

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
UNIVERSIDADE REGIONAL COMUNITÁRIA DE CHAPECÓ  
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**Benito Bodanese**

**Espectroscopia Raman Dispersiva no Diagnóstico de Carcinomas  
Basocelulares**

São José dos Campos, SP  
2008

**Benito Bodanese**

**Espectroscopia Raman Dispersiva no Diagnóstico de Carcinomas  
Basocelulares**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, dentro do curso de Mestrado Interinstitucional Univap / Unochapecó

Orientador: Prof. Dr. Landolfo Silveira Junior  
Co-Orientadora: Prof. Dra. Regiane Albertini de  
Carvalho

São José dos Campos, SP  
2008

B839e

Bodanese, Benito

**Espectroscopia Raman dispersiva no diagnóstico de carcinomas basocelulares** / Benito Bodanese; Orientadores: Prof.Dr. Landulfo Silveira Junior; Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho.— São José dos Campos; Chapecó, 2008.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, modalidade Minter Univap / Unochapecó. 2008.

1. Espectroscopia 2. Carcinoma Basocelular /diagnostico 3. Análise Espectral Raman I. Silveira Junior, Landulfo, Orient. II. Carvalho, Regiane Albertini de, orient. III. Título

CDU:616

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

Aluno: assinatura do aluno



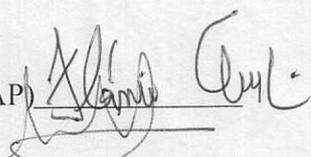
Data: da defesa

26/09/2008.

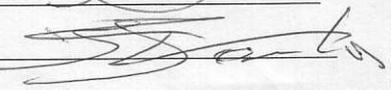
**BENITO BODANESE**

**“ESPECTROMETRIA RAMAN DISPERSIVA NO DIAGNÓSTICO DE CARCINOMAS  
BASOCELULARES”**

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

Prof. Dr. **FLÁVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP) \_\_\_\_\_

Prof. Dr. **IVAN DUNSHEE DE A. O. SANTOS** (UNIFESP) 

Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 26 de setembro de 2008.

**Dedico este trabalho aos pacientes que  
cederam amostras de seus tumores de pele e a  
todos os pacientes acometidos por essa doença.**

## **Agradecimentos**

Meus sinceros agradecimentos a:

Deus pela oportunidade de realizar mais uma etapa de minha formação acadêmica;

Meus pais pelo incentivo e apoio irrestritos;

Meu orientador, Professor Landulfo Silveira Júnior, por ter me aceitado como orientando tendo outros tantos alunos em orientação, pelo seu incentivo, disponibilidade e paciência, muitas vezes se desdobrando em muitos para poder dar a atenção necessária a todos. Meus sinceros agradecimentos;

Minha co-orientadora, Professora Regiane Albertini de Carvalho pelas correções que facilitaram a elaboração deste trabalho;

Instituto de Patologia do Oeste, nas pessoas dos médicos patologistas Dra. Cíntia Lopes Dias e Dr. Jerso Menegassi pela análise histológica das lesões para complementação do trabalho;

Professor Dr. Antonio Carlos Weston, que há mais de cinco anos despertou em mim a necessidade da realização do mestrado;

Todos os professores da Pós-Graduação de Engenharia Biomédica pela dedicação nas aulas que foram ministradas longe da UNIVAP;

Colegas de aula, em especial a Indiamara Dal Magro e Marines Bertoldo Peres, minhas colegas de estudo e apresentação de trabalhos, pelo incentivo, disposição e coleguismo;

Bibliotecária Rúbia Gravito de Carvalho Gomes pelos prontos auxílios nos períodos em que estivemos na UNIVAP e pela ajuda na revisão bibliográfica.

# Espectroscopia Raman Dispersiva no Diagnóstico de Carcinomas Basocelulares

## Resumo

A detecção precoce do câncer continua sendo um grande desafio da oncologia clínica. A espectroscopia Raman é uma ferramenta analítica moderna e sua utilização no diagnóstico do câncer pode proporcionar muitas vantagens, como diagnósticos em tempo real e menos invasivos. O objetivo deste trabalho foi utilizar a espectroscopia Raman dispersiva no infravermelho próximo para detectar diferenças espectrais entre amostras de pele humana normal (N) e com carcinoma basocelulares (CBC), relacionadas a alterações bioquímicas entre estes tecidos. Estas diferenças espectrais foram analisadas por dois diferentes modelos diagnósticos: primeiro uma Análise dos Componentes Principais (PCA) e classificação dos espectros pela distância de Mahalanobis e segundo por um modelo bioquímico simplificado baseado na porcentagem de gordura e colágeno obtida através dos espectros Raman dos tecidos. Quinze fragmentos diagnosticados histopatologicamente como N e 29 como CBC foram analisados através de um espectrógrafo Raman dispersivo no infravermelho próximo, resultando em 29 espectros N e 56 espectros CBC. As maiores diferenças espectrais entre as amostras foram nas regiões de 800 a 1000cm e 1200 a 1300cm, correspondendo às bandas vibracionais das ligações C-C e amido III, respectivamente, dos lipídios e proteínas. A PCA e a distância de Mahalanobis foram aplicadas em todas as amostras, podendo identificar os tipos teciduais com 0,93 de sensibilidade e especificidade. O modelo básico simplificado dos componentes bioquímicos apresentou uma sensibilidade de 0,83 e uma especificidade de 0,93. Os resultados demonstraram que a espectroscopia Raman, em conjunto com a PCA ou com o modelo bioquímico simplificado, pôde diferenciar tecidos N de CBC com alta sensibilidade e especificidade.

**Palavras-Chave:** Espectroscopia Raman dispersiva, Carcinoma basocelular, diagnóstico, análise dos componentes principais, modelo bioquímico.

## Use of dispersive Raman Spectroscopy for detecting basal cell carcinoma in human skin

### Abstract

Early cancer detection stills a great challenge in clinical Oncology. Raman spectroscopy is a modern analytical tool and its use for cancer diagnosis could lead to several advantages such as real time and less invasive diagnosis. The objective of this work was to use near-infrared, dispersive Raman spectroscopy to detect spectral changes between normal (N) and malignant (basal cell carcinoma - BCC) skin tissues which are related to biochemical alterations between N and BCC tissues. Those spectral changes were analyzed by two diagnostic models: first a Principal Components Analysis algorithm and classification line done by Mahalanobis distance and second a simplified biochemical model based on the percentage of collagen and fat obtained from the Raman spectra of tissues. A set of 15 fragments histopathologically diagnosed as N and 29 fragments diagnosed as BCC were spectroscopically scanned in a dispersive, near-infrared Raman spectrometer with 830nm (100mW power) excitation and liquid-nitrogen CCD detector, resulting in 29 N spectra and 56 BCC spectra. It was found that the main spectral differences between these samples were in the region of 800 to 1000  $\text{cm}^{-1}$  and 1200-1300 $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to vibrational bands of C-C bonds and amide III, respectively, from lipids and proteins. PCA with Mahalanobis distance applied over all samples could identify tissue type with 0.93 of sensitivity and specificity. The simplified model based on the biochemicals presented a sensitivity of 0.83 and specificity of 0.93. Results indicated that Raman spectroscopy, in conjunction with PCA or biochemical model, could differentiate among N and BCC tissues with high sensitivity and specificity.

**Keywords:** Dispersive Raman spectroscopy, Carcinoma, Basal Cell, diagnosis, principal components analysis, biochemical model.

## Lista de Figuras

Figura 1: Anatomia da Pele .....	16
Figura 2: Estimativa de incidência dos principais tumores no Brasil para o ano de 2008. ....	26
Figura 3: Carcinoma basocelular de frente.....	29
Figura 4: Carcinoma basocelular avançado de dorso .....	29
Figura 5: Fotos de carcinoma basocelular corado pela técnica H-E, visto a microscopia óptica com aumento de 40x. Observa-se invasão de células semelhantes a da camada basal (mais escura) no tecido conjuntivo (róseo). Nota-se ainda que estas células apresentam-se em ninhos celulares na derme. ....	30
Figura 6: Físico indiano C. V. Raman .....	32
Figura 7: Diagrama dos níveis de energia. As linhas horizontais grossas representam os níveis de energia eletrônicos e as linhas horizontais finas representamos níveis vibracionais de cada nível eletrônico. $S_0$ - estado eletrônico fundamental; $S_1$ - estado eletrônico excitado; $\nu_{exc}$ - frequência da radiação de excitação; $\nu_R$ - frequência do espalhamento Raman; $\nu_F$ frequência da emissão fluorescente; UV - radiação ultravioleta; IV - radiação infravermelha. ....	34
Figura 8: Espectro Raman esquemático mostrando os processos Rayleigh, Anti-Stokes e Stokes. ....	34
Figura 9: Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo de bancada. Potência do laser: 60mW, comprimento de onda de excitação: 830nm, resolução espectral: $8\text{ cm}^{-1}$ .....	46
Figura 10: Espectro Raman dispersivo de pele normal, ceratose, carcinoma basocelular, carcinoma epidermóide <i>in situ</i> e carcinoma basocelular pigmentado. ....	51
Figura 11: Espectros Raman dispersivos de pele normal e carcinoma basocelular, com suas áreas de maior diferença espectral grifadas com números. ....	53
Figura 12: Quadro com os quatro principais PC's obtidos a partir dos espectros Raman. ....	54
Figura 13: Componentes Principais 2 versus 1 (PC2 x PC1) para todos os espectros Raman. No gráfico foram traçadas as linhas Euclidiana e distância de Mahalanobis para separar os casos de CBC dos normais.....	55
Figura 14 Espectros Raman dos componentes basais colágeno de tendão humano e gordura dos adipócitos utilizados para desenvolver o modelo bioquímico.....	56
Figura 15: Intensidade relativa dos dois componentes bioquímicos em cada tipo de tecido, associado ao traçado da linha Euclidiana para separação dos mesmos.....	57

## Lista de tabelas

Tabela 1: Picos Raman de diferenças espectrais características de CBC na derme e sua correlação bioquímica. (38) .....	39
Tabela 2: Energia e identificação dos principais modos vibracionais da pele humana normal e maligna <i>ex vivo</i> (CBC) (14).....	40
Tabela 3 Resultados do algoritmo diagnóstico baseado nas distâncias Euclidianas e de Mahalanobis aplicadas aos PC1 e PC2.....	55
Tabela 4: Resultados do diagnóstico utilizando o modelo simplificado baseado nos componentes bioquímicos .....	57

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	11
<b>2 Objetivos</b> .....	13
<b>3 Revisão de Literatura</b> .....	14
3.1 Tecido Cutâneo.....	14
3.2 Neoplasias.....	16
3.2.1 Carcinogênese .....	18
3.2.2 Etiopatogênese das Neoplasias .....	21
3.2.3 Células Malignas .....	22
3.2.4 Fatores Carcinogênicos do Câncer de Pele .....	24
3.2.5 Epidemiologia do Câncer de Pele .....	25
3.3 Carcinoma Basocelular.....	27
3.3.1 Diagnóstico do CBC .....	30
3.4. Espectroscopia Raman.....	31
3.4.1 O Efeito Raman.....	33
3.4.2 Aplicações Biomédicas da Espectroscopia Raman.....	35
3.4.4 Alterações bioquímicas da célula neoplásica e a espectroscopia Raman da pele ....	37
<b>3.4.4.1 Proteínas</b> .....	38
<b>3.4.4.2 DNA</b> .....	38
<b>3.4.4.3 Lipídios</b> .....	39
3.5 Processamento dos Espectros Raman.....	40
3.5.1 Análise dos Componentes Principais (PCA).....	41
3.5.2 Utilização da PCA na Espectroscopia Raman.....	42
<b>4 Material e Métodos</b> .....	44
4.1 Obtenção das Amostras .....	44
4.2 Tamanho da Amostra .....	45
4.3 Parâmetros Éticos .....	45
4.4 Realização da espectroscopia Raman.....	45
4.5 Análise Histopatológica.....	47
4.6 Pré-processamento dos Espectros.....	48
4.7 Análise de Dados .....	49
<b>5 Resultados</b> .....	50
<b>6 Discussão</b> .....	58
<b>7 Conclusões</b> .....	61
<b>Referências</b> .....	62
<b>Anexo A - Formulário de consentimento pós-informado</b> .....	68
<b>Anexo B - Comitê de Ética em Pesquisa</b> .....	69

## 1 Introdução

O Carcinoma Basocelular (CBC) é o tumor de pele mais comum, correspondendo a 75% de todas as lesões malignas que acometem a pele. Mesmo sendo o tipo mais comum de todos os tumores malignos, eles correspondem a menos de 0,1% das mortes ocasionadas por câncer <sup>(1)</sup>. A incidência deste tipo de tumor é maior em pacientes com pele branca <sup>(2)</sup>, sendo a face, couro cabeludo e pescoço as regiões mais acometidas<sup>(3; 4)</sup>. Dentre os fatores de risco podemos citar: exposição solar, idade, sexo (homem tem risco aumentado), localização geográfica, pele clara, cabelos e olhos claros <sup>(2)</sup>.

Apesar de existirem diferentes apresentações clínicas para o CBC, a característica mais comum é a forma de nódulo assintomático ou lesão ulcerativa elevada da pele próxima, contendo vasos telangectásicos. O CBC tem tendência a ser localmente destrutivo. Áreas de alto risco para recidiva incluem a região central da face (periorbital, pálpebras, sulco nasolabial), região retroauricular, canal auditivo e couro cabeludo <sup>(1)</sup>.

Os métodos tradicionais de tratamento do CBC envolvem o uso da criocirurgia, radioterapia, eletrodissecção, curetagem e a excisão simples. Cada um desses métodos é útil em específicas situações clínicas <sup>(5)</sup>. Na dependência da seleção, esses métodos têm taxas de cura que variam de 85 a 95% <sup>(1)</sup>.

O padrão-ouro do tratamento do CBC baseia-se na ressecção cirúrgica completa da lesão. A taxa de cura está diretamente relacionada ao estadio da doença e o tipo de tratamento empregado<sup>(1)</sup>. Em áreas selecionadas, como face e couro cabeludo, cirurgias controladas microscopicamente (cirurgia de Mohs ou cirurgia convencional com exame transoperatório) podem reduzir a ressecção desnecessária de tecidos <sup>(6)</sup>.

A diferenciação histopatológica dos tipos de CBC está baseada nos diferentes tipos de crescimento, que também são à base do atual sistema de classificação sugerido pela Organização Mundial da Saúde (WHO)<sup>(7)</sup>. A classificação que tem mostrado relevância prática distingue os tumores em nodulares, superficiais e infiltrativos <sup>(7)</sup>.

Habitualmente, a confirmação dos tumores é realizada através de exames histopatológicos. Esta técnica avalia o grau de diferenciação celular do tecido neoformado e suas características citológicas, morfológicas e estruturais. A histopatologia fornece informações muito valiosas na orientação da abordagem terapêutica do câncer e possui resultados confiáveis <sup>(8)</sup>. Entretanto, esta

técnica possui algumas desvantagens e limitações, pois a biópsia convencional envolve remoção do tecido, necessidade da preparação das amostras e dependem da interpretação dos patologistas.

No sentido de aprimorar o diagnóstico precoce do câncer, pesquisas vêm sendo desenvolvidas, utilizando diversas técnicas, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, dermatoscopia, microscopia confocal a laser, Doppler a laser para avaliação de perfusão e espectroscopia.<sup>(9, 10, 11, 12)</sup> Entre os métodos ópticos, uma técnica que tem se mostrado promissora na investigação de doenças é a de espectroscopia Raman<sup>(13, 15)</sup>.

A espectrometria Raman apresenta um potencial promissor como uma ferramenta analítica para o diagnóstico de câncer porque pode diferenciar a composição química e estrutura molecular de tecidos normais e doentes<sup>(16)</sup>.

A aplicabilidade da Espectroscopia Raman consistirá em auxiliar o exame histopatológico, principalmente em situações em que a biópsia não é efetiva, por exemplo, em múltiplas lesões ou tumores incipientes (ainda sem manifestações clínicas). Também poderá ser utilizada na detecção dos limites do tumor em tempo real, evitando excisões amplas demais ou com margens comprometidas.

## **2 Objetivos**

Estudar a aplicação da técnica de espectroscopia Raman dispersiva em biópsias de pele *in vivo*, com a finalidade de correlacionar as características mais importantes do espectro Raman com as alterações patológicas presentes e diferenciar as lesões do tipo carcinomas basocelulares de biópsias de pele normal.

Analisar a fração relativa do peso dos componentes bioquímicos basais colágeno e lipídeos nos espectros dos tecidos cutâneos afim de diferenciar carcinoma basocelular de pele normal.

### 3 Revisão de Literatura

#### 3.1 Tecido Cutâneo

A pele ou *cútis* é o órgão de revestimento externo, o maior órgão do corpo humano e o mais pesado. É responsável pela proteção do organismo. Corresponde a 16% do peso corporal <sup>(17)</sup> e exerce diversas funções, como: regulação térmica, defesa orgânica, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra diversos agentes do meio ambiente e funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). A pele é um órgão vital e, sem ela, a sobrevivência seria impossível <sup>(18)</sup>.

Na pele, observam-se várias estruturas anexas, tais como pelos, unhas, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. Existem dois principais tipos de pele: a pele fina, que possui uma delgada camada epitelial queratinizada, pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas; e a pele espessa, que possui larga camada epitelial queratinizada, reveste a palma das mãos e a planta dos pés, apresenta glândulas sudoríparas, porém não possui pêlos e glândulas sebáceas <sup>(19)</sup>.

A epiderme dá origem aos anexos cutâneos: unhas, pêlos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A abertura dos folículos pilosebáceos (pêlo + glândula sebácea) e das glândulas sudoríparas na pele formam os orifícios conhecidos como poros <sup>(20)</sup>.

As unhas são formadas por células corneificadas (queratina) que formam lâminas de consistência endurecida. Esta consistência dura confere proteção à extremidade dos dedos das mãos e dos pés.

Os pêlos existem por quase toda a superfície cutânea, exceto nas palmas das mãos e plantas dos pés. Podem ser minúsculos e finos (lanugos) ou grossos e fortes (terminais). No couro cabeludo, os cabelos são cerca de 100 a 150 mil fios e seguem um ciclo de renovação no qual aproximadamente 70 a 100 fios caem por dia para mais tarde darem origem a novos pêlos. Este ciclo de renovação apresenta três fases: anágena (fase de crescimento) - dura cerca de 2 a 5 anos, catágena (fase de interrupção do crescimento) - dura cerca de 3 semanas e telógena (fase de queda) - dura cerca de 3 a 4 meses <sup>(18)</sup>.

As glândulas sudoríparas produzem o suor e têm grande importância na regulação da temperatura corporal. São de dois tipos: as *écrinas*, que são mais numerosas, existindo por todo o corpo e produzem o suor eliminando-o diretamente na pele, e as *apócrinas*, existentes principalmente nas axilas, regiões genitais e ao redor dos mamilos. São as responsáveis pelo odor característico do suor, quando a sua secreção sofre decomposição por bactérias.

As glândulas sebáceas produzem a oleosidade da pele. São mais numerosas e maiores na face, couro cabeludo e porção superior do tronco, não existem nas palmas das mãos e plantas dos pés. Estas glândulas eliminam sua secreção no folículo pilo-sebáceo.

A pele também realiza importante papel nas respostas imunológicas do organismo aos alérgenos que entram em contato com ela na superfície do organismo. Ela possui linfócitos na derme e células apresentadoras de antígenos na epiderme<sup>(18)</sup>.

O tecido cutâneo é constituído por três camadas principais (Figura 1): a epiderme, a derme e a hipoderme<sup>(19; 18; 20)</sup>.

A epiderme é a camada mais externa da pele e é formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Essa camada é constituída por grande quantidade de proteínas do tipo queratina, que são detectadas pela espectroscopia Raman<sup>(13)</sup>.

A epiderme é subdividida em quatro camadas: camada córnea, que é a camada mais externa da epiderme; camada granulosa; camada espinhosa, onde é sintetizada a queratina, é formada por células espinhosas e onde se origina o carcinoma espinocelular; e a camada basal, que separa a epiderme da derme<sup>(20)</sup>.

A camada basal da epiderme é conhecida como a camada germinativa, onde as células se dividem, garantindo a renovação da epiderme. Apresenta alta atividade mitótica. É nesta camada que se origina o carcinoma basocelular (CBC). Ela é constituída de células prismáticas ou cubóides repousando sobre a membrana basal que separa as camadas<sup>(21; 18)</sup>.

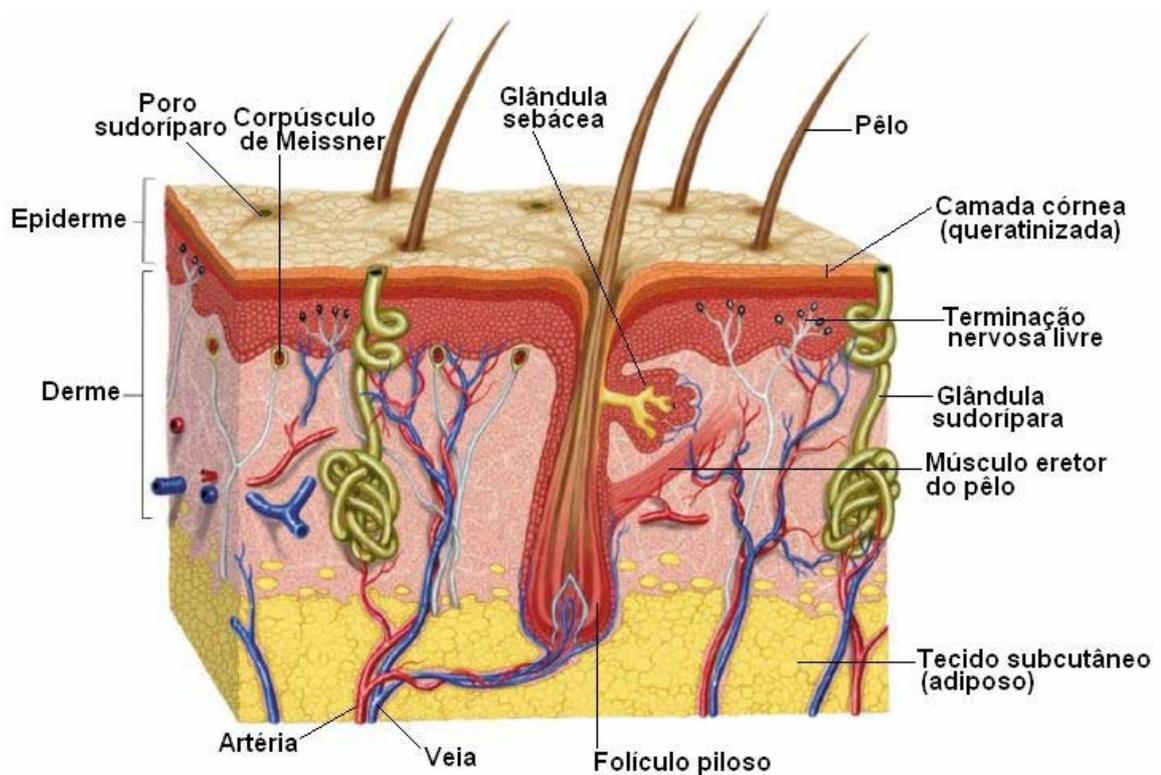
Na epiderme, existem ainda vários elementos celulares epiteliais interdependentes: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Merkel e as células de Langerhans<sup>(21)</sup>.

Os queratinócitos são as células mais abundantes na epiderme e produzem a queratina. Os melanócitos são as células que produzem a melanina, um pigmento de cor castanha natural da pele. A melanina dá a coloração à epiderme e representa uma importante barreira endógena contra os raios ultravioleta do sol. As características genéticas do indivíduo e a exposição solar determinam a quantidade da melanina incorporada em sua pele e, conseqüentemente, sua cor. As células de Merkel são receptores mecânicos e as células de Langerhans são células de defesa imunológica da pele<sup>(20)</sup>.

A derme localiza-se abaixo da epiderme. Esse limite não é regular, apresentando saliências e reentrâncias entre as duas camadas, aumentando a adesão e a coesão entre elas. Essas projeções recebem o nome de região papilar ou papilas dérmicas<sup>(18)</sup>.

A derme é uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, que se divide em derme superficial e derme profunda. A superficial é também chamada de derme papilar, e é formada pelo tecido conjuntivo papilar. A profunda é conhecida como camada reticular e é formada pelo tecido conjuntivo denso reticular. A derme reticular é composta principalmente por fibras de colágeno tipo I, rica em prolina. A derme é provida, ainda de vasos sanguíneos e linfáticos. A disseminação das células cancerígenas se dá através dessa camada<sup>(18)</sup>.

A hipoderme é a terceira camada da pele. Também chamada de tecido celular subcutâneo, colabora com a homeostasia corporal, na manutenção da temperatura fisiológica do corpo<sup>(18)</sup>.



**Figura 1: Anatomia da Pele**

Fonte: [www.afh.bio.br](http://www.afh.bio.br)

### 3.2 Neoplasias

A definição mais aceita de neoplasia é a do patologista inglês Rupert Willis: “Neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e não está coordenado ao crescimento dos tecidos normais, e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou”<sup>(22)</sup>.

As características principais das neoplasias são: proliferação celular descontrolada, perda da diferenciação celular e autonomia de crescimento. Neste contexto, o que diferencia uma neoplasia de uma displasia e hiperplasia é exatamente a autonomia de diferenciação<sup>(23)</sup>.

Na prática as neoplasias são chamadas de tumores. O termo “tumor” é mais abrangente, pois significa qualquer lesão expansiva ou intumescimento localizado, podendo ser causado por vários outros processos patológicos (inflamações, hematomas, etc).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, num processo chamado metastatização. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida<sup>(24)</sup>.

O termo câncer é a tradução latina da palavra grega carcinoma (de karkinos = crustáceo, caranguejo). Foi usado pela primeira vez por Galeno (138 – 201 d.C) para indicar um tumor maligno da mama no quais as veias superficiais do órgão eram túrgidas e ramificadas, lembrando patas de caranguejo<sup>(23)</sup>.

A classificação dos tumores em benignos e malignos baseia-se nos efeitos que eles tem sobre o organismo do hospedeiro. Os tumores benignos são de crescimento lento, expansivo, e são bem tolerados pelo organismo do hospedeiro. Os tumores malignos têm crescimento rápido, de tipo infiltrativo, e produzem efeitos nocivos importantes, podendo freqüentemente, levar à morte. Os tumores malignos são pouco diferenciados ou indiferenciados, enquanto os tumores benignos são bem diferenciados. A capacidade de invadir localmente, ganhar uma via de disseminação, chegar a sítios distantes e neles originar novos tumores é conhecida como metástase, e é outra característica dos tumores malignos<sup>(22)</sup>. O exame histológico é o método padrão para que se distingam tumores benignos de malignos<sup>(22)</sup>.

O poder de disseminação e de formar metástases constitui a diferença fundamental entre uma neoplasia benigna e maligna, porém, nem todo câncer origina metástase. O processo de disseminação das células alteradas é complexo, pois dependem de inúmeras interações entre as células malignas e normais do hospedeiro, com a participação, sobretudo do processo de

disseminação de diversos produtos gênicos, moléculas de adesão, enzimas hidrolíticas e fatores envolvidos na formação de vasos <sup>(23)</sup> .

A ciência que estuda os tumores é conhecida como Cancerologia ou Oncologia. Ela investiga as causas, a estrutura do câncer, seu tratamento e prognóstico <sup>(22)</sup> .

### **3.2.1 Carcinogênese**

Células tumorais se originam de células normais que sofreram a ação de um ou mais agentes cancerígenos, os quais provocaram alterações no DNA. Ao receberem a agressão de um agente tumorigênico, células que estão no ciclo celular ou que são capazes de nele entrar dão origem a clones de células transformadas. A carcinogênese é um processo complexo, multifásico e dependente de fenômenos genéticos e epigenéticos que culminam com o surgimento de clones de células imortalizadas que adquirem a capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de dar metástases em órgãos distantes <sup>(23)</sup> .

A carcinogênese é um crescimento novo de células que apresentam comportamento maligno e darão início ao câncer <sup>(8)</sup> em um indivíduo geneticamente suscetível <sup>(23)</sup> .

Nos últimos cem anos, o ser humano expõe-se cada vez mais a quantidades crescentes de fatores carcinogênicos. Esses fatores estão amplamente distribuídos no meio ambiente e são capazes de induzir danos ou lesões no material genético da célula, afetando a delicada homeostase existente entre as células da pele. O resultado de ações tão adversas na epiderme é representado pelo aparecimento de rugas, bolhas, erupções cutâneas ou, até mesmo, cânceres <sup>(23)</sup> .

Atualmente, admite-se que o desenvolvimento de um câncer, em qualquer órgão, é um processo evolutivo do tipo darwiniano, no qual alterações genéticas originam clones celulares que, ao adquirirem vantagem de proliferar, sobreviver, destruir e invadir os tecidos, formam os tumores <sup>(25)</sup> .

Os tumores são monoclonais, ou seja, formados por um clone que venceu a barreira do controle da proliferação celular e tornou-se imortal. Desse clone surgem os descendentes com capacidade de sobreviver, invadir os tecidos e se implantar à distância. Células normais, ao

contrário, tem capacidade limitada de duplicação, porque estão submetidas a um controle mais rígido <sup>(23)</sup>.

Os clones continuam a sofrer alterações genéticas que induzem a capacidade de sobreviver. Após a imortalização, a estabilidade do genoma diminui, diminuindo também o poder de reparo do DNA. Por essa razão, mutações, quebras e translocações ficam facilitadas, favorecendo o surgimento de novas alterações genéticas responsáveis pelas propriedades de sobrevivência, invasão e implante a distância <sup>(25)</sup>.

Alguns indivíduos são predispostos geneticamente a desenvolver algum tipo particular de câncer em algum estágio de sua vida, independente da ação do meio ambiente. Essa característica é denominada de herança genética, provém dos nossos pais e está armazenada no nosso código genético no interior do núcleo da célula. No entanto, as pessoas que herdaram de seus pais um gene mutado para o câncer, podem desenvolvê-lo ou não no decorrer de sua vida <sup>(23)</sup>.

Embora existam defesas naturais do nosso organismo, o estilo de vida e os hábitos nocivos à saúde, hoje adotados pelas pessoas, podem suprimir a capacidade desses mecanismos de defesa contra a célula mutada, e estas, se desenvolvem normalmente no organismo vindo a dar início ao câncer (carcinogênese) <sup>(23)</sup>.

O reconhecimento de que alguns tipos particulares de exposição voluntária ou ocupacional, estavam associadas a específicos tipos de cânceres, datam do século dezoito. Em 1713, o médico italiano Ramazzini correlacionou o aumento da incidência de câncer de mama entre freiras celibatárias. Durante o século vinte, enormes progressos foram feitos para definir a patologia celular e molecular nos eventos relacionados à carcinogênese, bem como elucidar os mecanismos de como vários agentes iniciam e promovem esse processo. Nas últimas décadas, o foco na pesquisa do câncer modificou-se para o estudo a nível macromoleular, dentro da bioquímica e biologia molecular das células cancerosas <sup>(25)</sup>.

A carcinogênese, portanto, é uma conseqüência não apenas de uma única mutação, mas sim o resultado do acúmulo de alterações no material genético da célula. A mutação genética, portanto, pode ser causada por repetidas exposições do organismo humano aos inúmeros agentes mutantes físicos, químicos ou biológicos <sup>(26)</sup>.

O genoma humano contém grande variedade de genes envolvidos com o controle de funções básicas, como a proliferação, sobrevivência e diferenciação terminal das células. Esses genes essenciais são suscetíveis a danos mutacionais, que podem resultar na desregulação da

proliferação e da estabilidade do genoma. Embora a natureza e a ordem de aparecimento das mutações não sejam inteiramente conhecidas para cada tipo de neoplasia, seu acúmulo progressivo é considerado crucial para a expressão do fenótipo maligno <sup>(22)</sup>.

Numerosos genes são importantes no estudo do câncer. No entanto, duas classes possuem maior interesse por serem os alvos principais das alterações genéticas que ocorrem nas neoplasias. São os genes cujos produtos favorecem ao crescimento celular descontrolado, os chamados oncogenes. São também os genes cuja ação tende a manter as células dentro dos limites fisiológicos de crescimento e diferenciação. Pertencem a esta categoria os genes de reparo do DNA, os genes controladores da apoptose e os genes supressores de tumor, entre outros <sup>(23)</sup>.

Os genes são os responsáveis em guardar e fornecer informações para o funcionamento, a multiplicação e a organização das células no organismo. São responsáveis pela produção de todas as nossas proteínas, determinando desde a estrutura até as funções do nosso corpo e o comportamento de nossas células <sup>(23)</sup>.

A causa da transformação neoplásica é uma modificação do genoma celular, ou seja, a célula neoplásica é uma célula mutante. O aparecimento de mutações no DNA ocorre em todos os seres vivos, em um processo que é fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas destas mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica e passam despercebidas. Outras, porém podem determinar a morte celular e, por conseqüência, não são detectáveis. Apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos, os protooncogenes, pode determinar um crescimento desordenado das células <sup>(27)</sup>.

A mutação, ao mesmo tempo permite que a célula se divida independentemente dos controles ambientais, leva também a alterações da diferenciação que fazem com que ela se apresente com morfologia e função diferentes da morfologia e da função da sua célula-mãe. Quanto mais intensa, quanto mais grave a alteração do genoma, tanto maior será a alteração de diferenciação e, portanto, tanto mais anômalas serão a morfologia e as funções da célula neoplásica <sup>(22)</sup>.

Os protooncogenes são genes ativos e importantes para as células normais, e na sua forma inativa ou quando regulados adequadamente, não provocam transtornos ao crescimento celular, porém quando ativados em oncogenes caracterizam as células cancerosas. Os protooncogenes podem se tornar oncogenes em duas condições: quando há alteração na estrutura do gene caracterizando a mutação ou por aumento da expressão gênica, gerando maior quantidade de proteína que estimula o crescimento celular <sup>(23)</sup>. Os oncogenes, portanto, são os protooncogenes

alterados e são responsáveis pela malignização das células normais. Quando um protooncogene sofre mutações, rearranjos, translocações ou outras alterações que o ativam em oncogene, ocorre o início da cancerização <sup>(23)</sup>.

Quando o produto protéico normal dos genes age no sentido de promover a proliferação ou a ativação celular, o gene mutado é chamado de oncogene. Quando, por um outro lado, o gene codifica alguma proteína para que haja a inibição da divisão ou ativação celular, a ele chamamos de antioncogene ou gene supressor de tumor <sup>(26)</sup>.

### **3.2.2 Etiopatogênese das Neoplasias**

Nos últimos anos, houve extraordinário avanço dos conhecimentos sobre a etiologia e patogênese das neoplasias e, junto com ele, a constatação de que fatores genéticos e componentes ambientais, alguns vírus, certos agentes físicos e substâncias químicas variadas, têm papel no aparecimento de vários tumores. Os agentes físicos, químicos e biológicos são capazes de induzir agressão ao genoma e levar ao desenvolvimento neoplásico. Tais agentes podem atuar de maneira isolada, repetida ou em conjunto. Os tumores podem ser entendidos como o resultado de agressões ambientais em um indivíduo geneticamente suscetível <sup>(22; 23)</sup>.

Atualmente cerca de 1% de todos os tipos de cânceres são de origem hereditária ou de natureza constitucional. A grande causa para o câncer, correspondendo a cerca de 80 a 90% de todos os tipos, são os fatores ambientais. Os fatores ambientais podem ser representados pelos agentes químicos oriundos do tabagismo e do alcoolismo, de infecções parasitárias veiculadas pela água e pelos alimentos contaminados, hábitos sexuais promíscuos, medicamentos e, principalmente, uma dieta alimentar inadequada.

Os fatores carcinogênicos estão divididos em: químicos, biológicos e físicos.

Substâncias químicas seguras ou presumivelmente cancerígenas encontram-se amplamente distribuídas na natureza e compreendem desde alimentos naturais até compostos altamente modificados pelo homem <sup>(23)</sup>. A maioria dos cancerígenos químicos possui ação genotóxica, ou seja, são capazes de induzir lesão do DNA <sup>(22)</sup>.

Dentre os fatores biológicos, os vírus encontram-se em destaque. Os vírus oncogênicos podem ser de DNA ou RNA. Os mecanismos pelos quais eles participam da transformação neoplásica dependem de seu ciclo no interior da célula hospedeira, sendo a etapa fundamental deste ciclo, a integração do DNA viral ao genoma. Portanto, são necessárias modificações adicionais do DNA da célula infectada para que ocorra a expressão do fenótipo maligno <sup>(22)</sup>.

Os fatores físicos relacionados a carcinogênese estão relacionados às radiações. Tanto as radiações excitantes (ultravioleta) quanto as ionizantes podem provocar tumores em humanos e em animais de laboratório. Como na carcinogênese química, as radiações também provocam mutações gênicas e podem ativar oncogene e/ou inativar genes supressores de tumor <sup>(23)</sup>.

### **3.2.3 Células Malignas**

As células das neoplasias malignas têm propriedades bioquímicas, morfológicas e funcionais diferentes. Como a taxa de multiplicação é elevada, seu crescimento é rápido. O mesmo não acontece com os vasos sanguíneos e o estroma, que se desenvolvem mais lentamente, resultando muitas vezes em degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações <sup>(23)</sup>.

Em geral, as células neoplásicas são mais volumosas que as normais, sobretudo pelo aumento do núcleo. A cromatina é irregular e mais compacta e as figuras de mitose e anomalias cromossômicas são freqüentes. Outra característica comum é o aumento da quantidade de células por área. O citoplasma também se altera, havendo geralmente variações pronunciadas no volume e forma das células. As células malignas apresentam atipias variadas, podendo perder seus aspectos morfológicos específicos <sup>(23)</sup>.

Como as células cancerosas são menos aderentes entre si, elas podem se movimentar e infiltrar os tecidos adjacentes. Também devido ao crescimento infiltrativo, o limite do câncer com as estruturas adjacentes são pouco definidos <sup>(23)</sup>.

O estudo ultra-estrutural das células malignas (microscopia eletrônica) revela tendência à simplificação, com muitos ribossomos livres, pouco retículo endoplasmático e um ou mais nucléolos exuberantes, relacionados a produção abundante de ribossomos para a síntese de proteínas necessárias para a divisão celular <sup>(22)</sup>.

As células tumorais possuem os mesmos constituintes bioquímicos das células normais, mas seu metabolismo apresenta diferenças qualitativas e quantitativas. As células malignas possuem um conjunto enzimático mais pobre que as células normais e acumulam mais água. No entanto, devido a sua grande atividade de metabolismo, possui uma quantidade baixa de glicose e seu conteúdo lipídico é semelhante ao dos tecidos normais <sup>(28)</sup>.

Essas células possuem grande capacidade de captar aminoácidos que aparecem diminuídos devido a grande atividade de síntese protéica. Ela exerce, de certo modo, uma ação espoliadora no seu hospedeiro, pois as células continuam se multiplicando mesmo quando a disponibilidade de aminoácidos é pequena <sup>(28)</sup>.

O metabolismo da célula cancerosa é dirigido fundamentalmente para a obtenção rápida de grande quantidade de energia, necessária para manter a elevada taxa de divisão celular. Portanto, nessas células a quantidade de carboidratos é diminuída. Possuem alta atividade glicolítica, seus lipídios não se alteram consideravelmente e a composição de gorduras dessas células tendem a ser diretamente proporcional a dieta do hospedeiro <sup>(28)</sup>.

A transformação maligna das células está associada a certas características comuns a toda célula neoplásica, como, por exemplo, a perda de um controle regulatório interno ou externo, próprio de cada célula. A célula neoplásica maligna possui a capacidade de se infiltrar em tecidos adjacentes, assim como a capacidade de disseminar metástases à distância por via hematogênica ou linfática. Esta nova célula maligna é diferente das demais células que a circundam, pois ela expressa enzimas de membranas alteradas e libera isoenzimas ou outros antígenos alterados. É capaz de exercer a fagocitose, o transporte celular e a glicolização de antígenos de membrana alterados. Além disso, na transformação maligna há a inibição dos processos de adesão e contato entre as células e prejuízo à comunicação intercelular favorecendo seu deslocamento para outros sítios <sup>(28)</sup>.

O organismo humano possui complexos sistemas para estimular ou inibir a proliferação celular. Nas células malignas, os oncogenes sintetizam substâncias que podem caracterizar o câncer de pele, como as citoqueratinas, que são proteínas úteis na diferenciação histológica das neoplasias epiteliais <sup>(13; 18)</sup>.

### 3.2.4 Fatores Carcinogênicos do Câncer de Pele

Os fatores carcinogênicos responsáveis pela formação de grande parte das neoplasias malignas da pele são os fatores físicos, representados principalmente pelos raios ultravioleta do sol. Causam o chamado fototrauma e fazem parte da radiação solar que atinge a Terra. São constituídos pelos raios tipos UVA, UVB e UVC <sup>(22)</sup>.

A radiação ultravioleta tipo A (UVA – 320 a 400nm) compõe a maior parte do espectro ultravioleta do sol e possui intensidade constante durante todo ao ano. O UVA é o principal responsável pelo fotoenvelhecimento da pele e possui importante participação na predisposição ao surgimento do câncer de pele e nas fotoalergias <sup>(17)</sup>.

A radiação ultravioleta tipo B (UVB – 280 a 320nm) possui maior incidência no verão, quando seus raios penetram superficialmente no tecido cutâneo. Causam queimaduras solares e trata-se da principal radiação responsável pelas alterações celulares que predispõem ao câncer de pele. A incidência dos raios solares tipo B e C tem aumentado gradativamente devido a destruição da camada de ozônio <sup>(25)</sup>.

A radiação ultravioleta tipo C (UVC > 280nm) é a parte da radiação solar letal à vida, pois tem alto poder carcinogênico, porém é filtrada pela camada de ozônio íntegra <sup>(25)</sup>.

A ação carcinogênica dos raios UV se deve à formação de dímeros de timina nas moléculas de DNA. Normalmente, essa mutação é corrigida pelos produtos dos genes de reparo do DNA. Entretanto, quando isso não ocorre, essas mutações são transmitidas para as células filhas, levando ao aparecimento de um câncer <sup>(23)</sup>.

Os raios ultravioletas da luz solar são provavelmente o agente cancerígeno mais atuante na espécie humana. Os cânceres de pele, que são os mais freqüentes em humanos, têm estreita relação com exposição ao sol e são encontrados predominantemente nas pessoas expostas à luz solar por período prolongado (lavradores, marinheiros, etc.) <sup>(23)</sup>.

O risco de aparecimento desses tumores depende da intensidade e duração da exposição e da proteção natural de cada indivíduo. A suscetibilidade a esses tumores é inversamente proporcional à pigmentação cutânea, já que a melanina é um filtro eficiente da radiação ultravioleta <sup>(23)</sup>.

As exposições prolongadas ao sol, principalmente na infância e na adolescência, podem resultar em câncer de pele na idade adulta. Os indivíduos de pele e olhos claros que se expõem excessivamente ao sol, são mais suscetíveis a desenvolverem algum dos principais tipos malignos de câncer de pele, como o carcinoma basocelular (CBC), o carcinoma espinocelular (CEC) e melanoma cutâneo <sup>(24)</sup>.

Dentre os demais fatores de risco associados a este tumor, existem os pessoais, como a pigmentação da pele, lesões precursoras (ceratoses), predisposição genética e fatores imunológicos. Agentes químicos como o arsênio e as nitrosaminas, assim como fatores relacionados à dieta, exposição à vírus e predisposição relacionada a traumas, queimaduras e cicatrizes, que podem ser identificados como agentes relacionados ao meio ambiente <sup>(32)</sup>.

### **3.2.5 Epidemiologia do Câncer de Pele**

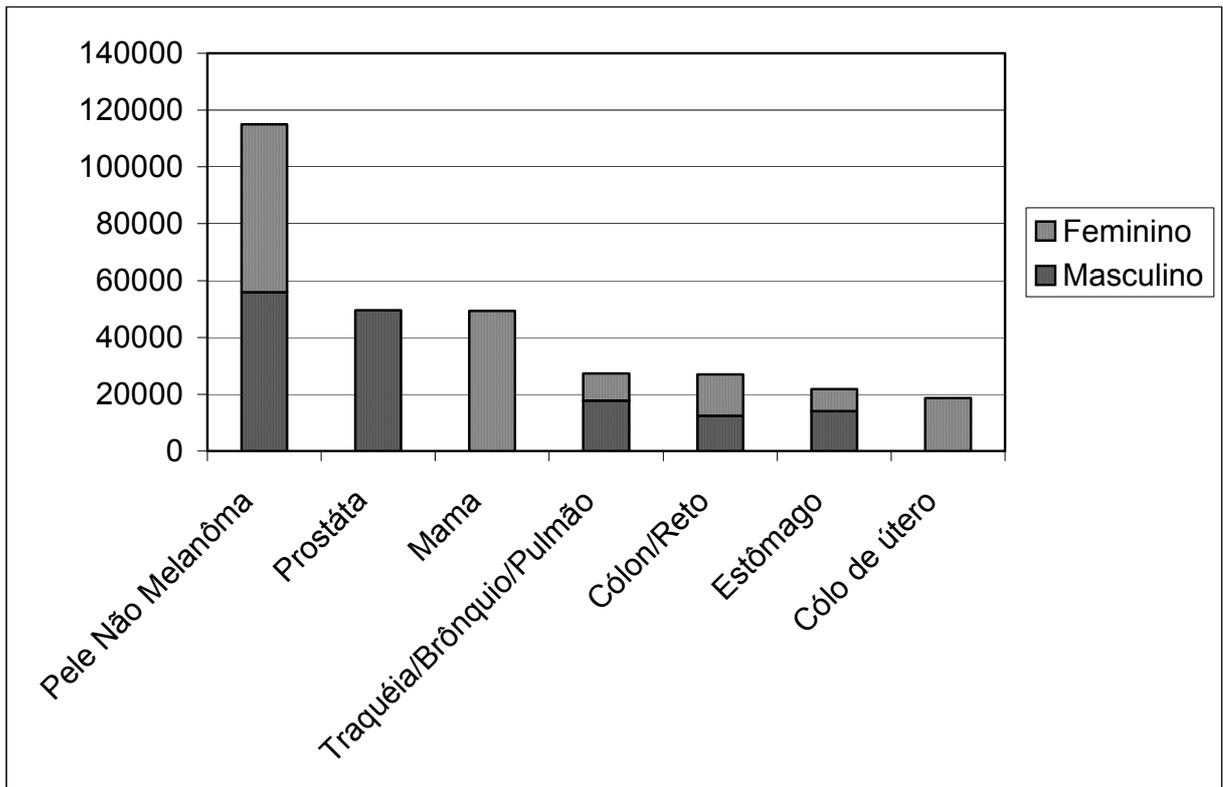
O carcinoma basocelular e o carcinoma epidermóide (CEC), também conhecidos como tumores de pele não-melanoma, são os tipos de câncer de pele mais frequentes, com 70 e 25% de incidência respectivamente <sup>(24)</sup>. São também os tipos de tumores malignos mais comuns no Brasil e no mundo.

O número de casos de câncer de pele (CEC e CBC) estimados para o Brasil em 2008 é de 55.890 casos para homens e 59.120 para mulheres, de acordo com a Estimativa de Incidência de Câncer publicada pelo Instituto Nacional do Câncer (Figura 2). Estes valores correspondem a um risco estimado de 62 novos casos para cada 100.000 homens e de 60 para cada 100.000 mulheres. A região sul é a que apresenta a maior incidência, com aproximadamente 164 novos casos para cada 100.000 habitantes. Santa Catarina é o estado com a maior incidência, tanto em homens quanto mulheres <sup>(24)</sup>.

Entretanto estes números não representam a realidade, pois existe um considerável número de casos que acabam sem registro devido ao sub-diagnóstico. Conseqüentemente, as estimativas das taxas de incidência e dos números esperados de casos novos em relação a este tipo de câncer devem ser consideradas como estimativas mínimas <sup>(24)</sup>. Em virtude da sua alta incidência, mesmo

com o diagnóstico precoce tornando-o eminentemente curável, constitui um enorme problema financeiro para os sistemas de saúde<sup>(29)</sup>.

Mais de 99% das pessoas acometidas por CBC são de pele branca e 95% se encontram em idade entre 40 e 79 anos<sup>(30)</sup>.



**Figura 2: Estimativa de incidência dos principais tumores no Brasil para o ano de 2008.**

Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA<sup>(24)</sup>

A Sociedade Americana de Câncer estimou que, no ano de 2007, mais de um milhão de casos de carcinoma epidermóides e basocelulares estariam associados à radiação ultravioleta<sup>(24)</sup>.

A incidência desses tumores parece estar crescendo em todo o mundo. O país com maior número de casos é a Austrália, chegando a uma incidência de 827 casos por 100.000 habitantes no ano de 1984, contra uma incidência de 19 casos por 100.000 habitantes de média no mundo<sup>(25)</sup>.

### 3.3 Carcinoma Basocelular

O Carcinoma Basocelular (CBC) é uma neoplasia maligna da pele. Foi primeiramente descrita por Jacobs em 1827 e é a neoplasia mais comum em humanos <sup>(29)</sup>.

Nos carcinomas basocelulares, lesões pré-malignas são identificadas em regiões de relativo aumento de exposição ultravioleta no corpo humano, como nariz, proeminência zigomática, orelhas, testa e couro cabeludo, correspondendo a 85% de todos os casos <sup>(31)</sup>. Em trabalhadores com longa exposição solar, são encontradas também em braços, mãos e pernas <sup>(25)</sup>. São menos frequentes no tronco e nas extremidades do corpo. Podem aparecer sobre queimaduras e cicatrizes <sup>(31)</sup>.

As lesões ocorrem em pele exposta e não exposta ao sol, entretanto, apresentam biologia e morfologia diferentes em cada localização. Tipicamente, o CBC ocorre a partir da quarta década de vida, porém, exceções ocorrem, particularmente em pacientes com genodermatoses específicas (que diminuem a pigmentação da pele e aumentam o risco da indução oncogênica da radiação ultravioleta ou promovem instabilidade genotípica na epiderme) <sup>(29)</sup> ou imunossupressão.

Geralmente os pacientes não referem queixas a respeito do tumor, a não ser a sua presença física. Em raras ocasiões podem apresentar desconforto ou dor, indicando a possibilidade de comprometimento de fibras nervosas. Metástases são raras e estão relacionadas ao tamanho e profundidade da lesão <sup>(29)</sup>.

Apesar de existirem diferentes apresentações clínicas para o CBC, a característica mais comum é a forma de nódulo assintomático ou lesão ulcerada e elevada da pele (Figura 3), contendo vasos telangectásicos. CBC tem tendência a ser localmente destrutivo (Figura 4). Áreas de alto risco para recidiva incluem a região central da face (periorbital, pálpebras, sulco nasolabial), região retroauricular, canal auditivo e couro cabeludo <sup>(1)</sup>. Tumores com crescimento agressivo tendem a ser maiores e ulcerados, podendo invadir e destruir olhos, orelhas e narizes <sup>(29)</sup>.

O aspecto clínico do carcinoma basocelular é muito variado e compreende-se em distintos tipos clínicos:

- CBC plano cicatricial: localiza-se principalmente na região temporal, as lesões são inicialmente uma pequena formação papulosa, de superfície lisa e com telangectasias. Forma

uma placa delimitada por bordas elevadas com pequenas ulcerações centrais cobertas por crosta, adotando na epiderme um aspecto cicatricial <sup>(34)</sup>.

- CBC nodular ulcerado: a lesão inicial é uma pequena ulceração redonda de localização maior em couro cabeludo e nariz. Suas bordas são lisas e centralmente há uma lesão infiltrada. Pode ser considerada como uma evolução do CBC nodular e pode ser destrutivo <sup>(34)</sup>.
- CBC pigmentado: contem pigmento melânico. É encontrado com frequência no tipo nodular<sup>(34)</sup>.
- CBC nodular: é um tumor globuloso de cor eritematosa, superfície lisa, coberto por telangectasias e máculas pigmentadas <sup>(34)</sup>.
- CBC vegetante: é redondo e papilomatoso. Pode ulcerar e ser confundido clinicamente com um carcinoma espinocelular <sup>(34)</sup>.
- CBC superficial: não possui tendência a se infiltrar. Ocorre com frequência no tronco, podendo ser múltiplo. Possui superfície rosada, circunscrita com bordas elevadas, máculas pigmentadas e telangectasias podem estar presentes. Crescem lentamente, no entanto, se não tratados podem ulcerar e evoluir para um CBC infiltrante <sup>(35)</sup>.
- CBC esclerodermiforme: é um tumor raro e localiza-se mais frequentemente na face. Apresenta uma placa bem delimitada de cor amarelada e aspecto céreo com superfície lisa e telangectasias. É infiltrante <sup>(34)</sup>.

Os carcinomas basocelulares derivam do epitélio basalóide localizado na protuberância folicular, nos bulbos capilares e nas matrizes foliculares das células e em células basalóides específicas da epiderme interfolicular. Os CBC manifestam um perfil de queratina similar aqueles da parte inferior do folículo piloso e isto o distingue da camada de epitélio epidérmico basal adjacente. Expressam queratinas dos tipos 5, 6 e 14, e também integrinas alfa 2 e beta 1, de uma maneira que não tem relação com os subtipos tumorais <sup>(29)</sup>.

CBC são comumente classificados em agressivos e não agressivos. A maioria dos autores considera os tipos micronodular, infiltrativo e esclerodermiforme e misto com pelo menos um componente agressivo independente do tamanho do tumor, no grupo agressivo. Os tumores não agressivos incluem os tipos nodular e superficial. Apesar da classificação do tipo superficial ainda ser motivo de debate <sup>(7)</sup>, segundo a Classificação de Sexton, ele pertenceria ao grupo não-agressivo <sup>(33)</sup>.

Os tumores agressivos são caracterizados por uma variada combinação de problemas clínicos, incluindo aumento da probabilidade de extensão subclínica e/ou excisão incompleta e/ou invasão e recorrência local <sup>(7)</sup>.



**Figura 3: Carcinoma basocelular de fronte**

Fonte: Acervo do autor



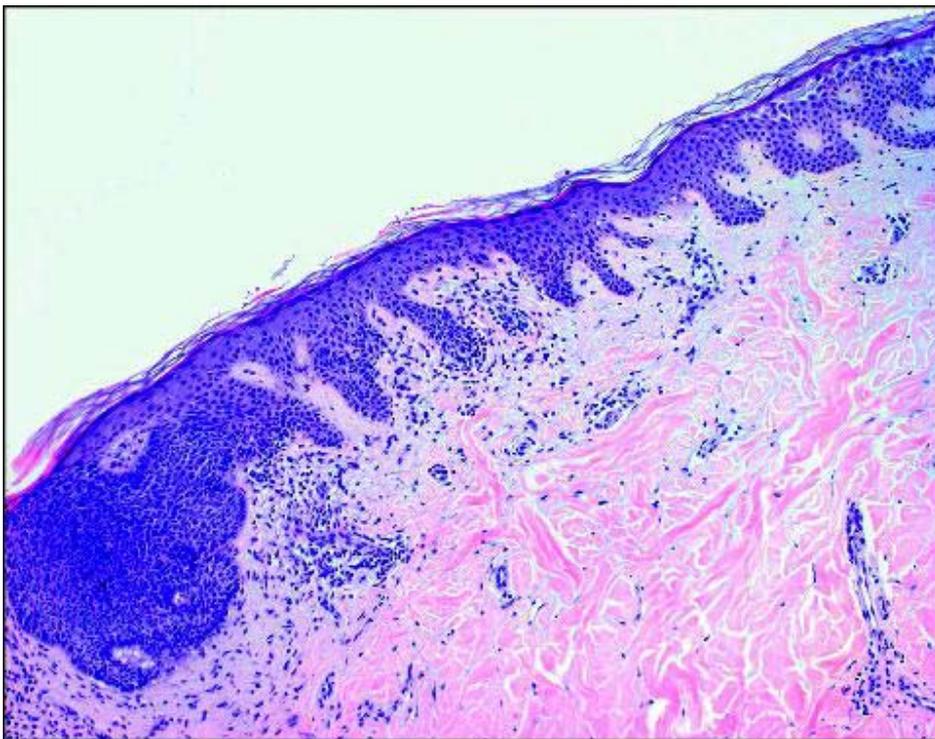
**Figura 4: Carcinoma basocelular avançado de dorso**

Fonte: Acervo do autor

### 3.3.1 Diagnóstico do CBC

Um dos grandes desafios da oncologia é o diagnóstico precoce dos tumores. Apesar da baixa letalidade dos tumores de pele (CBC e CEC), o diagnóstico tardio pode levar a ulcerações e deformidades importantes.

Atualmente, o diagnóstico dos tumores de pele se baseia na análise histopatológica de um fragmento do tecido. Através dela, pode-se avaliar o grau de diferenciação celular do tecido, suas características citológicas, morfológicas e estruturais (Figura 5) <sup>(8)</sup>. Seus resultados são confiáveis, entretanto dependem da interpretação de patologistas, os quais nem sempre chegam ao mesmo diagnóstico. Outra limitação diz respeito à necessidade da remoção tecidual, ou seja, é um procedimento invasivo <sup>(16)</sup>.



**Figura 5: Fotos de carcinoma basocelular corado pela técnica H-E, visto a microscopia óptica com aumento de 40x. Observa-se invasão de células semelhantes a da camada basal (mais escura) no tecido conjuntivo (róseo). Nota-se ainda que estas células apresentam-se em ninhos celulares na derme.**

Para o diagnóstico dos limites dos tumores cutâneos, a cirurgia micrográfica de Mohs, que consiste na análise das bordas do tumor pelo patologista durante o tratamento cirúrgico, é

atualmente a técnica que apresenta melhores resultados. Entretanto existe o inconveniente de ser uma técnica demorada, tanto para o cirurgião quanto para o patologista<sup>(36)</sup>.

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para aprimorar o diagnóstico precoce do câncer. Como exemplo, pode-se citar a dermatoscopia, tomografia computadorizada, epiluminescência microscópica, imagens produzidas pelo efeito “Doppler” dos lasers, ressonância magnética, microscopia confocal a laser, espectroscopia por fluorescência e espectroscopia Raman<sup>(13; 37; 9; 10; 11)</sup>.

A espectroscopia Raman tem se mostrado promissora na investigação de doenças malignas. Ela é capaz de fornecer importantes informações diagnósticas sem a necessidade da remoção tecidual. Permite detectar modificações na bioquímica celular, características de alterações neoplásicas, e analisa-las em segundos, possibilitando resultados em tempo real<sup>(16)</sup>.

Outra possível aplicação da espectroscopia é o diagnóstico de lesões pré-malignas e a diferenciação de tecido cutâneo normal do patológico, propiciando uma cirurgia segura e com margens adequadas<sup>(38)</sup>.

Com o advento das fibras ópticas, a possibilidade da utilização da espectroscopia no diagnóstico *in vivo* tornou-se real. Através destes *probes* pode-se, virtualmente, alcançar qualquer localização no corpo<sup>(39)</sup>. Desta maneira, esta técnica poderá se tornar uma boa alternativa para os exames anatomopatológicos, com a vantagem do diagnóstico instantâneo<sup>(38)</sup>.

### **3.4 Espectroscopia Raman**

O fenômeno de espalhamento Raman foi primeiramente descrito pelo físico indiano C. V. Raman em 1928, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1930. Na década de 60, com o advento do laser, passou a ser utilizado para a determinação da composição molecular de uma amostra (sólida, líquida ou gasosa)<sup>(76)</sup>.



**Figura 6: Físico indiano C. V. Raman (55)**

Com a introdução da espectroscopia Raman no infravermelho próximo no final da década de 1980, iniciou-se o uso da técnica Raman em estudos teciduais. Anteriormente, estes estudos eram dificultados devido à forte fluorescência dos tecidos biológicos, que impedia a obtenção de espectros Raman com boa relação sinal-ruído, por ser um sinal muito mais intenso que o próprio sinal Raman <sup>(13)</sup>. Nos últimos quinze anos, sua aplicação em análises biológicas teve grande impulso, motivada pelo desenvolvimento de novas técnicas de laser que fornecem radiação monocromática, por espectrógrafos que permitem uma dispersão eficiente e por detectores que possibilitam alta sensibilidade <sup>(41)</sup>. A evolução da informática com processadores mais rápidos e com maior capacidade de armazenamento de dados também contribuiu para o desenvolvimento da espectroscopia Raman.

Através desta técnica é possível diferenciar materiais biológicos normais e patológicos com grande precisão. Podem-se analisar diferentes materiais sem provocar danos à amostra, de maneira rápida e sem preparação prévia do material, possibilitando um exame *in vivo* em tempo real <sup>(13)</sup>.

A espectroscopia Raman apresenta um potencial promissor como uma ferramenta analítica para o diagnóstico de câncer porque pode diferenciar a composição química e estrutura molecular de tecidos normais e patológicos <sup>(16)</sup>.

### 3.4.1 O Efeito Raman

O efeito Raman é um processo em que há troca de energia entre a luz e a matéria. Quando a radiação eletromagnética proveniente de uma fonte monocromática (como o laser) atinge uma substância, ela pode ser absorvida, espalhada ou transmitida. No espalhamento elástico, chamado espalhamento Rayleigh, toda luz espalhada tem a mesma frequência da luz incidente <sup>(42)</sup>. Entretanto, para algumas moléculas, esta pode ser inelástica, a qual leva a matéria para um nível de energia excitado, o que resulta numa perda de energia do fóton e este é espalhado com frequências menores que a incidente. O espalhamento Raman pode resultar tanto em um fóton de menor energia, quanto em um fóton de maior energia. No primeiro caso, o fóton incidente encontra a molécula em um estado vibracional fundamental e o fóton espalhado a deixa em um estado vibracional excitado; a diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado corresponde, portanto, à energia necessária para excitar este nível vibracional. O mesmo acontece caso o fóton espalhado tenha maior energia que o fóton incidente, pois existe um número finito de moléculas que, devido às condições ambientais, já se encontram num estado vibracional excitado e, quando a molécula retorna ao estado fundamental, um fóton de maior energia do que o fóton incidente é criado (Figura 7) <sup>(41)</sup>.

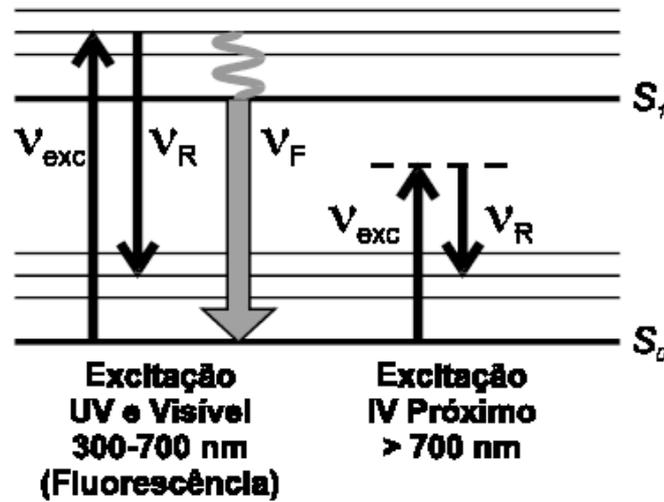


Figura 7: Diagrama dos níveis de energia. As linhas horizontais grossas representam os níveis de energia eletrônicos e as linhas horizontais finas representam níveis vibracionais de cada nível eletrônico.  $S_0$  - estado eletrônico fundamental;  $S_1$  - estado eletrônico excitado;  $\nu_{exc}$  - frequência da radiação de excitação;  $\nu_R$  - frequência do espalhamento Raman;  $\nu_F$  frequência da emissão fluorescente; UV - radiação ultravioleta; IV - radiação infravermelha.

As frequências Raman são conhecidas como linhas *Stokes* quando o fóton é espalhado com energia maior que a do incidente e de *Anti-Stokes* se a molécula está em um estado excitado e a colisão com um fóton causar uma perda de energia, fazendo a molécula sofrer uma transição para um estado de energia mais baixa (Figura 8).

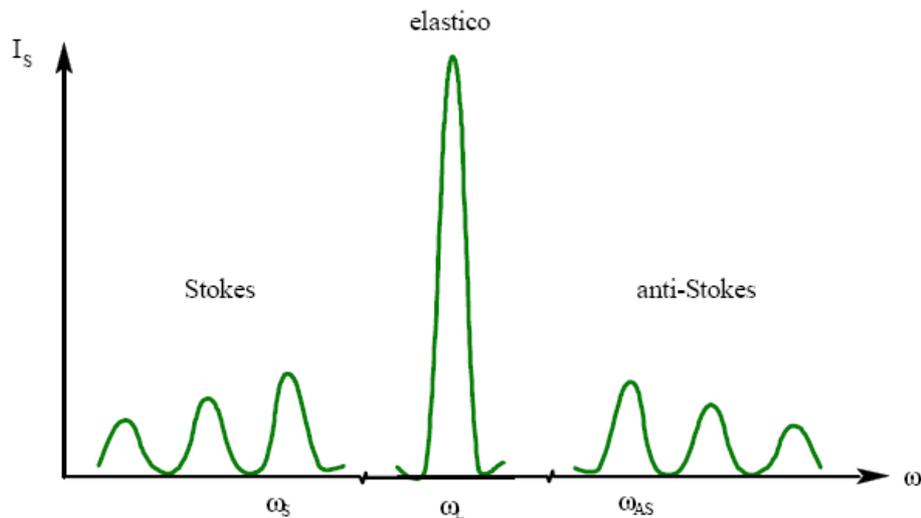


Figura 8: Espectro Raman esquemático mostrando os processos Rayleigh, Anti-Stokes e Stokes.

As frequências Raman estão relacionadas com a mudança de energia das excitações elementares de cada amostra. No caso de espalhamento Raman por vibrações das moléculas, o

espectro Raman está associado às vibrações e rotações intramoleculares, dependendo assim da simetria das moléculas e da intensidade das interações atômicas <sup>(42)</sup>.

Utilizando-se um sistema que produza radiação monocromática, como um laser, um espectrômetro que disperse a luz e um detector que converta esse sinal luminoso em elétrico, obtém-se um espectro Raman, em que a intensidade do sinal espalhado varia em função da frequência de vibração do sistema molecular. Pode-se, assim, estudar os movimentos vibracionais das moléculas dos diferentes materiais, permitindo sua identificação. O espectro Raman é, portanto, a impressão digital da molécula, demonstrando, assim suas informações bioquímicas específicas <sup>(43)</sup>.

### 3.4.2 Aplicações Biomédicas da Espectroscopia Raman

A Espectroscopia Raman (ER) é uma técnica utilizada na determinação da composição molecular de uma amostra sólida, líquida ou gasosa. Não provoca destruição das amostras, é um método não-invasivo e os resultados podem ser obtidos em tempo real. Através desta técnica é possível diferenciar materiais biológicos normais de patológicos com grande precisão <sup>(13)</sup>.

Com o advento de cabos de fibras ópticas especialmente projetadas para aplicações biomédicas, pôde-se aperfeiçoar os aparelhos e aumentar sua praticidade. Possibilitou-se, assim, a sua inserção em equipamentos como laparoscópios, endoscópios, cateteres e agulhas, dando condições de estudo *in vivo* em tempo real de vários tecidos biológicos <sup>(40; 44; 45)</sup>.

Através da ER, é possível caracterizar e diferenciar microorganismos, investigar células, tecidos e fluidos corpóreos <sup>(46; 48)</sup>. Outra aplicação, ligada à indústria farmacêutica é a análise biodinâmica de drogas. Esta técnica é também utilizada para detecção de gases (CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) dissolvidos em solução aquosa <sup>(46)</sup>, quantificação de componentes sanguíneos no soro humano (proteína, albumina, triglicerídeos, glicose) <sup>(46)</sup> e na identificação de drogas (álcool, acetaminofen, ticlopidina) <sup>(47)</sup> também no soro humano.

Devido à capacidade de analisar a composição molecular, a técnica Raman pode ser utilizada para diferenciação de tecidos malignos de benignos. Pode também avaliar o cálcio e lipídios em artérias humanas nos processos de aterosclerose <sup>(49)</sup>.

Uma das limitações do uso da ER nestes tecidos, que é a ocorrência da emissão fluorescente das moléculas biológicas, pode ser minimizado utilizando-se fontes de excitação laser na região do infravermelho próximo. Outra limitação encontrada quando se utilizam cabos de fibra óptica está relacionado à presença do sinal Raman proveniente do quartzo da fibra óptica, comportando-se como um ruído para o sinal gerado pelos tecidos biológicos. Este problema pode ser minimizado com a utilização de fibras ópticas especiais <sup>(6)</sup>, aplicação de filtros ópticos na extremidade dos cabos das fibras <sup>(6)</sup>, através da disposição geométrica mais eficiente das fibras <sup>(6)</sup> e através do aumento da abertura numérica das fibras de excitação <sup>(45)</sup>.

Recentemente, vários grupos de pesquisa demonstraram o potencial da espectroscopia vibracional no diagnóstico de câncer em vários órgãos <sup>(56)</sup>. Estes grupos têm demonstrado que diferentes achados no espectro vibracional podem estar relacionados a alterações moleculares e estruturais associadas com transformação neoplásica <sup>(57)</sup>. A ER vem sendo utilizada para detectar cânceres de origem epitelial e mesenquimal, como mama, cérebro, cólon, bexiga e pele <sup>(55)</sup>.

Por se apresentar como uma ferramenta muito útil na análise quantitativa de amostras biológicas, a espectroscopia Raman pode ser utilizada no diagnóstico médico *in situ* e *ex-situ* a fim de minimizar os procedimentos invasivos e executar tanto o diagnóstico como o tratamento em apenas uma intervenção cirúrgica.

Em 2006, Matousek et al descreveram a primeira espectroscopia Raman transcutânea de tecido ósseo *in vivo* <sup>(50)</sup>. No mesmo ano, Haka et al conseguiu analisar as margens de ressecção de tumores de mama *in vivo* utilizando a espectroscopia Raman <sup>(51)</sup>.

### 3.4.3 Espectroscopia Raman na Pele

A espectroscopia Raman foi utilizada para investigação da pele primeiramente por Edwards em 1992 <sup>(52)</sup>. Desde então vêm sendo utilizada como uma ferramenta para caracterizar a estrutura molecular da pele normal e com doença <sup>(15; 36; 38; 53; 54)</sup>.

Diversas moléculas biológicas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios apresentam bandas Raman distintas, proporcionando assim, informações sobre suas estruturas. As alterações moleculares e celulares que ocorrem no câncer podem resultar em diferenças espectrais nos

tecidos normais e cancerosos<sup>(53; 55)</sup>. Tecidos tumorais apresentam diferentes propriedades ópticas, que são causadas, principalmente, por mudanças nas estruturas moleculares das proteínas e lipídios.

Gniadecka et al (1997) comparou a estrutura molecular da pele normal com a pele com doenças benignas (dermatofibroma, ceratose seborréica, ceratose actínica, ceratoacantoma, nevos compostos, nevos displásicos) e malignas (CBC, CEC). Lesões histogeneticamente correlatas (ceratose actínica e CEC) apresentaram espectros similares, mas não idênticos. Cada lesão produziu um espectro único e reproduzível, concluindo que a espectroscopia Raman é uma ferramenta útil no diagnóstico de lesões cutâneas<sup>(14)</sup>.

#### **3.4.4 Alterações bioquímicas da célula neoplásica e a espectroscopia Raman da pele**

As células neoplásicas apresentam alterações características como aumento do material nuclear, aumento da razão núcleo-citoplasma, aumento da atividade mitótica e distribuição anormal da cromatina, entre outros. Existe uma progressiva perda da maturação celular, e a proliferação de células não diferenciadas resulta em um aumento da atividade mitótica.<sup>(23; 57)</sup>

Estas características gerais das células neoplásicas resultam em mudanças específicas no ácido nucléico, proteínas, lipídios e na quantidade ou na conformação dos carboidratos.<sup>(25)</sup>

As células neoplásicas captam aminoácidos em maior velocidade que as normais e realizam a glicólise com mais eficiência. O metabolismo dos lipídios é pouco alterado e a composição das gorduras nas células neoplásicas tende a ser semelhante à da dieta do hospedeiro.<sup>(23)</sup> Também sintetizam proteínas mais rapidamente. A quantidade de lactato produzida é maior que em células normais. Enzimas proteolíticas, como a serina e cistina são secretadas em maior quantidade, ocasionando alterações moleculares nos tecidos que podem indicar uma neoplasia. A espectroscopia Raman pode ser utilizada para detectar estas alterações bioquímicas específicas.

### 3.4.4.1 Proteínas

As proteínas são compostos orgânicos de alto peso molecular. São formadas por aminoácidos conectados por ligações de amido (peptídeos) <sup>(58)</sup>. Representam cerca de 50 a 80% do peso seco da célula sendo, portanto, o composto orgânico mais abundante da matéria viva.

A estrutura primária da proteína é determinada pela seqüência dos aminoácidos. Vários aminoácidos podem ser detectados pela espectroscopia Raman, como por exemplo, a adenina (727  $\text{cm}^{-1}$ ), timina (746  $\text{cm}^{-1}$ ), fenilalanina (1003  $\text{cm}^{-1}$ ), tirosina (1207  $\text{cm}^{-1}$ ) e triptofano (bandas em 1338, 1361 e 1553  $\text{cm}^{-1}$ ) <sup>(38)</sup>. Na estrutura secundária da proteína, o sinal Raman é influenciado pela amida I (1650 - 1660  $\text{cm}^{-1}$ , vibração de estiramento de C=O), pela amida III (na região de 1240  $\text{cm}^{-1}$ , vibração de estiramento C-N e C-H e pela vibração do C-C na região de 940  $\text{cm}^{-1}$ ) <sup>(53; 57)</sup>.

### 3.4.4.2 DNA

Os ácidos nucléicos, como o DNA, são constituídos por nucleotídeos, que consistem de açúcares tipo fosforilase ligados à purina ou a base de pirimidina. <sup>(58)</sup> As bases de purina são formadas pela adenina e guanina e as bases de pirimidina são formadas pela citosina e timina no DNA e formadas de uracil no lugar da timina no RNA.

O DNA pode existir em varias conformações, e a espectroscopia Raman pode ser utilizada para determinar estas conformações. Em geral, as bandas vibracionais Raman do DNA são atribuídas predominantemente, aos açúcares ou às suas quatro bases em várias regiões espectrais de 800 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , predominantemente em 786 e 830  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>(59)</sup>

### 3.4.4.3 Lipídios

Os lipídios estão presentes na pele em várias conformações. No estrato córneo, os lipídios são encontrados na forma cristalina. Já na pele total, os lipídios estão na forma fluida, na forma de adipócitos, perdendo sua estrutura cristalina e interagindo mais livremente com as proteínas<sup>(53)</sup>.

Na forma cristalina, os lipídios são caracterizados por bandas Raman nas regiões espectrais de 1066 e 1130  $\text{cm}^{-1}$ . Já na pele total, o pico dos lipídios se encontra na região de 1100  $\text{cm}^{-1}$ <sup>(53)</sup>.

As membranas celulares são formadas por duplas camadas de moléculas de fosfolipídios. O espectro do fosfolipídio contém vibrações do C-N, enquanto que nas cadeias hidrofóbicas este espectro corresponde à vibração do C-C (1100 $\text{cm}^{-1}$ ). Cadeias de deformação de  $\text{CH}_2$  e vibrações de  $=\text{C-H}$  (aproximadamente 1267 $\text{cm}^{-1}$ ), também podem ser detectadas utilizando a espectroscopia Raman, assim como os modos vibracionais  $\text{C}=\text{C}$  (aproximadamente 1670 $\text{cm}^{-1}$ )<sup>(14; 38)</sup>.

**Tabela 1: Picos Raman de diferenças espectrais características de CBC na derme e sua correlação bioquímica.**

Deslocamento Raman ( $\text{cm}^{-1}$ )	Identificação
727	Adenina
746	Timina
786	DNA, RNA (estiramento simétrico PO2)
830	DNA (estiramento assimétrico PO2), Tirosina
957	Lipídios, Proteínas (deformação $\text{CH}_3$ )
1003	Fenilalanina (anel)
1085	Lipídios, ácidos nucleicos (estiramento simétrico PO2)
1127	Lipídios (estiramento C-C, trans)
1207	Tirosina, Fenilalanina
1304	Lipídios, Proteínas (amida III), adenina, citosina
1336	Adenina, Fenilalanina, deformações CH
1445	Lipídios, Proteínas (deformação $\text{CH}_2$ )
1651	Lipídios (estiramento $\text{C}=\text{C}$ )
1640-1680	Proteína (amida I)

Fonte: NIJSSEN, et al.<sup>(38)</sup>

**Tabela 2: Energia e identificação dos principais modos vibracionais da pele humana normal e maligna *ex vivo* (CBC)**

<b>Deslocamento Raman (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Identificação</b>
700 - 800	Adenina, Timina, DNA e RNA
810 - 860	Polissacarídeos
900 - 985	Aminoácidos, Valina, Prolina
1003 - 1005	Fenilalanina (anel)
1021 - 1144	PO <sub>2</sub> , Ácidos Nucléicos
1144 - 1122	Tirosina
1222 - 1362	Lipídios, Proteínas, Amida III
1300 - 1400	Adenina e Fenilalanina
1400 - 1500	Proteínas e Lipídios
1540 - 1620	DNA
1640 - 1680	Amida I - Banda de Proteínas

Fonte: Gniadecka <sup>(14)</sup>

### 3.5 Processamento dos Espectros Raman

A técnica de Espectroscopia Raman tem se mostrado eficaz na análise de amostras biológicas, entretanto, a sua eficácia não está somente relacionada a uma boa coleta de sinal, mas principalmente ao tipo de análise espectral empregada, uma vez que os espectros possuem muitas informações não perceptíveis em uma análise meramente visual. Vários fatores e picos nos espectros dependem de uma análise específica para detectá-los e diferenciá-los <sup>(41)</sup>.

A Análise dos Componentes Principais (PCA) é uma das análises mais utilizadas. Trata-se de uma análise estatística multivariada que vem complementando a eficácia da espectroscopia Raman, sendo capaz de qualificar os espectros de acordo com as suas diferenças, manifestadas com picos. Outra técnica, a dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) que também tem sido utilizada para quantificar espectros <sup>(36; 41)</sup>.

### 3.5.1 Análise dos Componentes Principais (PCA)

A PCA é uma técnica de análise estatística multivariada empregada com eficiência nas análises espectroscópicas, permitindo a identificação tanto de alterações patológicas como na determinação de parâmetros ópticos de tecidos normais e patológicos<sup>(41; 43)</sup>. Os espectros obtidos podem ser alterados por uma série de fatores que influenciam seu padrão. Dentre estes fatores, pode-se citar diferenças nos constituintes das amostras, ruídos de fundo, ruídos de fóton, variações no espectrômetro, manuseio da amostra e outros artefatos. Esses fatores alteram a aparência final do espectro. Os fatores mais importantes estão relacionados com a composição da amostra, visto que se objetiva classificar os sinais em grupos bem definidos. A PCA é uma ferramenta que permite separar a informação relevante de ruído ou artefato e também compreender e reconhecer padrões<sup>(60)</sup>.

A PCA possibilita classificar as amostras em categorias bem definidas, a partir de um conjunto de espectros obtidos destes materiais, porém sem necessidade de conhecimento prévio da composição bioquímica dos mesmos. Esse fato é importante, porque nem sempre se tem a informação completa da composição do material que está sendo analisado<sup>(41)</sup>.

A PCA é baseada na repetição da coleta de espectros em pontos diferentes e em diferentes amostras. Com isto, há a ampliação das possibilidades de se verificar quais são as bandas de relevada importância para a identificação das variáveis e verificar também quais são as bandas com o mesmo comportamento<sup>(61)</sup>.

No cálculo da PCA, os dados obtidos na leitura espectral são decompostos em componentes principais (PC), que são as variações de maior ocorrência em todo o conjunto de dados das diferentes amostras. Cada PC representa o eixo de maior variação espectral. Após o cálculo do componente principal, esta informação é subtraída do conjunto de dados e um novo PC é calculado. Os escores (ES) são coeficientes de escala, ou seja, a intensidade que cada PC se apresenta em cada espectro e são calculados para cada componente principal<sup>(41)</sup>.

A equação da PCA pode ser descrita como:

$$\mathbf{A} = \mathbf{PC} \times \mathbf{ES}$$

onde A representa o conjunto de espectros originais do material a ser analisado, PC os espectros dos componentes principais e ES representa os escores, ou as intensidades que cada PC apresenta em cada espectro original.

Visando a separação dos dados espectrais em grupos com características semelhantes, os vários PCs são cruzados no intuito de se obter um agrupamento e a melhor classificação das amostras.

Como a PCA utiliza toda a informação espectral, e resulta em uma intensidade de cada espectro com relação ao componente principal, diferenças insignificantes que poderiam passar despercebidas em análises visuais ou utilizando faixas espectrais ou mesmo bandas são efetivamente levadas em consideração. Decompondo matematicamente os espectros em componentes principais, as informações mais importantes são utilizadas como critério de identificação dos tecidos, visto que cada componente principal é por definição um espectro <sup>(61)</sup>.

### **3.5.2 Utilização da PCA na Espectroscopia Raman**

A Análise dos Componentes Principais vem sendo amplamente utilizada por vários autores em associação com a ER para a análise de amostras biológicas.

Pandya et al (2008) diferenciou tecido pancreático normal de canceroso em ratos utilizando a espectroscopia Raman no infravermelho próximo (785nm) e a PCA. Foram analisados 920 espectros, com sensibilidade entre 91 e 96% e especificidade entre 88 e 96%. O tecido tumoral foi caracterizado por apresentar aumento de colágeno e diminuição de DNA, RNA e lipídios, quando comparado com o tecido normal <sup>(62)</sup>.

Kawabata et al (2008) utilizou a PCA para diferenciar câncer gástrico de tecido não-neoplásico analisado pela Espectroscopia Raman. O experimento foi realizado com um espectroscópio Raman (1064nm) em 251 espécimes de biópsia gástrica endoscópica contendo tecido tumoral e normal. A sensibilidade foi de 66% e a sensibilidade de 73% para diferenciar tecido neoplásico de normal <sup>(63)</sup>.

Maheedhar et al (2008) diferenciou câncer de ovário de tecido normal *ex vivo* utilizando a PCA e a distância de Mahalanobis como instrumentos de análise dos espectros. Foram analisados

72 espectros provenientes de 8 ovários normais e 7 com tumores. Utilizou-se um espectroscópio Raman no infravermelho próximo sintonizado em 785nm. Foi encontrada diminuição do espectro na banda da amida I e aumento na banda da amida III nos tecidos tumorais quando comparado com o ovário normal <sup>(64)</sup>.

Kast et al (2007) detectou alterações neoplásicas e pré-neoplásicas em mama de ratos através da espectroscopia Raman no infravermelho próximo, utilizando a PCA como instrumento de análise. Foram analisados espectros coletados de 17 tumores, 18 tecidos peri-tumorais e 17 tecidos da mama contra-lateral. Houve diferença estatística entre os tecidos tumorais, mastite e o tecido normal <sup>(65)</sup>.

Em suma, a técnica PCA possibilita analisar os espectros e agrupá-los, dependendo da informação espectral observada em cada componente principal correlacionada com a alteração histológica do tecido neoplásico.

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Obtenção das Amostras**

Amostras de Carcinomas Basocelulares foram obtidos de pacientes provenientes do consultório privado. Foram coletadas no Hospital Regional do Oeste e no Hospital da Unimed de Chapecó – SC.

As amostras foram obtidas de procedimentos cirúrgicos de biópsias excisionais de pele em lesões de pele humana suspeita de CBC. Estas lesões foram então divididas em duas partes, uma delas submetida à análise histopatológica convencional (hematoxilina-eosina) e outra identificada e prontamente armazenada em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior análise por espectroscopia Raman. As amostras para análise Raman foram retiradas da parte central do tumor, o que não prejudica a análise das margens de ressecção.

As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos de 1,2mL Nalgene® e mantidas congeladas em nitrogênio líquido até a realização da espectroscopia Raman, que implicou no transporte das amostras até o Laboratório de Espectroscopia Raman do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) em São José dos Campos. Este transporte foi realizado em tambor de nitrogênio líquido, evitando o descongelamento e a possível degradação das amostras.

As lesões suspeitas foram classificadas em malignas (diagnóstico histopatológico de CBC) e não-malignas (ceratoses, acantomas, cistos dermóides, etc.). Somente fizeram parte do estudo as amostras com diagnóstico histopatológico confirmado para malignidade (carcinomas basocelulares). Amostras de pele normal foram obtidas através de retalhos de pele normal de outras cirurgias. Em virtude da concentração local de indivíduos com fototipo de pele I e II, somente esses tipos de pele fizeram parte do estudo. As amostras foram conservadas em tubos criogênicos e mantidas congeladas em nitrogênio líquido até a realização da espectroscopia.

Para a realização do estudo dos componentes basais foram utilizadas espectros de tendão humano (colágeno) e gordura da adventícia de artérias coronárias (lipídios) armazenados no banco de dados do Laboratório de Espectroscopia Raman do IP&D da UNIVAP.

## **4.2 Tamanho da Amostra**

Foram examinados 54 fragmentos de tecido cutâneo, sendo 13 amostras de peles normais e 41 amostras com suspeita de carcinomas basocelulares.

Foram excluídas do estudo quatro amostras referentes a carcinomas basocelulares pigmentados de um paciente com fototipo de pele III e oito amostras cujas análises histopatológicas mostraram não se tratarem de carcinomas basocelulares (um carcinoma basoescamoso, um ceratoacantoma, três ceratoses, dois carcinomas epidermóides *in situ* e um carcinoma epidermóide infiltrativo).

Portanto, permaneceram no estudo 13 amostras de peles normais (29 espectros) e 29 amostras com diagnóstico histopatológico (58 espectros).

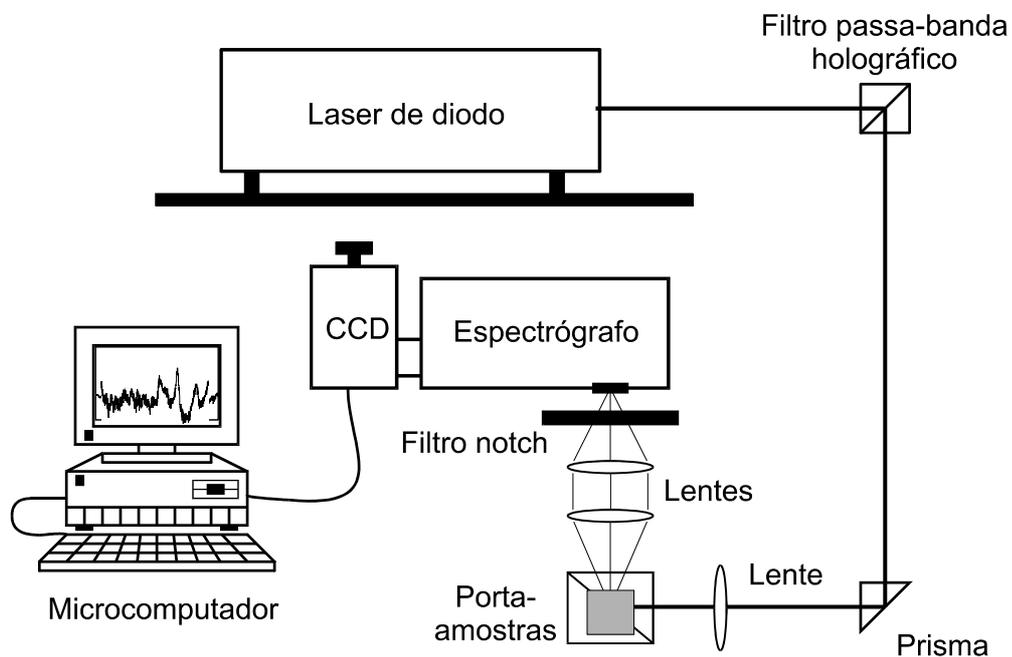
## **4.3 Parâmetros Éticos**

Os pacientes foram informados da pesquisa e foi obtida a permissão para a utilização das amostras, sendo que após o consentimento verbal, foi assinado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo A). Os pacientes terão acesso aos resultados do estudo. O estudo foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos, conforme as normas do Comitê de Ética da UNIVAP, tendo sido aprovado por este sob o número 043/07 (anexo B).

## **4.4 Realização da espectroscopia Raman**

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Raman do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

Utilizou-se um sistema Raman de bancada (Figura 9) que possui um laser de diodo AsGaAl (Micro Laser Systems Inc., model L4830S), sintonizado em 830 nm (infravermelho próximo) com potência de 100mW. Para a filtragem, direcionamento e focalização do laser foi utilizado um sistema óptico composto por um filtro passa-faixa holográfico para o comprimento de onda do laser (Kaiser Optical Systems, model HLBF 830), um prisma de ângulo reto de sílica fundida e uma lente de distância focal de 100 mm. O diâmetro do feixe de laser focalizado no porta-amostras foi de 0,2 mm. A potência do laser após o sistema óptico foi de 60mW.



**Figura 9: Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo de bancada. Potência do laser: 60mW, comprimento de onda de excitação: 830nm, resolução espectral:  $8 \text{ cm}^{-1}$ .**

O fragmento de tecido cutâneo foi colocado em um porta-amostras constituído basicamente por um suporte de alumínio fosco medindo 10 mm de largura por 20 mm de altura, adaptado a um posicionador com deslocamento nos três eixos. Este porta-amostras foi posicionado de forma a fazer um ângulo de aproximadamente  $45^\circ$  com relação ao feixe laser incidente. A coleta da luz retroespalhada e da emissão provenientes do tecido foi feita por um sistema óptico composto por duas lentes, também a  $45^\circ$  com relação ao feixe laser incidente. Para evitar a reflexão especular da amostra, que poderia entrar pelo espectrógrafo e causar saturação do detector, o ângulo foi ligeiramente diferente de  $45^\circ$ . A radiação laser foi bloqueada na entrada do espectrógrafo por

meio de um filtro rejeita-banda do tipo *notch* com comprimento de onda de rejeição de 830 nm (Spectral Iridian Technologies, model PN – ZX 000080).

O elemento dispersor de luz foi um espectrógrafo de imagem f/4 com grade de difração de 600 linhas/mm (Chromex, Model 250IS). A fenda de entrada do espectrógrafo foi fixada em 200 $\mu$ m. A resolução máxima deste instrumento para a abertura da fenda escolhida foi de 8 cm<sup>-1</sup>. Para a detecção do sinal luminoso, utilizou-se uma câmara CCD (Princeton Instruments, model ST130) refrigerada por nitrogênio líquido associada a um controlador da câmara. Esta câmara CCD é composta por 1024 elementos dispostos na horizontal que é o sentido da dispersão da grade do espectrógrafo e 256 elementos dispostos na vertical. O tempo de exposição para obtenção dos espectros foi escolhido de maneira que não houvesse saturação do sinal da câmara CCD e situou-se entre 50 e 100 s.

As amostras foram descongeladas individualmente, à temperatura ambiente e mantidas úmidas, com solução fisiológica a 0,9% até a coleta de dados. A fim de evitar a degradação das amostras, as mesmas foram mantidas descongeladas num período não superior a 20 minutos.

As amostras possuíam diâmetro entre 2 e 5 mm. Foram realizadas coletas de espectro em um ponto central e outro periférico em todas as amostras, para posterior análise. Algumas amostras de tecido normal foram feitos dois espectros na parte central e um na periférica. Foram utilizadas pinças para o manuseio, colocação e posicionamento corretos das amostras para sua leitura espectroscópica.

Após o experimento, as amostras foram fixadas em formol a 10%, acondicionadas em frascos rotulados, identificadas e encaminhadas para o exame histopatológico. Os dados foram comparados com os laudos histopatológicos prévios da peça principal.

#### **4.5 Análise Histopatológica**

A biópsia foi inicialmente fixada e armazenada em formol 10%. Foram confeccionados blocos de parafina, realizados cortes micrométricos e corados com corantes especiais. A análise histopatológica foi realizada no Instituto de Patologia do Oeste de Chapecó – SC.

As amostras foram processadas de acordo com as etapas da técnica histológica: desidratação em diferentes concentrações de álcool, diafanização em xilol, inclusão em bloco de parafina para o corte em micrótomo com uma espessura de 4 $\mu$ m, coloração com hematoxilina e eosina, e por último, a montagem das lâminas para sua leitura em microscopia óptica.

A amostra submetida à espectroscopia também foi submetida aos mesmos procedimentos de análise histopatológica, após a coleta de dados. A análise foi realizada no Instituto de Patologia Oeste de Chapecó/SC.

#### **4.6 Pré-processamento dos Espectros**

Foram realizadas calibração e filtragem dos espectros para a obtenção de espectros sem ruídos de fundo e artefatos. Para tanto, foram utilizados os seguintes *softwares*: Matlab (The Mathworks, MA, USA, versão 4,2) e o Excel (Microsoft Corporation, MA, USA, versão 7.0).

Para corrigir a dependência da intensidade da óptica de coleta do espectrômetro Raman (lentes / espectrômetro / CCD) com relação ao comprimento de onda da radiação na faixa de interesse, foi realizada a calibração da resposta espectral. A calibração do espectrômetro em relação ao deslocamento Raman foi realizada no início de cada nova seção de experimentos, devido à necessidade de conhecer a localização de cada banda de um espectro em termos da sua frequência e ao fato de que a posição da amostra no espectrógrafo pode sofrer deslocamento entre os experimentos.

O pré-processamento dos espectros Raman envolveu na primeira etapa a remoção da emissão de fluorescência de fundo (componente espectral de baixa frequência) e a filtragem do ruído eletrônico e ruído de fóton (componente de alta frequência). A emissão fluorescente, sem importância em termos de características espectrais, foi removida por meio de um filtro polinomial, que consiste na aplicação de um polinômio de ordem 4 no espectro bruto e subtrair este polinômio do sinal. Após a filtragem da fluorescência, os espectros foram normalizados, visando a equalização das intensidades. Para remover o ruído de alta frequência e melhorar a relação sinal-ruído do espectro Raman, utilizou-se filtragem do tipo passa-baixas digital. O pré-

processamento foi realizado por uma rotina implementada no *software* Matlab (The Mathworks, versão 5.2).

Ruídos espúrios tais como oriundos dos raios cósmicos foram removidos manualmente no *software* Excel.

#### **4.7 Análise de Dados**

A fim de verificar quais as regiões espectrais apresentaram maiores diferenças entre os tumores malignos (CBC) e a pele normal, os principais picos de um determinado espectro do tecido CBC foram correlacionados com o respectivo pico de um tecido normal, realizando-se uma comparação de posição de banda e intensidade. Esta análise foi apenas descritiva e teve o intuito de mostrar as bandas Raman que aparecem nos dois tecidos e correlacioná-las com os componentes bioquímicos presentes, descritos na literatura.

Visando classificar os espectros em dois grupos dependendo dos resultados histológicos das biópsias, foi aplicada a técnica PCA. A PCA objetiva encontrar os espectros de variância, e correlacionar estes espectros com o tipo de tecido analisado. Os coeficientes da PCA, que são os PCs (espectros das variâncias) e os ESs (intensidades destas variâncias em cada espectro), fornecem as informações necessárias para encontrar as variáveis que mais se relacionam na diferenciação dos tipos de tecidos.

Os componentes principais foram plotados e a indicação de qual ou quais PCs são responsáveis pela máxima diferenciação espectral foram determinados a partir do cálculo da distância Euclidiana e de Mahalanobis entre os dois diferentes tipos histológicos (pele normal e carcinoma basocelular). A distância de Mahalanobis, por levar em consideração a covariância dos dados, é um parâmetro muito útil para classificar os dados de um grupo comparativamente a outro e também para verificar a coesão do agrupamento da nuvem de pontos experimentais, visando a análise discriminante.

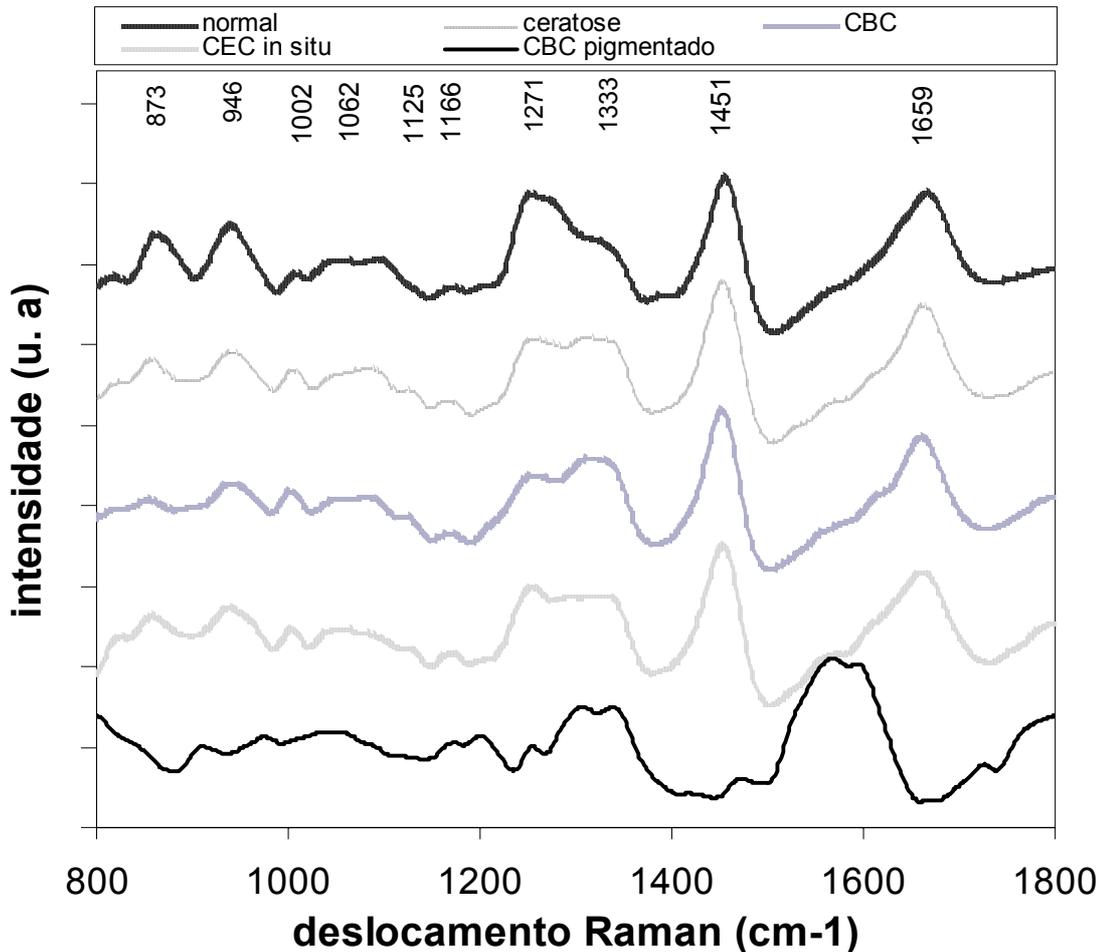
Para a análise dos Componentes Basais (colágeno e lipídios) foi utilizando o método dos mínimos quadrados (LSM) afim de verificar a quantidade relativa destes componentes dentro do espectro dos tecidos analisados.

## 5 Resultados

Na Figura 10 são apresentados os espectros Raman médios e normalizados de amostras de diferentes tipos de tecidos cutâneos humanos (pele normal e lesões cutâneas benignas e malignas) no intervalo espectral de 800 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ . Pode-se observar diferenças de intensidade de algumas bandas do espectro Raman em todos os tecidos, enquanto outras permanecem inalteradas. A correlação entre os picos Raman e os componentes bioquímicos foi realizada como descrito na Seção 3.4.4: banda em 1659 $\text{cm}^{-1}$  (entre 1640 e 1680 $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde ao estiramento C=O da amida I; banda em 1451 $\text{cm}^{-1}$  (entre 1420 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde à vibração de deformação do CH<sub>2</sub> dos lipídios; bandas entre 1271 e 1333 $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde à vibração N-H e estiramento C-N da estrutura alfa-helicoidal da amida III, banda em 1125 $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento C-C dos lipídios; banda em 1085 $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento simétrico PO<sub>2</sub> dos lipídios e ácidos nucleicos; a banda em 1002 $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde ao anel (ligações C-C) da fenilalanina; bandas entre 873 - 946 $\text{cm}^{-1}$  que correspondem ao colágeno, devido à vibração da prolina e do estiramento C-C da estrutura protéica <sup>(14; 38; 66)</sup>.

As proteínas podem ser identificadas através das bandas da amida I, no intervalo de 1600 a 1700 $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo principalmente, ao modo de vibração de estiramento das ligações C=O; e amida III, no intervalo de 1222 a 1362 $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo à vibração no plano das ligações do N-H, e também pelo estiramento do C-N, além de outras vibrações mais fracas. (14; 38; 67)

Achados espectrais provenientes da conformação dos lipídios são identificados pela deformação do CH<sub>2</sub> na região entre 1420 e 1500 $\text{cm}^{-1}$ , do estiramento C-C com banda em 1125 $\text{cm}^{-1}$  e estiramento PO<sub>2</sub> simétrico em 1085  $\text{cm}^{-1}$  <sup>(38; 67)</sup>.



**Figura 10:** Espectro Raman dispersivo de pele normal, ceratose, carcinoma basocelular, carcinoma epidermóide *in situ* e carcinoma basocelular pigmentado.

Em virtude da pequena quantidade de amostras, foram retirados do estudo as amostras de carcinomas espinocelulares, ceratoses e carcinomas basocelulares pigmentados.

Na Figura 11 são apresentados os espectros Raman médios das amostras de pele normal e pele com CBC na região entre 800 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ , onde podem ser observadas diferenças espectrais importantes em cada tipo de tecido. Essas diferenças ocorrem, principalmente, nas regiões identificadas no gráfico: região 1 - bandas de 800 a 1000 $\text{cm}^{-1}$ ; região 2 - bandas de 1000 a 1100 $\text{cm}^{-1}$ ; região 3 – bandas de 1200 a 1350 $\text{cm}^{-1}$ ; e região 4 - bandas de 1500 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Não se observou um decréscimo relevante entre os picos de proteínas e lipídios nas bandas de 1400 a 1500 $\text{cm}^{-1}$ , que pudesse ter impacto no diagnóstico.

A pele normal apresenta lipídios endógenos que podem ser identificados nas bandas de 946 e 1297 $\text{cm}^{-1}$  correspondendo, respectivamente, a fosfolipídios e ceramidas <sup>(67)</sup>. Achados espectrais de lipídios em tecido cutâneo encontram-se na região de 1050 - 1100 $\text{cm}^{-1}$  (cadeia de hidrocarbono). As deformações C-H associada a lipídios e CH<sub>2</sub> a proteínas correspondem ao pico 1445 $\text{cm}^{-1}$ . O conteúdo protéico da pele normal pode ser visualizado principalmente pelas bandas de amida I (1659 $\text{cm}^{-1}$ ), amida III (1304 $\text{cm}^{-1}$ ), além de diversas outras vibrações mais fracas ao longo do espectro <sup>(38; 67)</sup>.

A **região 4** da Figura 11 corresponde a amida I (1600 - 1680 $\text{cm}^{-1}$ ) e está relacionada as vibrações C=O. No nosso estudo, foi verificado um pequeno aumento da intensidade do espectro do CBC na região de menor energia desta banda, em torno de 1600 a 1500 $\text{cm}^{-1}$ .

Nas bandas espectrais de 1540 a 1620 $\text{cm}^{-1}$  (**região 4**) e 1040 a 1100 $\text{cm}^{-1}$  (**região 2**), que correspondem ao modo vibracional do DNA, foi observado um aumento na intensidade do espectro no tecido do tipo CBC.

No intervalo espectral de 800 a 1000 $\text{cm}^{-1}$  (**região 1**), correspondente à vibração de estiramento dos aminoácidos, adenina, timina, DNA e RNA, também houve diferenças espectrais entre os tecidos normais e neoplásicos.. Na região de 940  $\text{cm}^{-1}$  (banda de proteína, deformação CH<sub>3</sub>) há uma diminuição da intensidade do espectro no CBC.

As alterações bioquímicas encontradas no tecidos malignos modificam significativamente a intensidade das bandas de vibração da amida III (**região 3**), sendo que na intensidade da banda em 1271 $\text{cm}^{-1}$  é duas vezes menos intensa que na pele normal.

Na região da banda em torno de 1450  $\text{cm}^{-1}$ , relacionada a proteínas e lipídios (CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>), não foi verificado um aumento significativo da intensidade no espectro do CBC.

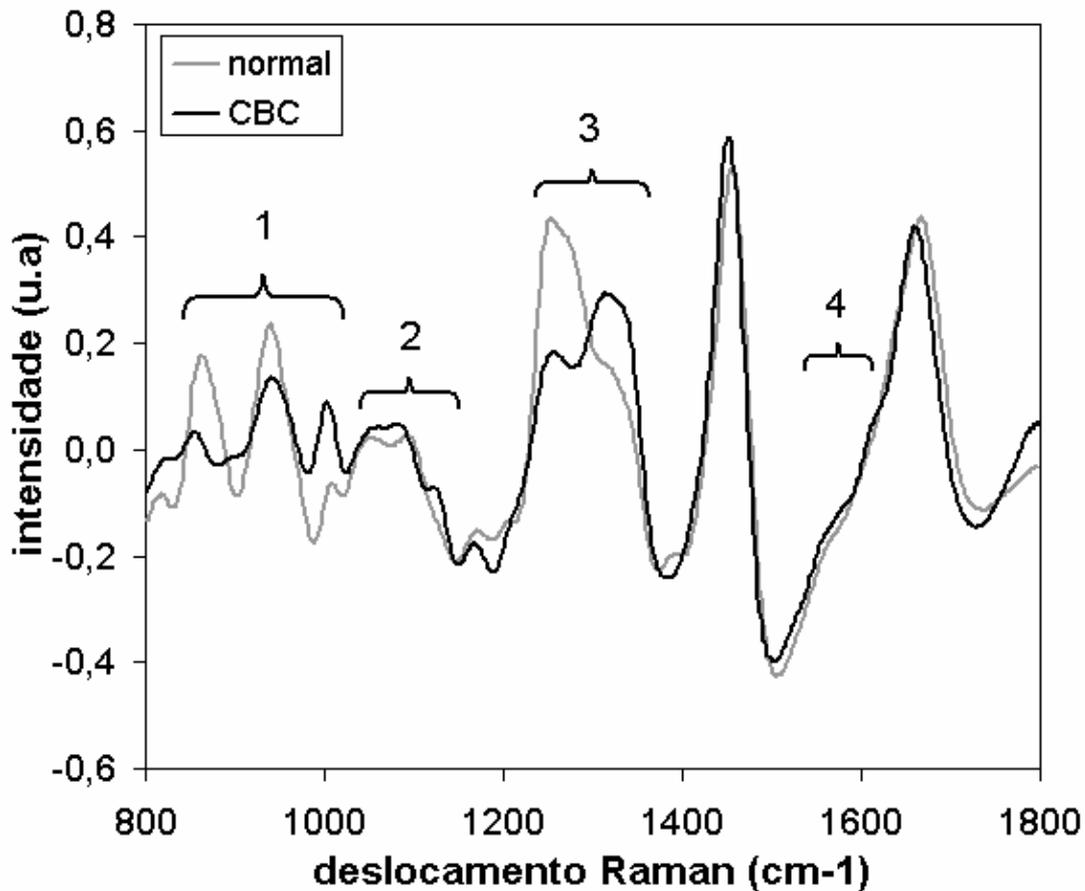
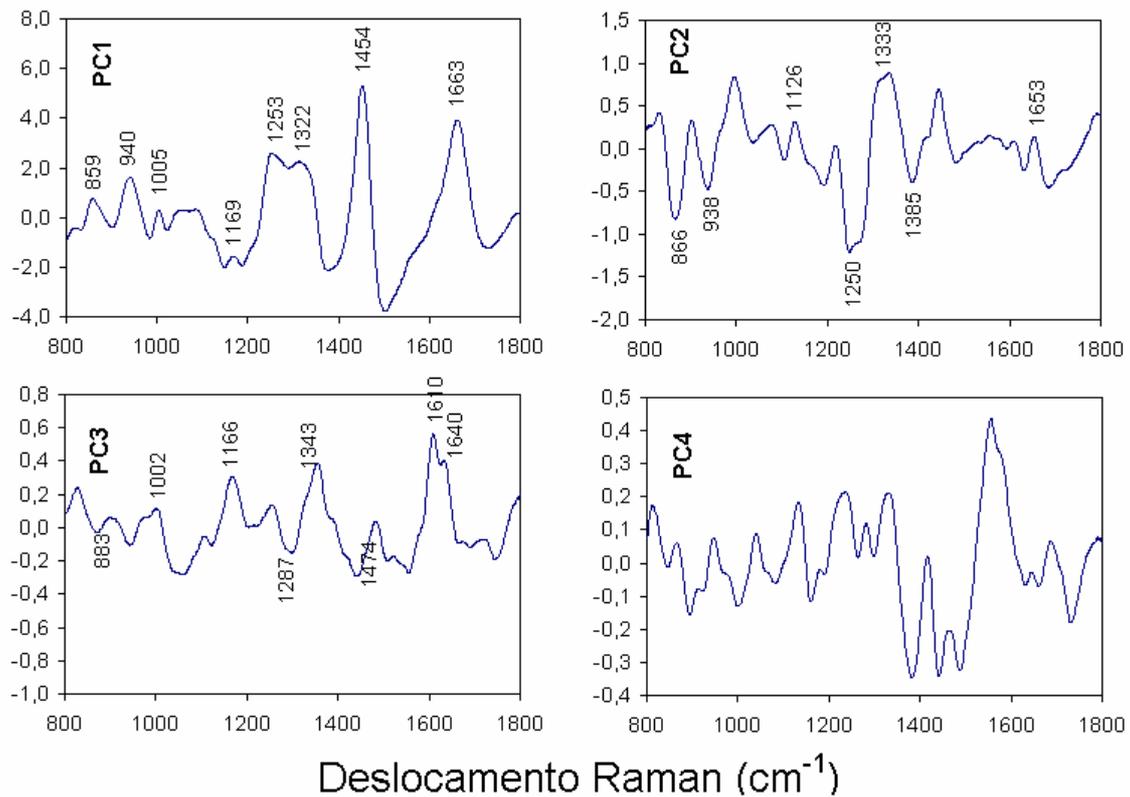


Figura 11: Espectros Raman dispersivos de pele normal e carcinoma basocelular, com suas áreas de maior diferença espectral grifadas com números.

A fim de verificar a possibilidade de separação das amostras em função das diferenças nas características espectrais dos tecidos normais e CBCs, foi aplicado um método de separação baseado na decomposição espectral multivariada chamada Análise dos Componentes Principais (PCA – Principal Components Analysis). Através desta técnica estatística, foi possível diferenciar os espectros Raman das amostras analisadas em tecidos normais e malignos (CBC).

Os quatro primeiros PCs são mostrados na Figura 12 e são responsáveis por aproximadamente 90% de todas as variações espectrais nos dados coletados dos fragmentos de pele. Pela análise da Figura 12, pode-se observar que o PC1 reproduz o espectro médio de todos os dados inseridos na análise e possui achados espectrais tanto da pele normal quanto da pele com CBC. Já o PC2, apresenta informações não-correlacionadas com o PC1, com posições de bandas (positivas e negativas) que podem ser usadas para diferenciar tecidos com doença de

tecidos normais. PC3 e PC4, apesar de apresentarem bandas similares à pele normal e com CBC, não adicionam informações relevantes ao estudo.



**Figura 12: Quadro com os quatro principais PC's obtidos a partir dos espectros Raman.**

Os escores dos dois primeiros PCs (PC1 e PC2) foram plotados na Figura 13. Estes escores foram utilizados para implementar uma rotina de separação dos dados nos dois tipos de tecido (N e CBC) de acordo com as informações espectrais relevantes encontradas em cada PC. Pode-se observar que a separação entre os dois tipos de tecidos foi efetiva, porém é necessário implementar um separador entre os dois grupos, a fim de implementar a análise discriminante. Foram implementados dois tipos de discriminantes: o primeiro baseado na distância Euclidiana e o segundo na distância de Mahalanobis (Figura 13). A Tabela 3 apresenta o resultado da análise discriminante entre os dois tipos de tecidos utilizando os dois tipos de classificadores. A distância de Mahalanobis apresentou melhor discriminação quando comparada com a Euclidiana, podendo identificar corretamente e separar os dois tipos de tecidos, proporcionando uma sensibilidade de 0,93 e uma especificidade também de 0,93.

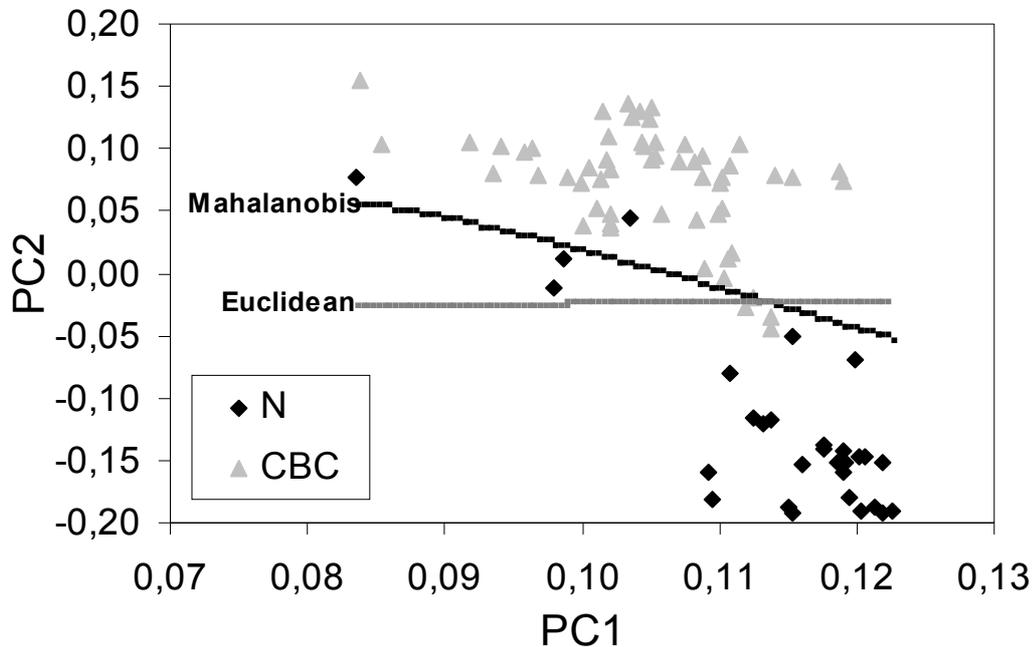


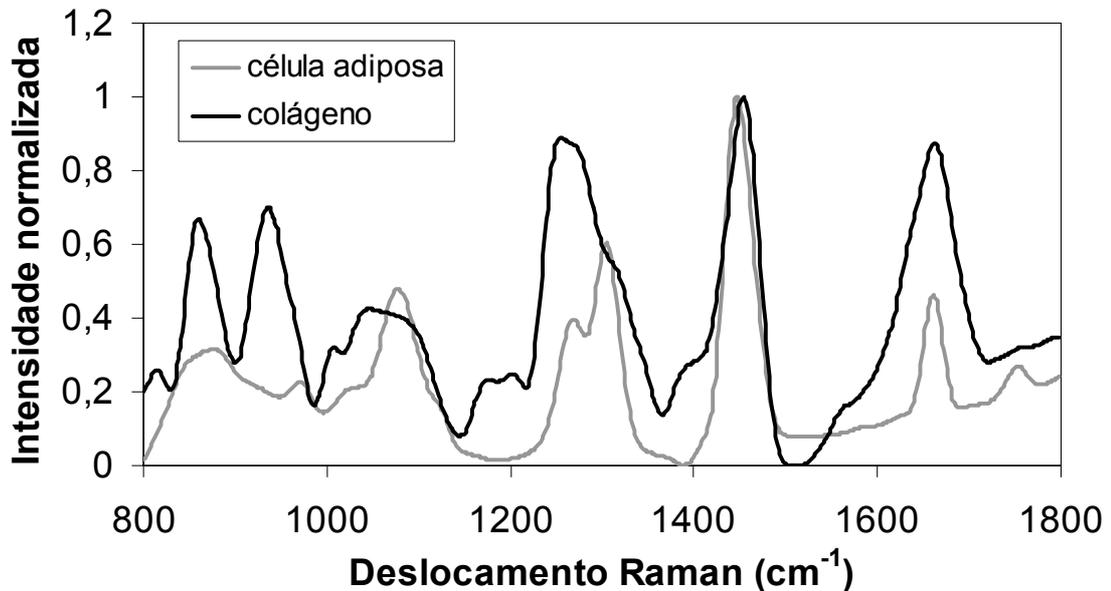
Figura 13: Componentes Principais 2 versus 1 (PC2 x PC1) para todos os espectros Raman. No gráfico foram traçadas as linhas Euclidiana e distância de Mahalanobis para separar os casos de CBC dos normais.

Tabela 3 Resultados do algoritmo diagnóstico baseado nas distâncias Euclidianas e de Mahalanobis aplicadas aos PC1 e PC2.

Histopatologia	Algoritmo Diagnóstico baseado na PCA							
	Euclidiana		Mahalanobis		Euclidiana		Mahalanobis	
	N	CBC	N	CBC	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
					y	y	Y	y
N (29)	25	4	27	2	0,86	0,93	0,93	0,93
CBC (56)	4	52	4	52				

No presente estudo, também foi desenvolvido um modelo de identificação simplificado do tipo de tecido baseado na composição bioquímica da amostra, basicamente na quantidade relativa de colágeno e gordura encontradas em cada tecido, utilizando-se de espectros Raman de tendão humano para as fibras colágenas e células adiposas (adipócitos) para a gordura. Este modelo simplificado, que se utiliza apenas dois componentes bioquímicos, pode ser de grande importância, pela sua simplicidade e possibilidade de análise sem necessidade de processamentos matemáticos mais complexos. A Figura 14 apresenta os espectros do tendão e de adipócitos

provenientes de amostras humanas. Estes espectros mostram bandas nas mesmas posições que os encontrados na pele normal e na pele com CBC.



**Figura 14** Espectros Raman dos componentes basais colágeno de tendão humano e gordura dos adipócitos utilizados para desenvolver o modelo bioquímico.

A intensidade relativa destes dois componentes bioquímicos encontrada em cada espectro normalizado de tecido foi calculada ajustando-se, através de minimização por mínimos quadrados, da intensidade de cada espectro com a intensidade de cada um dos dois espectros basais. Este modelo foi então comparado com os resultados da Análise dos Componentes Principais (PCA). A Tabela 4 apresenta a porcentagem de gordura e colágeno calculada para cada espectro Raman de tecido. Uma linha de classificação foi traçada baseada na intensidade média (Euclidiana) dos componentes de gordura e colágeno (Figura 15). Este modelo simplificado mostrou sensibilidade e especificidade de aproximadamente 0,86 e 0,93 para o percentual de colágeno (Tabela 4), sendo este resultado comparável ao algoritmo dos PCA e distância Euclidiana.

**Tabela 4: Resultados do diagnóstico utilizando o modelo simplificado baseado nos componentes bioquímicos**

Histopatologia	Diagnóstico baseado no modelo simplificado							
	Colágeno %		Adipócitos %		Colágeno %		Adipócitos %	
	N	CBC	N	CBC	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
					y	y	Y	y
N (29)	25	4	24	5	0,86	0,93	0,83	0,93
CBC (56)	4	52	4	52				

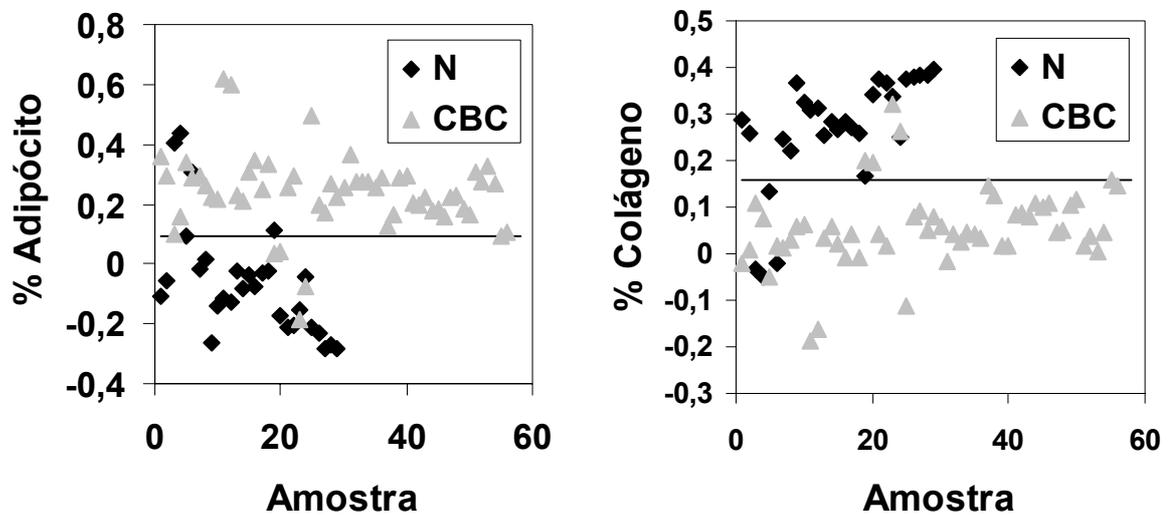


Figura 15: Intensidade relativa dos dois componentes bioquímicos em cada tipo de tecido, associado ao traçado da linha Euclidiana para separação dos mesmos

## 6 Discussão

Os tecidos normais e com CBC apresentam diferenças espectrais que podem ser usadas para diferenciá-los *in vitro* <sup>(14; 36; 66; 68; 69)</sup>. Estas diferenças foram utilizadas para o diagnóstico óptico pela implementação de rotinas baseadas nos escores dos componentes principais da PCA e também através de um modelo bioquímico simplificado, pelo cálculo da porcentagem relativa de componentes bioquímicos específicos, encontrados nos tecidos sob análise, no caso particular colágeno e lipídios. Estes componentes são os mais importantes na diferenciação entre os tecidos normais e malignos (CBC) nas regiões espectrais das vibrações C-C e amida III.

As bandas dos peptídeos amida I e amida III estão claramente presentes no espectro da pele. As vibrações da amida I são representadas pela região espectral em torno de  $1640\text{cm}^{-1}$  e refletem principalmente as vibrações C=O. Já as vibrações da amida III são representadas em torno de  $1270\text{cm}^{-1}$  e refletem um modo mais complexo, envolvendo diversas bandas químicas (estiramento C-R, N-H, e deformação CNH) <sup>(70)</sup>.

Nijssen et al e Nunes et al analisaram pele normal e com carcinoma basocelular e concluíram que existem diferenças entre os picos de amida I e III, proteínas e lipídios <sup>(36; 38)</sup>.

Lawson e Barry, Williams e Wu et al em seus estudos de espectroscopia Raman em pele observaram um aumento na intensidade do espectro do CBC nas bandas da amida I, comparadas com tecido de pele normal <sup>(74; 75)</sup>. Já Gniadecka, não encontrou diferenças significativas nestas bandas <sup>(66)</sup>. No trabalho de Nunes et al, o ganho de intensidade neste pico pode ser observado na região de menor energia desta banda, em torno de  $1600$  a  $1500\text{cm}^{-1}$  <sup>(36)</sup>. Neste estudo, encontramos um pequeno aumento da intensidade do espectro do CBC na região de menor energia, semelhante aos achados de Nunes.

Os primeiros estudos com espectroscopia Raman para diagnóstico de câncer foram desenvolvidos em útero, ovário e colo de útero e também foi demonstrada a diminuição da intensidade do espectro da amida III <sup>(71)</sup>. Este fenômeno foi observado por outros autores em câncer de pele <sup>(36; 66)</sup>. Alterações no espectro Raman da amida são atribuídas a mudanças conformacionais das proteínas. O colágeno contribui predominantemente no espectro Raman da pele e mudanças na sua estrutura ou sua degradação podem explicar a diminuição da intensidade das bandas de amida <sup>(66)</sup>. A degradação de colágeno é influenciada pelas metaloproteinases <sup>(72)</sup>. O

aumento destas enzimas é encontrado em tumores invasivos de pele, como o CBC<sup>(73)</sup>.

Os tumores apresentam um aumento na síntese de ácidos nucléicos e proteínas devido ao elevado número de mitoses e, conseqüentemente, ao aumento da duplicação do material genético, responsáveis pela proliferação celular maligna descontrolada. Estas bandas correspondem ao modo vibracional do DNA, que se apresenta aumentado em virtude da maior síntese de ácidos nucléicos e proteínas nos tumores. Isso explica o aumento da intensidade dos espectros nas bandas relacionadas ao DNA (1540 a 1620 $\text{cm}^{-1}$  e 1040 a 1100  $\text{cm}^{-1}$ ). Achados semelhantes foram observados por Mahadevan-Jansen, que encontrou bandas intensas na região 1540 e 1570 $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo a bases de nucleotídeos Guanina e Adenina, formadoras do DNA<sup>(57)</sup>.

A estrutura dos lipídios é representada pela vibração do CH<sub>2</sub> na região entre 1420 e 1500 $\text{cm}^{-1}$ . Estes picos são complexos e dependem de vários fatores, como por exemplo, as ligações de hidrogênio que podem estar alteradas devido ao crescimento tumoral e suas demandas. Neste estudo, não foi verificada uma alteração significativa nestas bandas. Essa ocorrência pode estar relacionada com uma compensação entre os picos das proteínas e dos lipídios, visto que ocorre um aumento da síntese protéica nos tecidos malignos como citoqueratinas e colágeno do tipo I, que compensaria o consumo de lipídios elevado que ocorre também nestes tecidos.

Os resultados da aplicação de um modelo baseado na PCA e análise discriminante via distância de Mahalanobis nos espectros Raman da pele normal e CBC mostrou melhor sensibilidade do que o algoritmo utilizando o modelo bioquímico simplificado e a distância Euclidiana. A PCA utilizando a distância Euclidiana mostrou resultados comparáveis aos do modelo bioquímico. Todos apresentaram a mesma especificidade.

A PCA pode ser efetivamente utilizada para classificação de doenças humana, já que cada componente principal apresenta um espectro único e característico correlacionado com a histopatologia do tecido. Neste estudo, a PCA pôde separar ambos tipos de tecidos com alta concordância com a histopatologia, se valendo da distância de Mahalanobis como discriminador. Os vetores dos componentes principais foram utilizados para análise prospectiva espectral, através do cálculo do score de cada componente principal projetado em cada um dos dados espectrais, por meio do cálculo dos mínimos quadrados. As intensidades resultantes dos dois primeiros PCs foram plotados no mesmo espaço cartesiano.

Os resultados 93% de sensibilidade e 93% de especificidade na classificação das amostras em tecidos normais e tumorais (CBC) através da análise da PCA e a distância de Mahalanobis, aqui

apresentada, são semelhantes aos resultados encontrados na literatura. Nijssen et al conseguiu 100% de sensibilidade e 93% de especificidade na diferenciação do carcinoma basocelular do tecido normal adjacente utilizando a espectroscopia Raman em amostras de tecidos. Pôde-se, assim, demarcar as bordas do tumor e suas margens<sup>(38)</sup>. Sigurdsson et al analisou 222 casos de cinco diferentes tipos de lesões cutâneas *in vitro* através da espectroscopia Raman. Conseguiu 80,5% de classificação correta para melanoma (índice similar ao obtido na dermatoscopia por um médico experiente) e 95,8% para carcinoma basocelular. A maioria das alterações estavam em pequenas bandas do espectro de proteínas e lipídios<sup>(54)</sup>.

Adicionalmente, foi aqui mostrado que um modelo simplificado baseado na quantidade relativa de componentes bioquímicos básicos, o colágeno e os lipídios, obteve resultados comparáveis aos algoritmos baseados em estatística multivariada. Pela sua fácil realização, o modelo bioquímico pode ser aplicado a qualquer dado, sem necessidade de pré-processamentos ou técnicas de reduções e a análise prospectiva pode ser feita sem a necessidade de identificação dos componentes principais, uma vez que o espectro Raman dos componentes bioquímicos básicos nada mais é do que a base das informações espectrais do tecido estudado.

Através do estudo das principais diferenças espectrais e utilizando-se de fibras ópticas poder-se-á analisar a estrutura de qualquer tecido do corpo humano. Em princípio, a classificação tecidual pode ser feita instantaneamente após a coleta do espectro. Assim, no futuro esta técnica poderá se tornar uma alternativa para as biópsias histopatológicas e exames de congelação transoperatórios, sem a desvantagem do tempo de realização e sem destruição do tecido.

## 7 Conclusões

1 – A espectroscopia Raman dispersiva no infravermelho próximo, utilizando excitação em 830nm, mostrou ser uma técnica sensível e eficiente na reprodução de espectros de tecidos cutâneos normais e doentes, e que estes espectros possuem alterações significativas nas bandas espectrais relativas a amida III e DNA presentes nos tecidos, tornando possível sua diferenciação espectral;

2 – Os resultados apresentados neste estudo indicam que a espectroscopia Raman dispersiva no infravermelho próximo pode ser utilizada para diferenciar tecidos normais de tecidos com carcinoma basocelular *ex vivo*;

3 – Através de um modelo bioquímico simplificado, utilizando espectros de tendão (colágeno) e tecido adiposo (adipócitos), foi possível identificar alterações espectrais específicas destes componentes presentes nos tumores e na pele normal, sendo utilizado para sua diferenciação.

## Referências

- (1) NATIONAL CANCER INSTITUTEI. **US National Institutes of Health**, 2008. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>>
- (2) BIVENS, M. M. et al. Nonmelanoma Skin Cancer: Is the Incidence Really Increasing among Patients Younger Than 40? A Reexamination Using 25 years of U.S. Outpatient Data. **Dermatol. surg.**, v. 32, n.12, p. 1476 – 1479, 2006.
- (3) SALDANHA, G. et al. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. **Br. j. dermatol.**, v.148, p.195–202, 2003.
- (4) BOULINGUEZ, S. et al. Histological evolution of recurrent basal cell carcinoma and therapeutic implications for incompletely excised lesions. **Br. j. dermatol.**, v.151, p. 623–626, 2004.
- (5) PRESTON, D. S.; STERN, R. S. Nonmelanoma cancers of the skin. **N. Engl. j. med.** v. 327, n. 23, p. 1649-62, 1992.
- (6) LEWIS, I. R.; GRIFFITHS, P. R. Raman spectroscopy with fiber optic sampling. **Appl. spectrosc.**, v. 50, n. 10, p. 12A – 30A, 1996.
- (7) RAASCH, BA et al. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. **Br. j. dermatol.**, v .155, n.2, p. 401–407, 2006.
- (8) HAGE, R. **Aplicação da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser na Diferenciação entre Tecido Normal Neoplásico da Mama Humana Feminina**. 2001. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2001.
- (9) PANJEHPOUR, M et al. Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers. **Lasers surg. med.**, v. 31, n. 5, p. 367-73, 2002.
- (10) ERICSON, M.B.et al. Bispectral fluorescence imaging combined with texture analysis and linear discrimination for correlation with histopathologic extent of basal cell carcinoma. **J biomed. Optics**, v. 10, n. 3, p. 2005.
- (11) GERGER, A. et al. Diagnostic applicability of in vivo confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors. **J. invest. dermatol.**, v. 124, n. 3, p. 493-498, 2005.
- (12) CHWRIOT, B.W. et al. Detection of melanomas by digital imaging of spectrally resolved ultraviolet light- induce auto fluorescence of human skin. **Eur. j. cancer.**, v. 34, n. 11, p. 1730-34, 1998.
- (13) GNIADHECKA, M. Potential for high-frequency ultrasonography, nuclear magnetic resonance, and Raman spectroscopy for skin studies. **Skin res. technol.**, v.3, p. 139-146, 1997.

- (14) GNIADHECKA, M. et al. Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy. **J. Raman Spectrosc.**, v. 28, n. 2-3, p. 125-129, 1997.
- (15) MARTIN, A.A. et al. Principal Components Analysis of FT-Raman Spectra of *ex vivo* Basal Cell Carcinoma. BIOS 2004, 2004, Bellingham. **Proceedings...** . Bellingham: Biomedical Vibrational Spectroscopy; Biohazard Detection Technologies, 2004. v. 5321. p. 198-204
- (16) ZONIOS, G et al. Spectral Pathology. **Ann NY Acad Sci.**, v.9, n.838, p. 108-115, 1998.
- (17) MURPHY, G. F.; MIHM JR., E. M. C. A pele. In: MITCHELL, R. N. et al. **Robbins & Cotran: Fundamentos de Patologia**, 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1058 –1093.
- (18) JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 427p.
- (19) GLERAN, A. **Manual de Histologia: Texto e Atlas para os estudantes da área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 145-153.
- (20) YOUNG, B. et al. **Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas**, 5. ed.: Edinburgh: Churchill Livingstone, 2006.
- (21) BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia**, v. 2, p. 16-18, 1999.
- (22) MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**, 4<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 320 p
- (23) BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 380 p.
- (24) BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer-INCA. **Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil**. Banco de dados de 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>>
- (25) MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Fundamentos de Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 880 p.
- (26) PARISE JR, O. **Câncer de Boca: Aspectos Básicos e Terapêuticos**. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 23-28.
- (27) BRENTANI, M. M; COELHO, F. R. G.; KOWALSKI, L. P. **Bases da Oncologia**. São Paulo: Tecmedd, 2003. 452 p.
- (28) PRADAL, M.; MENEZES, A. M.; DIO, R. D. Marcadores Tumorais. **R. Soc Bras. Cancerol.**, v. 4, p. 23-29, 1998.

- (29) CROWSON, A. N. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. **Mod. Pathol.**, v.19, p. S127-S147, 2006.
- (30) LOPEZ, R. F. R.; MARTINEZ, L. A. D. Características clínicas de los pacientes com carcinoma basocelular: uma serie de 305 casos em Bucaramanga. **MedUnab**, v. 5, n. 14, p. 63-67, 2002.
- (31) DIXON, A. Y.; SAING, H. L.; MCGREGOR, D. H. Factors predictive of recurrence of basal cell carcinoma. **Am. j. Dermatopathol.**, v. 11, n. 3, p. 222-232, 1989.
- (32) SUARES, B. et al. Occupation and skin cancer: the results of the HELIOS-I multicenter case-control study. **BMC Public Health**, v. 7, p. 1-21, 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/7/180>>.
- (33) SEXTON M, et al. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. **J. am. Acad. Dermatol.**, v.23, p. 1118–26, 1990
- (34) KARAGAS, M. R. Desarrollo de carcinoma basocelular y de neoplasia de células escamosas entre aquellos pacientes cõn una historia previa de câncer cutâneo. **J. invest. dermatol.**, v. 102, 10S-13S, 1994.
- (35) STEVENS, A.; LOWE, J. **Dermatopatologia**. Madrid: Harcourt Barce, 1994, p. 449-475.
- (36) NUNES, LO et al. FT-Raman spectroscopy study for skin cancer diagnosis, **Spectroscopy** v.17, p.597-602, 2003.
- (37) BRANCALEON, L. et al. In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. **Photochem. Photobiol.**, v. 73, n. 2, p. 178-183, 2001.
- (38) NIJSSEN, A. et al. Discriminating Basal Cell Carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. **J. invest. dermatol.**, v. 119, p. 64-69, 2002.
- (39) CASPERS, P. J.; LUCASSEN, G.W; PUPPELS, G. J. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. **Biophysical J.**, v. 85, p. 572-80, 2003.
- (40) CASPERS, P. J. et al. in vitro and in vivo Raman spectroscopy for human skin. **Biospectroscopy**, v. 4, n. 5, p. S31-S9, 1998.
- (41) SILVEIRA JR., L. **Correlação entre a técnica de espectroscopia Raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas**. 2001. 109f. Tese (Doutorado) – Departamento de Fisiopatologia Experimental – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- (42) BALL, D. W. Rayleigh and Raman scattering. **Spectroscopy**, v. 16, n. 2, p. 28-31, 2001.

- (43) MANOHARAN, R.; WANG, Y.; FELD, M. S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochim. acta. a. mol. biomol. spectrosc.**, v. 52, n. 2, p. 215-249, 1996.
- (44) DAVIS, K. L.; TEDESCO, J. M.; SHAVER, J. Advances in fiber optic Raman instrumentation. **SPIE Biomedical Applications of Raman Spectroscopy.**, n. 3608, p. 148-156, 1999.
- (45) LIMA, C. J. et al. Development of catheters with low fiber background signals for Raman spectroscopic diagnosis applications. **Artif. Organs.**, v. 24, n. 3, p. 231-234, 2000.
- (46) BERGER, A. J. et al. Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy. **Appl. Optics**, v. 38, n. 13, p. 2916-2926, 1999.
- (47) MARKOPOULOU, C. K. et al. Quantitative nondestructive methods for the determination of ticlopidine in tablets using reflectance near-infrared and Fourier transform Raman spectroscopy. **Appl Spectrosc.**, v. 62, n. 2, p. 251-257, 2008.
- (48) DUARTE, J. **Comparação qualitativa e quantitativa da detecção de anticorpos anti-toxoplasma gondii da classe IgG em soros de gatos domésticos através da análise sorológica via ELISA e biópsia óptica.** 2002. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002.
- (49) ROMER, T. J. et al. Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman spectroscopy. **Circulation**, v. 97, n. 9, p. 878-885, 1998.
- (50) MATOUSEK, P et al. Noninvasive Raman spectroscopy of human tissue in vivo. **Appl. Spectrosc.**, v. 60, n. 7, p. 758-63, 2006.
- (51) HAKA, A. S. et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. **Cancer res.**, v. 66, n. 6, p. 3317-32, 2006.
- (52) BAARY, B.W.; EDWARDS, H. G. M.; WILLIAMS, A.C. Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands. **J Raman Spectrosc.**, v. 23, p. 641-645, 1992.
- (53) GNIADACKA, M. et al. Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy. **J Raman Spectrosc.**, v. 28, p.125-129, 1999.
- (54) SIGURDSSON, S. et al. Detection of Skin Cancer by classification of Raman Spectra. **IEEE trans. biomed. eng.**, v. 51, n.10, p. 1784-93, 2004.
- (55) HANLON, E.B. et al. Prospects for in vivo Raman Spectroscopy. **Phys Med Biol.**, v.45, n.2), p.R1-59, 2000.

- (56) HUANG, Z. et al. Raman spectroscopy in combination with background near-infrared autofluorescence enhances the in vivo assessment of malignant tissue. **Photochem. Photobiol.**, v. 81, n.5, p. 1219-1226, 2005.
- (57) MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUN, R. Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers. **J. biomed. Optics**, v. 1, n. 1, p. 31-70, 1996.
- (58) STRYER, L **Biochemistry**. New York: Freeman, 1988.
- (59) PETICOLAS, W. L.; EVERTSZ, E. Conformation of DNA in vitro and in vivo from laser Raman scattering. **Methods Enzymology**, v. 211, p. 335-352, 1992.
- (60) FERREIRA, M. M. C. et al. Chemometrics I: Multivariate calibration, a tutorial. **Quim. Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- (61) OLIVEIRA, A. P. **Estudo da espectroscopia Raman em carcinogênese induzida na mucosa jugal de hamsters**, 2003. 65f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.
- (62) PANDYA, A. K. et al. Evaluation of pancreatic cancer with Raman spectroscopy in a mouse model. **Pancreas**, v. 36, n. 2, p. 1-8, 2008.
- (63) KAWABATA, T. et al. Optical diagnosis of gastric cancer using near-infrared multichannel Raman spectroscopy with a 1064-nm excitation wavelength. **J. Gastroenterol.**, v. 43, n. 4, p. 283-90, 2008.
- (64) MAHEEDHAR, K. et al. Diagnosis of ovarian cancer by Raman spectroscopy: a pilot study. **Photomed Laser Surg.**, v. 26, n. 2, p. 83-90, 2008.
- (65) KAST, R. A. et al. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model. **Biopolymers**, v. 89, n. 3, p. 235-41, 2008.
- (66) GNIADHECKA, M. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, p. 443-449, 2004.
- (67) TFAYLI, A. et al. Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. **Eur. Biophys. J.**, n. 36, p. 1049-1058.
- (68) FENDEL, S.; SCHRADER, B. Investigation of skin and skin lesions by NIR-FT Raman spectroscopy. **Fresenius j. anal. chem.**, v. 360, n. 5, p. 609-613, 1998.
- (69) NAITO, S. et al. In vivo measurement of human dermis by 1064 nm-excited fiber Raman spectroscopy. **Skin res. technol.**, v. 14, n.1, p. 18-25, 2008.

(70) OSADA, M.; GNIADĘCKA, M.; WULFF, H. C. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic analysis of proteins, water and lipids in intact normal stratum corneum and psoriasis scales. **Exp. dermatol.**, v. 13, p. 391-95, 2004.

(71) LIU, C. H. et al. Raman fluorescence and time resolved light scattering as optical diagnostic techniques to separate diseased and normal biomedical media. **J. Photochem Photobiol. B**, v. 16, n. 2, p. 287-209, 1992.

(72) YOSHIZAKI, T.; SATO, H.; FURUKAWA, M. Recent advances in the regulation of the matrix metalloproteinases activation: from basic research to clinical implication (Review). **Oncol Rep**, v. 9, p. 607-611, 2002.

(73) VARANI, J. et al. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of the skin: comparison with normal skin. **Br. Journal of Cancer**, v. 82, p. 657-665, 2000.

(74) WU, J. G. et al. Distinguishing malignant from normal oral tissues using FT-IR fiberoptic techniques. **Biopolymers**, v. 62, n. 4, p. 185-192, 2001.

(75) LAWSON, E. E.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Biomedical applications of Raman spectroscopy. **J. Raman Spectrosc.**, v. 28, p. 111-117, 1997.

(76) WOODWARD, L. A. The Raman effect. In: SZYMANSKI, H. A. **Raman Spectroscopy, theory and practice**. New York: Plenum Press., 1967. p. 1-43.

### **Anexo A - Formulário de consentimento pós-informado**

Com o objetivo de conhecer melhor os mecanismos de desenvolvimento das doenças, pesquisadores realizam estudos científicos. Estes estudos podem ser realizados com fragmentos de tumores removidos em cirurgias.

Você será submetido a remoção de um tumor cutâneo como tratamento da sua doença. Rotineiramente, utiliza-se parte do tumor retirado para exames histológicos, necessários para o diagnóstico. O restante do tumor retirado não é utilizado, sendo armazenado para novos exames ou descartados conforme a Legislação Sanitária regulamentar sobre o assunto.

A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem tampouco, em aumento de tempo da mesma ou da extensão na incisão cirúrgica.

Sua privacidade e identidade serão preservadas, pois o fragmento de tumor será identificado no laboratório por códigos e letras.

O projeto de pesquisa que utilizará esse material foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNOCHAPECÓ. Trata-se de uma técnica chamada biópsia óptica ou Espectroscopia Raman, que trará muitas vantagens na área da Oncologia como diagnóstico precoce do câncer. Você terá acesso aos resultados da pesquisa.

Concordando com o uso do material, é necessário esclarece-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar com a doação, sua decisão não influenciará de nenhum modo no seu tratamento. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Somente assine este termo se consentir.

#### **DECLARAÇÃO**

**Declaro estar ciente das informações ora prestadas,  
tendo lido atentamente e concordado com todo o seu  
teor.**

**Chapecó, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.**

**Assinatura do Paciente ou Responsável**

\_\_\_\_\_  
**Nome:** \_\_\_\_\_

**RG:** \_\_\_\_\_

## Anexo B - Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA REGIONAL DE CHAPECÓ  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.



---

### PARECER CONSUBSTANCIADO

**Parecer Nº:**  
**Pesquisador Responsável: Benito Bodanese**  
**Registro do CEP: 043/07**  
**Situação: APROVADO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Comunitária Regional de Chapecó – UNOCHAPECÓ, analisou na reunião do dia 17/08/2007, o protocolo de pesquisa nº 043/07, referente ao projeto de pesquisa: “Espectrometria Raman Dispersia no Diagnóstico de Carcinomas Basocelulares”.

Mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**.

Chapecó, 22 de agosto de 2007

Roberto Deitos  
Coordenador do Comitê de Ética.