

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

**RENATA ANDRADE BITAR**

**ESPECTROSCOPIA RAMAN *IN VIVO* NO ESTUDO DO CARCINOMA  
MAMÁRIO INDUZIDO EM MODELO ANIMAL: IMPLICAÇÕES PARA  
BIÓPSIA ÓPTICA**

São José dos Campos

2008

**RENATA ANDRADE BITAR**

**ESPECTROSCOPIA RAMAN *IN VIVO* NO ESTUDO DO CARCINOMA  
MAMÁRIO INDUZIDO EM MODELO ANIMAL: IMPLICAÇÕES PARA  
BIÓPSIA ÓPTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin; Prof. Dr. Marco Antônio de Oliveira; Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leandra Náira Zambelli Ramalho

São José dos Campos

2008

B535e

Bitar, Renata Andrade

Espectroscopia Raman *in vivo* no estudo do carcinoma mamário induzido em modelo animal: implicações para Biópsia Óptica./Renata Andrade Bitar. São José dos Campos, 2008. Disco laser. Color.

Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba. 2008.

1. Neoplasias de Mama 2.Metaloproteases 3.Espectroscopia Raman 4. *in vivo* 5. DNA, espectroscopia I. Martin, Airton Abrahão. Orient. II. Oliveira, Marco Antônio. Orient. III Ramalho, Leandra Náira Zambelli. Co-orient. IV. Título  
CDU:616-006

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura do(a) Aluno (a): Renata Andrade Bitar  
Renata Andrade Bitar

São José dos Campos, 12 de Dezembro de 2008.

**RENATA ANDRADE BITAR**

**“ESPECTROSCOPIA RAMAN IN VIVO NO ESTUDO DO CARCINOMA MAMÁRIO  
INDUZIDO EM MODELO ANIMAL: IMPLICAÇÕES PARA BIÓPSIA ÓPTICA”**

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

Prof<sup>a</sup>. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP) *Cristina Pacheco Soares*  
Prof. Dr. **AIRTON A. MARTIN**(UNIVAP) *Airton A. Martin*  
Prof. Dr. **MARCO ANTONIO DE OLIVEIRA** (UNIVAP) *Marco Antonio de Oliveira*  
Prof. Dr. **JOSÉ CLAUDIO GALZERANI** (UFSCar) *José Claudio Galzerani*  
Prof. Dr. **FERNANDO SILVA RAMALHO** (USP) *Fernando Silva Ramalho*  
Prof<sup>a</sup>. Dra. **MARTHA SIMÕES RIBEIRO** (USP) *Martha Ribeiro*

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretora do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 12 de dezembro de 2008.

***À minha mãe, Liliana.***

Suas Mãos

*Aquele doce que ela faz  
quem mais saberia fazê-lo?*

*Tentam. Insistem, caprichando.  
Mandam vir o leite mais nobre.  
Ovos de qualidade são os mesmos,  
manteiga, a mesma,  
iguais açúcar e canela.  
É tudo igual. As mãos (as mães?)  
são diferentes.*

**Carlos Drummond de Andrade**

***Ao Bráulio, meu marido.***

Além da Terra, além do Céu

*Além da Terra, além do Céu,  
no trampolim do sem-fim das estrelas,  
no rastro dos astros,  
na magnólia das nebulosas.  
Além, muito além do sistema solar,  
até onde alcançam o pensamento e o coração,  
vamos!  
vamos conjugar  
o verbo fundamental essencial,  
o verbo transcendente, acima das gramáticas  
e do medo e da moeda e da política,  
o verbo sempreamar,  
o verbo pluriamar,  
razão de ser e de viver.*

**Carlos Drummond de Andrade**

## **Agradecimentos**

Ao Magnífico Reitor da Universidade do Vale do Paraíba, Prof. Dr. Baptista Gargione Filho, o agradeço e parablenizo pelo incentivo ao desenvolvimento da pesquisas de alta qualidade na UNIVAP.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Maria Fonseca da Costa, Diretora do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, por incentivar atitudes institucionais que valorizam comportamentos responsáveis.

Ao Prof. Dr. Antonio Guillermo José Balbin Villaverde, Coordenador do Programa de Doutorado em Engenharia Biomédica da UNIVAP, por auxiliarme no encerramento das minhas atividades na UNIVAP.

Ao Prof. Dr. Ailton Abrahão Martin, coordenador do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, professor da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), orientador deste projeto, agradeço por me apresentar a possibilidade da carreira científica e por me expor a situações que favoreceram enormemente meu crescimento pessoal.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Emília Ângela Loschiavo Arisawa, professora da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), pela amizade, carinho e conforto em todas as horas, mas principalmente pela oportunidade de aprender contigo a lecionar e gostar ainda mais de Patologia.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Angélica Gargione Cardoso, professora da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), pelo carinho e apoio constantes.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria do Espírito Santo, professora da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), sua inteligência e determinação me encorajam e incentivam diariamente.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kumiko Koibuchi Sakane, professora da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), pelo crescente entusiasmo em valorizar quem somos e pelos ensinamentos profissionais que vieram abrilhantar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo da Silva Soares, professor da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), com você aprendi a ter carinho e dedicação pela pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Wellington Ribeiro, professor da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) e Erika Fonseca Ferrari, aluna de Mestrado da UNIVAP, agradeço profundamente pelo carinho o qual fomos recebidos no Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, pela paciência e por ensinar-nos todos os procedimentos com os animais do estudo.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio de Oliveira, professor da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), co-orientador deste projeto, obrigada pelo apoio nos momentos decisivos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina Soares Pacheco, professora da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), muito obrigada pela credibilidade em minhas idéias e apoio nos momentos decisivos.

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, muito obrigada pelo convívio durante esses quase oito anos, por me fazerem enxergar os trabalhos científicos sob novas perspectivas.

Aos colegas (iniciação científica, mestrado e doutorado) do LEVB e para aqueles que por lá estiveram (demais pós-graduandos): a vocês: muito obrigada pela agradabilíssima convivência, pelo estímulo a sobrevivência, pelos estudos em conjunto, pelo ouvidos, pela generosidade em me ajudarem a crescer profissionalmente. Além do mais, obrigada pela sincera amizade que agora cultivamos.

Agradeço especialmente aos meus queridos amigos: Mário Augusto da Silva Martins, Dayana Gonçalves Ribeiro, Edson Aparecidos Pereira dos Santos, Bianca Palma Fogazza e Carolina da Silva Carvalho, pela paciência, pelo apoio, pelo enorme carinho não só durante a execução deste trabalho, bem como nos meus momentos de dificuldades e dúvidas.

Às secretárias do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP): Sra. Valéria Freitas de Oliveira Yamada, Sra. Ivone Paranaíba Vilela Monteiro, Sra. Vanessa Aparecida de Oliveira e Sra. Neusa de Moraes Delgado, muito obrigada por carinhosamente me acolherem em todos os momentos os quais as solicitei, tornando minha passagem mais organizada, segura e bem humorada.

Às bibliotecárias da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP): Sra. Rosangela Regis Cavalcanti e Sra. Rúbia Gravito de Carvalho Gomes, muito obrigada por realizarem a normalização desta Tese de Doutorado com tamanha dedicação.

Ao Prof. Dr. Herculano da Silva Martinho, professor do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC (UFABC), seu companheirismo tem sido além de qualquer forma de homenagem. O agradeço profundamente pelo apoio, encorajamento e amizade.

Ao Prof. Dr. Dieter Naumann, coordenador do laboratório “P13 – Biomedical Spectroscopy” do Robert Koch Institut, Berlim, Alemanha, pelo incentivo nestes anos de convivência e por apoiar esse projeto.

A Profa. Dra. Anita Mahadevan-Jansen, professora associada de Engenharia Biomédica do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade de Vanderbilt, Nashville, TN, EUA, por dividir seu entusiasmo humanitário em relação à pesquisa, mostrando que o sucesso é a consequência natural para aqueles que multiplicam e dividem seus conhecimentos.

Ao Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho, professora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), co-orientadora deste projeto, agradeço profundamente pelo constante apoio, incentivo e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho, professor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) por acreditar na potencialidade deste projeto.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (Projeto: 05/58565-7) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo fomento deste projeto de pesquisa científico.

## Lágrimas e Tormentos

*“Lágrimas, tormentos  
Quantas desilusões  
Foram tantos sofrimentos e decepções*

*Mas um dia o Destino a tudo modificou  
Minhas lágrimas secaram  
Meus tormentos terminaram  
Foi uma nuvem que passou*

*E hoje a minha vida é um carrossel de alegrias  
E como se não bastasse, estou amando de verdade  
Me perdoa se eu me excedo em minha euforia  
Mas é que agora sei o que é FELICIDADE”.*

**Argemiro Patrocínio**

# ESPECTROSCOPIA RAMAN *IN VIVO* NO ESTUDO DO CARCINOMA MAMÁRIO INDUZIDO EM MODELO ANIMAL: IMPLICAÇÕES PARA BIÓPSIA ÓPTICA

## Resumo

A aplicação da espectroscopia Raman no estudo de carcinoma com finalidade diagnóstica é uma promessa a olhos vistos. A versatilidade da técnica permite que sejam estudadas amostras de diversas origens e preparações. Neste estudo, foi possível abranger algumas técnicas de aplicação da espectroscopia Raman em tecido mamário humano e animal com finalidade de diagnóstico do carcinoma mamário. Foram utilizados os espectrômetros FT-Raman e Raman Dispersivo para adquirir espectros de tecido mamário humano *in natura*, do material genético extraído destes tecidos e do tecido mamário normal e com adenocarcinoma induzido em modelo animal com auxílio de fibra-óptica para coleta *in vivo*. Com auxílio rotinas matemáticas baseadas em algoritmos de análise estatística multivariada, foi possível classificar esses espectros em função de seu estado fisiológico ou patológico e entender as alterações espectrais, associados ao processo carcinogênico, que favoreceram essas interpretações. Dessa forma, foi possível: (a) caracterizar e associar as alterações bioquímicas aos espectros FT-Raman de nove tipos histológicos associados ao tecido mamário humano; (b) identificar e classificar o espectro Raman de tecido mamário da margem ressectiva de CDI em relação aos espectros de Mama Normal e CDI; (c) desenvolver a metodologia mais adequada de extração de DNA para avaliação por Espectroscopia Raman; (d) identificar a extensão da lesão de Adenocarcinoma Mamário por Espectroscopia Raman Dispersivo transcutânea em modelo animal; (e) avaliar o prognóstico do Adenocarcinoma mamário por FT-Raman *ex vivo* e exame MMP19 em modelo animal; (f) classificar por espectroscopia FT-Raman transcutânea *in vivo* o Adenocarcinoma Mamário em modelo animal.

**Palavras-Chave:** Espectroscopia Raman, Biópsia Óptica, Câncer de Mama, Análise Estatística Multivariada, Modelo Animal.

# **IN VIVO RAMAN SPECTROSCOPY STUDY OF MAMMARY CARCINOMA INDUCED IN ANIMAL MODEL: IMPLICATIONS FOR OPTICAL BIOPSY**

## **Abstract**

The application of Raman spectroscopy in cancer diagnosis is almost a reality. The versatility of this technique has been allowing probe samples of diverse origins and preparations. In this study, it was possible to enclose several Raman spectroscopy techniques in human and rats breast tissue with the purpose of diagnosis of the mammary carcinoma. Dispersive and FT-Raman spectrometers had been used to acquire spectra from normal and malignant mammary human *in natura*, spectra from the DNA of these tissues, and also runned *in vivo* experiments. It was also The mathematical routines based on multivariate statistical analyzes established for this study made possible the classification of these spectra according to its physiological and/or pathological state. For this reason, it was possible: (a) to characterize and to associate the biochemical alterations of nine histopathological types of human mammary tissue FT-Raman spectra; (b) to identify and to classify mammary cancer lesions margins Raman spectra; (c) to develop the most accurate methodology of DNA extration for Raman Spectroscopy analysis; (d) to identify the extension of a mammary Adenocarcinoma transcutaneously using Dispersive Raman spectroscopy *in vivo* in animal model; (e) to evaluate the aggressive potential of mammary Adenocarcinoma using FT-Raman spectroscopy and MMP19 exam in animal model; (f) to classify using FT-Raman spectroscopy *in vivo* transcutaneously the mammary adenocarcinoma in animal model.

**Keywords:** Raman Spectroscopy, Optical Biopsy, Breast Cancer, Multivariate Statistical Analysis, Animal Model.

## Lista de abreviaturas e símbolos

cm <sup>-1</sup>	Número de onda
HE	Hematoxicilina, Eosina
IR	Infravermelho
Laser	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LDA	Análise discriminante linear
NIR	Infravermelho próximo
NMF	<i>Natural moisturizing factor</i>
PCA	Análise dos componentes principais
S/N ratio ou SNR	Relação sinal e ruído
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
~	Aproximadamente
MMP19	Metalotioneína
WHO	<i>World Health Organization</i>
ER	Receptor de Estrogênio
<i>BRCA1</i>	<i>Breast cancer 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast cancer 2</i>
FT-Raman	Raman com transformada de Fourier
DNA	Ácido desoxirribonucléico
CDI	Carcinoma Ductal infiltrante
nm	Nanometro
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
PLC	<i>Programmable logic controller</i>
SERS	<i>Surface-enhanced Raman scattering</i>
nL	Nanolitros
PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
RNA	Ácido ribonucléico
FNAC	Citologia por punção por agulha fina
3D	Três Dimensões

µm	Micrometro
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CCD	<i>Charge Couple Device</i>
NIR	Infravermelho Próximo
IVRS	Sistema Raman <i>in vivo</i>
kHz	Quilo Hertz
mg/dL	Miligrama por decilitro
mm	Milímetro
IG-RS	Espectroscopia Raman guiada por imagem
MPPs	Metaloproteinases
CARS	<i>Coerence Anti-Stokes Raman Spectroscopy</i>
Au	Ouro
Ag	Prata
In	Índio
P	Fósforo
Ga	Gálio
As	Arsenieto
Ti	Titânio
MT	Metaloproteinase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacção em cadeia pela
polimerase)	
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase</i> PCR
pT1	Estágio 1 PCR
pT2	Estágio 2 PCR
MMP(s)	Metaloproteinase(s)
p53	gene p53
<i>walf1</i>	gene <i>walf1</i>

## Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	27
4	RESULTADOS	52
4.1	Análise Bioquímica do tecido mamário humano usando espectroscopia Raman com transformada de Fourier (Anexo B).	52
4.2	Avaliação por Espectroscopia FT-Raman do tecido mamário da margem ressectiva de carcinoma infiltrante (Anexo C)	53
4.3	Extração sistemática de DNA de CDI mamário para caracterização por Espectroscopia Raman (Anexo D)	54
4.4	Avaliação de extensão da lesão de Carcinoma mamário em modelos animal por Espectroscopia Raman Dispersivo transcutânea (Anexo E)	55
4.5	Discriminar por FT-Raman <i>ex vivo</i> e exame MMP19 os tipos histológicos de tecido mamário em Ratos Sprague-Dawley fêmeas submetidas a carcinogênese química (Anexo F) 56	
4.6	Raman transcutâneo <i>in vivo</i> no diagnóstico do Adenocarcinoma Mamário em modelo animal (Anexo G)	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO A. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/UNIVAP)	84
	ANEXO B BIOCHEMICAL ANALYSIS OF HUMAN BREAST TISSUES USING FOURIER-TRANSFORM RAMAN SPECTROSCOPY.	86
	ANEXO C. FT-RAMAN SPECTRA OF THE BORDER OF INFILTRATING DUCTAL CARCINOMA LESIONS.	87
	ANEXO D. DNA EXTRACTION SYSTEMATICS FOR SPECTROSCOPIC STUDIES.	88
	ANEXO E. IN VIVO RAMAN SPECTROSCOPY FOR BREAST CANCER: DIAGNOSIS IN ANIMAL MODEL.	89

ANEXO F. RAMAN SPECTROSCOPY AND IMUNOHISTOCHEMISTRY FOR  
AGRESSIVENESS PREDICTION OF HISTOLOGICAL SUBTYPES OF  
BREAST ADENOCARCINOMA. 90

ANEXO G. RAMAN TRANSCUTÂNEO *IN VIVO* NO DIAGNÓSTICO DO  
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO EM MODELO ANIMAL. 91



## 1 INTRODUÇÃO

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13 % de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão (1,3 milhão); estômago (cerca de 1 milhão); fígado (662 mil); cólon (655 mil); e, mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70 % ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO, 2006). Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60 % destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos. Parkin e colaboradores (2001) estimaram que o número de casos novos de câncer em todo o mundo seria maior que 10 milhões. Os tumores de pulmão (902 mil casos novos) e próstata (543 mil) seriam os mais frequentes no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino as maiores ocorrências seriam os tumores de mama (1 milhão de casos novos) e de colo do útero (471 mil).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22 % dos casos novos de câncer em mulheres são de mama.

O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (67/ 100.000), Centro-Oeste (38/

100.000) e Nordeste (28/ 100.000). Na região Norte é o segundo câncer mais incidente (16/ 100.000).

Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama. Além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos, e posteriormente seguem de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é conhecida na literatura como "*Clemmesen's hook*", e tem sido atribuída à menopausa. Alguns estudos apontam para dois tipos de câncer de mama relacionados com a idade: o primeiro tipo ocorre na pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e estrogênio receptor (ER) negativo; o segundo ocorre na pós-menopausa e está associado com características indolentes e principalmente por ser ER positivo. As variações morfológicas também estão relacionadas ao ER, como por exemplo, os carcinomas medulares estão relacionados ao ER - negativos e os carcinomas tubulares e lobulares em ER - positivos. Com relação aos carcinomas medulares, pode-se dizer ainda que eles estão associados às mutações no gene *BRCA1* e são mais frequentes em populações de baixo risco, como as japonesas. Por outro lado, os carcinomas tubulares e lobulares têm associação com as mutações do gene *BRCA2* e são mais comuns em populações de alto risco, como os Estados Unidos.

A prevenção primária dessa neoplasia ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e as características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Novas estratégias de rastreamento factíveis para países com dificuldades orçamentárias têm sido estudadas, uma vez que até o momento é recomendado a mamografia anual para mulheres com idade entre 50 e 69 anos como método efetivo para detecção precoce.

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como principais estratégias de rastreamento populacional um exame mamográfico, pelo menos

a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos. O exame clínico da mama deve ser realizado em todas as mulheres que procuram o serviço de saúde, independente da faixa etária, como parte do atendimento à saúde da mulher. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama (com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau) recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos. Apesar de ser considerado um câncer de prognóstico relativamente bom, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados.

Inúmeras frentes de pesquisa, em diversos centros de referência no tratamento de câncer e em universidades, se baseiam no diagnóstico precoce e no tratamento individualizado como sendo os maiores aliados na luta contra o câncer. São inúmeras pesquisas relacionadas à melhoria de equipamentos e técnicas existentes, ensaios laboratoriais em amostras de pacientes e em modelos animais e que pesquisam sobre a patofisiologia do câncer, visando a individualização do caso para precisar diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Os sistemas de modelos experimentais são particularmente úteis para o estudo da carcinogênese mamária. Entre estes sistemas, os modelos de indução química em ratos são os mais utilizados por diferentes razões. Primeiramente, as glândulas mamárias dos ratos mostram uma alta suscetibilidade em desenvolver neoplasias, e estes neoplasmas mimetizam as doenças mamárias humanas. As maiorias dos tumores desenvolvidos em modelos experimentais são malignos, especificamente adenocarcinomas. O início do processo de carcinogênese ocorre primariamente, assim como ocorre em mama humana, a partir do ducto terminal da unidade lobular (RUSSO, 1990). Além do mais, ambas as lesões mostram similaridades. Estudos comparativos revelaram a existência de receptores de estrógeno e progesterona com propriedades idênticas nos dois sistemas: humano e animal

(ESCRICH et al., 1987), o que pode explicar a dependência positiva a hormônios e a presença de mutações no gene *ras* em carcinomas nos dois sistemas (SOLANAS et al., 1996). Em segundo lugar, o comportamento biológico dos tumores mamários experimentais tem sido bem caracterizado e ficou bem estabelecido a idade do hospedeiro na fase de exposição ao carcinógeno, a história reprodutiva, o ambiente endocrinológico, dieta, entre outros diversos fatores que influenciam a iniciação e desenvolvimento dos tumores (RUSSO et al., 1996). Finalmente, as condições e demandas experimentais foram bem estabelecidas e aceitas (ESCRICH et al., 1987). Por essas razões, pela inegável distância entre as espécies humanas e animais, o câncer de mama em modelos experimentais induzidos em ratos são os mais utilizados para estudar o câncer de mama (COSTA et al., 2002). A análise histopatológica dos tumores mamários humanos é essencial na definição entre a natureza benigna e maligna destes tumores e estabelecer a agressividade dos tumores malignos. Além do mais, algumas características microscópicas indicam, essencialmente nas formas clássicas (ou outras designações específicas) dos carcinomas ductais infiltrantes, o comportamento clínico e inclusive a opção terapêutica. Desde a introdução destes modelos animais em estudos de carcinogênese mamária, diversos artigos de revisão foram publicados para estabelecer a característica microscópica destas lesões promovendo estudos comparativos baseados nas doenças humanas (YOUNG et al., 1973; ALTMAN et al., 1979; VAN ZWIETEN et al., 1984; RUSSO et al.; 1989). Todos esses trabalhos concordam que o câncer de mama que se desenvolve com a maior frequência sob os modelos de indução em ratos exibe o padrão de áreas cribiformes e/ou papilares. Ainda mais, eles mostram predominantemente um padrão de crescimento não-invasivo ou microinvasivo e um baixo índice no desenvolvimento de metástases. Estas características morfológicas e biológicas diferem àquelas descritas para os carcinomas invasivos humanos, os quais tipicamente apresentam um padrão ductal, com crescimento infiltrativo e comportamento hábil para metastização. Em continuidade, todas essas características contribuem para a dificuldade de se estabelecer uma distinção clara entre tumores benignos e malignos nos tumores mamários nos ratos. Por essa razão, Young e Hallowes (1973) para somar o conhecimento na classificação dos tumores mamários em ratos

definiram uma série de critérios de benignidade e malignidade, adotados mais tarde por diversos autores. A metodologia de classificação dos tumores mamários mais referenciada nos dias atuais estabeleceu-se por consenso em conferência em Hanover, Alemanha (1987). Essa classificação correlaciona as lesões neoplásicas às não-neoplásicas das glândulas mamárias humanas e dos ratos. Pareceu claro que a maioria das lesões encontradas em humanos tem similares na patologia dos ratos. No entanto, existem algumas lesões específicas humanas, como: Carcinoma Ductal Infiltrante (com chances de promover metástases), Doença de Paget da Mama, Carcinoma Ductal Infiltrante Medular e Carcinoma Lobular Infiltrante que ainda não foram encontradas em ratos.

Os estudos que possivelmente serão extrapolados para uso humano em modelo animal (mais especificamente em ratos) parecem ser uma forma cientificamente aceitável de se encarar os primeiros desafios a serem superados. Portanto, nesse estudo, todo o processo de geração dos tumores mamários em ratos através de indução química, aquisição dos espectros e viabilização da classificação diagnóstica dos mesmos em padrões benignos e malignos, enriqueceu enormemente a superação de desafios, projetados e não-projetados. Estes desafios se originaram desde o manuseio dos animais, a montagem experimental Raman, o conhecimento das possibilidades de análises dos espécimes biológicos obtidos para identificação e o aprimoramento dos ferramentais estatísticos.

Para se entender a razão de tal opção, um relato sobre a contabilização dos dados obtidos e sobre a base literária escassa utilizada para discussão dos resultados será descrito, evidenciando que os objetivos propostos desse trabalho estão nivelados com o “Estado da Arte” internacional sobre Espectroscopia Vibracional no estudo de tumores mamários em modelo animal. Deste modo, pretende-se o aprofundamento dos estudos sobre os dados obtidos, criando-se um material consistente para a comunidade científica.



## 2 OBJETIVOS

Caracterizar os espectros FT-Raman de mama normal e oito tipos histológicos de patologias benignas e malignas associadas ao tecido mamário;

Avaliar por Espectroscopia FT-Raman do tecido mamário da margem ressectiva de carcinoma infiltrante;

Extrair sistematicamente o material genético (DNA) de CDI mamário para caracterização por Espectroscopia Raman;

Avaliar a extensão de uma lesão de adenocarcinoma mamário em modelo animal por Espectroscopia Raman Dispersivo, transcutaneamente;

Diagnosticar o Adenocarcinoma Mamário por meio da FT-Raman transcutâneo *in vivo*.

Discriminar, por espectroscopia FT-Raman *ex vivo* e exame MMP19, os tipos histológicos de tecido mamário em Ratos Sprague-Dawley fêmeas submetidas a carcinogênese química.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo de revisão de literatura foi traçado um quadro teórico fundamentado na literatura publicada realizando uma estruturação conceitual sobre a aplicação da Espectroscopia Raman no estudo do Câncer de forma geral, e principalmente de Câncer de Mama, que deram sustentação ao desenvolvimento desta pesquisa.

Esta pesquisa permitiu traçar um mapeamento em relação as últimas aplicações da Espectroscopia Raman com finalidade diagnóstica, a inclusão dos trabalhos sob os aspectos da aplicação da espectroscopia Raman em diagnósticos de diversas doenças, principalmente em tecidos mamário e a possibilidade de se encontrar marcadores tumorais nos espectros, procurando mostrar através da literatura já publicada o que já sabe sobre o tema, quais as lacunas existentes e onde se encontram os principais entraves teóricos ou metodológicos.

#### **Aplicação da Espectroscopia Raman associada à algoritmos matemáticos multivariados com finalidade diagnóstica**

Ellis e colaboradores (2006) acreditam que a habilidade de diagnosticar precocemente uma doença, de maneira imediata e não invasiva tem múltiplos benefícios. Dentre os benefícios, a intervenção imediata das estratégias terapêuticas leva a redução na morbidade e mortalidade e a economia de recursos dos sistemas de saúde. Alguns dos testes de rotinas médicas atualmente utilizadas não são suficientemente sensíveis ou específicos, além de serem desenvolvidos para marcar somente uma doença sendo inapropriados quando múltiplos fatores estão envolvidos. Muitas doenças são resultados de desordens metabólicas, sendo lógico medir esse metabolismo diretamente. Uma das estratégias empregadas pela ciência emergente de *metabolomics* é a “impressão digital” do metabolismo. Envolve métodos de análises rápidos, robustos e eficientes na discriminação de amostras de diferentes estados ou origens biológicas. Os autores propuseram essa revisão para focar no seletivo número de estudos recentes onde a

“impressão digital” tem sido evidenciada como ferramenta potencial para diagnóstico de doenças pela análise de seus espectros de absorção no infravermelho e Raman.

Keller e colaboradores (2006) mostraram que a espectroscopia Raman é uma ferramenta promissora para diagnóstico não invasivo por meio da aplicação da técnica no diagnóstico de quatro tipos de tecido: pele, mama, trato gastrintestinal e cervix. Por meio de análise estatística multivariada e algoritmo de discriminação obtiveram a classificação automática dos espectros em categorias patológicas de relevância clínica usando a histologia como padrão ouro. Embora existam limitações, a técnica mostrou ser factível de ser aplicada em ambiente clínico.

Cao e colaboradores (2007) desenvolveram em seu estudo um novo método de remoção do *background* de fluorescência gerado pelos tecidos nos espectros Raman. Os autores afirmam que estes espectros são constituídos de ruído, fluorescência e espalhamento Raman. Com o objetivo de extrair somente o espalhamento Raman, tanto o ruído quanto a fluorescência deveriam ser removidos, idealmente sem interferência humana e preservando os dados originais. Neste estudo, os autores desenvolveram um método de subtração de *background*, aplicaram estes parâmetros em espectros Raman e compararam a outros métodos usuais. Como conclusão, o método “*adaptive minmax*” se mostrou significativamente melhor do que os outros métodos aplicados, possibilitando sua implementação como parte modular de sistemas de diagnóstico automatizados Raman *in vivo*.

Hattori e colaboradores (2007) desenvolveram um sistema com um pequeno endoscópio equipado com uma fibra-óptica para micro-Raman para medidas *in vivo* em ratos. As medidas foram realizadas em ratos anestesiados e respiração artificial para minimizar o impacto nos animais. Os espectros Raman *in vivo* do esôfago e do estômago dos ratos foram medidos com sucesso. Os resultados deste estudo sugeriram que os espectros Raman refletem uma imagem logo abaixo da superfície da mucosa que não pode ser distinguida por meio da imagem do endoscópio. Depois dos experimentos, os ratos retomaram a consciência sem qualquer alteração. Foi verificado que as

medidas Raman usando o sistema de fibra-óptica e endoscópio apresentadas foi segura para as medidas *in vivo* nos ratos.

Lee e colaboradores (2007) rastrearam e construíram a imagem de marcadores específicos de câncer em células vivas por meio da técnica SERS (*Surface-enhanced Raman scattering*). Para este propósito, nanopartículas *core-shell* de Au/Ag, conjugadas com anticorpos monoclonais, foram preparados. O procedimento de marcar as células vivas com essas nanosondas bimetálicas foi desenvolvido para construção de imagens altamente sensíveis por meio de SERS. No presente estudo, células vivas HEK293 que expressam *PLC gama 1* foram estudadas como marcadores da imagem óptica. Os resultados demonstraram o potencial da tecnologia SERS para construir a imagem altamente sensível de marcadores de câncer em células vivas.

Liu e colaboradores (2007) afirmaram que a detecção *in situ* em tempo real de proteases ativas é crucial para o rastreamento de estágios iniciais de câncer e estudo de padrões de sinalização celular; entretanto, é difícil conseguir estas informações usando fluorescência ou sondas radioativas em volumes menores que 1 nL. Neste estudo, Liu e colaboradores demonstraram uma sondagem óptica híbrida incorporando nano partículas e peptídeos com agregação por meio de moléculas artificiais. Desenvolveram um estudo conceitual usando PSA (*prostate specific antigen*) um dos mais proeminentes marcadores do câncer de próstata e uma protease sérica presente no fluido seminal de pacientes e soro sanguíneo. O espectro Raman das moléculas artificiais foi melhorado pelas nanopartículas e este sinal foi monitorado como indicador de clivagem dos peptídeos em uma reação de volume da ordem de femtolitro, perto do nível de uma molécula de PSA ativa. A alta especificidade da reação dos peptídeos em nanopartículas individuais minimizou a detecção falsa de outras proteases séricas e sinal de *background*, o que resultou em uma sondagem para câncer altamente fidedigna e com alta resolução entre o sinal e o ruído que poderá ser facilmente incorporada em equipamento de análise de fluidos em escala micro e nanoscópica.

Movasaghi e colaboradores (2007) revisam algumas das recentes inovações em espectroscopia Raman, em áreas relacionadas aos tecidos *in natura* às células. O artigo resume alguns dos mais frequentes modos vibracionais utilizados em caracterizar tecidos biológicos. O objetivo deste estudo foi preparar uma base de dados de “impressões digitais” moleculares, a qual pôde auxiliar pesquisadores na definição de estruturas químicas dos tecidos biológicos. Ao invés de aplicar diferentes métodos, os autores afirmaram haver similaridade em definir picos de áreas idênticas dos espectros. Como resultados, acreditam que, preparar uma única coleção das frequências encontradas em estudos por espectroscopia Raman pode levar a melhorias significativas dos dados espectrais e análises. Este artigo foi o primeiro a promover um preciso banco de dados das mais importantes características dos espectros Raman para pesquisadores que desejam analisar tecidos e células, principalmente para aqueles que estudam tecidos cancerosos.

#### **Aplicação da Espectroscopia Raman associado a algoritmos matemáticos multivariados no diagnóstico de Câncer de Mama**

Haka e colaboradores (2005) empregaram a espectroscopia Raman para diagnosticar lesões benignas e malignas de mama humana baseados na composição química. Neste estudo foram adquiridos 130 espectros Raman de amostras de tecido mamário humano (normal, alteração fibrocística, fibroadenoma e carcinoma infiltrante) de 58 pacientes. Os dados foram analisados por *fitting* usando um modelo de combinação linear no qual nove espectros base representaram as características morfológicas e químicas dos tecidos de mama. Os coeficientes de *fitting* resultantes promoveram um conhecimento sobre a estrutura química/morfológica dos tecidos favorecendo o desenvolvimento do algoritmo diagnóstico. Os coeficientes de *fitting* para gordura e colágeno foram os parâmetros chaves do algoritmo diagnóstico resultante, o qual classificou as amostras de acordo com o específico diagnóstico patológico com 94 % de sensibilidade e 96 % de especificidade para distinção de tecidos canceroso de tecido normal e benigno. Os excelentes resultados demonstraram que a espectroscopia Raman tem o potencial para a

aplicação *in vivo* para diagnosticar precisamente as lesões de mama, desta forma reduzindo o número de biópsias excisionais de mama.

Mourant e colaboradores (2005) afirmam que tanto a espectroscopia de absorção do infravermelho quanto Raman tem potencial de estimar a composição bioquímica de maneira não-invasiva de células, embora isso não possa ser precisamente determinado por ações analíticas como assinaturas dos picos ou métodos de classificação multivariável. Mourant e colaboradores desenvolveram uma rotina de *fitting* que determinou a composição bioquímica por meio de espectros bases dos maiores constituintes bioquímicos encontrados em células de mamíferos (proteínas, DNA, RNA, lipídios e glicogênio), o qual mostrou que estes espectros eram robustos e reprodutíveis. Os autores também mediram os espectros Raman e IR suspensões de fibroblastos de ratos de linhagens tumorigênicas e não-tumorigênicas. Na tentativa de simular as condições *in vivo*, foram comparadas as células não-proliferativas e não-tumorigênicas às proliferativas e tumorigênicas. Diferenças reprodutíveis na composição molecular foram encontradas para todos os modelos celulares pelas duas técnicas. Estas diferenças incluíram o aumento do conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos nas células tumorigênicas, com correspondente decréscimo do conteúdo de lipídios e glicogênio. As medidas de cada uma das células, dos tipos proliferativo a não-proliferativo, mostraram que o estado proliferativo foi o maior determinante das diferenças entre os espectros vibracionais, mesmo comparando o estado tumorigênico. A menor das variações espectrais associadas a tumorigenicidade pôde estar relacionada às ínfimas alterações oncogênicas do sistema, como um único oncogene mutante.

Yan e colaboradores (2005) apresentaram os espectros de células de mama normais e com câncer humanos. Foram reportados que todas as linhas Raman apareceram mais fracas. As intensidades das linhas em  $782$  e  $1084\text{ cm}^{-1}$  do grupo fosfato do DNA e  $1155$  e  $1262\text{ cm}^{-1}$  da deoxirribose-fosfatase diminuíram. As linhas em  $812\text{ cm}^{-1}$  do DNA tipo A e as linhas  $979$  e  $668\text{ cm}^{-1}$  desapareceram e o pico  $905\text{ cm}^{-1}$  foi deslocado para uma frequência menor (cerca de  $6\text{ cm}^{-1}$ ). Esses resultados significaram que a

estrutura de fosfato do DNA foi destruída para certa extensão e a multiplicação das células cancerosas não podem ser controladas efetivamente. Contudo, os autores encontraram um tipo de linha Raman em  $960\text{ cm}^{-1}$  relacionada a calcificação e a esclerose de células de câncer. Os resultados indicaram que os espectros Raman podem oferecer informações de base sobre as células de câncer favorecendo o diagnóstico e o tratamento.

Bitar e colaboradores (2006) empregaram a espectroscopia FT-Raman para estudar tecido mamário humano normal e doente, incluindo diversos subtipos de câncer de mama. Foram analisados 194 espectros Raman de tecidos mamário separados em 9 grupos de acordo com o respectivo diagnóstico histopatológico. A denominação de bandas Raman relevantes habilitou os autores a identificar diversos tipos de tecido mamários (normal e doentes) às suas correspondentes alterações bioquímicas e a distinguir os espectros em 7 grupos: mama normal, condição fibrocística, carcinoma *in situ*, carcinoma *in situ* com necrose, carcinoma ductal infiltrante (sem tipo específico), carcinoma ductal infiltrante mucinoso e carcinoma lobular infiltrante. Neste estudo foi possível estabelecer as bases bioquímicas para cada espectro, por meio de relato dos picos observados especificamente para cada biomolécula importante no processo de carcinogênese. Este trabalho se mostrou bastante útil para o diagnóstico óptico prematuro de várias doenças relativas à mama. Não foi possível diferenciar os carcinomas ductal infiltrante inflamatório e medular do carcinoma ductal infiltrante sem tipo específico.

Chowdary e colaboradores (2006) relatam que o câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres. A citologia por punção por agulha fina (FNAC) pode ser dita com um dos métodos “padrão ouro” de diagnóstico, devido aos altos resultados falso positivos obtidos pela técnica de mamografia. No trabalho desenvolvido por Chowdary e colaboradores, os espectros Raman de tecido mamário normal, com doenças benignas e malignas apresentaram diferenças significativas. Diferenças espectrais entre mama normal e com doença benigna são mais pronunciadas do que entre as patologias. Baseados em dados espectrais previamente descritos, a presença

dos lipídios (1078, 1267, 1301, 1440, 1654 e 1746  $\text{cm}^{-1}$ ) foi indicativa de normalidade e as proteínas (Amida I,  $\text{CH}_2$ , Amida III, 1002, 1033, 1530 e 1556  $\text{cm}^{-1}$ ) foram encontrados mais pronunciadamente nos espectros das doenças benignas e malignas. As maiores diferenças entre as patologias, parecer ser o excesso de lipídios (1082, 1301 e 1440  $\text{cm}^{-1}$ ) e a presença de excesso de proteínas (Amida I,  $\text{CH}_2$ , Amida III, 1003 e 1002  $\text{cm}^{-1}$ ) indicaram doença benigna. Ferramentas de análises estatísticas multivariadas, como PCA foi empregada para desenvolver métodos de discriminação. O *score* do *Factor 1* promoveu uma razoável classificação dos três tipos tissulares. A análise seguinte promoveu uma melhora no método de análise por meio da aplicação da Distância de Mahalanobis e resíduos espectrais como parâmetros de discriminação. Esse método de aplicação foi testado retrospectiva e prospectivamente. O teste limite promoveu a melhor discriminação foi considerado o método que mais claramente dividiu os três tipos de espectros. Esses resultados suportam a eficácia dos espectros Raman em discriminar tecidos de mama normais e patológicos.

Demos e colaboradores (2006) apresentaram uma revisão sobre os recentes avanços no imageamento óptico e espectroscopia e o uso da luz em câncer de mama. Técnicas espectroscópicas oferecem meios de caracterizar os componentes tissulares e obter informações funcionais em tempo real. Imagens ópticas em 3D da mama usando vários tipos de iluminação e esquemas de coleta de sinais em combinação com algoritmos de reconstrução de imagem podem promover uma nova ferramenta de detecção e monitoramento do câncer de mama.

Fournier e colaboradores (2006) investigaram a detecção *in vivo* de tumores mamários em ratos usando imagem de autofluorescência na região espectral vermelho e infravermelho-próximo. O objetivo deste estudo foi explorar a autofluorescência como método não invasivo para detecção de tumores malignos e correlação entre as propriedades de autofluorescência dos tumores e seus diferentes estados patológicos. Dezoito tumores induzidos em ratos, sendo oito benignos e dezessete malignos foram imageados. As imagens de autofluorescência foram adquiridas usando a janela espectral

centrada em 700 nm, 750 nm e 800 nm sob excitação *laser* em 632,8 nm e 670 nm. A intensidade das imagens de autofluorescência dos tumores malignos sob excitação em 670 nm foi maior que o tecido normal adjacente. A intensidade dos tumores benignos foi menor comparado ao tecido normal.

Yu e colaboradores (2006) utilizaram a espectroscopia micro-Raman para caracterizar linhagens celulares epiteliais de mama humanas normais e transformadas. Os componentes celulares chave (DNA, RNA) foram extraídas do núcleo das células e os espectros Raman foram medidos e usados como base para correlacionar com os espectros dos núcleos das células. As contribuições de cada um dos componentes e seus respectivos conteúdos foram avaliados baseados em coeficientes de correlação. Como resultado, o coeficiente de correlação entre os espectros revelou que a atividade de duplicação do DNA nas células tumorigênicas foi significativamente maior em relação às células normais. O coeficiente de correlação pode servir como um bom marcador espectral de identificação do estado da doença. Yu e colaboradores concluíram que a espectroscopia permitiu produzir informações sobre a composição do núcleo celular sendo desta forma uma ferramenta poderosa para rápida caracterização celular e distinção das atividades celulares em nível subcelular.

Yu e colaboradores (2006a) examinaram seções de tecido de mama por espectroscopia Micro-Raman confocal com comprimento de onda de excitação de 633 nm. Os espectros foram adquiridos usando um microscópio para mapeamento com volume de amostra de 2  $\mu\text{m}$ , sendo comparáveis aos espectros comercialmente disponíveis de actina, DNA, colágeno (tipo I) e trioleína. Alguns dos espectros foram diferenciados e identificados, como características morfológica dos elementos do citoplasma e da matriz extracelular. O espectro do núcleo celular também foi obtido pelo *K-means cluster analysis*. A análise de correlação mostrou que o espectro de um elemento morfológico está altamente correlacionado ao seu respectivo componente químico puro. A caracterização espectral destes elementos morfológicos foi realizada desta forma. Este estudo foi útil para o entendimento

das bases químicas/morfológicas do espectro Raman e para o desenho do modelo de espectroscopia Micro-Raman de tecido mamário humano.

Zhao e colaboradores (2006) coletaram os espectros Micro-Raman confocal de câncer de mama de 40 casos cirúrgicos. Diferenças importantes foram encontradas entre os espectros de carcinoma ductal infiltrante, hiperplasia e fibroadenoma, o qual foi possível a utilização para caracterização do câncer de mama e outros tumores mamários factíveis de evidenciar características para diagnóstico. Desta forma, a espectroscopia Raman de tecido mamário humano tem grande valor.

Pichardo-Molina e colaboradores (2007) estudaram amostras de soro sanguíneo usando espectroscopia Raman e métodos estatísticos multivariados (PCA e LDA). As amostras de sangue foram obtidas de 11 pacientes que foram clinicamente diagnosticados com câncer de mama e 12 voluntários saudáveis usados como grupo controle. PCA permitiu que fossem definidas diferenças entre os comprimentos de onda entre as bandas espectrais dos pacientes dos grupos controle e câncer de mama. No entanto, desde que as diferenças nas moléculas envolvidas foram em suas estruturas quaternárias, não foi possível determinar qual molécula causou as diferenças nos espectros observados. A relação entre as intensidades das bandas correspondentes foi analisada calculando os valores  $p$  e foram encontrados que somente sete das bandas relacionadas foram significantes e correspondentes a proteínas, fosfolípidios e polissacarídeos. Estas bandas podem ser úteis durante o rastreamento para o câncer de mama usando espectroscopia Raman de amostras sanguíneas. Os resultados também mostraram que as amostras de sangue de pacientes com câncer de mama e de pacientes do grupo controle podem ser diferenciadas quando o LDA é aplicado aos respectivos espectros Raman.

Rehman e colaboradores (2007) descreveram um método não-destrutivo de análise de espécimes histopatológicas empregando espectroscopia Raman. A espectroscopia Raman permite uma análise qualitativa das mesmas amostras que são usadas para avaliação histopatológica. Os tecidos de câncer de mama foram analisados para

demonstrar que é possível caracterizar as alterações químicas antes que o tecido biológico pareça alterado. Estas alterações são identificadas precisamente, e os resultados são reprodutíveis. A análise Raman das secções de tecidos promove espectros distintos que podem ser usados para distinguir entre as graduações nucleares dos carcinomas ductais *in situ* (CDIS) e carcinomas ductais infiltrantes (CDI) da mama. Sessenta casos de câncer de mama incluindo CDIS e CDI e sete casos de mama normal foram estudados por espectroscopia Raman. Neste estudo, Rehman e colaboradores reportaram pela primeira vez as diferenças espectrais entre as diferentes graduações de Carcinomas ductais *in situ*. Por meio deste estudo, foi possível concluir que a espectroscopia Raman pode objetivamente distinguir entre as graduações de CDIS e de CDI de maneira não destrutível e reprodutível. Poderia ser possível utilizar a espectroscopia Raman futuramente como método informativo e qualitativo para classificação e diagnóstico dos diferentes graus dos carcinomas mamários.

### **Espectroscopia Raman *in vivo*: desenvolvimento tecnológico e aplicações experimentais em tecido cutâneo e ósseo**

Baraga e colaboradores (1992) demonstraram a aplicabilidade de um sistema Raman Dispersivo no infravermelho próximo (NIR) com detector CCD para coletar espectros do tecido arterial humano intacto. Utilizando laser de excitação em 810 nm, a emissão de fluorescência da artéria foi suficientemente fraca e permitiu coletar mais rapidamente os espectros Raman em relação ao espectrômetro FT-Raman que utiliza laser de excitação em 1064 nm. Para remoção do background de fluorescência foi apresentado o método que obteve os espectros Raman a partir da diferença entre dois espectros de emissão coletados em frequências ligeiramente diferentes de excitação. Neste estudo, indicaram que os espectros Raman (NIR) podem ser coletados em um segundo com a utilização do sistema de espectrógrafo/CCD, e quando associados a uma fibra óptica possibilitam aplicações clínicas.

Williams e colaboradores (1993) avaliaram por Espectroscopia Raman *in vitro* e *in vivo* o estrato córneo humano utilizando o sistema FT-Raman. Demonstraram que os espectros Raman podem ser relativamente

insensíveis ao estado de hidratação do estrato córneo (por terem sido usados cadáveres?), indicando que a técnica deve ser valiosa para monitorar a entrega de drogas em soluções aquosa. Para coleta *in vivo*, foram utilizados tipos diferentes de instrumentos de Raman (micro-sonda para excitação em visível-luz (Raman Dispersivo) e para FT-Raman). O sistema de FT-Raman forneceu espectros de boa qualidade, mas sistemas Dispersivos devem ser aqueles que serão aplicados por especialistas clínicos.

Caspers e colaboradores (1998) afirmaram que as técnicas não-invasivas que fornecem informações detalhadas sobre a composição molecular, a estrutura, e as interações moleculares são cruciais para a compreensão da relação das alterações bioquímicas nas doenças da pele. Neste estudo foi desenvolvido um sistema Micro-Raman para a coleta de espectros da pele humana tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estes espectros forneceram informações sobre a composição molecular das diferentes camadas da pele. A evidência foi encontrada pela existência de uma variação grande no índice de lipídios do estrato córneo em relação às outras camadas. Os espectros Raman *in vivo* foram coletados em posições diferentes do braço e da mão de três voluntários, e forneceram informações sobre o fator natural de hidratação (*moisturizing natural factor* –MNF).

Mahadevan-Jansen e colaboradores (1998) tiveram por objetivo desenvolver uma ponta de fibra óptica compacta para medir espectros Raman *in vivo* tecido cervical humano para o diagnóstico clínico de lesões pré-cancerígenas. Esta sonda Raman foi projetada, construída e testada primeiramente usando padrões Raman previamente conhecidos (medidos *in vitro*), e posteriormente usada para adquirir espectros *in vivo* do tecido cervical normal e pré-canceroso. Estes espectros puderam ser adquiridos em 90 segundos. Embora algum sinal da sílica oriundo da fibra óptica pudesse obscurecer sinal Raman abaixo de  $900\text{ cm}^{-1}$ , as características Raman do tecido cervical puderam claramente ser discernidas acima de  $900\text{ cm}^{-1}$ . O sucesso da utilização da sonda óptica para aquisição dos espectros Raman *in vivo* indica que podem ser medidos tecidos *in vivo*, e que aumentando a

potência da excitação da fonte pode ser reduzido o tempo de integração para menos de 20 segundos.

Shim e Wilson (1998) desenvolveram um sistema Raman *in vivo* (IVRS - Espectroscopia Raman *in vivo*) compacto e móbil para obter espectros de tecido em menos de 30 segundos, apropriado para aplicações clínicas. Foram apresentados neste estudo os principais componentes deste sistema, tais como o espectrógrafo, o detector CCD, o laser de diodo, e as pontas de fibra-óptica. Os métodos da calibração do número de onda, correção da intensidade e subtração da linha de base foram esboçados. Os espectros *in vivo* foram coletados da pele humana, da mucosa oral, unha e dente, sendo apresentados as principais atribuições de bandas Raman. O desempenho do IVRS foi comparado ao sistema FT-Raman. Com parâmetros similares da coleta, os espectros de IVRS tiveram relação S/N superiores devido ao menor comprimento de onda do laser de excitação (785 nm contra 1064 nm).

Shim e colaboradores (1999) utilizaram um espectrômetro Raman associado a uma fibra óptica para coleta de espectros em menos de 30 segundos. Os detalhes espectrais foram limitados pelo sinal de fluorescência e pelo sinal de Raman gerados pela própria fibra-óptica. Neste estudo, projetaram uma nova fibra-óptica para suprimir estes sinais. Os filtros incluídos nesta ponta de prova otimizaram a eficiência da coleção dos espectros Raman. A resposta da fibra foi testada com medidas no ar, na água, e em meios turvos. Espectros de pele de coelho foram coletados também com estas pontas de prova para demonstrar seu desempenho.

Bakker Schut e colaboradores (2000) investigaram o potencial da espectroscopia *in vivo* no diagnóstico de tecido normal e displásico. Para tanto foi utilizada indução de displasia química em modelo animal. Os espectros Raman *in vivo* foram coletados do palato normal e displásico do rato, com tempos de integração de 100 segundos. Foram usados modelos de classificação baseados em métodos estatísticos multivariados. Foi possível distinguir os espectros *in vivo* de tecido normal, displasia de baixo grau e displasia de alto grau (ou carcinoma *in situ*) com especificidade de 93 % e

sensibilidade de 78 %, e 100 % de sensibilidade e especificidade para diagnóstico entre displasia de baixo grau e alto grau (carcinoma *in situ*).

Buschman e colaboradores (2000) apresentaram resultado de coleta de espectros Raman *in vivo* intravenoso, em que fibra-óptica dedicada e miniaturizada foi usada para esta finalidade. Os resultados mostraram que existem alguns obstáculos importantes para aplicação clínica da espectroscopia Raman no diagnóstico de placas ateroscleróticas, sendo os principais a coleta de espectros Raman *in vivo* intravenosos de alta qualidade e a separação das contribuições do sinal Raman da parede do vaso e do sangue. Informações sobre a composição química do vaso sanguíneo foram adaptadas por meio da aplicação de método de análise estatística aos espectros, eliminando as contribuições do sinal do sangue.

Casper e colaboradores (2000) utilizaram um Micro-espectrômetro Raman confocal automatizado para adquirir de maneira rápida os perfis moleculares da pele. Foi possível obter espectros Raman em uma escala de profundidades abaixo da superfície da pele com definição axial confocal, determinando perfis de concentração da água do estrato córneo.

Halon e colaboradores (2000) revisaram neste artigo a base biológica e física da espectroscopia Raman em tecido biológico, avaliando o status atual do campo e explorando as perspectivas futuras. Foi apresentada a evolução das técnicas de espectroscopia Raman na biologia e na medicina, em relação às pesquisas usando excitação visível à infravermelho- próximo. Revisados os métodos de análise espectral por meio de técnicas estatísticas multivariadas para extrair a informações químicas e morfológicas com finalidade diagnóstica. Finalmente, foram descritas e discutidas as possibilidades de aplicações da espectroscopia Raman em diversas aplicações clínicas, em diferentes tecidos.

Huang e colaboradores (2001) desenvolveram e testaram a aplicabilidade de um espectrômetro Raman Dispersivo associado a uma fibra óptica para analisar a pele humana de maneira não-invasiva. Na configuração desenhada, foi possível obter espectros Raman em menos de 1 segundo, com

boa relação S/N, livres da interferência da fluorescência e do sinal Raman da fibra, que facilita extremamente a caracterização prática do tecido para o diagnóstico clínico.

Pilloto e colaboradores (2001) afirmam que a acumulação do ácido láctico no corpo humano é um dos fatores que conduz à fadiga e conseqüentemente deve continuamente ser monitorado durante o treinamento físico. A proposta desse grupo é desenvolver um espectrômetro Raman que seja capaz de monitorar o ácido láctico de um atleta sem interromper seu exercício para a coleta da amostra. Como início do desenvolvimento deste projeto, foram medidos espectros Raman para verificar a presença do ácido láctico em soluções de ácido láctico e soro humano e soluções de ácido láctico e sangue de rato de Wistar. Para o experimento *in vivo*, um cateter da fibra ótica tocou a pele do rato, sobre a veia ilíaca, onde foram coletados os espectros de maneira não invasiva e transcutaneamente. A concentração mínima do ácido láctico que o equipamento pode detectar foi estudada também. Os resultados indicaram que a técnica pode ser apropriada para a avaliação física dos atletas.

Uttinger e colaboradores (2001) avaliaram o potencial da espectroscopia Raman NIR *in vivo* para detecção de displasia escamosa. Foram coletados espectros *in vivo* em três locais distintos no cervix: com auxílio do exame de colonoscopia, foram adquiridos espectros de uma área clinicamente normal e outro espectro na área clinicamente alterada. Ambas regiões foram biopsiadas para confirmação diagnóstica. Vinte e quatro espectros foram coletados em cada uma das 13 pacientes. Os espectros de cervix humana apresentaram picos na região de 1070, 1180, 1195, 1210, 1245, 1330, 1400, 1454, 1505, 1555, 1656 e 1760  $\text{cm}^{-1}$ . A relação das intensidades em 1454 a 1656  $\text{cm}^{-1}$  se mostrou maior na displasia escamosa em relação aos outros tipos espectrais; enquanto as relações entre as das intensidades em 1330 a 1454  $\text{cm}^{-1}$  foram menores. Um algoritmo simples baseado nestas relações de duas intensidades pôde classificar a displasia escamosa de alto grau dos outros tecidos.

Bakker Schut e colaboradores (2002) discutem que a aplicabilidade da técnica Raman em ambiente clínico também deve considerar o desenvolvimento de uma rotina dedicada capacitada em processar e analisar os espectros Raman permitindo que parâmetros clínicos relevantes também possam ser extraídos em tempo real. Neste estudo, propuseram o uso de uma rotina dedicada que permitiu processar e analisar os espectros Raman em tempo real. O programa utilizado para elaboração da rotina foi o Matlab e a execução para a classificação dos espectros de pele humana coletada *in vivo* usou PCA e LDA como algoritmo matemático de classificação.

Choo-Smith e colaboradores (2002) apresentaram uma discussão sobre o status atual da aplicação da espectroscopia Raman *in vivo*, assim como as dificuldades que ainda necessitavam de empreendimento para que a técnica pudesse ser aplicável em ambiente clínico (laboratório médico ou centros cirúrgicos). Foi realizada uma pesquisa sobre a opinião de médicos e da equipe de apoio em relação ao potencial da espectroscopia Raman como uma nova ferramenta biomédica. Por meio dos resultados foi possível vislumbrar propostas para a execução clínica destas técnicas

Gellermann e colaboradores (2002) utilizaram Raman Dispersivo Ressonante para como uma nova, não-invasiva técnica óptica para medir a concentração de pigmentos maculares da retina humana *in vivo* de adultos jovens e idosos. Por meio da geometria de *backscattering* e da excitação em comprimento de onda visível, foi possível medir os sinais de Raman originários de uma única vibração do estiramento da espinha dorsal do carbono da molécula *p-conjugated* do carotenóide. Para esse experimento, a excitação requerida do laser esteve bem abaixo dos limites de segurança para a exposição macular. Como resultado foi possível observar que sinais Raman declinam significativamente com idade crescente nos olhos normais. A técnica de Raman é objetiva e pode conduzir a um método novo para a seleção rápida de níveis do pigmento em populações grandes em risco para a perda da visão por degeneração macular relacionada à idade, a causa principal de perda da visão em pessoas idosas nos Estados Unidos.

Kaminaka e colaboradores (2002) desenvolveram um detector multicanal de InP/InGaAsP para Espectroscopia Raman NIR que pudesse medir tecidos humanos eficientemente sem interferência da fluorescência. Este detector permitiu espectros *in vivo* de tecido humano vivo (pele) com auxílio de fibra-óptica. Foram também coletados espectros *in vivo* de tecido pulmonar humano, onde foi possível classificar os espectros de tecido pulmonar normal e dois tipos de carcinoma de pulmão. Os resultados indicaram um futuro promissor da espectroscopia Raman *in vivo* para o diagnóstico minimamente invasivo e em tempo real.

Knudsen e colaboradores (2002) examinaram as variações dos espectros FT-Raman *in vivo* de pele humana saudável. A variação entre pessoas, a variação entre pontos diferentes na mesma região do corpo e a variação nos espectros obtidos no mesmo ponto foram estudadas em 13 voluntários. Em 140 voluntários foram examinadas as variações dos espectros Raman causadas pela pigmentação da pele. As análises foram concentradas nos números de onda e as intensidades relativas da água em  $3250\text{ cm}^{-1}$ , Amida I, Amida III, nas regiões em  $1645\text{-}1680$  e  $1230\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ , e nos números de onda nas regiões em  $1450$  e  $2940\text{ cm}^{-1}$ , usadas como referências. Os resultados mostraram que houve variação interpessoal em relação à intensidade relativa da água. Na intensidade relativa da Amida I houve uma variação entre as pessoas e entre as medidas repetidas no mesmo ponto. Entre pessoas, a variação pôde levantar as diferenças entre a hidratação e as proteínas, mas foi difícil explicar a razão desta variação quando as medidas repetidas foram feitas no mesmo ponto. As variações na intensidade relativa da Amida III foram observadas entre os indivíduos, provavelmente por causa da estrutura diferente do colágeno. A pigmentação não influenciou o número de onda ou intensidades consideravelmente, mas uma análise dos espectros por regressão mostrou uma correlação entre a altura das bandas Raman e o background de pigmentação.

Barros e colaboradores (2003) afirmaram que o uso da espectroscopia Raman no infravermelho pode vir a constituir uma nova técnica para avaliação física, permitindo medidas da concentração de ácido láctico em

sangue e em músculo esquelético, por um método não invasivo. A espectroscopia Raman é uma técnica que oferece grande riqueza de detalhes provida pela vibração de moléculas em diferentes níveis de energia. Em estudos prévios, foram obtidos espectros Raman de ácido láctico em plasma humano e em sangue de rato, onde os picos característicos foram observados claramente na matriz biológica. No presente estudo a espectroscopia Raman foi usada para a identificação de ácido láctico em músculo tibial de rato. Foi usado um laser de Ti:Safira sintonizado em 830nm, um espectrômetro Kaiser f/l.8 e um detector de CCD refrigerado. O espectro Raman do ácido láctico apresenta oito picos bem distintos, entre 700 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo aos diferentes modos de vibração da molécula do ácido láctico. O pico principal em 830  $\text{cm}^{-1}$  foi usado para caracterizar a presença do ácido láctico no músculo tibial de rato. Foram analisados espectros Raman de músculos tibiais *in vivo* e *in vitro*. Além disso, também foi monitorada a difusão do ácido láctico através do músculo, *in vitro*. Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos, que a espectroscopia Raman no infravermelho próximo apresenta grande potencial para, no futuro, com o aperfeiçoamento da técnica, ser utilizada em avaliações físicas com o intuito de permitir medições das concentrações de ácido láctico no músculo esquelético, através de metodologia não invasiva.

Caspers e colaboradores (2003) descreveram a combinação das técnicas Raman *in vivo* associada à microscopia para permitir que a morfologia da pele seja visualizada em profundidade para medidas Raman. Os resultados desta combinação mostraram imagens da seção transversal e perfis da concentração da água e do fator de hidratação natural do estrato córneo relacionados diretamente à arquitetura da pele. Foi possível distinguir as imagens de obtidas por Raman *in vivo* dos ductos sudoríparos e das glândulas sebáceas. Nas medidas *in vivo* em capilares da derme, foi possível obter espectros de alta qualidade do sangue em uma maneira completamente não-invasiva. Dos resultados deste estudo pôde ser explorado que a técnica apresentada tem o potencial para a pesquisa fundamental da pele, em farmacologia (transporte percutâneo), em dermatologia clínica, pesquisa cosmética, assim como análise não-invasiva de compostos sanguíneos, como a glicose.

Molckovsky e colaboradores (2003) avaliaram o potencial diagnóstico da espectroscopia Raman NIR em distinguir pólipos adenomatosos e hiperplásicos durante uma endoscopia. Foram coletados espectros Raman dos pólipos dois pontos por meio de um espectrômetro dedicado associado a um endoscópio. As técnicas estatísticas multivariadas, PCA e LDA foram usadas desenvolver algoritmos diagnósticos para classificar os pólipos adenomatosos e hiperplásicos baseados em suas características espectrais, e validados pelo método cross-validation leave-one-out. Foram obtidos 20 espectros Raman de pólipos hiperplásicos e 34 de pólipos adenomatosos. Os espectros foram classificados com 91 % de sensibilidade, 95 % de especificidade e 93 % de acurácia. A nosso conhecimento, esta foi a primeira demonstração do potencial da espectroscopia Raman para o diferenciação entre pólipos colônicos durante uma endoscopia.

Huang e colaboradores (2004) adquiriram, de maneira bem sucedida, espectros Raman *in vivo* da melanina de pele humana utilizando um espectrômetro NIR-Raman. Os sinais Raman *in vivo* da melanina cutânea observados foram similares aos observados dos espectros de eumelanina natural e sintética. O espectro da melanina é dominado por dois modos vibracionais intensos e largos em 1580 e 1380  $\text{cm}^{-1}$ , os quais podem ser interpretados como originários do estiramento “em plano” do anel aromático e estiramento linear da ligação C—C dentro do anel, juntamente com algumas contribuições da vibração C—H dos grupos metil e metileno. Variações nas frequências dos picos e larguras de banda destes dois sinais Raman, devido aos diferentes ambientes biológicos, puderam ser observadas na melanina das diferentes fontes. A habilidade de adquirir o único espectro da melanina coletado *in vivo* sugere que a espectroscopia Raman pode ser utilizada como método clínico não-invasivo para análise e diagnóstico *in situ* da pele.

Darvin e colaboradores (2005) utilizaram a espectroscopia Raman Ressonante como um método óptico rápido e não-invasivo para medir as concentrações absolutas do  $\beta$ -caroteno e do licopeno pele humana *in vivo*. O  $\beta$ -caroteno e o licopeno têm valores diferentes de absorção (488 e 514,5 nm) e, conseqüentemente, as linhas de Raman têm eficiências

diferentes nas excitações em 488 e 514,5 nm. Estas diferenças foram usadas para a determinação das suas concentrações. Os espectros Raman foram caracterizados por duas linhas Stokes em 1160 e 1525  $\text{cm}^{-1}$ , que tiveram intensidades relativas quase idênticas. Ambas as substâncias foram detectadas simultaneamente. Os espectros Raman foram obtidos em aproximadamente 10 segundos, e do nível de exposição requerido do laser de excitação esteve dentro dos padrões de segurança. As concentrações do  $\beta$ -caroteno e do licopeno da pele forma mais baixas em fumantes em relação aos não-fumantes e ainda mais baixas no grupo vegetariano.

Draper e colaboradores (2005) avaliaram a qualidade óssea por meio da análise dos espectros Raman transcutâneos das fases minerais e orgânicas do osso. Esses espectros foram obtidos, pela primeira vez, pela análise do osso abaixo de pele, sendo eliminado todos os componentes espectrais dos tecidos subjacentes. O laser de excitação estava centrado em 800 nm (pulsos de 1-kHz, de 1 picosegundo) com aproximadamente 4 picosegundos de excitação. Foram coletados espectros dos ossos em um ponto a 2 mm acima do carpo de dois tipos rato geneticamente distintos, com diferenças extremas na qualidade da matriz do osso. As características espectrais principais estavam presentes em ambas as fases do osso. As faixas espectrais estavam em relações similares quando medidas através da pele ou diretamente do osso (em ambos os genótipos). Esta técnica permitiu que, pela primeira vez, fizessem medidas espectrais transcutâneas objetivas do mineral e das fases orgânicas dos ossos e distinguir entre tecido ósseo normal e alterado.

Enejder e colaboradores (2005) relataram pela primeira vez um estudo bem sucedido na caracterização por espectroscopia Raman transcutânea da concentração de glicose no sangue. Foram utilizados 17 indivíduos saudáveis cujos os níveis de glicose foram elevados por um período de 2 a 3 horas usando um protocolo padrão do teste da tolerância de glicose. Durante o teste, 461 espectros Raman foram coletados transcutaneamente junto com os valores de referência de glicose fornecidos pela análise capilar padrão do sangue. A calibração dos espectros Raman foi realizada pelo

método qui-quadrado e classificados pelo método leave-one-out cross validation. O espectro da glicose é uma parte importante das calibrações pela análise dos vetores da regressão da calibração.

Motz e colaboradores (2005) apresentaram um espectrômetro Raman para aquisição de espectros in vivo em menos de 2 segundos. Esta foi a primeira demonstração de aquisição de espectro seguidos de análise e diagnóstico simultâneos. O instrumento foi projetado trabalhar com cateteres ópticos específicos para Raman, e incluiu programas com rotinas dedicadas (LabVIEW e Matlab) para fornecer a calibração, a análise, e o diagnóstico espectral exatos, associados à segurança relacionadas à exposição do laser. As potencialidades do sistema Raman em tempo real foi demonstrado durante cirurgias de lumpectomia femoral. Tal sistema facilitará extremamente a adoção da espectroscopia Raman na pesquisa e na prática clínica.

Haka e colaboradores (2006) apresentaram pela primeira vez a coleta de espectros Raman in vivo de tecido mamário com finalidade de diagnóstico de câncer de mama. Foram coletados 31 espectros Raman de nove pacientes que submeteram a procedimentos de mastectomia parciais para a avaliação da margem da lesão durante a cirurgia. A aplicação de algoritmo diagnóstico previamente desenvolvido resultou em sensibilidade e especificidade adequados para distinguir tecidos cancerosos de tecidos benignos e normais. Estes resultados sugerem que a espectroscopia Raman tem o potencial diminuir a necessidade de cirurgias de ressecção das margens positivas e reduzir desse modo a taxa de recidiva do câncer de mama em cirurgias de mastectomia parciais.

Matousek e colaboradores (2006) relataram a aquisição de espectros Raman transcutâneo de osso para construção de imagem em níveis. Os espectros da falange distal do polegar foram obtidos usando espectroscopia Raman com resolução espacial que forneceram informação quimicamente específica sobre as camadas profundas de tecido humano. Esta técnica baseou-se na coleta de espectros Raman longe do ponto da iluminação do laser de excitação por meio da utilização de anéis concêntricos de fibras ópticas.

Motz e colaboradores (2006) caracterizaram por espectroscopia Raman *in vivo* em tempo real a camada aterosclerótica de artérias calibrosas. Foram examinadas espectroscopicamente 74 pontos durante cirurgias de endarterectomia da artéria femoral. Destes, 34 pontos foram biopsiados e examinados histopatologicamente. Espectros com relação S/N excelentes em 1 segundo, demonstrando a caracterização exata do tecido examinado. Foi relatado o potencial da espectroscopia Raman em identificar vulnerabilidade da artéria, conseguindo uma sensibilidade e uma especificidade de 79 % e de 85 % respectivamente, mostrando sua capacidade em diagnosticar doenças vasculares.

Schulmerich e colaboradores (2006) demonstraram a possibilidade de aquisição de espectros Raman transcutâneo de osso com auxílio de uma fibra óptica contendo uma fonte de excitação circular de um *laser* @785 nm circundada por uma série de fibras coletoras circulares. A configuração do cateter óptico promoveu distribuição da luz *laser*. A fibra guia do *laser* de excitação estava localizada de 2 a 3 mm além do limite do campo de visão das fibras coletoras para rejeitar contribuições da pele e de outros tecidos adjacentes. Os dados apresentados foram provenientes de tecidos de rato e de frango. Para a tíbia dos ratos, a razão carbonato/fosfato medido a uma profundidade de 1 mm abaixo da pele foi calculada para um erro de 2,3 % em um tempo de integração de 120 s e de 10 % em 30s de integração. Para as tíbias de frango, esta mesma razão foi encontrada para 4 mm abaixo da superfície da pele com erro menor que 8 % com 120 s de tempo de integração.

Stuart e colaboradores (2006) pela primeira vez demonstraram a capacidade e a reprodutibilidade da técnica SERS em medir quantitativamente glicose *in vivo* em modelo animal. Uma monocamada de prata sobre a superfície externa de nanoesferas foi funcionalizada e implantada subcutaneamente em um rato Sprague Dawley. A concentração de glicose do líquido intersticial pôde ser medida espectroscopicamente quando dirigindo o sensor através de uma janela óptica. As medidas do sensor tiveram o erro relativamente baixo (RMSEC) de 7,46 mg/dL (0,41 mm) e (RMSEP) 53,42 mg/dL (2,97 mm).

Huff e Chen (2007) construíram a imagem óptica não-linear do tecido nervoso ciático de rato a partir dos espectros obtidos pela técnica CARS e microscopia obtida por espectros construídos com sinais gerados pela segunda harmônica. Foi necessária uma pequena cirurgia incisiva para que o tecido nervoso fosse exposto, para que fossem coletados os sinais CARS de axônios mielinizados e a imagem microscópica pela segunda harmônica das fibras de colágeno circunvizinhas. Os sinais coletados tiveram qualidade S/N e definição espacial tridimensional. O contraste obtido pela técnica CARS aplicado ao tecido nervoso se mostrou capaz de construir imagens tridimensionais.

Matousek (2007) revisou sistematicamente os estudos que descreveram aplicações das técnicas emergentes de espectroscopia Raman *in vivo* mínima ou não-invasiva. Associados as ferramentas analíticas genéricas, os métodos de espectroscopia Raman puderam ser aplicados a diversas finalidades, incluindo diagnóstico de diversas patologias, avaliarem de maneira não-invasiva do controle de qualidade produtos farmacêuticos.

Shim e colaboradores (2007) relataram a aquisição de espectros Raman *in vivo* de tecido gastrointestinal durante um procedimento de endoscopia de rotina. Este procedimento foi possível com a associação do cateter óptico do sistema Raman a canaleta do instrumento do endoscópio para ser colocada em contato com a superfície da mucosa gastrointestinal para aquisição dos espectros. Os espectros puderam ser coletados com boa relação S/N com tempo de integração de 5 segundos. Visualmente os espectros Raman de tecido normal e alterado apresentaram diferenças sutis, entretanto, quando aplicados algoritmos de classificação previamente desenvolvidos foi possível classificar esses tecidos. Desta forma, foi possível concluir que a espectroscopia Raman associada ao exame de endoscopia tem a capacidade auxiliar de diagnóstico clínico de alterações do trato gastrointestinal.

Schulmerich e colaboradores (2007) descreveram a capacidade de um cateter óptico construído com 50 fibras de coleta em coletar sinais Raman. A profundidade da captação do sinal Raman e a preservação da

informação espacial do sinal recuperado foram investigadas usando os blocos do polímero empilhados em diferentes geometrias. Os anéis da iluminação foram combinados diferentemente para aumentar a variação no sinal. A análise de dados foi realizada por meio de estatística multivariada para recuperar os espectros Raman dos componentes abaixo da superfície. O polímero teste era composto de Teflon (cobertura) e Delrin (alvo) que poderia ser encontrado até 22,6 mm de profundidade. A informação espacial foi perdida em aproximadamente 6,5 mm abaixo da superfície do Teflon. Os mesmos protocolos de coleta dos sinais Raman foram usados recuperar transcutaneamente espectros de osso canino em profundidades até 5 mm abaixo da superfície da pele. Os espectros recuperados do osso foram validados por medidas obtidas com o osso exposto.

Schulmerich e colaboradores (2008) aumentaram a capacidade de coleta de espectros Raman in vivo transcutâneo de tecido ósseo pela associação de glicerol como um agente de “limpeza/clareamento” óptico. As medidas Raman transcutâneas da tíbia de quatro foram obtidas de cada membro; o glicerol foi aplicado como um agente de “limpeza/clareamento” óptico, e as medidas transcutâneas foram novamente realizadas. O glicerol reduziu o ruído nos espectros ( $p=0,0037$ ) e melhorou significativamente a correlação entre o fator de recuperação dos espectros de tecido ósseo e a medida Raman do osso exposto (referência).

Schulmerich e colaboradores (2008) demonstraram pela primeira vez a capacidade de construção de uma imagem latente tomográfica difusa por meio da recuperação dos espectros Raman. Estes espectros Raman foram coletados de maneira não invasiva, associados à imagem e a composição química do tecido humano e animal e de outros meios turvos. Esta técnica foi aplicada à composição de imagem do tecido ósseo de um membro de cão. A luz de excitação 785 nm foi empregada para impedir os danos térmicos causados ao tecido. A reconstrução difusa tomográfica foi usada, e a posição que foi recuperada foi confirmada por imagens de tomografia computadorizada.

Srinivasan e colaboradores (2008) utilizaram a Espectroscopia Raman Dispersiva como marcador bioquímico para prever a composição do tecido do osso predizendo fratura em osteoporose. A imagem latente da tomografia obtida por espectros Raman foi possível, entretanto a definição espacial ainda foi baixa. Tomografia computadorizada (Raio X) forneceu a imagem em alta resolução usada com orientação para a caracterização dos espectros Raman. Esta hipótese foi testada a partir de espectros obtidos de polímeros construídos de Teflon e osso de cão. A espectroscopia Raman guiada por imagem (IG-RS) do membro do cão auxiliado por imagens de tomografia computadorizada pôde recuperar um contraste de 145:1 entre o osso e o fundo cortical. Menos contraste foi encontrado consideravelmente sem a imagem de Tomografia computadorizada para guiar a recuperação. Este estudo apresentou os primeiros resultados sabidos de IG-RS do tecido ósseo.



## 4 RESULTADOS

4.1 Análise Bioquímica do tecido mamário humano usando espectroscopia Raman com transformada de Fourier (Anexo B).

*Biochemical analysis of human breast tissues using  
Fourier-transform Raman spectroscopy*

**Jounal of Biomedical Optics**, 11(5), 054001, 2006.

Renata Andrade Bitar, Airtton Abrahão Martin  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911,  
12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Carlos Julio Tierra-Criollo  
Departamento de Engenharia Elétrica, Grupo de Engenharia Biomédica,  
Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-010, Minas Gerais, Brasil.

Leandra Náira Zambelli Ramalho  
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP,  
Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Mário Mourão Netto  
A.C. Camargo Hospital - Hospital do Câncer. Rua Prof. Antonio Prudente, 211  
01509-010, São Paulo, Brasil.

Herculano da Silva Martinho  
Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua  
Catequese 242, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brasil.

4.2 Avaliação por Espectroscopia FT-Raman do tecido mamário da margem ressectiva de carcinoma infiltrante (Anexo C)

*FT-Raman Spectra of the Border of Infiltrating Ductal*

*Carcinoma Lesions*

**Photomedicine & Laser Surgery**, v.25, n.5, 2007.

Ana Carolina de Miranda Marzullo, Osmar Pinto Neto, Renata Andrade Bitar,  
Airtton Abrahão Martin  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911,  
12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Herculano da Silva Martinho  
Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua  
Catequese 242, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brasil.

4.3 Extração sistemática de DNA de CDI mamário para caracterização por Espectroscopia Raman (Anexo D)

*DNA Extraction Systematics for Spectroscopic Studies*

**Sensors** 2008, 8, 3624-3632; DOI: 10.3390/s8063624.

Bianca Fogazza Palma, Herculano da Silva Martinho  
Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua Catequese 242, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brasil.

Renata Andrade Bitar, Airton Abrahão Martin, Amanda Borges Ferrari, Maria Angélica Gargione Cardoso  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

4.4 Avaliação de extensão da lesão de Carcinoma mamário em modelos animal por Espectroscopia Raman Dispersivo transcutânea (Anexo E)

*In vivo Raman spectroscopy for breast cancer:  
diagnosis in animal model.*

**Biomedical Optical Spectroscopy**, edited by Anita Mahadevan-Jansen, Wolfgang Petrich, Robert R. Alfano, Alvin Katz, Proc. of SPIE Vol. 6853, 68530O, (2008) 1605-7422/08/\$18 doi: 10.1117/12.760089  
**Proc. of SPIE Vol. 6853 68530O-1, 2008.**

Renata Andrade Bitar, Mário Augusto Martins, Dayana Gonçalves Ribeiro, Carolina da Silva Carvalho, Edson Aparecido Pereira dos Santos, Airton Abrahão Martin  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Leandra Náira Zambelli Ramalho, Fernando da Silva Ramalho  
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Herculano Da Silva Martinho  
Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua Catequese 242, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brasil.

4.5 Discriminar por FT-Raman *ex vivo* e exame MMP19 os tipos histológicos de tecido mamário em Ratos Sprague-Dawley fêmeas submetidas a carcinogênese química (Anexo F)

*Raman spectroscopy and imunohistochemistry for aggressiveness prediction of histological subtypes of breast adenocarcinoma.*

Artigo submetido: revista internacional indexada *Qualis A: Journal of Biomedical Optics* (fator de impacto 3,0).

Renata Andrade Bitar, Mário Augusto Martins, Dayana Gonçalves Ribeiro, Edson Aparecido Pereira dos Santos, Kumiko Koibuchi Sakane, Airton Abrahão Martin

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Leandra Náira Zambelli Ramalho, Fernando da Silva Ramalho  
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Herculano da Silva Martinho  
Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua Catequese 242, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brasil.

4.6 Raman transcutâneo *in vivo* no diagnóstico do Adenocarcinoma Mamário em modelo animal (Anexo G)

*In vivo transcutaneous Raman spectroscopy in mammary adenocarcinoma diagnosis.*

Artigo submetido: revista internacional indexada *Qualis A: The Analyst* (fator de impacto 3,198).

Renata Andrade Bitar, Mário Augusto Martins, Dayana Gonçalves Ribeiro, Edson Aparecido Pereira dos Santos, Kumiko Koibuchi Sakane, Airton Abrahão Martin  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Leandra Náira Zambelli Ramalho, Fernando da Silva Ramalho  
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Herculano da Silva Martinho  
Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua Catequese 242, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brasil.



## 5 DISCUSSÃO

Referir-se a aplicação da espectroscopia Raman em tecidos biológicos é explorar um campo de pesquisa muito recente, de 20 anos aproximadamente, que somente dos nos últimos dois anos pode realmente iniciar suas verdadeiras explorações potenciais. A espectroscopia Raman tem sido aplicada por muitos anos, principalmente a partir da década de 60, quando a essa técnica foi associado o *laser* como fonte de excitação Raman. A partir de então, inúmeras possibilidades foram abertas e o desenvolvimento tecnológico tomou parte importante das publicações nesta área. A partir da década de 90, os estudos por espectroscopia Raman em tecidos biológicos de caracterização foram iniciados, embora muito conhecimento sobre as propriedades ópticas dos tecidos biológicos já havia sido adquirido por meio da aplicação da espectroscopia de absorção no infravermelho. A principal vantagem da espectroscopia Raman frente à espectroscopia de absorção no Infravermelho é a possibilidade de aplicação *in vivo*, pois a água não interfere negativamente nos sinais. Desta forma, quando detectores dedicados e *lasers* na região do visível e infravermelho próximo puderam servir para essa aplicação, a espectroscopia Raman tornou-se uma ferramenta potencial de análise biológica para fins diagnósticos. Durante os últimos 10 anos houve muita dedicação em firmar a espectroscopia Raman como ferramenta diagnóstica para diversos tipos de espécies, bactérias, animais e humanos, e classificação de tecidos normais e doenças associadas. Dentro deste tema, discutiu-se bastante sobre as possíveis aplicações das diversas técnicas Raman e seus equipamentos, como Micro-Raman, Raman *in vivo*, CARS e SERS, veiculando a aplicabilidade dos espectros na elucidação dos fenômenos bioquímicos difíceis de serem monitorados pela dificuldade de se trabalhar com amostras complexas.

A caracterização das alterações bioquímicas dos espectros FT-Raman de nove tipos histológicos associados ao tecido mamário humano foi primeiramente evidenciada quando foram observados os espectros médios dos grupos histopatológicos encontrados (mama normal, condição fibrocística, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal *in situ* comedo, carcinoma ductal

infiltrante sem tipo específico, carcinoma ductal infiltrante inflamatório, carcinoma ductal infiltrante medular e carcinoma ductal infiltrante mucinoso) normalizados por meio do pico  $1446\text{ cm}^{-1}$ . Todos os grupos apresentaram praticamente o mesmo número de bandas características, entretanto puderam diferenciar o tecido normal dos tecidos patológicos por meio das alterações de intensidade (aumento ou diminuição) relativas de algumas destas bandas, como também observados por diversos autores (ALFANO et al., 1991; FRANK et al., 1995; PAPPAS et al., 2000; SHAFER-PELTIER et al., 2002; HAKA et al., 2002; STONE et al., 2004; BITAR et al., 2005; YANG et al., 2006). Por meio destas observações foi possível construir uma tabela de referência descrevendo 12 dos principais modos vibracionais observados nestes espectros médios. Estas frequências foram obtidas após a deconvolução de cada um destes espectros. Estes resultados foram confrontados aos dados da literatura, e dessa forma, foi possível atribuir cada modo vibracional a uma molécula específica (ALFANO et al., 1991; FRANK et al., 1995; PAPPAS et al., 2000; SHAFER-PELTIER et al., 2002; HAKA et al., 2002; STONE et al., 2004; BITAR et al., 2005; YANG et al., 2006). A construção desta tabela permitiu executar uma análise bioquímica qualitativa dos tecidos mamários humanos normais e patológicos, e confrontar objetivamente os dados espectroscópicos aos dados histopatológicos.

O tecido mamário normal apresentou bandas Raman fortes em  $1270$ ,  $1304$ ,  $1446$ ,  $1657$  e  $1747\text{ cm}^{-1}$  identificando a quantidade grande de lipídios nestes tecidos. Esses modos vibracionais estão relacionados aos estiramentos CN, CC e CO e o dobramento  $\text{CH}_2$ . Redd e colaboradores (1993) identificaram diferenças entre a concentração de lipídios e caroteno no tecido mamário por espectroscopia Raman. Neste estudo, mostraram que estas bandas se apresentam mais intensas no tecido normal e menos intensas nos fibroadenomas e carcinomas, propondo que estas diferenças espectrais podem promover o diagnóstico diferencial.

Histopatologicamente, os tecidos malignos estudados apresentaram alterações bioquímicas marcantes em relação ao tecido normal: presença de necrose, inflamação, presença de cisto, variação do conteúdo de

DNA e principalmente aumento do conteúdo de colágeno. Quando foram comparados os tecidos mama normal, carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal infiltrante, as alterações espectrais indicaram fortemente a alteração do conteúdo de colágeno. Na região de deslocamento Raman entre 800 e 1400  $\text{cm}^{-1}$  foram indicados os modos vibracionais referentes aos aminoácidos prolina, valina, glicina e fenilalanina, que constituem a estrutura primária do colágeno (LEHNINGER et al., 2004). Estes modos vibracionais se apresentaram desobstruídos favorecendo o aumento da intensidade destas bandas no tecido tumoral, especialmente quando o carcinoma se tornou infiltrante. A origem da variação de intensidade destas bandas está relacionada provavelmente ao conteúdo de colágeno nos diferentes tecidos (HELLMAN et al., 2004). Além disso, o aumento do conteúdo de colágeno nos carcinomas foi descrito em pele (HATA et al., 2000), pulmão (KAMINAKA et al., 2001), mama (ELMORE et al., 1998) devido a ocorrência da reação desmoplásica, também conhecida como fibrose reativa, onde a deposição de colágeno é abundante e ocorre como resposta do estroma a invasão o câncer. Assim, os espectros Raman do carcinoma ductal infiltrante mostrou as bandas de prolina, valina, glicina e fenilalanina mais intensas em relação aos outros tecidos (STONE et al., 2004). Considerando que o carcinoma ductal infiltrante é o carcinoma que mais acomete a mama, o índice relativo de colágeno, determinado pela espectroscopia Raman, poderia ser usado como indicador de patogenia do câncer de mama.

Na região de deslocamento Raman entre 1200 e 1800  $\text{cm}^{-1}$  podem ser encontrados os modos vibracionais referentes à Amida I e Amida III, que correspondem às ligações peptídicas da estrutura secundária de proteínas. Estas bandas também se apresentaram mais intensas nos espectros dos tecidos malignos, especialmente nos tipos infiltrantes. O modo Amida corresponde à vibração de C, O, e os átomos de H no grupo CONH (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994). Mahadevan-Jansen e colaboradores (1996) também observaram estas bandas estudando o papel das proteínas nos tecidos benignos e malignos da mama. Além das diferenças entre os tecidos benignos e malignos, no presente estudo também foi possível verificar que

essas alterações poderiam diferenciar carcinoma *in situ* de infiltrante, além dos subtipos de carcinoma infiltrante.

Quando confrontados os espectros médios dos tecidos de carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal *in situ* comedo e carcinoma ductal infiltrante, foi possível identificar as alterações espectrais referentes ao conteúdo necrótico. Os modos vibracionais em 1304 a 1310, 1446 e 1657 a 1660  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à adenina, citosina, colágeno, lipídios, carboidratos, proteínas e pentoses, respectivamente. Estas bandas são muito similares em relação àquelas descritas por Shafer e colaboradores (2002) que adquiriram espectro de colesterol simulando necrose. As diferenças de intensidade poderiam estar relacionadas à presença de necrose e linfócitos presentes devido ao processo inflamatório ocorrido. Desta forma, estes modos vibracionais poderiam diagnosticar a presença de tecido necrótico no câncer de mama.

Para identificação espectral de conteúdo cístico, foram confrontados os espectros médios de condição fibrocística, carcinoma ductal infiltrante e carcinoma ductal infiltrante mucinoso. As principais alterações foram apresentadas na região de 800 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas ao índice de colágeno (SINGER et al., 1995). As bandas referentes aos carboidratos, presentes no conteúdo da substância amorfa dos cistos, dominaram a região espectral entre 1020 e 1140  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas entre 1065 e 1085  $\text{cm}^{-1}$  foram relacionadas ao estiramento CO do grupo CHOH acoplado ao grupo do CO dos carboidratos. Essas observações favorecem a identificação de cistos em tecido mamário.

Clinicamente, é de imensa importância a diferenciação entre tumores *in situ* e invasivo, pois essa diferença determinará a agressividade do tratamento e prognóstico proposto à paciente. Para demonstrar a capacidade da espectroscopia Raman em diferenciar tecidos malignos *in situ* de infiltrante foram comparados os espectros de tecido mamário normal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal infiltrante e carcinoma lobular infiltrante, relacionando o potencial de invasibilidade à região espectral da cisteína, entre 500 e 580  $\text{cm}^{-1}$ . O pico o mais intenso, em 538  $\text{cm}^{-1}$ , foi relacionado às pontes do bissulfeto

da cistina, apresentando intensidade crescente do tecido normal, carcinoma *in situ* e carcinomas infiltrantes. Thomssen e colaboradores (1995) mostraram que a catepsina lisossomal B e catepsina L (metaloproteínases relacionadas ao tecido epitelial) formadas em grande parte pelo aminoácido cisteína, implicam na propagação e na metástase do tumor. Desta maneira, a variação da intensidade do modo vibracional da cisteína em  $538\text{ cm}^{-1}$  pode ser um excelente indicativo de agressividade do tumor, indicado possibilidade de metástase. Por esta razão, esta região espectral tem o potencial de ser utilizada para o diagnóstico diferencial em tempo real de lesões *in situ* e infiltrantes.

Por meio do presente estudo foi possível estabelecer uma base bioquímica para cada espectro encontrado, que poderá ser útil para o diagnóstico óptico precoce de diversas patologias mamárias. Neste contexto, foi possível identificar e classificar o espectro Raman de tecido mamário da margem ressectiva de CDI em relação aos espectros de Mama Normal e CDI.

Por meio dos resultados da análise estatística multivariada do conjunto de espectros Raman de mama normal e CDI, da região espectral do ente  $500\text{ a }1800\text{ cm}^{-1}$ , foi possível observar dois grupos principais: A (grupo 3) e grupo B, subdividido em 1B e 2B. O grupo 1B mostrou que todos os 26 espectros eram provenientes de tecido normal; o grupo 2B (17 espectros) apresentou espectros de tecido de CDI. O grupo A (3A) compreendeu os 50 espectros remanescentes das amostras de CDI. Interessantemente, os 17 espectros do grupo 2B foram obtidos de amostras da margem de lesão de CDI, como confirmado pela análise histopatológica dos espécimes analisados, que apresentaram segmentos de tecido normal e CDI.

Observando-se a média e o desvio padrão destes três grupos espectrais (Mama Normal 1B, Margem 2B e CDI 3A) é possível inferir que existem grandes diferenças entre eles. O grupo 1B apresenta intensidade média mais elevada, enquanto os espectros do grupo 3A foram menos intensos. O grupo 2B apresentou características mais marcantes relativas ao grupo 1B, exceto pelo aparecimento do pico em  $538\text{ cm}^{-1}$ . Como descrito anteriormente, este pico pode estar relacionado às pontes de dissulfeto da

cisteína (BITAR et al., 2006). A análise bioquímica, por meio da observação dos espectros Raman, confirma que nos tecidos de margem há conteúdo de cisteína intermediário, comparado ao tecido normal que não apresenta praticamente esse pico e ao CDI que o apresenta mais intenso. Esses resultados parecem fornecer dados para determinação dos limites entre o tecido saudável e patológico, indicando a necessidade de estudos para aplicação da espectroscopia Raman, além de auxiliar na inspeção de biópsias, como guia cirúrgico para determinação de margens seguras.

Para aprofundar o entendimento das alterações bioquímicas decorrentes do processo carcinogênico associado à aplicação da Espectroscopia Raman, foi desenvolvida uma metodologia adequada e reprodutível de extração e manutenção do DNA de amostras de CDI de mama humana para avaliação por Espectroscopia Raman.

Recentemente, tem sido descrito sobre a aplicabilidade da Espectroscopia Raman no diagnóstico das doenças (NAUMANN, 2001) como subtipos de câncer de mama, doenças da pele, estados degenerativos dos tendões, entre outros estados patológicos (PENTEADO et al., 2008), evidenciando que a principal característica que une essas patologias é a alteração genética. Conseqüentemente, é evidente que existe a necessidade de serem observadas as contribuições espectrais dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) de um tecido normal assim como sua variação no estado patológico. O desenvolvimento de sensores bioanalíticos especiais para sondar alterações genéticas poderia ser inferido como uma aplicação direta para favorecer esse conhecimento.

Por meio da extração do DNA de amostras de tecido mamário humano acometido por CDI, sob três métodos amplamente aplicados na prática laboratorial, e testados por dois métodos de indicação qualitativos e quantitativos do DNA extraído, foi possível escolher o método de extração mais adequando, assim como indicar o método de armazenamento do DNA específico para aquisição dos espectros Raman. É importante salientar que a integridade estrutural do DNA foi preservada em todas as fases do método desenvolvido, além de ter se mostrado um método altamente reprodutível.

Os espectros Raman obtidos do DNA foram obtidos com auxílio do acessório “célula de longo caminho óptico” acoplado ao sistema FT-Raman (Bruker). As bandas de DNA foram encontradas em 883, 1276, 1456/1496, 1558 e 1670  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas à espinha dorsal de O-P-O, citosina (C), guanina (G); adenosina (A), e aos modos vibracionais de timina (T) do DNA, de acordo com a literatura (TWARDOWSKI ; ANZENBACHER, 1994).

Os resultados deste presente estudo indicaram que é possível extrair DNA de qualidade apropriada do tecido mamário humano acometido por CDI para aquisição de espectros Raman além de outras formas de espectroscopia (IR, por exemplo). Estabeleceu-se que o método de DNeasy com eluição final com água deionizada apresentou alto índice de pureza e elevada integridade estrutural do DNA

Até o momento foram descritos os métodos e resultados das análises *in vitro* dos espectros Raman de tecido mamário humano com finalidade diagnóstica. É importante lembrar que o conhecimento desenvolvido por meio da associação da Espectroscopia Raman e Patologia tem intenções mais audaciosas do que somente desenvolver-se como método de entendimento teórico/laboratorial das doenças. Pelo fato de ser factível o acoplamento de fibras ópticas aos espectrômetros Raman, tem sido amplamente discutido o desenvolvimento de métodos de análises que impliquem na aplicação clínica da Espectroscopia Raman (BARAGA et al., 1992; CASPERS et al., 1998; MAHADEVAN-JANSEN et al., 1998; SHIM e WILSON, 1998; SHIM et al., 1999; BUSCHMAN et al., 2000; HALON et al., 2000; HUANG et al., 2001; CHOO-SMITH et al.,2002).

Inúmeros obstáculos devem ser superados para que a perspectiva de inclusão clínica da espectroscopia Raman se estabeleça. Um dos desafios é o desenvolvimento de cateteres ópticos dedicados, com possibilidade de aquisição de espectros com discriminação de camadas em profundidade; outro desafio é o desenvolvimento de espectrômetros mais específicos para o comprimento de onda de excitação apropriado (geralmente @ 785 nm ou @ 830 nm) para que os espectros possam ser coletados de forma rápida, sendo possível minimizar os efeitos de variação espectral por

ocorridos pelo fluxo sanguíneo e respiração do pacientes (!). O passo seguinte é o pré-processamento e análise destes espectros, que devem ser feitas de forma rápida, objetiva e sem qualquer interferência humana. Inúmeros passos já foram dados nesta direção, como mostram estudos em pele humana (estrato córneo) *in vivo*, displasia escamosa, medidas em profundidade, espectros Raman *in vivo* da melanina de pele humana, Raman Ressonante como um método óptico rápido e não-invasivo para medir as concentrações absolutas do  $\beta$ -caroteno e do licopeno pele humana *in vivo* (WILLIAMS et al., 1993; UTZINGER et al., 2001; KNUDSEN et al., 2002; CASPERS et al., 2003; HUANG et al., 2004; DARVIN et al., 2005); diagnóstico de tecido normal e displásico utilizando indução de displasia química em modelo animal (BAKKER SCHUT et al., 2000); micro-espectroscopia Raman confocal automatizada para adquirir de maneira rápida os perfis moleculares da pele (CASPER et al., 2000); Raman Dispersivo Ressonante *in vivo* para medir a concentração de pigmentos maculares da retina humana *in vivo* de adultos jovens e idosos (GELLERMANN et al., 2002); potencial diagnóstico da espectroscopia Raman NIR em distinguir pólipos adenomatosos e hiperplásicos durante uma endoscopia (MOLCKOVSKY et al., 2003; SHIM et al., 2007); qualidade óssea por meio da análise dos espectros Raman transcutâneos das fases minerais e orgânicas do osso, construção de uma imagem latente tomográfica difusa por meio da recuperação dos espectros Raman (DRAPER et al., 2005; MATOUSEK et al., 2006; SCHULMERICH et al., 2006; SCHULMERICH et al., 2008); espectroscopia Raman transcutânea da concentração de glicose no sangue (ENEJDER et al., 2005); espectros Raman *in vivo* de tecido mamário com finalidade de diagnóstico de câncer de mama (HAKA et al., 2006).

Dentro destas perspectivas, para verificar a potencialidade da espectroscopia Raman em viabilizar o diagnóstico do câncer de mama *in vivo*, foi proposto o desenvolvimento destes tumores em modelo animal, para identificar a extensão da lesão de Adenocarcinoma Mamário por Espectroscopia Raman Dispersiva Transcutânea e FT-Raman, e avaliar o potencial prognóstico da Espectroscopia FT-Raman *ex vivo* associado ao exame MMP19.

Primeiramente, é importante salientar que os modelos experimentais em animais são necessários para elucidação da natureza do processo carcinogênico do câncer de mama, da influência do hospedeiro e dos fatores externos de desenvolvimento destas neoplasias. O modelo mais extensamente usado é baseado na indução química por DMBA em ratos (COSTA et al., 2002; AMAT et al., 2002; FOURNIER et al., 2006, RUDEL et al., 2007; THAKUR et al., 2007). Além da praticidade, outras importantes vantagens que favorecem a utilização do modelo animal são a homogeneidade, a reprodutibilidade e a necessidade de um tempo de indução tumoral curto. Não obstante, as propriedades fundamentais deste modelo experimental são as similaridades com a patogenia humana, assim como as influências endócrinas, genéticas e dietéticas que afetam o processo neoplásico.

Os estudos de espectroscopia vibracional dos tumores mamários de modelo animal atualmente baseiam seus resultados no esquema modificado de Scarff-Bloom-Richardson. Como o intuito deste estudo foi desenvolver conhecimento para futura utilização da Espectroscopia Raman *in vivo* em humanos, optou-se por basear a classificação dos tumores de modelo animal apresentados no estudo de Costa e colaboradores (2002). Por essa razão, após a indução por DMBA optou-se em comparar as lesões humanas e dos ratos simultaneamente, estabelecendo as similaridades e as diferenças entre estes, favorecendo a validação do modelo experimental para extrapolação dos resultados na carcinogênese mamária em humanos, sob uma perspectiva histológica.

Os espectros coletados pelo Sistema Raman Dispersivo de forma transcutânea *in vivo*, originaram oito espectros de um Adenocarcinoma Cribiforme de 2 cm de diâmetro. Foram coletados espectros no longo eixo desta lesão contemplando tecido normal fora da lesão, espectros no centro da lesão e margem da lesão. Os espectros tecido normal fora da lesão, apresentaram maior intensidade, principalmente quando observado o pico de  $1446\text{ cm}^{-1}$ ; os espectros no centro da lesão apresentaram a intensidade menor quando comparados aos primeiros. O espectro da margem da lesão apresentou intensidade e características intermediárias comparados aos outros

dois grupos. Os espectros do primeiro grupo espectral foram adquiridos da região marginal do tumor, identificado clinicamente e histopatologicamente como o tecido conjuntivo periférico normal. O segundo grupo espectral foi obtido do tumor propriamente dito, classificado histologicamente como adenocarcinoma cribiforme, o tipo mais comum em modelo de indução experimental, apresentaram características similares como encontradas por outros autores (BITAR et al., 2006). O espectro da margem de lesão apresentou intensidade e características intermediárias como descrito por Marzullo e colaboradores (2007). Por meio deste estudo foi possível estabelecer que é possível distinguir os espectros de mama normal, adenocarcinoma cribiforme e margem de lesão por Espectroscopia Raman transcutânea. Entretanto, estudos ainda precisam ser realizados, pois o tumor mamário em ratos é superficial e circunscrito, que favorecerem a elucidação dos resultados, diferentemente nos humanos, em que os tumores de mama são profundos e difusos.

Simultaneamente, também foram coletados espectros das mamas dos ratos por meio da utilização do Sistema FT-Raman (Bruker). Foram obtidos 100 espectros Raman *in vivo* transcutaneamente. A maioria dos tumores desenvolvidos foram adenocarcinomas (tumores dos tecidos glandulares), onde foram coletados 55 espectros transcutâneos, seguidos da aquisição dos espectros de mamas normais, que totalizaram 45 espectros. As mamas normais foram oriundas das mamas das ratas do grupo controle e mamas sem qualquer manifestação clínica de alteração, das ratas do grupo DMBA, histologicamente normais. O menor grupo formado foi o grupo das lesões benignas, formado por seis espectros.

Na região espectral de 500 a 900  $\text{cm}^{-1}$  foi observada uma grande influência do modo vibracional relativo ao quartzo pertencente à parte distal (ativa) da fibra óptica em todos os grupos diagnóstico; entretanto, felizmente, para este estudo que estabeleceu a classificação entre os tumores malignos, doenças benignas e mama normal, sua influência pareceu uniforme em todos os espectros não desfavorecendo o desenvolvimento do algoritmo para classificação. Os modos vibracionais identificados para a lesão mamária humana se repetem para o tecido mamário dos ratos, tanto normais quanto

patológico, como descrito por Bitar e colaboradores (2006) e Marzullo e colaboradores (2007).

Os 105 espectros selecionados para a classificação espectral, foram submetidos à Análise dos Componentes Principais (PCA). Foram conservados os primeiros 10 componentes principais, entretanto, apenas os primeiros quatro componentes principais utilizados para caracterizar o conjunto de dados para promoção de diagnóstico. Foram obtidos dois grandes grupos de dados: o grupo Normal foi composto em sua maioria por espectros de Mama Normal (68 %), embora composto também por todos os espectros de Lesões Benignas (12 %) (Adenoma e Hiperplasia Mamária) e 20 % de espectros de Adenocarcinoma. O grupo Adenocarcinoma foi composto em sua maioria (80,35 %) pelos espectros de Adenocarcinoma, sem separação dos subgrupos histológicos, e Mama Normal e 19,64%. Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise de Cluster (CLA) aplicadas para a classificação dos 105 espectros Raman obtidos *in vivo* em ratos Sprague-Dawley transcutaneamente, resultaram na divisão dos espectros em Mama Normal e Adenocarcinoma com sensibilidade e especificidade de 83,33 % e 78,43 %, respectivamente.

Atualmente não há trabalhos em Espectroscopia Raman que tenham realizado estudos comparativos entre os resultados de um ensaio imunohistoquímico e as alterações características entre espectros Raman dos tecidos analisados. No presente estudo, com o objetivo de encontrar tais características nos espectros, estes foram classificados por referência do padrão arquitetural histológico e graduação da marcação da MMP19 de acordo com Ramalho e colaboradores (2006).

Considerando os relevantes achados acima descritos, por meio das primeiras impressões sobre as análises dos espectros FT-Raman das amostras *ex vivo* de tecido mamário de ratos, foi possível afirmar que houve discriminação entre os espectros de mama normal e de hiperplasia dos espectros de adenocarcinoma mamário aplicando o algoritmo PCA/CLA aos espectros Raman, sendo compatível aos resultados do exame imunohistoquímico da MMP19.

A MMP19 humana, recentemente identificada, tem a estrutura básica característica de todas as MMPs, incluindo a seqüência do sinal do N-terminal, um domínio pró-peptídeo com resíduos de cisteína necessários para manutenção da latência enzimática, a seqüência de ativação o qual contém um sítio de ligação com o Zinco, e um domínio terminal “*hemopexim*”. A expressão *in vitro* da MMP19 humana mostrou potente atividade de degradação da membrana basal e também foi capaz de degradar dois componentes da cartilagem, chamados matriz protéica da cartilagem oligomérica e agrecan. Interessantemente, MMP19 também foi identificada como um auto-antígeno em alguns pacientes com artrite reumatóide. Djonov e colaboradores (2001) propuseram que as MMP19 estão presentes na camada mioepitelial dos ductos e na camada endotelial dos vasos sangüíneos assim como nos capilares. Com o aumento do fenótipo invasivo e desdiferenciação neoplásicas, a MMP19 desaparece e concomitantemente ha um aumento da MMP2. Explicando a alta concentração em tecidos normais e/ou pouco diferenciados, como foi encontrado neste trabalho.

As diferenças histológicas entre os adenocarcinomas cribiforme, papilar e sólido se referem ao modo de organização das células nestes diferentes padrões. Sabe-se que a geometria de um composto determina suas propriedades funcionais, não sendo diferente para os tecidos biológicos. A conformação cribiforme se assemelha mais com a mama normal, em relação aos padrões papilares e principalmente o sólido que não apresenta padrão de aglomerado celular. Corroborado pelo ensaio de coloração imunohistoquímica da MMP19, o padrão menos agressivo foi o cribiforme, seguido de papilar e do sólido. De acordo com Russo e colaboradores (1996), geralmente os padrões arquiteturais do carcinoma mamários de ratos são padrões mistos, ou seja, os três padrões descritos se misturam dentro de uma única lesão. O diagnóstico é dado pelo padrão dominante na lesão. Entretanto, é possível encontrar padrões isolados dos tipos arquiteturais de Adenocarcinoma Cribiforme e Papilar. O padrão Sólido pode ser somente encontrado associado aos outros padrões. Dessa forma, considerando as informações fornecidas pelo exame da MMP19, pode ser concluído que o aparecimento do padrão Sólido nas lesões denota um padrão mais agressivo.

A análise dos espectros FT-Raman *ex vivo* do tecido mamário de ratos Sprague-Dawley fêmeas obedeceu ao algoritmo matemático proposto por diversos autores (HAKA et al., 2005; MOURANT et al., 2005; AFSETH et al. 2006; CAO et al., 2007) que associaram a fase de pré-processamento automático e análise estatística multivariada com propósito diagnóstico, contemplando as duas regiões de deslocamento Raman que caracterizam o tecido biológico: (a) a região de “*Fingerprint*” (500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ ) e (b) a região de Alta frequência Raman (2800 a 3020  $\text{cm}^{-1}$ ). Os espectros do tecido mamário de ratos encontrados neste estudo, com concordância à descrição de similaridade histológica entre o mesmo tecido em humanos e ratos, também apresentam profundas similaridades, que favoreceram enormemente a descrição (que pode ser baseada na descrição prévia deste trabalho para o tecido mamário humano – Resultado 4.1), a compreensão e o desenvolvimento de metodologia de análise diagnóstica.

Como perspectiva, tendo em vista até o presente momento explorado algumas aplicações experimentais da Espectroscopia Raman em tecido mamário humano e discutido com o estado da arte da literatura, é possível que sejam feitas considerações sobre futuras investigações com propósito de inclusão desta técnica em ambiente clínico.

Apesar de ainda serem necessários novos empreendimentos tecnológicos para a construção de um equipamento robusto, portátil, confiável que produza sinais Raman reproduzíveis, ainda assim, deve ser considerada, mesmo para a construção de um protótipo clínico, a inclusão da problemática a ser investigada. É possível que um único equipamento Raman seja utilizado para a monitoração de diversos tipos de tecido, entretanto, o “*software*” deste sistema, ou seja, o método de pré-processamento e análise dos espectros Raman, deverá provavelmente ser individualizado para cada uma das aplicações.

Para tanto, a inclusão da espectroscopia Raman em ambiente clínico também será um desafio, este, altamente planejado. Sendo a principal vantagem da espectroscopia Raman transformar informações biológicas/químicas em eletrônicas, favorecendo armazenamento e análise de

informações, é factível que também sejam incluídas eletronicamente as informações e exames prévios dos pacientes para que dessa forma a Espectroscopia Raman possa finalmente contribuir para o diagnóstico precoce do paciente favorecendo a manutenção de sua vida!



## 6 CONCLUSÕES

Este estudo apresentou a aplicação da técnica de Espectroscopia Raman como ferramenta de análise viável para o estudo de tecido mamário humano e animal com finalidade de diagnóstico de Câncer de Mama. Com base nos resultado, foi possível:

Caracterizar e associar as alterações bioquímicas aos espectros FT-Raman de nove tipos histológicos associados ao tecido mamário humano;

Identificar e classificar o espectro Raman de tecido mamário da margem ressectiva de CDI em relação aos espectros de Mama Normal e CDI;

Desenvolver a metodologia mais adequada de extração de DNA para avaliação por Espectroscopia Raman;

Identificar a extensão da lesão de Adenocarcinoma Mamário por Espectroscopia Raman Dispersivo transcutânea em modelo animal;

Diagnosticar o Adenocarcinoma Mamário por meio da Raman transcutâneo *in vivo*;

Avaliar a agressividade das lesões de Adenocarcinoma mamário por espectroscopia FT-Raman *ex vivo* e exame MMP19 em modelo animal.



## REFERÊNCIAS

AFSETH, N. K. et al. Raman spectra of biological samples: A study of preprocessing methods. Applied Spectroscopy, v.60, n.12, p.1358-1367, 2006.

AMAT, S. et al. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) Grading: A Pleiotropic Marker Of Chemosensitivity In Invasive Ductal Breast Carcinomas Treated By Neoadjuvant Chemotherapy. International Journal Of Oncology. v.20, p.791-796, 2002.

ANDRADE, P.O. et al. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.387, n.5, p.1643-1648, 2007.

ALTMAN, N.H.; GOODMAN, D.G. Neoplastic diseases. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, eds. The Laboratory Rat. New York: NY: Academic Press; 1979: 361–362.

BAKKER SCHUT T.C. et al. *In Vivo* Detection of Dysplastic Tissue by Raman Spectroscopy. Anal. Chem. v.72, n.24, p.6010-6018, 2000.

BAKKER SCHUT T.C. et al. Real-time tissue characterization on the basis of *in vivo* Raman spectra. Journal of Raman Spectroscopy. v.33, n.7, p.580-585, 2002.

BARAGA, J.J.; FELD, M.S.; RAVA, R.P. Rapid Near-Infrared Raman Spectroscopy of Human Tissue with a Spectrograph and CCD Detector. Applied Spectroscopy. v.46, n.2, p.187-381, 1992.

BARROS, A. C. S. D. et al. Induction Of Experimental Mammary Carcinogenesis In Rats With 7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. v.59, p. 257-261, 2004.

BITAR, R. A. et al. Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy. Journal of Biomedical Optics, v.11, n.5, p.8, 2006.

BUSCHMAN, H.P. et al. *In Vivo* Determination of the Molecular Composition of Artery Wall by Intravascular Raman Spectroscopy. Anal. Chem. v.72, n.16, p.3771-3775, 2000.

CASPERS, G.W. et al. *In vitro* and *in vivo* Raman spectroscopy of human skin. Biospectroscopy. v.4, n.5, p.S31-S39, 1998.

CASPERS P.J., LUCASSEN, G.W., BRUINING H.A., PUPPELS, G.J. Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid *in vivo* determination of water concentration profiles in human skin. Journal of Raman Spectroscopy. v.31, n.8-9, p.813-818, 2000.

CAO, A. et al. A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence. Journal of Raman Spectroscopy, v.38, n.9, Sep, p.1199-1205, 2007.

CHOO-SMITH L.P. et al. Medical applications of Raman spectroscopy: From proof of principle to clinical implementation. Biopolymers. v.67, n.1, p.1-9, 2002.

CHOWDARY, M. V. P.; et al. Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy. Biopolymers, v.83, n.5, p.556-569, 2006.

COSTA I., et al. Histopathologic Characterization of Mammary Neoplastic Lesions Induced With 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene in the Rat. Arch Pathol Lab Med, v.126, p.915-927, 2002.

CURRAN S, MURRAY GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol; v.189, p.300–308, 1999.

DARVIN, M.E., GERSONDE, I., MEINKE, M., STERRY, W., LADEMANN, J. Non-invasive in vivo determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method. Phys. D: Appl. Phys. v.38, p.2696–2700, 2005.

DEMOS, S.G. et al. Advances in optical spectroscopy and imaging of breast lesions. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v.11, p.165-181, 2006.

DJONOV, V. et al. MMP-19: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours. J Pathol. v.195, p.147–155, 2001.

DRAPER, E.R.C. et al. Novel Assessment of Bone Using Time-Resolved Transcutaneous Raman Spectroscopy. Journal of Bone and Mineral Research. v.20, n.11, p.1968-1972, 2005.

ELLIS, D.I, GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. Analyst, v.131, n.8, p.875-885, 2006.

ENEJDER, A.M.K. et al. Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements. J. Biomed. Opt. v.10, p.031114, 2005.

ESCRICH, E. Validity of the DMBA-induced mammary cancer model for the study of human breast cancer. Int J Biol Markers. v.2, p.197–206, 1987.

ESCRICH, E. Mammary cancer model induced by 7,12-dimethylbenz (a) anthracene: a good experimental tool for the study of tumors markers. Int J Biol Markers.v.2, p.109–119, 1987.

FOURNIER, L.S. et al. *In vivo* NIR autofluorescence imaging of rat mammary tumors. Optics Express, v.14, n.15, p. 6713-6723, 2006.

GELLERMANN, W. et al. *In vivo* resonant Raman measurement of macular carotenoid pigments in the young and the aging human retina. J. Opt. Soc. Am. A v.19, p.1172-1186, 2002.

HAKA, A.S. et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.102, n.35, p. 12371-12376, 2005.

HAKA, A.S. et al. *In vivo* Margin Assessment during Partial Mastectomy Breast Surgery Using Raman Spectroscopy: Running head: Raman Margin Assessment at Partial Mastectomy. Cancer Res. v.66, p.3317-3322, 2006.

HANLON, E.B. et al. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. Phys. Med. Biol. 45 R1-R59, 2000.

HATTORI, Y. et al. *In vivo* Raman study of the living rat esophagus and stomach using a micro-Raman probe under an endoscope. Applied Spectroscopy, v.61, n.6, p. 579-584, 2007.

HOCHMAN, B., NAHAS, F.X., OLIVEIRA-FILHO, R.S., FERREIRA, L.M. Desenhos de pesquisa. Acta Cirúrgica Brasileira. v.2, 2005.

HUANG Z., et al. Raman spectroscopy of *in vivo* cutaneous melanin. J. Biomed. Opt. v.9, 1198, 2004.

HUANG Z. et al. Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time *in vivo* skin measurements. Opt. Lett. v.26, p.1782-1784, 2001.

HUFF, T.B., CHENG, J.X. *In vivo* coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of sciatic nerve tissue. Journal of Microscopy. v.225, n.2, p.175-182, 2007.

KAMINAKA, S. et al. Near-infrared multichannel Raman spectroscopy toward real-time *in vivo* cancer diagnosis. Journal of Raman Spectroscopy. v.33, n.7, p.498-502, 2002.

KELLER, M. D. et al. Raman spectroscopy for cancer diagnosis. Spectroscopy, v.21, n.11, p.33-41, 2006.

KNUDSEN, L. et al. Natural variations and reproducibility of *in vivo* near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of normal human skin. Journal of Raman Spectroscopy. v.33, n.7, p.574-579, 2002.

KRISHNA, C.M. et al. Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic identification approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines. Biopolymers, v.82, n.5, p. 462-470, 2006.

LEE, S. et al. Biological imaging of HEK293 cells expressing PLC gamma 1 using surface-enhanced Raman microscopy. Analytical Chemistry, v.79, n.3, p. 916-922, 2007.

LUCASSEN, G.W., CASPERS, P.J., PUPPELS, G.J. *In vivo* infrared and Raman spectroscopy of human stratum corneum. Proc. SPIE, v.3257, p.52, 1998.

MAHADEVAN-JANSEN, A. et al. Development of a Fiber Optic Probe to Measure NIR Raman Spectra of Cervical Tissue *In Vivo*. Photochemistry and Photobiology, v.68, n.3, p.427-431, 1998.

MATOUSEK, P. et al. Noninvasive Raman Spectroscopy of Human Tissue *In Vivo*. Appl. Spectrosc. v.60, p.758-763, 2006.

MATOUSEK, P. Deep non-invasive Raman spectroscopy of living tissue and powders. Chem. Soc. Rev. v.36, p.1292-1304, 2007.

MOLCKOVSKY, L. et al. 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.

MOTZ, J.T. et al. *In vivo* Raman spectral pathology of human atherosclerosis and vulnerable plaque. J. Biomed. Opt. v.11, p.021003, 2006.

MOTZ, J.T. et al. Real-time Raman system for *in vivo* disease diagnosis. J. Biomed. Opt. v.10, p.031113, 2005.

MOURANT, J.R. et al. Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman and infrared spectroscopy. Journal of Biomedical Optics, v.10, n.3, p.15, 2005.

MOVASAGHI, Z. et al. Raman spectroscopy of biological tissues. Applied Spectroscopy Reviews, v.45, n.5, p.493-541, 2007.

MUELLER, M.S., MAUCH, S., SEDLACEK, R. Structure of the human MMP-19 gene. Gene, v.252, p.27-37, 2000.

OLIVEIRA, A.P., et al. Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. Photomedicine and Laser Surgery, v.24, n.3, p.348-353, 2006.

PENDAS, A.M. et al. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. J Biol Chem, v.272, p.4281-4286, 1997.

PICHARDO-MOLINA, J.L. et al. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. Lasers in Medical Science, v.22, n.4, p.229-236, 2007.

- PILOTTO, S. et al. Analysis of Near-infrared Raman Spectroscopy as a New Technique for a Transcutaneous Non-invasive Diagnosis of Blood Components. Lasers in Medical Science. v.16, n.1, 2001.
- RAMALHO, L.N.Z.; RIBEIRO-SILVA, A.; CASSALI, G.D.; ZUCOLOTO, S. The Expression of p63 and Cytokeratin 5 in Mixed Tumors of the Canine Mammary Gland Provides New Insights into the Histogenesis of These Neoplasms. Vet Pathol. v.43, p.424–429, 2006.
- REHMAN, S. et al. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. Journal of Raman Spectroscopy, v.38, n.10, p.1345-1351, 2007.
- RUSSO J. et al. Classification of neoplastic and non-neoplastic lesions of the rat mammary gland. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds. Integument and Mammary Gland of Laboratory Animals. Berlin, Germany: Springer-Verlag. p.275–304, 1989.
- RUSSO, J., Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. Lab Invest. v.62, p.1–32, 1990.
- RUSSO, J., RUSSO, J.H. Experimentally induced mammary tumors in rats. Breast Cancer Res Treat. v.39, p.7–20, 1996.
- RUSSO, H.I. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. Environmental health perspective, v.104, n.9, p.938-967, 1996.
- SCHULMERICH, M.V. et al. Transcutaneous fiber optic Raman spectroscopy of bone using annular illumination and a circular array of collection fibers. Journal of Biomedical Optics, v.11, n.6, p.3, 2006.
- SCHULMERICH, M.V. et al. Subsurface and Transcutaneous Raman Spectroscopy and Mapping Using Concentric Illumination Rings and Collection with a Circular Fiber-Optic Array. Appl. Spectrosc. v.61, p.671-678, 2007.
- SCHULMERICH, M.V. et al. Noninvasive Raman tomographic imaging of canine bone tissue. J. Biomed. Opt. v.13, p.020506, 2008.
- SCHULMERICH, M.V. et al. Optical clearing in transcutaneous Raman spectroscopy of murine cortical bone tissue. J. Biomed. Opt. v.13, p.021108, 2008.
- SHIM, M.G., WILSON, B.C. Development Of An In Vivo Raman Spectroscopic System For Diagnostic Applications. Journal of Raman spectroscopy. v.28, n.2-3, p.131-142, 1997.

SHIM, M.G., WILSON, B.C., MARPLE, E., WACH, M. Study of Fiber-Optic Probes for *in Vivo* Medical Raman Spectroscopy. Appl. Spectrosc. v.53, p.619-627, 1999.

SHIM, M.G., SONG, L.M.W.K., MARCON, N.E., WILSON, B.C. *In vivo* Near-infrared Raman Spectroscopy: Demonstration of Feasibility During Clinical Gastrointestinal Endoscopy. Photochemistry and Photobiology. v.72, n.1, p.146-150, 2007.

SOKOLOV, K. et al. Molecular optical imaging of therapeutic targets of cancer. Advances in Cancer Research, v.96, p.299-344, 2007.

SOLANAS, M. ESCRICH, E. Ha-ras in normal and tumoral tissues: structure, function and regulation. J Physiol Biochem. v.52, p.173–192, 1996.

SOUZA, F.B. et al. Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte. Rev Bras Med Esporte. v.9, n.6, p.388-395, 2003.

SRINIVASAN, S. et al. Image-guided Raman spectroscopic recovery of canine cortical bone contrast *in situ*. Opt. Express. v.16, p.12190-12200, 2008.

STUART, D.A. et al. *In Vivo* Glucose Measurement by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Anal. Chem. v.78, p.7211-7215, 2006.

SUGIURA, T., BERDITCHEVSKI, F. Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). J Cell Biol. v.146, p.1375–1389, 1999.

UTZINGER, U. et al. Near-Infrared Raman Spectroscopy for *in Vivo* Detection of Cervical Precancers. Applied Spectroscopy. v.55, n.8, p.260A-294A, 955-1111 and pp. 955-959, n.5, 2001.

VAN ZWIETEN, M.J. Normal anatomy and pathology of the rat mammary gland. In: *The Rat as Animal Model in Breast Cancer Research*. Boston, Mass: Martinus Nijhoff. p.53–134, 1984.

WESTAD, F. et al. Finding relevant spectral regions between spectroscopic techniques by use of cross model validation and partial least squares regression. Analytica Chimica Acta, v.595, n.1-2, p.323-327, 2007.

WILLIAMS, A.C. et al. A Critical Comparison of Some Raman Spectroscopic Techniques for Studies of Human Stratum Corneum. Pharmaceutical Research. v.10, n.11, p.1642-1647, 1993.

YAN, X.L. et al. Raman spectra of cell from breast cancer patients. Spectroscopy and Spectral Analysis, v.25, n.1, p.58-61, 2005.

YOUNG S., HALLOWES, R.C. Tumors of the mammary gland. In: Pathology of Tumors in Laboratory Animals. Lyon, France: IARC Scientific Publications. p.31–86, 1973.

YU, C.X. et al. Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman micro spectroscopy. Cancer Detection and Prevention, v.30, n.6, p. 515-522, 2006.

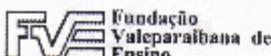
YU, G. et al. Confocal Raman microspectroscopic study of human breast morphological elements. Spectroscopy and Spectral Analysis, v.26, n.5, p. 869-873, 2006a.

YU, Q., STAMENKOVIC, I. Localization of matrix metalloproteinase-9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. Genes Dev. v.13, p.35–48, 1999.

ZHAO, Y.L. et al. Study the Raman spectroscopy of breast tumor limbic tissue. Spectroscopy and Spectral Análisis, v.26, n.7, p. 1267-1271, 2006.



## ANEXO A. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UNIVAP)



  
 UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

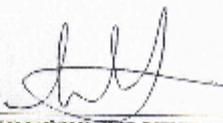
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo n.º A022/2006/CEP, intitulado "*Aplicação da espectroscopia Raman in vivo no estudo do estadiamento do câncer de mama induzido em camundongos*", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Airton Abrahão Martin, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivissecação de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **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


  
**Sandra Regina Passif**  
 Escrevente Autenticada

Av. Shalima Trifunil, 2911 - URBANOVA - CEP: 13.244-000 - PARY (012) 3440-1151 FAX: (012) 3440-1152

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA**  
**UNIVAP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo n.º A066/CEP/2007, sobre "*Espectroscopia Raman in vivo no estadiamento do carcinoma mamário induzido em modelo animal*" sob a responsabilidade de *Airton Abrahão Martin*, foi *aprovado* por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

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, 06 de junho de 2007.

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA**

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

## ANEXO B Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy.

Journal of Biomedical Optics 11(5), 054001 (September/October 2006)

### Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy

**Renata Andrade Bitar**  
**Herculano da Silva Martinho**  
 University of the Valley of Paraíba  
 Institute of Research and Development - IP&D  
 Laboratory of Biomedical Vibrational Spectroscopy  
 UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911  
 12244-000, São José dos Campos  
 São Paulo, Brazil

**Carlos Julio Tierra-Criollo**  
 Federal University of Minas Gerais - UFMG  
 Electrical Engineering Department  
 Biomedical Engineering Group  
 31270-010, Minas Gerais, Brazil

**Leandra Náira Zambelli Ramalho**  
 University of São Paulo  
 Ribeirão Preto Medicine College  
 Department of Pathology  
 São Paulo, Brazil

**Mário Mourão Netto**  
 A.C. Camargo Hospital - Hospital do Câncer  
 Rua Prof. Antonio Prudente, 211  
 01509-010, São Paulo, Brazil

**Airton Abrahão Martin**  
 University of the Valley of Paraíba  
 Institute of Research and Development - IP&D  
 Laboratory of Biochemical Vibrational Spectroscopy  
 UniVap, Av. Shishima Hifumi, 2911  
 12244-000, São José dos Campos  
 São Paulo, Brazil

#### 1 Introduction

Breast cancer is the most common malignant tumor found in women in the Western world. Usually, breast cancer screening involves two steps. The first one is the search for palpable lesions in the annual clinical breast examination. The second one is the X-ray mammography, in which suspicious local density changes could be detected. Whenever the tissue is particularly dense throughout, ultrasound may also be used to locate suspicious regions. If a lesion is found during the examination, the tissue is submitted to biopsy—which could range from the fine-needle aspiration of single cells to the surgical removal of the entire suspicious mass by excisional biopsy. The main problem of the fine-needle aspiration procedure is the high rate of false positive. Elmore et al.<sup>1</sup> have shown that over a 10-year period, during which subjects received a median of four mammograms and five clinical breast

**Abstract.** We employ Fourier–transform Raman spectroscopy to study normal and tumoral human breast tissues, including several subtypes of cancers. We analyzed 194 Raman spectra from breast tissues that were separated into 9 groups according to their corresponding histopathological diagnosis. The assignment of the relevant Raman bands enabled us to connect the several kinds of breast tissues (normal and pathological) to their corresponding biochemical moieties alterations and distinguish among 7 groups: normal breast, fibrocystic condition, duct carcinoma *in situ*, duct carcinoma *in situ* with necrosis, infiltrating duct carcinoma not otherwise specified, colloid infiltrating duct carcinoma, and invasive lobular carcinomas. We were able to establish the biochemical basis for each spectrum, relating the observed peaks to specific biomolecules that play a special role in the carcinogenesis process. This work is very useful for the premature optical diagnosis of a broad range of breast pathologies. We noticed that we were not able to differentiate inflammatory and medullary duct carcinomas from infiltrating duct carcinoma not otherwise specified. © 2006 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers. [DOI: 10.1117/1.2363362]

**Keywords:** Raman spectroscopy; breast cancer; optical biopsy.

Paper 05235RR received Aug. 16, 2005; revised manuscript received Apr. 2, 2006; accepted for publication May 9, 2006; published online Oct. 30, 2006.

examinations, 31.7% of all women experienced at least one false positive from either test. Other inconveniences are related to the time expended in awaiting the biopsy result as well as the biopsy procedure itself.

The breast is a large secretory gland composed of 15 to 25 autonomous and empty lobes connected to the nipple. The lobes themselves are divided into smaller units, called lobules, which are connected by ducts. Lobular and duct elements consist of single layers of epithelial and myoepithelial cells.<sup>2</sup> The breast undergoes many changes throughout a woman's life, both progressive due to puberty, pregnancy, and menopause and cyclical due to menstruation. Hormones regulate these changes. This dynamical activity could induce a lot of opportunities for disease. Usually, breast pathology is extremely diverse, but it could be divided into two main categories: benign and malignant pathologies. Most benign breast lesions are part of a spectrum of fibrocystic changes, whereas 70% of malignant lesions are infiltrating duct carcinomas.<sup>2</sup>

Address all correspondence to Airton Abrahão Martin, IP&D, UNIVAP, AV. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, São Paulo 12244-000, Brazil; Tel: +55 012 39471165; Fax: +55 012 39471165; E-mail: amartin@univap.br

1083-3668/2006/11(5)/054001/8/\$22.00 © 2006 SPIE

## ANEXO C. FT-Raman Spectra of the Border of Infiltrating Ductal Carcinoma Lesions.

Photomedicine and Laser Surgery  
Volume 25, Number 5, 2007  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
Pp. 455-460  
DOI: 10.1089/pha.2007.2094

### FT-Raman Spectra of the Border of Infiltrating Ductal Carcinoma Lesions

ANA CAROLINA DE MIRANDA MARZULLO, B.S.,<sup>1</sup> OSMAR PINTO NETO, M.Sc.,<sup>2</sup>  
RENATA ANDRADE BITAR, M.Sc.,<sup>1</sup> HERCULANO DA SILVA MARTINHO, Ph.D.,<sup>1</sup>  
and AIRTON ABRAHÃO MARTIN, Ph.D.<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

**Objective:** The characterization of the FT-Raman spectra of the borders of lesions is of great importance in guiding the surgeon during surgical intervention. **Background Data:** The main goals of this study were to investigate spectra of the borders of lesions of samples of infiltrating ductal carcinoma (IDC) and to determine the characteristics of these spectra. **Methods:** A total of 93 spectra were collected from five samples of healthy tissues and from 13 samples of IDC breast tissues using FT-Raman spectroscopy. Cluster analysis was used to separate the spectra into different groups. The results obtained from the statistical analysis were confirmed by a histopathological analysis. **Results:** The results showed that 17 out of the 67 spectra collected from the IDC samples demonstrated wide variety. The only significant difference between the peaks of the spectra of normal tissues and those of lesion borders is a peak at 538  $\text{cm}^{-1}$ . This peak is related to disulfide bridges in cysteine, and it seems to be the main factor for the FT-Raman determination of the boundaries between healthy and pathological tissue. **Conclusions:** These results serve as a foundation for future studies and application of Raman spectroscopy for optical diagnosis to guide biopsy and surgical intervention.

#### INTRODUCTION

**B**REAST CANCER is the most common cancer among women. Of all types of breast cancer, the most common is infiltrating ductal carcinoma (IDC), which comprises approximately 70%–80% of breast cancer cases.<sup>1</sup>

Diagnostic mammography, self-examination, and ultrasound are the most common techniques for detecting breast cancer. These techniques detect alterations of normal breast tissue, but these alterations are not uniquely correlated with breast cancer. Therefore they serve as screening tests rather than diagnostic tools. This is shown by the fact that only 10%–25% of mammographically detected lesions are found to be malignant upon needle biopsy.<sup>2</sup> Each year, many healthy women are subjected to breast biopsies, which cause unnecessary discomfort and high medical costs.<sup>3</sup> Diagnosis by Raman spectroscopy is a minimally invasive optical method that has been studied as an alternative to current diagnostic techniques.<sup>4</sup> Several studies of breast cancer diagnosis using Raman spectroscopy have dem-

onstrated this method's potential for *in vivo* diagnosis. Haka et al.<sup>5</sup> obtained 94% sensitivity and 96% specificity for distinguishing cancerous tissues from normal and benign tissues. In another study by Haka et al.,<sup>6</sup> they found perfect sensitivity and specificity for distinguishing cancerous from normal and benign tissues for a small data set. Mahadevan-Jansen et al.<sup>7</sup> differentiated precancerous from normal tissues, inflammation, and metaplasia with a sensitivity and specificity of 82% and 92%, respectively, in an unbiased test.

There is currently a need to determine the spectral characteristics of the borders of IDC lesions.<sup>6</sup> This is not only important to understand the variability among IDC spectra, but also so that Raman spectroscopy can be used in the future to guide surgeons and help them determine the boundaries between healthy and unhealthy tissues.

The main goals of this study were to investigate spectra of the borders of IDC lesions and to determine the main characteristics of these spectra. In some studies, researchers divided the spectra from normal and pathological tissues into two

<sup>1</sup>Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, <sup>2</sup>Laboratório de Matemática Aplicada, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento-IP&D, Universidade do Vale do Paraíba-UniVap, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

## ANEXO D. DNA extraction systematics for spectroscopic studies.

*Sensors* **2008**, *7*, 1-x manuscripts

**sensors**

ISSN 1424-8220

© 2008 by MDPI

www.mdpi.org/sensors

*Full Research Paper, Review, Communication (Type of Paper)*

### DNA EXTRACTION SYSTEMATICS FOR SPECTROSCOPIC STUDIES

**Bianca Fogazza Palma<sup>1</sup>, Amanda Borges Ferrari<sup>1</sup>, Renata Andrade Bitar<sup>1</sup>, Maria Angélica Garglone Cardoso<sup>1</sup>, Airton A. Martin<sup>1</sup>, Herculano da Silva Martinho<sup>2\*</sup>**

1 Full Address (Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brazil)

E-mail: bianca\_palma@hotmail.com, amanda.borges@univap.br, rabc@univap.br, magcard@univap.br, amartin@univap.br.

2 Full Address (Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Rua Catequese 242, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brazil)

E-mail: herculano.martinho@ufabc.edu.br.

\* Author to whom correspondence should be addressed. (Apply M\_address)

*Received: / Accepted: / Published:*

---

**Abstract:** DNA study allows understand the biochemical changes that follow diseases, like cancer, promoting the development of early preventive inquiry and more efficient individual treatments. Raman spectroscopy can be an important tool in DNA study, since it allows verify molecular vibrations of genetic material, however, extracted DNA needs to be purified in an extreme manner. This work's goal is establish a suitable systematic for DNA extraction in suitable concentrations to its study by Raman spectroscopy.

**Keywords:** DNA, Raman spectroscopy, Cancer.

---

## ANEXO E. *In vivo* Raman spectroscopy for breast cancer: diagnosis in animal model.

### **In vivo Raman spectroscopy for breast cancer: diagnosis in animal model**

R. Bitar<sup>a</sup>, M.A. Martins<sup>a</sup>, D. Ribeiro<sup>a</sup>, C. Carvalho<sup>a</sup>, E.A.P. Santos<sup>a</sup>, L.N.Z. Ramalho<sup>b</sup>, F. Ramalho<sup>b</sup>, H. Martinho<sup>a</sup>, A.A. Martin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica - UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP, Brazil 12244-000;

<sup>b</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil 14049-900

#### ABSTRACT

Raman spectroscopy has been well established as a powerful method for studying biological tissues and diagnosing diseases. In this study we have developed a breast cancer animal model and collected *in vivo* Raman spectra of mammary glands of 27 Sprague-Dawley female rats treated with DMBA and 5 non-treated used as control group. A dispersive Raman spectrometer with a @785 nm laser excitation coupled a fiber optic probe and a CCD detector was used to obtain the spectra. The obtained *in vivo* transcutaneous Raman spectra have shown important differences between normal and abnormal tissues when acquired from one side to the other side of the lesion.

**Keywords:** Raman Spectroscopy, Optical Biopsy, Breast Cancer in Animal Model.

#### 1. INTRODUCTION

According to the National Institutes of Health, breast cancer is the most diagnosed non-skin cancer and the second leading cause of cancer death among women worldwide. Although the breast cancer diagnosis rate has increased, there has been a steady drop in the overall breast cancer death rate since the early 1990's. Depending on the size of the tumor and the involvement of the lymph nodes, survival rates can vary from 45 % to 95 %. The key problem with the breast is the variation in demographic size, texture, chemical composition, and age.<sup>1,2</sup>

X-ray mammography is the gold standard for breast cancer screening and detection. Mammography is most sensitive in women over 35 to 40 years of age because of their fatty breast composition and less effective and sensitive in younger women because they have denser breasts.<sup>1,2</sup> For younger women, ultrasound is commonly used. Magnetic resonance imaging (MRI) can also play a significant role in the diagnosis and characterization of breast disease. According to the National Cancer Institute, up to 10 % of all breast cancers are not discovered by X-ray mammography. It also suffers from a significant number of false positives that often lead to unnecessary biopsy, since biopsy is generally required to determine malignancy in most women with an abnormal mammogram. Although these methods have a high sensitivity (>75 %), only one of four detected lesions will prove to be cancer at pathology. The remaining tumor masses are benign or inflammatory. All three techniques, X-ray mammography, ultrasound, and MRI provide high spatial resolution, but comparatively little information about

Biomedical Optical Spectroscopy, edited by Anita Mahadevan-Jansen, Wolfgang Petrich, Robert R. Alfano, Alvin Katz, Proc. of SPIE Vol. 6853, 685300, (2008) · 1605-7422/08/\$18 · doi: 10.1117/12.760089

Proc. of SPIE Vol. 6853 685300-1

## ANEXO F. Raman spectroscopy and imunohistochemistry for agressiveness

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE (VER. 3.1) - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR DETAILS

ARTICLE TYPE

www.rsc.org/xxxxxx | XXXXXXXX

## Raman spectroscopy and imunohistochemistry for aggressiveness prediction of histological subtypes of mammary adenocarcinoma

Renata Andrade Bitar,<sup>a\*</sup> Dayana Gonçalves Ribeiro,<sup>a</sup> Mário Augusto Martins,<sup>a</sup> Edson Aparecido Pereira dos Santos,<sup>a</sup> Kumiko Kobuchi Sakane,<sup>b</sup> Leandra Náira Zambelli Ramalho,<sup>c</sup> Fernando Silva Ramalho,<sup>c</sup> Herculano da Silva Martinho,<sup>d</sup> Aírton Abrahão Martin,<sup>a</sup>

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X

First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b000000x

Raman technology has been studied since 90's decade with the objective to develop a fast, trustful, and minimally invasive diagnostic clinical method for several cancer diseases. The high incidence of breast cancer in worldwide and the difficulties of early diagnosis have been raising an interest to contribute for this technology. The object of this study is to analyze FT-Raman spectra from normal and diseased mammary tissues in animal model to identify some differences that could diagnose and explain a malignant transformation. Mammary adenocarcinoma was induced in female rats by a single dose of 50 mg of DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene). The Raman spectra had been collected by a FT-Raman system (RFS 100 - Bruker), using a 1064 nm as excitation laser source. Using immunohistochemical technique for the identification of MMP19 it was possible to classify the samples by malignant graduation in accordance to the classification results of PCA and CLA algorithm. It was possible to verify that normal breast, benign lesions, and adenocarcinomas spectra, including the subtypes (cribriforme, to papillar and solid) could be diagnosed and also some vibrational bands responsible for this classification were identified.

## Introduction

The mammary cancer is the second most common type of cancer among the world population, with a survival rate of 61% after 5 years. The number of new mammary cancer cases expected for 2008 in Brazil was 49.400, with an estimated risk of 51 caes for every 100 thousand women. Lately, methods based on histopathologic standards are used to confirm diagnosis<sup>(1)</sup>.

Recently, on the literature, there are many studies that use the optical spectroscopy on the *in vitro* analysis of mammary malignant and benign<sup>(2-6,17)</sup>. However, Raman *in vivo* experiments are scarce due to the great difficulties of the technique<sup>(6,14,16)</sup>.

Rehman et al. (2007)<sup>(17)</sup> described a non-destructive method of analysis of histopathologic specimen employing Raman spectroscopy. The Raman spectroscopy allows a qualitative analysis of the same samples that are used for histopathologic evaluation. The mammary cancer were analyzed to demonstrate that it is possible to characterize the chemical alterations before the biological tissue present alterations. These alterations are precisely identified, and the results are reproducible. The analysis of tissue sections promotes distinct spectra that can be used to distinguish among the nuclear graduations of the ductal carcinoma *in situ* (DCIS) and intraductal carcinomas (IDC) of the breast. Sixty cases of mammary cancer including DCIS and IDC and seven cases of normal breast were studied through Raman spectroscopy. In that study, Rehman and partners reported for the first time the spectral differences among the different DCIS graduations. Through that study, it was possible to conclude that the Raman spectroscopy can objectively distinguish the graduations of DCIS and IDC in a non-destructive and

reproducible manner. It could be possible in the future to use the Raman spectroscopy as an informative and qualitative method to classify the diagnosis of different degrees of mammary carcinoma.

Thus, experiments that use experimental models to induce carcinogenesis are particularly important for the study of clinical applicability of the spectroscopy in the cancer diagnosis. The animal model seems to be a scientifically acceptable way to overcome the first challenges, as their mammary gland may present similar diseases to the human mammary<sup>(17,16)</sup>. Considering the necessity of mammary cancer studies through Raman spectroscopy, this study objects on evaluate and discriminate the histologic subtypes of mammary adenocarcinoma in animal model through FT-Raman spectroscopy associated to imunohistochemistry.

## Material and Methods

This research followed the policies and rules that regulate the researchs involving animal and the ethic principles on the animal experimentation, edited by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and obtained approval of the Committee of Ethics in Researchs of the University of Vale do Paraíba (CEP/UNIVAP).

## Experimental Mammary Carcinogenesis

The experimental group of animals was formed by 20 young virgin Sprague-Dawley female rats. Mammary gland tumors were induced by a single dose of 50 mg of DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) diluted in soy oil (1 mL) given intragastrically by gavage<sup>(1)</sup>. All of the rats, with an average

prediction of histological subtypes of breast adenocarcinoma.

Artigo submetido em Dezembro de 2008 para a revista Journal of Biomedical Optics .

## ANEXO G. Raman transcutâneo *in vivo* no diagnóstico do Adenocarcinoma Mamário em modelo animal.

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE (VER. 3.1) - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR DETAILS

ARTICLE TYPE

www.rsc.org/xxxxxx | XXXXXXXX

### *In vivo* transcutaneous Raman spectroscopy in mammary adenocarcinoma diagnosis

Renata Andrade Bitar,<sup>a,d</sup> Dayana Gonçalves Ribeiro,<sup>a</sup> Mário Augusto Martins,<sup>a</sup> Edson Aparecido Pereira dos Santos,<sup>a</sup> Kumiko Kobuchi Sakane,<sup>b</sup> Leandra Náira Zambelli Ramalho,<sup>c</sup> Fernando Silva Ramalho,<sup>c</sup> Herculano da Silva Martinho,<sup>d</sup> Airton Abrahão Martin,<sup>a</sup>

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X  
 First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X  
 DOI: 10.1039/b000000x

The application of Raman spectroscopy to diagnose breast cancer has been overcoming technologic challenges on its clinical use. However, the idea of establishing a real system for its applicability is a recent discussion. This project aimed on adapting the method of mammary carcinoma induction in Sprague-Dawley rats to obtain mammary tumors possible to be analyzed by the Raman spectroscopy; adapt the FT-Raman Spectrometer RamProbe (Bruker) to the normal and tumoral mammary glands; acquire a number of Raman spectra that are proportionally statistically viable to the histologic types found; mathematically analyze the transcutaneous *in vivo* Raman spectra, observing the spectral regions 550 to 2000 cm<sup>-1</sup>. As a conclusion, it was possible, by means of the Principal Components Analysis (PCA) and Cluster Analysis (CLA) applied to classify 105 Raman spectra obtained transcutaneously from Sprague-Dawley rats, to classify the Normal Breast from Adenocarcinoma spectra with sensibility and specificity and of 83.33 % and 78.43 %, respectively.

#### Introduction

The systems of experimental models are particularly useful for the study of mammary carcinogenesis. Among these systems, the ones of chemical induction in rats are more used for many reasons. Firstly, the mammary glands in rats show a high susceptibility to develop neoplasias, and these neoplasms mime the human mammary diseases. Most tumors developed in experimental models were malignant, specifically adenocarcinomas. The beginning of the carcinogenesis occurs, as in the human breast, first in the final duct of the lobular session<sup>(1)</sup>. Comparative studies show that there are estrogen and progesterone receptors with identical properties in both rat and human systems<sup>(2)</sup>, which explains the positive dependence on hormones and mutations in the Ras gene in carcinomas of both systems<sup>(3)</sup>. Secondly, the biological behaviour of experimental mammary tumors has been well characterized and the age of the host in the phase of exposure to the carcinogen, the reproductive history, the endocrine environment, the diet, among other many factors that influence the start and development of the tumors, were well established<sup>(4)</sup>. For these reasons the mammary cancer induced in rats as experimental models seems to be the most used to study mammary cancer<sup>(5)</sup>.

The histologic analysis of the mammary tumors is essential to define the benign or malignant nature of these tumors, in order to establish the aggressiveness of the malignant tumors. Moreover, some microscopic characteristics indicate, essentially in classic form (or other specific designations) of the infiltrating ductal carcinoma, the clinical behaviour and also the therapeutic option. Since the introduction of these animal models in studies of mammary carcinogenesis, many review articles were published to establish the microscopic characteristics of these lesions in order to promote comparative studies based on human

diseases<sup>(1,5-7)</sup>. All these studies agreed that the mammary cancer developed more frequently in rats under induction are of the cribriform and/or papillary area standard. Moreover, they show, predominantly, a non-invasive or micro invasive growing standard and a low index of metastasis development. These morphologic and biologic characteristics differ from those described to human invasive carcinomas, which typically show ductal standard, with infiltrative growth and metastatic behaviour. Combined, all these characteristics contribute to the difficulty in establishing a clear distinction between malignant and benign mammary tumors in rats. Therefore, Young and Hallowes (1973)<sup>(8)</sup>, in order to add knowledge to the classification of mammary tumors in rats, defined a series of benignity and malignancy criteria, later adopted by many authors, having as the object the precise diagnose of these lesion in most of cases. The best classification method for the mammary tumors used nowadays established as a consensus during a conference in Hanover, (1987). This classification relates the neoplastic lesion to the non-neoplastic ones in the human and rats' mammary glands. It seemed clear that most of the lesion found in humans have similarities to the pathologic in rats. However, there are some lesions that are specifically human, such as the Mammary Paget's Disease, Medular Infiltrating Ductal Carcinoma and Infiltrating Lobular Carcinoma, which still were not found in rats.

Thus, basing studies on animal models (especially rats) that later can be used in human model seems to be a scientifically accepted means of facing the first challenges to be overcome. In this study, all the process of generating mammary tumors in rats through chemical induction, spectra acquisition and their diagnostic classification in benign or malignant enriched the overcome of these challenges, projected or not.

These challenges are present since the handling of the animals, to the Raman experiment assembling, the knowledge of

Artigo submetido em Dezembro de 2008 para a revista: **The Analyst**.