Infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues. **International Journal of Oncology**, v.23, p.649-655, 2003.

HUANG ,Z.; McWILLIANS, A. Near-Infrared Raman Spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. **International Journal of Cancer**,v.107, p.1047-1052, 2003.

HUANG,Z.; MCWILLIANS,A.; LUI,H.; MC LEAN,D.; LAM,S.; ZENG,H. Near-Infrared Raman Spectroscopy For Optical Diagnosis of Lung Cancer. **International Journal of Cancer**, v.107, p.1047-1052, 2003.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. **Incidência de câncer no Brasil - Estimativas / 2005**. Banco de dados. Disponível em:
< <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/>> Acesso em : 30 Jun. 2005.

JUNQUEIRA,L.C.; CARNEIRO,J. **Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.488p.

KAMINAKA,S.; ITO,T. Near-Infrared Multichannel Raman Spectroscopy toward real-time *in vivo* cancer diagnosis. **Journal of Raman Spectroscopy** ,v.33, p.498-502, 2002.

KELLER,S.; SCHRADER,B Application of Near-Infrared-Fourier Transform Raman Spectroscopy in Medical Research. **Journal of Raman Spectroscopy**,v.25, p. 663-671, 1994

KEIGHLEY, M.R.B.; WILLIANS,S,N. **Cirurgia do Ânus Reto e Colo**. SãoPaulo: Manole , 1998. p.794-795.

KODATI,V,R.; TU,A,T.; TURUMIN,J,L. Raman Spectroscopic identification of Uric-Acid-Type Kidney Stone. **Applied Spectroscopy**, v. 44, n.7, p.1134-1136. 1990.

KOLJENOVIC,S.; CHOO-SMITH,L.; SCHUT,T,C,B.; KRO,J,M.VANDEN BERG,H,J.; PUPPELS,G,J. Discriminating Vital Tumor from necrotic Tissue in Human Glioblastoma Tissue Samples by Raman Spectroscopy. **Laboratory Investigation** v. 82, n.10, p.1265-1277, 2002.

LASCH,P.; HAENSCH,W.; LEWIS,E,N.; KIDDER,L,H.; NAUMANN,D. Characterization of colorectal adenocarcinoma sections by spatially resolved FT-IR microspectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.56(1),2002.

LAWSON,E,E.; BARRY,B,M.; WILLIAMS,A,C. Biomedical Applications of Raman Spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.28, p.101-117, 1997.

LOPES,C,A. **Tratado de Clínica Médica**. São Paulo:Editora Roca,v.1, 2006.1884p.

MAHADEVAN-JANSEN,A.; MITCHELLM,F,; UTZINGER,U; RICHARDS-KORTUM,R. Development of a fiber optic probe to measure NIR Raman Spectra of cervical tissue *in vivo*. **Photochemistry and Photobiology**, v.68, p.427. 1998.

MAHADEVAN-JANSEN,A; RICHARDS-KORTUM,R. Raman Spectroscopy for the detection of cancer and precancers. **Journal of Biomedical optics**,v.1, n.1,p.31-70 1996.

MANOHARAN,R.; WANG,Y.FELD,M,S. Biochemical analysis of biological tissues using Raman Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A** 52, p.215-249, 1996.

MANOHARAN ,R.; WANG,Y. Histochemical analysis of biological tissues using Raman Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A** ,v.52,p. 215-249, 1996.

MARTIN,A,A.; BITTAR,R,A.; NUNES,L,O.; ARISAWA,E,A.; SILVEIRA JR,L. Principal Components Analysis of FT-Raman spectra of *ex-vivo* basal cell carcinoma. **Biomedical Vibrational Spectroscopy**,v.5321, n.7, p.198, 2003.

MARY BIRD PERKINS. **Cancer Center** Disponível em:<http://www.marybird.org/admin/cancer_news/images/Polyps-and-text.jpg> Acesso em: 5 jul. 2005.

MARZZOCO, A; TORRES,B.B. **Bioquímica Básica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1999.360p.

MILLIGAN,G,W; COOPER,M,C. A Study of Variable Standardization **Journal of Classification**.v.5, p. 181-204,1988.

MIZUNO,A.; KITAJIMA,H.; KAWAUCHI,K.; MURAISHI,S.; OZAKI,Y. Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy Study of Human Brain Tissues and Tumors. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.25, p. 25-29, 1994.

MOLCKOVSKY,A.; SONG,L,M,W,K.; SHIM,M,G.; MARCON,E.; WILSON,B,C. Diagnostic potential of Near-Infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. **Gastrointestinal Endoscopy**,v. 57, n.3, p.396-402, 2003.

NCI. **NATIONAL CANCER INSTITUTE**. Disponível em: <http://www.nci.nih.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/patient> Acesso em: 14 Jul 2005.

NCCS. **NATIONAL CANCER CENTER SINGAPORE** Singhealth. Disponível em: http://www.nccs.com.sg/epub/CU/vol_04/images/coloncancer.jpg Acesso em: 5 Jul. 2005.

NETTER,F,H. **Interative Atlas of Human Anatomy**. Ciba-Geigy Corporation for Network, 1995. 1 CD-ROM.

NIJSSEN,A.; SCHUT,T,C,B.; HEULE,F.; CASPRES,P,J.; HAYES,D,P.; NEUMANN,M,H,A.; PUPPELS,G,J. Discriminating Basal Cell Carcinoma from its Surrounding Tissue by Raman Spectroscopy. **Journal of Investigate Dermatology** , v. 119, n.1, p. 64-69, 2002.

NOGUEIRA,G,V.; SILVEIRA,L,J; MARTIN,A,A.; ZÂNGARO,R,A.; PACHECO,M,T.; CHAVANTES M,C.; PASQUALUCI ,C,A,G. Diagnosis of atherosclerosis in human carotid artery by FT-Raman spectroscopy: Principal Components Analysis algorithm. **Biomedical Vibrational Spectroscopy**,v.5321, n.7,p.205-210, 2004.

NUCLEOUS – MEDICAL ART.Disponível em:<[http//.www.nucleosing.com](http://www.nucleosing.com)>. Acesso em: 15 Jun. 2006.

OHTANI,H.; SASANO,N. Stromal cell changes in Human colorectal adenomas and carcinomas. **Virchows Arch [Pathol Anat]** v. 401, p.209-222,1983.

OLIVEIRA,A.; AIRTON,A,A.; SILVEIRA,L,J.; ZÂNGARO,R,A. Application of Principal Components Analysis to diagnosis hamster oral carcinogenesis: Raman Study. **Biomedical Vibrational Spectroscopy**,v. 5321, v.4, p. 111-116, 2004.

OLIVEIRA,A,A.; BITAR,R,A; SILVEIRA,LJ,;ZÂNGARO,R,A.;AIRTON,A,A. Near-Infrared Raman Spectroscopy for oral Carcinoma Diagnosis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n.3,p.348-353, 2006.

PEREIRA,R,M. **Estudo de carcinoma espinocelular de pele humana por Espectroscopia Raman**. 100f. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

PORTO,C.C. **Semiologia Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.p.635.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Ed.UNESP, 1995. 224p.

SCHRADER,B.; KELLER,S; LÖCHTE,T.;FENDEL,S.; MOORE,D,S.; SIMON,A.; SASAWATZKI,J. NIR-FT Raman Spectroscopy in Medical Diagnosis. **Journal of Molecular Structure**, v.348, p.293-296, 1995.

SCHUT,T,C,B.; WITJES,M,J,H.; STERENBORG,HJ,C,M. *In vivo* Detection of Dysplastic Tissue by Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**.,v.72, n.24, p.6010-6018, 2000.

SHIM,M,G.; WILSON,B,C. The effects of *ex vivo* handling procedures on the near-infrared Raman spectra of normal mammalian tissues. **Photochemistry and Photobiology**, v. 63, n.5,p. 662-671, 1996.

STEVENS,A; LOWE, J.S. **Histologia Humana**. 2.ed. São Paulo: Manole , 2001. p.5-9.

STONE,S.; KENDALL,C.; SMITH,J.; CROW,P.; BARR,H. Raman Spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Farady Discuss**, v.126, p.141-157, 2003.

TWARDOWSKI,J.; ANZENBACHER,P. **Raman and IR Spectroscopy in Biology and Biochemistry**. New York: Ellis Horwood, 1994.

TOWNSEND,C,M.; BEAUCHAMP,B,M; EVERS,B,M.; MATTOX,K,L. **Sabiston-Tratado de Cirurgia**. 17^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.v-2,p.1444-1451.

UFSC-1 Universidade Federal de Santa Catarina. **Departamento de Química**. Disponível em: <http://www.qmc.ufsc.br/~minatti/exercicios> Acesso em 12 set. 2006.

UFSC-2 Universidade Federal de Santa Catarina. **Departamento de Engenharia Química e Engenharia de alimentos**. Disponível em:

http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/proteinas.htm. Acesso em: 23 set. 2006.

UFSC-3 Universidade Federal de Santa Catarina. **Departamento de Engenharia Química e Engenharia de alimentos**. Disponível em:

http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/carboidratos.htm. Acesso em: 12 out. 2006.

U.F.C.- Universidade Federal do Ceará. **Efeito Raman**. Disponível em:

<http://www.seara.ufc.br/ufc/fisica/raman/raman.html> Acesso em: 2 jul. 2005.

UTZINGER,U.; HEINTZELMAN,D,L.; MAHADEVAN-JANSEN,A.; MALPICA,A.; FOLLEN,M.; RICHARDS-KORTUM,R. Near-Infrared Raman Spectroscopy for *in vivo* detection of cervical precancers. **Applied Spectroscopy**, v.55, n.8,p.955-959, 2001.

UW HEALTH. **University of Wisconsin**. Disponível em:

http://www.uwhealth.org/futuretense_cs/ewebeditpro2/upload/virtual_colon_arrow.jpg Acesso em: 5 Jul. 2005.

VIEIRA,E,C.; GAZZINELLI,G.; MARES-GUIA,M. **Bioquímica Celular e Biologia Molecular**. 2.ed SãoPaulo: Atheneu, 1999. p.45-76.

VISSER,R.; ARENDS,J,W.;LEIGH,I,M.;BOSMAN,F,T. Patters and Composition of basement membranes in Colon Adenomas and Adenocarcinomas. **Journal of Pathology**, v.170, p. 285-290 , 1993.

YAMASAKI,H.; KAMINAKA,S.; KOHDA,E.; MUKAI,M.; HAMAGUSHI,H. The Diagnosis of Lung Cancer Using 1064-nm Excited Near-infrared Multichannel Raman Spectroscopy. **Radiation Medicine**.v. 21, n.1,p.1-6, 2003.

WAY,L.W.; DOHERTY,M.G. **Current Surgical Diagnosis & Treatment.** 11.ed.
New York: Mosb McGraw-Hills , 2003.p. 717.

WANEBO,J.H. **Colorectal cancer.** St.Louis, Missouri: Mosby- Year book,Inc, 1993.p. 116

ANEXO A

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo n.º L166/2004/CEP, sobre "*Estudo do adenocarcinoma de cólon por espectroscopia Raman*", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Airton Abrahão Martin, 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, 16 de maio de 2006



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Univap

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 5899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

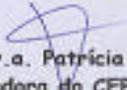
Parecer n.º 019/2005

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º *0855/2005* sob a responsabilidade de Kiyoshi Yassoyama com o título "Adenocarcinoma de olon: Espectroscopia Raman X Histopatologia", está de acordo com a Resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 07 de março de 2005.


Prof.ª Dr.ª Patrícia Maluf Cury
Coordenadora do CEP-FAMERP

Formulário de consentimento pós-informado do paciente

Estudo do adenocarcinoma de cólon por Espectroscopia FT-Raman

Para obter maiores conhecimentos clínicos e científicos das doenças, pesquisadores desenvolvem estudos clínicos e científicos. É por meio destes, que há um conhecimento melhor dos mecanismos da doença, podendo oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa a utilização da Espectroscopia Raman para diferenciação entre um tecido normal e um tecido comprometido pela neoplasia (tumor) retirados por ressecções de tumorações por colonoscopia e por cirurgia dos pacientes que estão sendo tratados nesta Instituição.

Você está sendo admitido(a) nesta instituição para o estabelecimento de diagnóstico e /ou tratamento de alguma forma de doença do intestino grosso, o fator prognóstico e como parte do seu tratamento, há necessidade de remoção de parte de material biológico relacionado à enfermidade.

É rotineiro usar parte do material biológico retirado para exame histopatológico, necessário para um diagnóstico definitivo. O restante do material biológico, não é utilizado, sendo então, congelado e armazenado para novos exames, se necessário, para pesquisa, por exemplo, este projeto que está sendo apresentado à você. Caso contrário serão descartados conforme a Legislação Sanitária Regulantar sobre o assunto.

A obtenção e o estudo do referido fragmento e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na cirurgia, nem tampouco, em aumento de tempo e da extensão na incisão cirúrgica.

O projeto de pesquisa que utilizará este material foi previamente apreciação ao Comitê de Ética em Pesquisa da UniVap e FUNFARME. Trata-se de uma nova técnica chamada de

Biópsia Ótica ou também Espectroscopia Raman a qual através da emissão de uma luz laser sobre a amostra, permite obter detalhes das ligações bioquímicas presentes no tecido.

O fragmento de tecido será identificado no laboratório através de código formado por números e letras, mantendo portanto, sua privacidade e identidade serão sempre preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato dos pacientes.

Concordando com o uso do material para fins acima descritos, é necessário esclarecê-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa, mas também não há qualquer tipo de despesa adicional para fazer parte deste estudo, caso exista, esta será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, o participante terá direito a tratamento médico na Instituição, bem com a indenização legalmente estabelecida.

Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará de nenhum modo no seu tratamento.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o mestrando Kiyoshi Yassoyama, que pode ser contactado, Av. Shishima Hifumi, 2911-Urbano, São José dos Campos-SP, tel: (12) 39471165. Universidade do Vale do Paraíba (Univap) - Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica(LEVB).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que lidas para mim, descrevendo o “Estudo do adenocarcinoma de cólon por Espectroscopia FT-Raman”.

Eu discuti com o Dr. _____ sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar do mesmo, sem penalidade,

prejuízo ou perda de quaisquer benefícios no meu atendimento ou que eu possa ter adquirido neste serviço.

.....

Assinatura do paciente/ representante legal

Data / / .

.....

Assinatura da testemunha

Data / / .

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva e visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

.....

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / / .