

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

CAROLINE SILVEIRA BARROS TEIXEIRA

DIAGNÓSTICO DE PATOLOGIAS DA TIREÓIDE POR  
ESPECTROSCOPIA RAMAN

São José dos Campos, SP  
2009

**Caroline Silveira Barros Teixeira**

**“Diagnóstico de Patologias da Tireóide por Espectroscopia Raman”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin  
Prof(a). Dr(a). Emília Ângela Loschiavo Arisawa

São José dos Campos, SP.

2009

T 265d

Teixeira, Caroline Silveira Barros

Diagnóstico de patologias da tireóide por espectroscopia Raman/ Caroline Silveira Barros Teixeira. Orientadores: Profs. Drs. Airton Abrahão Martin; Emília Ângela Loschiavo Arisawa São José dos Campos: 2009.

1 Disc Laser; Color

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

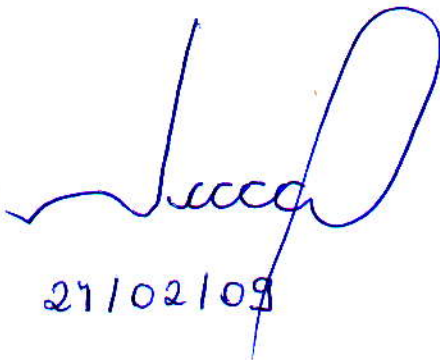
1. Espectroscopia Raman 2. Neoplasias da Glândula Tireóide 3. Biópsia Óptica

I. Martin, Airton Abrahão, Orient. II. Arisawa, Emília Ângela Loschiavo, Orient. III. Título

CDU:616.44

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

Aluno:




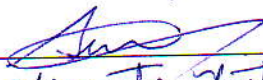
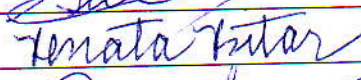
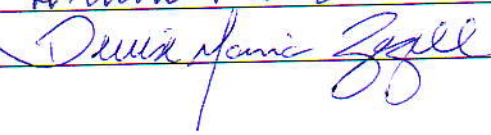
Data:

27/02/09

# CAROLINE SILVEIRA BARROS TEIXEIRA

## “DIAGNÓSTICO DE PATOLOGIAS DA TIREÓIDE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN”

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:

Profª. Dra. **EMÍLIA ÂNGELA LOSCHIAVO ARISAWA** (UNIVAP)   
Prof. Dr. **AIRTON A. MARTIN** (UNIVAP)   
Dra. **RENATA ANDRADE BITAR** (UFABC)   
Profª. Dra. **DENISE MARIA ZEZELL** (USP) 

Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa  
Diretor do IP&D – UniVap  
São José dos Campos, 19 de fevereiro de 2009.

Dedico este trabalho aos pacientes que cederam as amostras de Tireóide para realização desta pesquisa. Pessoas que sofrem não somente pelas alterações fisiológicas decorrentes das patologias, mas sofrem, ainda mais, pelos efeitos psicológicos desencadeados por esta que é considerada popularmente como a glândula das emoções.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por direcionar a minha vida e conduzir o meu destino dentro dos objetivos de superação que cabe a cada um de nós cumprir neste mundo, afim de, acrescentar valor à minha própria evolução, e daqueles que fazem parte desta história.

Ao, Vagner Arêdes, por me apresentar à área de engenharia biomédica despertando-me para a sua importância na complementação dos meus estudos.

Quero dizer intensamente “obrigado” aos professores que me ensinaram o que é hoje o meu trabalho e aprofundaram minha formação profissional. Em especial, ao orientador Airton Abrahão Martin, o qual, em muitas ocasiões, solicitou-me pleno empenho, agora analiso a oportunidade de amadurecimento que obtive ao seu lado por entender que você sabe o quanto me será exigido daqui para frente e necessitarei mais do que capacidade. Agradeço da mesma forma, à orientadora Emília Ângela pelos conselhos, correções e discussões, sempre preocupada com o andamento desta pesquisa acreditando na sua importância e me motivando a raciocinar com coerência dentro da histopatologia da Tireóide.

Quero agradecer em especial, ao professor Herculano da Silva Martinho, nós sabemos das dificuldades enfrentadas e nos mantivemos concentrados nos objetivos a serem alcançados.

À professora Renata Bitar desejo agradecer não somente pelo que acrescentou à este estudo, mas principalmente, pela amizade e palavras de conforto. Você me fez entender que era preciso realizar além do que me era solicitado ultrapassando a todo o momento meus próprios limites. Obrigada por me orientar os pensamentos em muitos momentos com discussões produtivas e importantes para o aprimoramento deste estudo. Foi maravilhoso poder contar com a sua participação e ter alguém com quem dividir as minhas dificuldades.

Aos médicos, Dr. Celso, Dr. Marco Aurélio que gentilmente me cederam as amostras de tireóide e ao Dr. Ricardo Borges da Costa que realizou o diagnóstico Histopatológico, os quais permaneceram unidos na tentativa de ampliar conhecimentos e auxiliarem o progresso da

medicina. Em especial agradeço ao Dr. André por ressaltar a importância deste estudo, me incentivando e estando sempre a disposição, propondo-se a dar embasamento para que não restassem dúvidas com relação a clínica médica.

Agradeço aos colegas de mestrado e de laboratório, em especial a Rubia Cristina, Viviane Bório, Carolina, Bianca, Edson, Mário, Luiz Felipe, pelo companheirismo e amizade. Foram divertidos os momentos que passamos juntos.

Agradeço às secretárias do IP&D, Valéria e Ivone, também a Rubia e Rosangela da Biblioteca Setorial pelo carinho, atenção e simpatia a mim dedicados.

Aos meus pais, Marco Antônio e Marli, dedico todo meu esforço, sem dúvida eles são os que mais acreditam e torcem pela realização dos meus projetos, espero corresponder às suas expectativas simplesmente pelo infinito amor que lhes dedico. À irmã, Gislene, que me trás a razão nos momentos difíceis e me dá força quando me deixo levar pela emoção, houveram momentos em que ela realmente me reergueu e me motivou a prosseguir.

Quero agradecer ao Rafael a tolerância e o apoio, baseados no respeito e na cumplicidade. Sua participação neste estudo foi fundamental para execução deste estudo em harmonia com o meu coração.

Por fim, ao meu amigo Gardhiel, que me trás a inspiração, a direção, proteção e permanece em constante presença por toda a vida.

*“Pensar é praticar química cerebral, promovendo uma cascata de respostas através do corpo. Esta inteligência invade a fisiologia e adquire uma base material. Em nosso corpo, as perguntas e respostas prosseguem sem fim. A rapidez de nosso pensamento, nossa estatura, o tamanho dos nossos olhos, por exemplo, dependem em parte do conselho da tireóide. Portanto, podemos concluir com segurança que a mente não fica confinada ao cérebro como numa divisão precisa, que serve a nossa conveniência. A mente se projeta a qualquer ponto do universo interior.”(Dr. Deepak Chopra)*



## DIAGNÓSTICO DE PATOLOGIAS DA TIREÓIDE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

### Resumo

O diagnóstico das patologias de tireóide normalmente ocorrem por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e o material é encaminhado para análise citológica. Entretanto, este procedimento possui baixa sensibilidade, apresentando uma variação de 2% a 37%. A aplicação da técnica de espectroscopia vibracional, na caracterização destas alterações poderá resultar no desenvolvimento de métodos minimamente invasivos para diagnóstico de doenças de Tireóide. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as características bioquímicas de tecidos e hormônios (T3 e T4) da glândula tireóide por meio de espectros FT-Raman. Pela análise de discriminante linear dos espectros Raman dos tecidos, foi possível estabelecer (em percentuais) o índice de classificação correta entre os grupos: Tecido Adjacente ao Bócio, Região nodular do Bócio, Adenoma Folicular, Carcinoma Folicular e Carcinoma Papilífero. Como resultado para o confronto entre os grupos Tecido adjacente ao bócio *versus* bócio região nodular foi obtido o índice de 58.3 % de classificação correta; este percentual se mostrou baixo, não sendo possível discriminar os espectros Raman destes dois grupos. Entre bócio (região nodular e periferia) *versus* carcinoma papilífero, o índice de classificação correta foi de 64.9 %, considerado bom. Resultado relevante foi obtido na análise dos espectros de tecidos Benignos (Bócio e Adenoma Folicular) *versus* Malignos (Carcinomas Papilífero e Folicular), cujo percentual foi 72.5 %, considerado bom. Foi possível também encontrar, por meio do observação visual, modos vibracionais dos hormônios nos tecidos patológicos de tireóide. Como conclusão, foi possível identificar algumas diferenças bioquímicas, representadas pelo espectros FT-Raman, factíveis de serem utilizadas para classificação dos grupos histológicos da tireóide. Entretanto, mais estudos serão necessários devido a dificuldade de padronização dos grupos histopatológicos.

Palavras-chaves: Câncer de Tireóide; Biópsia Óptica; Espectroscopia Raman.

# THYROID TISSUE ANALYSIS THROUGH RAMAN SPECTROSCOPY

## Abstract

The diagnosis of thyroid pathologies is usually made by cytologic analysis of the fine needle aspiration (FNA) material. However, this procedure has a low sensitivity at times, presenting a variation of 2% to 37%. The application of optical spectroscopy in the characterisation of alterations could result in the development of a minimally invasive and non-destructive method for the diagnosis of thyroid diseases. Thus, the objective of this work was to study the biochemical alterations of tissues and hormones (T3 and T4) of the thyroid gland by means of molecular vibrations of the FT-Raman spectra. Through the discriminative linear analysis of the Raman spectra of the tissue, it was possible to establish (in percentages) the correct classification index among the groups: goitre adjacent tissue, goitre nodular region, follicular adenoma, follicular carcinoma and papillary carcinoma. As a result of the comparison between the groups goitre adjacent tissue *versus* goitre nodular region, an index of 58.3% of correct classification was obtained; this percentage was considered low, and it was not possible to distinguish the Raman spectra of these groups. Between goitre (nodular region and around) *versus* papillary carcinoma, the index of correct classification was 64.9%, which was considered good. A relevant result was obtained in the analysis of the benign tissues (goitre and follicular adenoma) *versus* malignant tissues (papillary and follicular carcinomas), for which the index was 72.5% and considered good. It was also possible, by means of visual observation, to find similar vibrational modes in the hormones and pathologic tissues. In conclusion, it was possible to identify some biochemical alterations, represented by the FT-Raman spectra, that could possibly be used to classify histologic groups of the thyroid. However, more studies are necessary due to the difficulty in setting a standard for pathologic groups.

Key-Words: Thyroid Cancer; Optical Biopsy; Raman Spectroscopy.

## Lista de figuras

Figura 1 – Vista anterior da glândula Tireóide, localização a frente da laringe e traquéia, pesando em torno de 20g a glândula regula uma série de processos metabólicos no organismo.....	25
Figura 2 – Estrutura microscópica da glândula Tireóide.....	26
Figura 3 – Bócio adenomatoso, X55, estruturas foliculares.....	27
Figura 4 – Ninhos sólidos de células.....	28
Figura 5 – Tireóide Ectópica.....	28
Figura 6 – Adenoma folicular, X340.....	29
Figura 7 – Carcinoma folicular, X135, minimamente invasivo. Tumor primário.....	31
Figura 8 – Carcinoma folicular, X135, invasão vascular na região capsular .....	31
Figura 9 – Carcinoma papilífero, X540, núcleo claro com aspecto de vidro fosco....	32
Figura 10 – Carcinoma papilífero, X340, corpos psamomatosos.....	33
Figura 11 – Progressão tumoral da neoplasia da Tireóide, com indicação dos genes envolvidos por mutação e rearranjo. Baseado no modelo de Volgstein.....	36
Figura 12 – Imagens do tecido da tireóide para diagnóstico citopatológico.....	39
Figura 13 – Homeostasia no eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano e mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos.....	40
Figura 14 – Estrutura das hormonas da tireóide e seus precursores, MIT, 3 – Monoiodotirosina; DIT, 3,5 - Diiodotirosina; rT3, 3, 3',5' Triiodotironina inativa ou T3 reverso; T3, 3,5,3' triiodotironina; T4, 3,5,3',5' Tetraiodotironina.....	41
Figura 15 – Diagrama do nível de energia para absorção no infravermelho e espelhamento Raman Stokes, transição vibracional de g <sub>0</sub> a g <sub>1</sub> .....	42
Figura 16 – Vibrações de um grupo de átomos (+ e – significam vibrações perpendiculares ao plano do papel).....	45
Figura 17 – Espectro FT-Raman obtido de complexa espécime biológica (Escherichia coli).....	45
Figura 18 – Diagrama esquemático do espectrômetro Raman com transformada de Fourier. L– Laser Nd:YAG, S – amostra, P – coleção de espelhos parabólicos, SF – filtro secundário, BS – separador de saída dos feixes de luz, FM, MM – espelhos fixos e móveis respectivamente, F – filtro regional, CD– detector refrigerado.....	47
Figura 19 - FT-Raman RFS 100, Bruker. (1) detector de Germânio resfriado por nitrogênio líquido, (2) caixa óptica – corpo do equipamento, (3) estágio motorizado	

controlador do eixos X, Y e Z do porta-amostra do equipamento, (4) micro-Raman, (5) porta-amostra (6) câmara do porta-amostra.....	48
Figura 20 – Esquema de aquisição de dados em Espectroscopia Raman.....	48
Figura 21 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C )T2 na região entre 1.000 a 1300 $\text{cm}^{-1}$ . Espectro Infravermelho (D) T4, (E) T3 e (F) T2 na região entre 1.000 a 1300 $\text{cm}^{-1}$ .....	50
Figura 22 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C) T2 na região entre 1.500 a 1650 $\text{cm}^{-1}$ .....	51
Figura 23 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C) T2 na região entre 800 a 900 $\text{cm}^{-1}$ .....	51
Figura 24 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C) T2 na região entre 100 a 300 $\text{cm}^{-1}$ .....	52
Figura 25 – Amostra do tecido da tireóide e A1, A2, A3 - pontos de leitura pelo FT-Raman.....	54
Figura 26 – Média dos espectros de bócio tecido adjacente linha preta e bócio região nodular em vermelho na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800 $\text{cm}^{-1}$ .....	62
Figura 27 – Dendograma com análise de cluster para separação de bócio tecido adjacente à lesão e bócio região nodular.....	67
Figura 28 – Distribuição dos espectros para bco vs BCO.....	69
Figura 29 – Dispersão dos grupos na classificação discriminante de bco vs BCO...69	69
Figura 30 – Média dos espectros de bócio adenomatoso linha preta, carcinoma papilífero linha vermelha e carcinoma folicular linha verde na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800 $\text{cm}^{-1}$ .....	71
Figura 31 – Dendograma com análise de cluster para separação de bócio e carcinoma papilífero.....	79
Figura 32 – Distribuição dos espectros para BCO vs PAP.....	80
Figura 33 –Dendograma com análise de cluster para separação das lesões benignas e malignas.....	82
Figura 34 – Distribuição dos espectros para Benigno vs Maligno.....	82
Figura 35 – Dispersão dos grupos na classificação discriminante de BCO vs PAP..83	83
Figura 36 – Dispersão dos grupos na classificação discriminante de Benigno vs Maligno.....	84
Figura 37 – Média dos espectros de bócio adenomatoso linha preta, adenoma	

folicular linha vermelha e carcinoma folicular verde na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800 $\text{cm}^{-1}$ .....	85
Figura 38 – Média dos espectros dos hormônios T3 e T4 - linha espectral preta e verde na região inferior do gráfico. Média dos espectros do tecido de adjacente à lesão linha preta, bócio região nodular em azul e carcinoma papilífero (vermelho) parte superior do gráfico na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800 $\text{cm}^{-1}$ .....	90

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Transferência de dados em algumas bandas encontradas no espectro FT-Raman de espécime biológica.....	46
Tabela 02 – Relação entre o número de amostras e número de espectros obtidos por lesão.....	55
Tabela 03 – Relaciona os fragmentos obtidos para experimento com o diagnóstico clínico, análise histológica e laudo anátomo-patológico dos respectivos pacientes..	58
Tabela 4 – Modos vibracionais relevantes na diferenciação do tecido adjacente à lesão em comparação com o bócio região nodular.....	63
Tabela 5 – Eigenvalue PCA de bócio tecido adjacente (bco) vs Bócio região nodular (BCO).....	64
Tabela 6 – Escores das componentes e classificação do cluster de bco vs BCO.....	65
Tabela 7 – Número de espectros por Cluster e a Distância (Análise Discriminante Linear) no pareamento bócio adj <i>versus</i> Bócio.....	67
Tabela 8 – Percentual de classificação da função discriminante em bócio tecido adjacente (bco) versus bócio região nodular (BCO).....	70
Tabela 9 – Modos vibracionais relevantes na diferenciação de bócio adenomatoso em comparação com carcinoma papilífero e carcinoma folicular.....	71
Tabela 10 – Eigenvalue da PCA de BCO vs PAP.....	74
Tabela 11 – Eigenvalue da PCA de Benigno vs Maligno.....	74
Tabela 12 – Escores das componentes e classificação do cluster de BCO vs PAP.	75
Tabela 13 – Escores das componentes e classificação do cluster de Benigno vs Maligno.....	76
Tabela 14 – Quantidade de espectros por cluster e a distância dele em BCO versus PAP.....	78
Tabela 15 – Quantidade de espectros por cluster e a distancia dele em Benigno vs Maligno.....	81
Tabela 16 – Percentual de classificação da função discriminante em BCO vs PAP.	83
Tabela 17 – Percentual de classificação da função discriminante em Benigno vs Maligno.....	84
Tabela 18 – Modos vibracionais relevantes na diferenciação de bócio adenomatoso em comparação com adenoma folicular e carcinoma folicular.....	86
Tabela 19 – Modos vibracionais dos hormônios T3 e T4 juntamente com tecido adjacente à lesão, bócio região nodular e carcinoma papilífero.....	90

## Lista de Abreviaturas e Siglas

A	Adenina
AdFOL	Adenoma Folicular
AFBM	Alterações Funcionais Benignas da Mama
bco	bócio tecido adjacente à lesão
BCO	Bócio região nodular
C	Carbono
C	Citosina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CCD	Deep Depletion
CDI	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CDIS	Doença de Paget mamária
DIT	Diiodotirosina
DNA	<i>Deoxyribose nucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
Eigenvalues	Valores próprios
FBD	Fibroadenoma
FT-IR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
FT-Raman	<i>Fourier Transform Raman Spectroscopy</i>
FOL	Carcinoma Folicular
G	Guanina
Gq11	Proteína
Gs	Proteína
GSP	Gene de suscetibilidade para o desenvolvimento de adenomas hiperfuncionantes de Tireóide, quando mutado.
H	Hidrogênio
I	Iodeto

INCA	Instituto Nacional do Câncer
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
MIT	Monoiodotirosina
N	Nitrogênio
Nd-YAG	Neodímio Itrio-Alumínio-Granada
NIS	co-transportador sódio-iodeto
O	Oxigênio
P	Fosfato
p 53	Gene de suscetibilidade para o desenvolvimento de carcinomas anaplásicos de Tireóide, quando mutado.
PAP	Carcinoma Papilífero
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCA	Análise de Componentes Principais
PAX8/PPAR $\lambda$	Gene de suscetibilidade para o desenvolvimento de adenomas e carcinomas foliculares de Tireóide, quando mutado.
RAS	Gene de suscetibilidade para o desenvolvimento de adenomas e carcinomas foliculares de Tireóide, quando mutado.
RET	Gene de suscetibilidade para o desenvolvimento de carcinoma papilífero de Tireóide, quando mutado.
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
R-TSH	Receptor da Tireotrofina
S	Dissulfeto
SP	São Paulo
T3	3,5,3' Triiodotironina, Liotironina Sódica
T4	3,5,3',5' Tetraiodotironina ou Tiroxina, Levotiroxina Sódica Mono
T	Tirosina
Tg	Tireoglobulina



THs	Hormônios Tireoideanos
TPO	Tireóide peroxidase
TRH	Tireotropina
TRK	Gene de suscetibilidade para o desenvolvimento de carcinoma papilífero de Tireóide, quando mutado.
TSH	Hormônio estimulante da Tireóide
U	Uracila
US	Ultra-som
$h\nu_i$	Luz incidente
$h(\nu_i - \nu_R)$	Stokes
$h(\nu_i + \nu_R)$	Anti-Stokes
°	Graus
C	Celsius
$\text{cm}^{-1}$	comprimento de onda, 1/centímetro
mm	milímetros
nm	nanômetros
mw	miliWatt
%	Porcentagem
$\nu$	Modo de estiramento
$\nu_s$	Modo de estiramento simétrico
$\delta$	Modo de dobramento
=	Dupla Ligação
-	Ligação simples

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1	Anatomia da Glândula Tireóide.....	24
3.2	Histologia da Glândula Tireóide.....	25
3.2.1	Dificuldades da Análise Histopatológica.....	26
3.2.1.1	Lesões Histologicamente Semelhantes a Neoplasias.....	26
3.2.1.2	Neoplasias Benignas do Epitélio Tireoideano.....	29
3.2.1.3	Neoplasias Malignas do Epitélio Tireoideano.....	30
3.3	Métodos de Diagnóstico de Câncer de Tireóide.....	35
3.4	Síntese e Secreção dos Hormônios Tireoidianos.....	39
3.4	Espectroscopia Raman.....	42
3.4.1	Sistema Raman.....	47
3.5	Utilização da Espectroscopia Raman e Diagnóstico de Câncer.....	48
4	METODOLOGIA.....	53
4.1	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	53
4.2	Obtenção das amostras.....	53
4.2.1	Preparação das amostras.....	54
4.3	Obtenção dos espectros FT-Raman.....	54
4.3.1	Parâmetros para análise FT-Raman.....	54
4.4	Análise Estatística dos Espectros Raman.....	55
4.4.1	Pré-processamento.....	55
4.4.2	Análise Qualitativa.....	56
4.5	Diagnóstico Histopatológico.....	57
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Histologia.....	58
5.2	Espectros Raman.....	61

5.2.1	Análise Estatística.....	61
5.2.1.1	Bócio tecido adjacente à lesão versus bócio região nodular.....	61
5.2.1.2	Lesões benignas versus malignas.....	70
5.2.2	Análise Descritiva.....	85
5.2.2.1	Estudo do “Padrão Folicular”.....	85
5.2.2.2	Análise dos hormônios (T3 e T4) sintéticos.....	89
6	DISCUSSÃO.....	93
7	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102
	ANEXO A Certificado do comitê de ética e pesquisa da UNIVAP.....	106
	ANEXO B Termo de consentimento livre esclarecido.....	107
	ANEXO C Artigo enviado para publicação.....	108

## 1 INTRODUÇÃO

A tireóide é considerada o órgão de maior função endócrina do corpo humano. A secreção dos hormônios tireóideanos exerce importante função para o crescimento e desenvolvimento normais, além de contribuir na homeostasia, produção de calor e energia. Alterações na síntese e secreção dos hormônios tireoideanos podem acarretar retardo do crescimento, doenças vasculares, disfunções pulmonares e renais, constipação crônica, alterações no sistema neuromuscular, sintomas referentes ao sistema nervoso central, anemia, entre outras patologias associadas (GREENSPAN; STREWLER, 1997).

Dentre as lesões que acometem este órgão, o câncer tem se destacado como um dos problemas mais importantes e de difícil diagnóstico (GREENSPAN; STREWLER, 1997). No Brasil, o câncer de tireóide representa 4,5% das neoplasias nas mulheres e 0,9% no gênero masculino. Os carcinomas tireoidianos são classificados em diferenciados (papilífero e folicular), não diferenciados (anaplásicos e medulares), sendo os carcinomas papilíferos mais incidentes, seguidos pelos foliculares (INCA, 2007).

A incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil, calculadas dentro de um período de 20 anos (1980-1999), foram classificadas em três grupos após a análise dos dados referentes a sete cidades do Brasil. Verificou-se que o primeiro grupo, formado por Belém, Porto Alegre, Recife e Salvador, apresentavam menores taxas de incidência. São Paulo e Distrito Federal se destacaram por apresentar as maiores taxas, enquanto Goiânia apresentou um valor situado entre esses dois grupos extremos. A variabilidade das taxas de incidência entre locais deve estar relacionada às variações de cobertura dos Registros de Câncer de Base Populacional, assim como a disponibilidade e acesso a recursos diagnósticos e terapêuticos (COELI et al., 2005).

O exame de Ultra-sonografia (US) atualmente é empregado no diagnóstico dos nódulos tireoidianos, tanto benignos quanto malignos, entretanto seus achados são inespecíficos para caracterização do nódulo, sendo necessário, paralelamente, a realização da punção aspirativa por agulha fina (PAAF). A PAAF é excelente no diagnóstico do carcinoma papilífero, porém pouco específica nos carcinomas foliculares e de células de Hürthle. Todavia, quando o resultado citológico depara

com o “Padrão Folicular” não faz diagnóstico diferencial com bócios, adenomas e tireoidites crônicas, sendo então considerados, resultados suspeitos para malignidade e o tratamento frequentemente é cirúrgico (FERRAZ et al., 2001).

Entretanto, estudos prévios verificaram que a sensibilidade e a especificidade da PAAF na detecção do câncer em nódulos de tireóide foram, respectivamente, 87% e 62%, e a sensibilidade e a especificidade do US foram, respectivamente, 81% e 70%. A combinação em série dos dois exames (PAAF e US) resultou em sensibilidade de 69% e especificidade de 91%, e a combinação em paralelo (PAAF ou US) apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 52%. Assim, a eficácia da PAAF depende da experiência em selecionar e aspirar nódulos palpáveis para se obter esfregaços com celularidade representativa; preparação adequada dos esfregaços, como fixação e coloração; e finalmente, conhecimento e familiaridade com a histopatologia de lesões tireoidianas (PECCIN et al., 2003).

Outro aspecto a ressaltar no diagnóstico diferencial dos nódulos de tireóide é a busca de aperfeiçoamentos desses métodos. Alguns trabalhos têm sugerido o emprego de uma série de novos marcadores moleculares que poderiam ser aplicados em conjunção com a citologia aspirativa de tireóide ou, até mesmo, de novas técnicas, como análise de expressão diferenciada de genes e de “*microarrays*”, ou técnicas de espectroscopia óptica (MARCIEL, 2001).

Tendo em vista que todas as doenças, sem exceção, são causadas por mudanças na bioquímica celular e/ou dos tecidos, o corrente desafio da medicina moderna é o de encontrar uma técnica analítica que investigue estas alterações por métodos minimamente invasivos e não-destrutivos. Poucos métodos analíticos satisfazem esses requisitos e são sensíveis o suficiente para revelar detalhes da composição e estrutura bioquímica dos tecidos. Dentre as novas técnicas recentemente apresentadas, a biópsia óptica por espectroscopia Raman é uma das mais promissoras, visto que essas alterações bioquímicas e moleculares podem ser detectadas por espectroscopia óptica através dos sinais espectrais característicos da doença (BITAR et al., 2006).

Neste trabalho, visando minimizar as desvantagens promovidas pela biópsia convencional, foi utilizada a técnica de espectroscopia Raman para análise das vibrações moleculares em amostras de tecido humano coletadas de patologias da tireóide. O intuito foi identificar alterações bioquímicas presentes, valorizando assim,

o diagnóstico utilizando a espectroscopia Raman. O objetivo deste estudo está descrito na seção 2.

A seção 3.1 e 3.2 deste trabalho descrevem brevemente a anatomia e histologia da tireóide a fim de situar o leitor na região focal deste estudo. A seção 3.3 apresenta breve descrição do câncer de tireóide, suas características, manifestações e diagnóstico convencional. A técnica de biópsia óptica, seu histórico, princípios físicos, algumas aplicações na medicina diagnóstica e as vibrações moleculares dos principais constituintes moleculares encontram-se nas seções 3.4 e 3.5. Posteriormente, há a descrição do experimento, resultados, discussão e conclusão.

## 2 OBJETIVOS

Perante a importância da função fisiológica glândula tireóide na manutenção da homeostasia de um organismo humano e o corrente desafio enfrentando na análise citológica, histológica, bioquímica e molecular desse tecido, o objetivo deste trabalho foi:

- Identificar os modos vibracionais presentes nos espectros de tecido adjacente à lesão, bócio região nodular, adenoma folicular, carcinoma folicular, carcinoma papilífero, triiodotironina e tetraiodotironina.
  
- Classificar os espectros obtidos de tireóide acometidos por patologias benignas e malignas.
  
- Realizar, paralelamente, a análise dos espectros dos hormônios sintéticos T3 (Triiodotironina) e T4 (Tetraiodotironina) associados com análise dos espectros patológicos obtidos inicialmente.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Anatomia da Glândula Tireóide**

De origem endodérmica, a tireóide se desenvolve precocemente na porção cefálica do tubo digestivo, no embrião. Produz os hormônios tiroxina (tetraiodotironina) e triiodotironina, que estimulam o metabolismo. Situa-se na região cervical, adiante da traquéia, e apresenta-se constituída por dois lobos unidos por um istmo, como demonstrado na figura 1 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Os hormônios produzidos por esta glândula atuam no desenvolvimento, na manutenção da homeostase e na proliferação e diferenciação celular. Sabe-se que nos mamíferos, os THs (Hormônios Tireideanos) agem em todos os órgãos e vias metabólicas e seus principais efeitos incluem o desenvolvimento de vários tecidos, como o sistema nervoso central, o consumo de oxigênio, a regulação da temperatura, da frequência cardíaca e também o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Além disso, participam da síntese e degradação de muitos outros fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em outros efeitos secundários (BARRA et al., 2004).

A glândula tireóide é um dos órgãos endócrinos mais estudados, e talvez um dos mais conhecidos; mas ainda restam muitos aspectos que exigem pesquisas a serem realizadas para que se compreenda o papel exato desta glândula endócrina, como mecanismo controlador, regulador e modulador de funções, dado que seus efeitos podem ser evidenciados em muitos diversos níveis da organicidade. Com efeito, a maior parte dos tecidos possui receptores (T3) e, por conseguinte, podem ser ativadas essas muitas e diferentes funções (DOUGLAS, 2002).



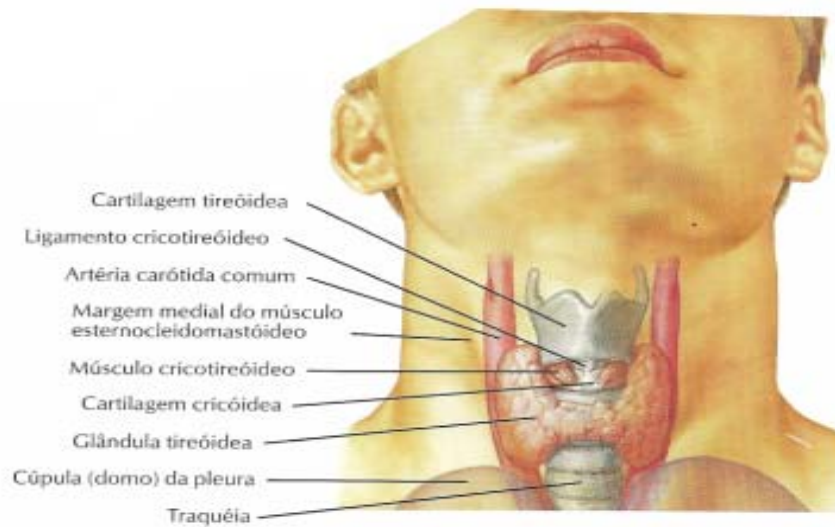


Figura 1 – Vista anterior da glândula Tireóide (NETTER, 2000).

### 3.2 Histologia da Glândula Tireóide

A tireóide é composta por um epitélio cubóide, disposto de somente uma camada, limitando espaços esféricos cheios de uma substância gelatinosa chamada colóide (Figura 2). Esta disposição celular em esferas, limitando o colóide, forma estruturas conhecidas como folículos tireoidianos que medem, no homem, de 0,2 a 0,9 mm de diâmetro. A glândula apresenta-se envolta por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo que envia septos para o interior do parênquima glandular. Esses septos vão se adelgaçando gradualmente e atingem todos os folículos, separando uns dos outros por uma fina e irregular membrana conjuntiva, constituída principalmente por fibras reticulares. A tireóide é um órgão muito vascularizado, apresentando uma extensa rede capilar sanguínea e linfática entre os folículos. As células dos capilares sanguíneos da tireóide são fenestradas, como ocorre comumente nos capilares das glândulas endócrinas. Esta disposição facilita a passagem do hormônio para dentro dos vasos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).



Figura 2 – Estrutura microscópica da glândula Tireóide (DI FIORE, 2001).

### 3.2.1 Dificuldades para Análise Histopatológica

A glândula tireóide é um órgão complexo e com inúmeras controvérsias em relação à análise citológica e histológica para classificação das lesões benignas de malignas. Da mesma forma, existem controvérsias referentes à conduta clínica (regulação hormonal) e ao procedimento cirúrgico (tireoidectomia total ou parcial) a ser adotado em cada caso. A dificuldade histológica se justifica pela similaridade interpretativa do tecido e suas patologias.

Segundo Hedinger, Willians e Sobin (1998), existem variações das doenças de tireóide e o pleomorfismo das células foliculares pode ser contraditório evidenciando malignidade. Estas células são caracterizadas por alterações nucleares, de tamanho, formato e de hiper cromatismo. Isto pode ocorrer em hiperplasias, tireoidites crônicas e em glândulas que podem ter sido submetidas à irradiação externa ou radioiodo.

#### 3.2.1.1 Lesões Histologicamente Semelhantes a Neoplasias

A seguir foram descritas as principais patologias que acometem a glândula tireóide e destacadas as dificuldades de interpretação morfológicas por bases que dificultam a diferenciação das lesões pela análise histopatológica.

1) *Bócio hiperplásico*: lesão causada por uma hiperplasia (Figura 3) que pode ser difusa ou nodular, como por exemplo, doença de Graves ou doença de Basedow, bócio endêmico e bócio disormonogênico. Frequentemente exibe áreas de proliferação folicular envolvendo o tecido, assemelhando-se à neoplasia papilar. As estruturas macropapilares do nódulo hiperplásico podem ser confundidas com o carcinoma papilífero. O bócio nodular hiperplásico costuma ser encapsulado, assemelhando-se às lesões classificadas como adenomas por possuir atípias celulares e irregularidade em seu limite. O Bócio adenomatoso (Figura 3) e disormonogênico são difíceis de se distinguir das lesões malignas, no entanto, carcinomas raramente associam-se ao bócio disormonogênico (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

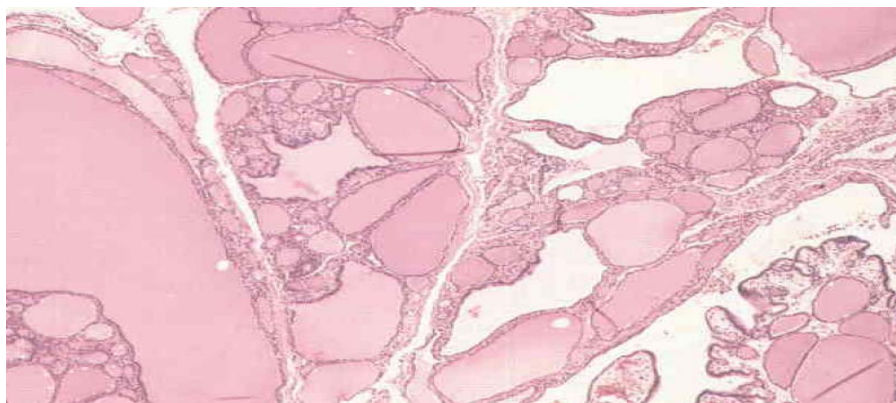


Figura 3 – Bócio adenomatoso, estruturas foliculares, X55. (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

2) *Cistos na Tireóide*: representam mudanças degenerativas e/ou antigas hemorragias no interior dos nódulos ou adenomas. Raramente os cistos são encontrados na região epitelial. Visto que os cânceres, particularmente os papilíferos, podem apresentar-se como cistos, todas as lesões císticas devem ser cuidadosamente examinadas (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

3) *Ninhos Sólidos de células* (Figura 4): são fáceis de serem encontrados e podem parecer focos de metaplasia escamosa. Estes, frequentemente, contêm mucina. Células C (claras) ou parafoliculares produtoras de calcitonina, são comumente encontradas nos arredores dos ninhos celulares (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

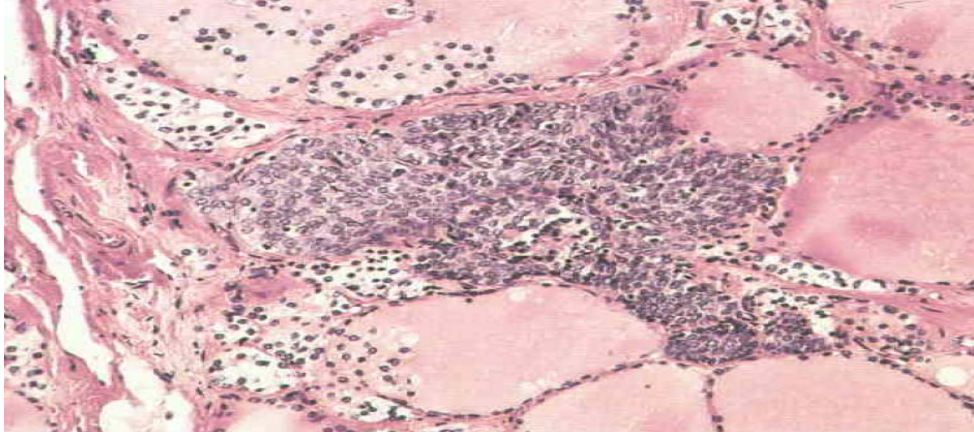


Figura 4 – Ninhos sólidos de células (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

4) *Tireóide Ectópica* (Figura 5): é o tecido localizado no meio da base lingual no interior do mediastino. Conseqüentemente, ilhas de tecido normal e nodular na glândula estão, ocasionalmente, presentes no pescoço. Estes não devem ser mal interpretados, confundindo-os com metástases do carcinoma de tireóide (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

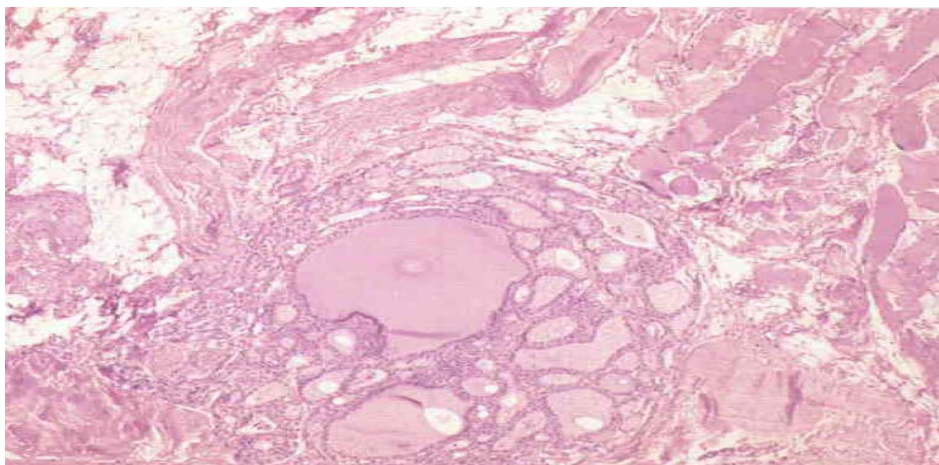


Figura 5 – Tireóide Ectópica (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

A avaliação microscópica de linfonodos removidos de região de pescoço associados a doenças não tireoidianas demonstra focos de folículos aparentemente normais. A maioria são metástases clinicamente ocultas dos carcinomas papilíferos (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

5) *Tireoidite Crônica*: particularmente a tipo Hashimoto apresenta mudanças com aspecto de malignidade. A forte infiltração linfóide sugere linfoma maligno e em alguns casos a proliferação é proeminente assemelhando-se ao carcinoma. A

Tireoidite presente em pequenas biópsias da tireóide, ou em tecido tireoidiano isolado, leva a um diagnóstico errôneo de metástase de carcinoma de tireóide e linfonodos (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

6) *Tireoidite de Ridel*: é uma doença rara, sendo uma afecção exclusivamente inflamatória com lesão proliferativa fibrosa associada à flebite oclusiva. É significativa porque tem a tendência de acometer ambos os tecidos, tireoidiano e paratireóideano, simulando um processo maligno (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

### 3.2.1.2 Neoplasias Benignas do Epitélio Tireoideano

1) *Adenoma Folicular* (Figura 6): é um tumor benigno encapsulado que mostra evidências de células foliculares diferenciadas. O adenoma folicular normalmente é um tumor solitário com cápsula fibrosa bem definida; o tecido glandular adjacente pode se apresentar comprimido e sua arquitetura padrão e aspecto citológico se diferem daqueles que envolvem a glândula. Estas características podem separar um adenoma típico de um nódulo típico; também podem ocorrer mudanças degenerativas como hemorragia, edema, fibroses, calcificações, formações ósseas e cistos (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

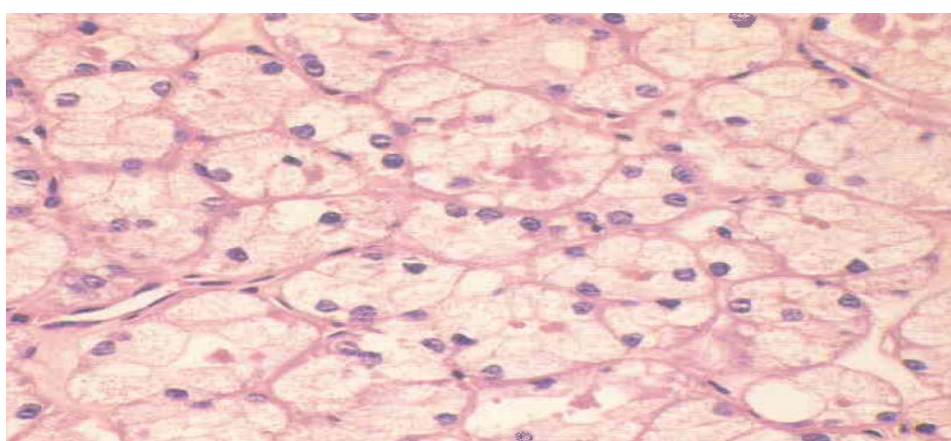


Figura 6 – Adenoma folicular, X340 (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

São descritas diversas variantes citológicas nos adenomas foliculares; no entanto, o adenoma folicular com arquitetura normofolicular pode exibir estruturas

pseudopapilares, as quais podem ser confundidas com o carcinoma folicular (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

2) *Adenolinfomas* consistem em tecido adiposo e células foliculares da tireóide. Extremamente raro, apesar de visto em pequenas quantidades, o estroma (adipócito) infiltrante ocasionalmente aparece nos tumores foliculares. O *adenoma trabecular hialinizante*, também raro, tem importante diagnóstico, podendo ser interpretado como carcinoma medular ou papilífero (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

### 3.2.1.3 Neoplasias Malignas do Epitélio Tireoideano

1) *Carcinoma Folicular*: é uma neoplasia epitelial maligna que mostra evidências de células foliculares diferenciadas, porém sem demonstrar um padrão diagnóstico de carcinoma papilífero. A morfologia dos carcinomas foliculares é extremamente variável, possuindo aspectos bem formados, contendo células em arranjo sólido. De qualquer forma, nem a arquitetura e atipias de células seriam um critério de malignidade confiável, estas modificações podem estar presentes em neoplasias benignas, principalmente nos adenomas atípicos. A atividade mitótica, da mesma forma, não é um indicador de malignidade (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

Prognosticamente, o ideal é classificar o carcinoma folicular de acordo com seu grau de invasão, considerando os aspectos abaixo relatados:

1a) *Minimamente invasivo (encapsulado)* (Figura 7): Tumor solitário encapsulado, freqüentemente maciço, encorpado e de superfície firme. O carcinoma minimamente invasivo possui arquitetura e citologia diferenciada dos adenomas (embrionário, fetal e atípico) e o diagnóstico de malignidade depende essencialmente da demonstração de invasão vascular (normalmente apresenta uma capa endotelial intravascular); esta invasão penetra profundamente, formando uma cápsula cheia. A invasão de um ou mais vasos no interior ou externamente à cápsula está presente na maioria dos casos e é o maior critério de invasão capsular (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

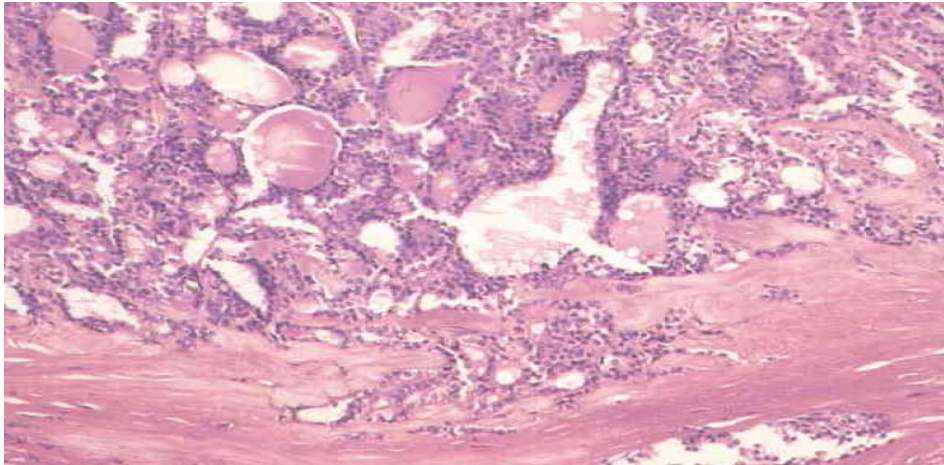


Figura 7 – Carcinoma folicular, minimamente invasivo. Tumor primário, X135 (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

A distinção entre carcinoma folicular minimamente invasivo e adenoma folicular depende da análise da invasão capsular e vascular. Estudos citopatológicos, incluindo citologia de aspiração, não é o método adequado para conclusão do diagnóstico; deve-se destacar que o diagnóstico não invasivo para o carcinoma folicular de baixo grau é inaceitável (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

*1b) Altamente invasivo* (Figura 8): estes tumores demonstram áreas de infiltração extensa com vasos sanguíneos e/ou tecido tireoidiano adjacente, freqüentemente sem encapsulamento completo. Em contraste com os tumores minimamente invasivos, estes raramente apresentam problemas para diagnóstico (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

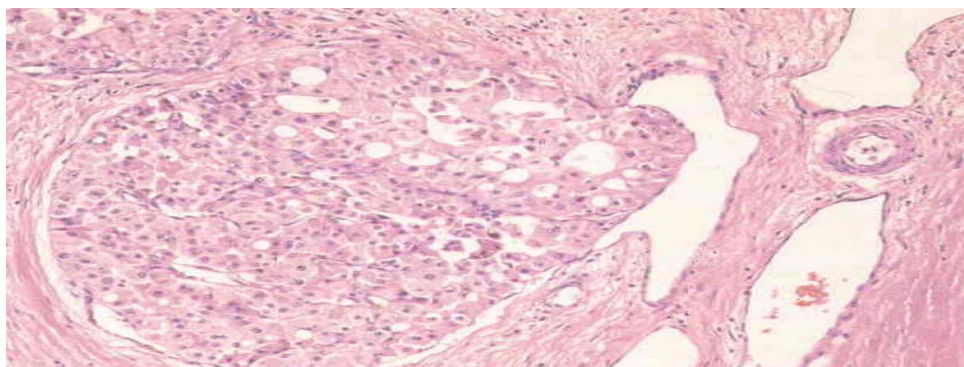


Figura 8 – Carcinoma folicular, invasão vascular na região capsular, X135 (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

As metástases para linfonodos regionais são incomuns nos carcinomas foliculares, exceto para o carcinoma folicular do tipo diferenciado insular. As

mestástases distantes não são observadas nos carcinomas minimamente invasivos; quando ocorrem, os pulmões e ossos são os locais mais acometidos. Histologicamente, as metástases se diferem dos neoplasmas primários da tireóide (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

2) *Carcinoma Papilífero*: é uma neoplasia epitelial maligna que mostra evidências de células foliculares diferenciadas; no entanto, demonstra estruturas papilares e foliculares, bem como características de mudanças nucleares (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

O carcinoma papilífero é a neoplasia maligna mais comum da glândula tireóide. A maioria dos carcinomas papilíferos apresenta formações denominadas papilas com cobertura fibrovascular demonstrando uma única camada de células neoplásicas. Os núcleos celulares do carcinoma papilífero apresentam modificações, incluindo aspecto de vidro fosco (Figura 9), grande dimensão, coloração opaca, contorno irregular, nucléolo imperceptível e pseudoinclusões resultantes de invaginações citoplasmáticas. O núcleo normalmente se sobrepõe. Estes padrões nucleares são importantes para o reconhecimento do carcinoma papilífero durante o diagnóstico citopatológico pela PAAF (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

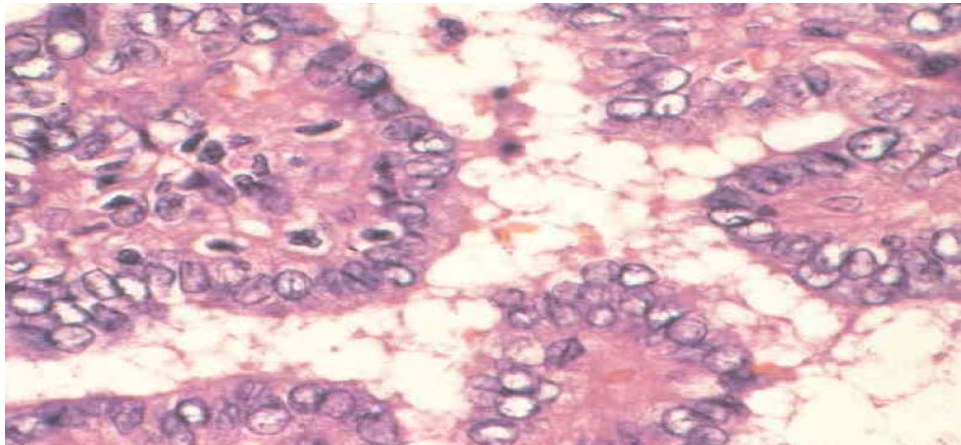


Figura 9 – Carcinoma papilífero, núcleo claro com aspecto de vidro fosco, X540 (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

Nos carcinomas papilíferos, mitoses são raras. O citoplasma celular usualmente apresenta coloração opaca e a imunohistoquímica demonstra a produção de tireoglobulina. Metaplasia escamosa se faz presente algumas vezes. Corpos psamomatosos (Figura 10) ocorrem em aproximadamente metade dos



carcinomas papilíferos, enquanto que raramente aparecem nas lesões de tireóide (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

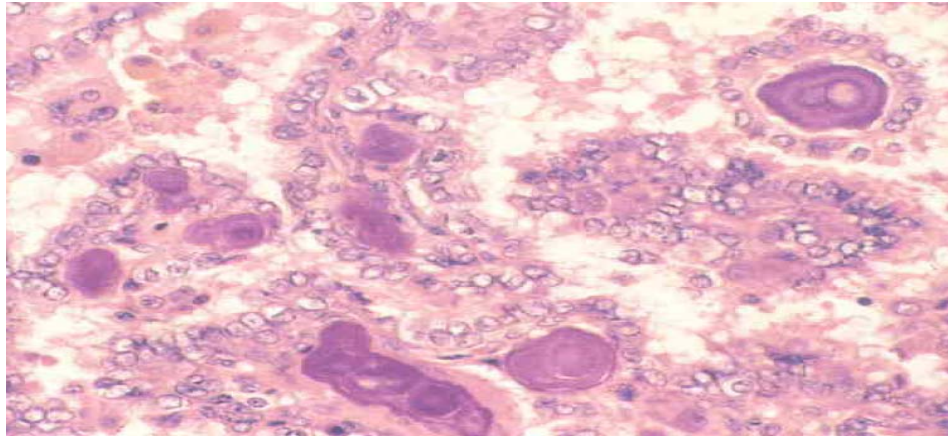


Figura 10 – Carcinoma papilífero, corpos psamomatosos, X340 (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

Nos carcinomas papilíferos, os folículos freqüentemente estão presentes, sendo inclusive os componentes predominantes; estes elementos foliculares possuem aparência irregular, porém são bem diferenciados. Em soma, as estruturas papilares e foliculares com padrão de crescimento sólido ou trabecular são vistas. Carcinomas mistos (papilar-folicular) exibem estruturas com comportamento biológico de carcinoma papilífero; desta maneira, são classificados como carcinoma papilífero (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

Os carcinomas papilíferos possuem a característica de expansão para regiões de linfonodos, mas também há metástases para órgãos distantes, particularmente nos pulmões. Folículos tireoidianos com ou sem padrão papilar nos linfonodos cervicais sempre representam metástases dos carcinomas papilíferos, o qual permanece, por vezes, clinicamente oculto. De toda forma, o valor histológico para graduação dos carcinomas papilíferos permanece consolidado (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

Estruturas macropapilares no bócio e no adenoma folicular estão presentes pela ocorrência de hiperplasia, porém não devem ser confundidas com carcinoma papilífero. Neste caso, o aspecto histológico nuclear auxilia na distinção do carcinoma papilífero.

Basófilos, calcificações, estrutura intrafolicular levam a mudanças degenerativas do colóide tireoidiano. Este evento ocorre em casos de adenomas

foliculares e carcinomas, particularidade nos tumores oxifílicos, diferentemente da degeneração papilar no carcinoma papilífero com corpos psamomatosos (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

### ***Variantes do Carcinoma Papilífero***

2a) *Microcarcinoma Papilíferocarcinoma* : definido como o carcinoma papilífero com diâmetro inferior a 1,0 cm (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998). *Varição Encapsulada*: A maioria dos carcinomas papilíferos mostra padrão de crescimento invasivo, circunscrito ou encapsulado e de baixa incidência. O carcinoma papilífero encapsulado pode ser metastásico obtendo bom prognóstico se comparado com os tumores não encapsulados. Não há um critério morfológico confiável para diferenciar estas associações e o termo adenoma papilífero não é recomendado (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

2b) *Varição Folicular*: os carcinomas papilíferos podem ser compostos essencialmente por folículos; quando estes tumores são circunscritos, sua diferenciação com carcinomas e adenomas foliculares é dificultada. A separação papilar desta neoplasia assemelha-se com padrão morfológico do carcinoma papilífero possuindo um bom comportamento clínico (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

2c) *Esclerose Difusa Variante*: é um carcinoma papilífero raro com envolvimento difuso de um ou ambos os lobos da glândula tireóide; apresenta escleroses densas e abundantes corpos psamomatosos mesclados com carcinoma papilífero isolado. Focos de metaplasia escamosa apresentam-se conjuntamente com linfócitos infiltrantes incompletos (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

2d) *Tipo Celular Oxifílico*: minoria das neoplasias, podendo ser classificada pela sua arquitetura papilar clássica composta essencialmente de células oxifílicas. Seu núcleo geralmente assemelha-se com os núcleos vistos em outros tumores oxifílicos e não demonstra mudanças nucleares comumente associadas ao carcinoma papilífero. Em outros aspectos, se assemelha com carcinoma papilífero típico, tanto morfológicamente como em seu comportamento. Podem se confundir com tumores foliculares oxifílicos encapsulados (HEDINGER; WILLIANS; SOBIN, 1998).

A glândula tireóide possui além dos tumores descritos acima, outros tipos de carcinomas, como os indiferenciados (medular e anaplásico), tumores não epiteliais, linfomas malignos, tumores variantes e mistos, secundários e não classificados. Não se fez necessário para este estudo, a especificação dos demais tipos; pela baixa incidência destes, o estudo se limitou aos mais freqüentes e principais lesões.

### **3.3 Métodos de Diagnóstico de Câncer de Tireóide**

Fatores ambientais influenciam no desenvolvimento do câncer de tireóide, como exposição à radiação, predispondo ao carcinoma papilífero, e fatores nutricionais sugeridos pela maior incidência de carcinoma folicular observada na população iodo-deficiente. O carcinoma papilífero e folicular diferenciados são considerados curáveis e mais comuns. De qualquer forma, alguns pacientes correm alto risco de recidiva e até mesmo óbito. A maioria dos pacientes identifica a doença a tempo para se estabelecer um bom prognóstico (MATSUO et al., 2004; SCHLUMBERGER, 1998).

Recentes avanços na biologia molecular procuram entender a patogênese dos carcinomas tireoidianos. Foram identificadas mutações dos genes relacionados ao receptor da tireotrofina (R-TSH) e mutações de GSP em adenomas hiperfuncionantes. Rearranjos da tirosina kinase nos domínios dos genes RET e TRK são encontrados em alguns carcinomas papilíferos. Mutações de genes RAS verifica-se similarmente com alta incidência nos adenomas e carcinomas foliculares, assim como o rearranjo PAX8/PPAR $\lambda$ . A mutação de p53 é rara em pacientes com carcinomas diferenciados, porém comum em carcinoma anaplásico (Figura11). (MATSUO et al., 2004; SCHLUMBERGER, 1998).

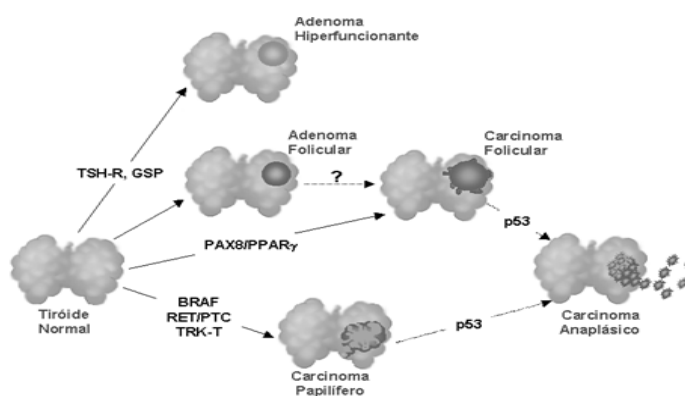


Figura 11 – Progressão tumoral da neoplasia da Tireóide, com indicação dos genes envolvidos por mutação e rearranjo. Baseado no modelo de Volgstein (MATSUO et al., 2004).

A incidência do nódulo tireoidiano palpável na população geral é cerca de 4% a 7%; contudo, com advento da ultra-sonografia, a prevalência sobe para 30% mostrando alta capacidade mitogênica do tecido. Os nódulos são, em sua grande maioria, lesões benignas que incluem bócio colóide e os adenomas foliculares atóxicos e tóxico, enquanto que uma pequena porção corresponde ao câncer. Os carcinomas de tireóide se originam de dois tipos celulares: carcinoma medular originário de células parafoliculares e as neoplasias de células epiteliais foliculares; cerca de 1% corresponde ao carcinoma indiferenciado ou anaplásico, a neoplasia folicular mais agressiva da tireóide (MATSUO et al., 2004).

Os vários tipos histopatológicos de câncer de tireóide são classificados em bem diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados. O grupo dos bem diferenciados inclui os carcinomas papilíferos e os foliculares, com suas variantes celulares. Esses tumores correspondem à maioria (aproximadamente 85%) dos cânceres de tireóide (SANTOS et al., 2007).

Os casos de carcinomas diferenciados têm excelente prognóstico, sendo que apenas 10% dos pacientes apresentam recidiva e 2% podem vir a falecer do tumor tireoidiano. Por outro lado, os carcinomas diferenciados de alto risco permitem sobrevivência de 10 anos, com uma recidiva de até 60%. Por sua vez, os carcinomas indiferenciados têm um prognóstico ruim, sendo que o óbito ocorre geralmente em até um ano. Deve-se lembrar que a glândula tireóide pode ser sede de outros tipos de neoplasias primárias, como sarcomas, linfomas, carcinomas epidermóides e teratomas, além de ser local de metástases de outros tumores malignos, particularmente aqueles originados nos pulmões, mama e rins (INCA, 2002).

O diagnóstico das patologias de tireóide normalmente obedece a seguinte seqüência: anamnese, ultrassonografia e exames laboratoriais; posteriormente pode ser indicada a PAAF onde a celularidade coletada é encaminhada para análise citológica. Confirmada então a suspeita de malignidade, é indicado o procedimento cirúrgico (tireoidectomia parcial ou total), para então o material ser enviado à análise histológica e finalmente ser concluído o diagnóstico médico.

A PAAF atualmente é o procedimento mais aceito para diagnóstico das lesões de tireóide por possuir custo acessível e ser uma ferramenta útil. No entanto, a sensibilidade deste procedimento para tireóide mostra-se pobre, com resultados falso-negativos apresentando uma variação de 2% a 37%. A diferenciação entre nódulo hiperplásico (bócio), adenoma folicular e carcinoma folicular é difícil. Existem dúvidas sobre a precisão do método para diagnóstico destas lesões, fazendo-se necessários métodos adicionais e alternativos que possam fornecer maior exatidão para diagnóstico destas lesões obscuras no estudo citopatológico (ROUT; SHARIFF,1999). É importante ressaltar que muitas vezes o diagnóstico impreciso leva o paciente à cirurgia sem a urgência e indicação apropriada.

Já é antiga a controvérsia sobre os tumores de tireóide, Histologistas possuem opiniões diferentes para separação entre carcinoma papilífero e folicular. Alguns autores chamam estes dois tipos de tumores apenas de carcinomas diferenciados, referindo aos tumores compostos essencialmente de papilas como papilífero e aqueles compostos por folículos de carcinomas foliculares. Outros autores buscaram elaborar uma separação que consistia em tipos entre os dois, papilas e folículos, e nomeavam de misto o carcinoma papilífero e folicular. Frequentemente os tumores mistos são as neoplasias consideradas, atualmente, como carcinomas papilíferos (KAARLE; FRANSSILA,1973).

A PAAF é uma técnica de rápida execução, sem grandes complicações e altamente sensível na detecção dos neoplasmas tireoidianos. No entanto, a técnica possui algumas limitações: resultados falso-negativos devido a erro comum de amostragem que ocorrem normalmente em pequenos tumores, e amostra associada com inflamações e mudanças degenerativas próximas ao parênquima tireoidiano. Além disso, existem grupos de lesões que apresentam dificuldades de interpretação, sendo difícil distinguir as características benignas ou malignas. Deste modo, não é fácil determinar as lesões foliculares do bócio colóide. O diagnóstico citopatológico do adenoma folicular e carcinoma folicular são complicados pelo fato do diagnóstico

dependem do acesso histológico para perceber a invasão capsular e vascular. Contudo, é vital encontrar novos caminhos para detectar as mudanças bioquímicas e celulares com objetivo de aperfeiçoar o diagnóstico e prognóstico das doenças que acometem a tireóide. Isto é especialmente essencial em situações onde o diagnóstico citológico falha porque as células tumorais não foram extraídas na PAAF e o câncer permanece irreconhecível (LIU et al., 2003).

Recentemente, têm sido discutidas orientações gerais para PAAF na tentativa de se estabelecer linhas de padronização. O número médio recomendado de procedimentos de PAAF para se obter amostra adequada de nódulos palpáveis tem sido três vezes de diferentes áreas da lesão, mas ocasionalmente até seis punções podem ser necessárias. Estudo comparativo entre clínicos e patologistas revelou que estes últimos profissionais obtiveram menor proporção de aspirados insatisfatórios em todas as localizações avaliadas, incluindo tireóide (SANTOS, 2007).

Como ilustração, a Figura 12 representa imagens do tecido intacto da tireóide extraído da glândula por PAAF. A imagem ampliada ao centro demonstra as células cancerígenas e as demais figuras ao redor a celularidade total colhida para análise. Larga área do tecido pode ser afetada, mas as alterações cancerígenas necessitam de um diagnóstico positivo contido em uma pequena área. Muitas vezes, é necessária uma simples palpação combinada com a aspiração, o que freqüentemente dificulta o diagnóstico de células relevantes. Nos casos onde as células puderam ser colhidas pela PAAF, a estrutura do tecido na maioria das vezes é destruída e somente deve-se retirar o que for de possível diagnóstico citológico baseado unicamente na morfologia dos núcleos.

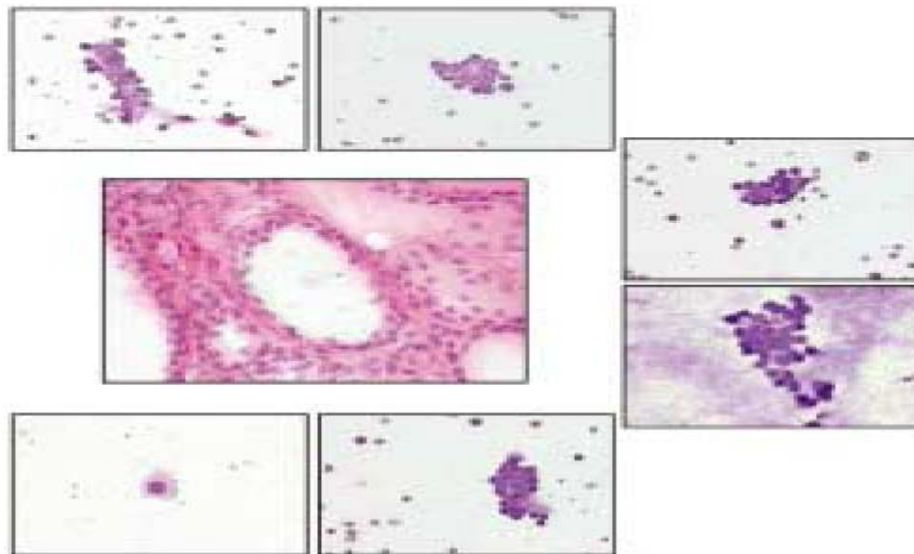


Figura 12 - Imagens do tecido da tireóide para diagnóstico citopatológico (SCHULTZ, 2002).

Contudo, os meios de diagnóstico constituem um fator primordial tanto no período pré-operatório como no pós-operatório e exercem grande influência na determinação de condutas terapêuticas e prognósticos. O câncer de Tireóide é uma patologia de freqüente controvérsia quanto à abordagem clínica. Muitas vezes, é realizada a tireodectomia total ou parcial em tecidos sem caracterização morfológica maligna. O diagnóstico por Espectroscopia Raman, se associado ao método tradicional, poderá fornecer maiores informações sobre o tecido por meio da biópsia óptica e análise vibracional dos agrupamentos químicos.

### 3.4 Síntese e Secreção dos Hormônios Tireoidianos

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (THs) são excepcionalmente reguladas por um sistema de retroalimentação que envolve o hipotálamo e as glândulas pituitária e tireóide. O hormônio de liberação de tireotropina (TRH) é um tripeptídeo (PyroGle-His-Pro) sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo, transportado via axônios para a eminência mediana e, em seguida, para a pituitária anterior através do portal de plexos capilares. O TRH se liga aos receptores de TRH de tireotropina na pituitária, uma subpopulação de células pituitárias que segregam o hormônio estimulante da tireóide (TSH). Os receptores TRH são membros de superfamília compartilhando um domínio transmembrana de sete aminoácidos que

podem ser acoplados à proteína Gq11. A estimulação de TRH leva a liberação e síntese de novos TSH. O TSH é uma glicoproteína de 28-kDa composta de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  também é partilhada com outros hormônios tais como o luteinizante, o folículo-estimulante e a gonadotropina coriônica. Ambos, TRH e TSH têm sua secreção negativamente regulada pelos hormônios tireoidianos. A conversão intrapituitária de T4 para T3 pela enzima deiodinase tipo II, pode ser um importante mecanismo para regulação negativa de TSH. Adicionalmente, a somatostatina e dopamina a partir do hipotálamo também podem fazer a regulação negativa de TSH (YEN,2001).

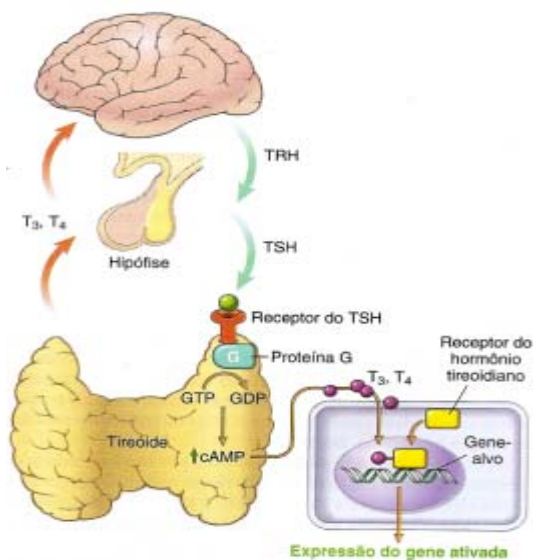


Figura 13 – Homeostasia no eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano e mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos (ROBBINS; CONTRAN; KUMAR, 1984).

O TSH é o regulador primário de liberação e secreção, no entanto, também exerce uma função crítica com relação ao crescimento e desenvolvimento da tireoide. A ligação do TSH com o receptor (R-TSH) sete transmembrane permite que este se acople à proteína Gs. A ativação do TSHr pelo TSH ou anticorpos na doença de Grave's leva ao aumento intracelular de cAMP e a estimulação da proteína Kinase A mediadora de precursores. Genes da tireoide, incluindo Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> simportador (NIS), tireoglobulina (Tg) e tireoide peroxidase (TPO) são estimuladores e capazes de promover a síntese de THs. Nota-se que ativando mutações no TSHr e na proteína



Gs há um funcionamento autônomo de nódulos tireoidianos e hipertireoidismo congênito (YEN,2001).

Os THs, T4 e o mais potente T3 são sintetizados na glândula tireóide (Fig. 14). O iodo é transportado ativamente e permanece concentrado na tireóide pela NIS (co-transportador sódio-iodeto). O iodo aprisionado é oxidado pela TPO na presença de peróxido de hidrogênio, e incorporado nos resíduos de tirosina uma glicoproteína 660-kDa, tireoglobulina (TG). Esta iodação de tirosinas específicas localizadas na Tg tem como produto a monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) que são precursoras das HTs: 3,5,3',5' tetraiodotironina (tiroxina ou T4) e a 3,5,3' triiodotironina (T3). Após a iodação Tg e ser produzido a MIT, DIT, T4, e T3, estes THs ficam armazenados como reserva extracelular polipeptídica no colóide dentro do lúmen do folículo tireoideano. Defeitos genéticos ao longo da via sintética de THs têm sido descritos nos seres humanos e são as principais causas de hipotireoidismo congênito em ambientes com alta concentração de iodo (YEN, 2001).

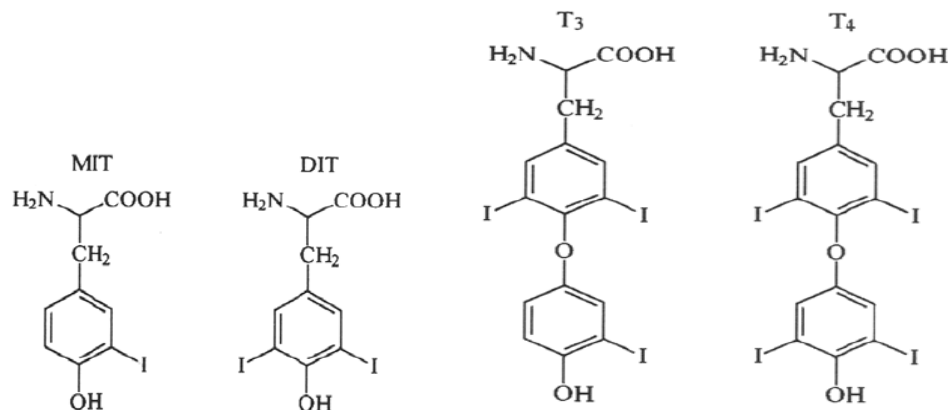


Figura 14 – Estrutura das hormonas da tireóide e seus precursores, MIT, 3 – Monoiodotirosina; DIT, 3,5 - Diiodotirosina; rT3, 3, 3',5' Triiodotironina inativa ou T3 reverso; T3, 3,5,3' triiodotironina; T4, 3,5,3',5' Tetraiodotironina (RODRIGUES, 2004).

A tireóide é um dos órgãos mais reativos do corpo humano e, de todas as glândulas endócrinas, é a que contém a maior quantidade de hormônio armazenado. Ela responde a vários estímulos e se encontra em um estado de constante adaptação. Durante a puberdade, gravidez e estresse fisiológico de qualquer natureza, a glândula aumenta de tamanho e se torna mais ativa. Essa labilidade funcional se reflete na hiperplasia transitória do epitélio tireoideano. Nesse momento, a tireoglobulina é reabsorvida e as células foliculares se tornam mais altas e mais colunares, algumas vezes formando pequenos botões contorcidos ou papilas.

Quando o estresse desaparece, ocorre involução da glândula, ou seja, a altura das células epiteliares diminui, ocorre acúmulo de colóide e as células foliculares retornam ao seu tamanho e arquiteturas normais. Alterações nesse equilíbrio normal entre hiperplasia e involução podem produzir desvios mais ou menos acentuados do padrão histológico normal (ROBBINS; CONTRAN; KUMAR, 1984).

### 3.4 Espectroscopia Raman

Chandrasekhara Venkata Raman foi o primeiro a relatar em 1928 o fenômeno de espalhamento da luz conhecido como efeito Raman. A primeira publicação representou o foco de pesquisa explorado durante toda a década de 1920. Em realidade, estes estudos eram exemplos de descrições prévias do atual efeito Raman. Pesquisas relacionadas ao espalhamento da luz tiveram início pela observação da cor do céu e do mar mediterrâneo durante a viagem de Raman em 1921.. Raman conseguiu demonstrar conclusivamente que a cor do mar resulta do espalhamento de luz do sol pelas moléculas da água. . Em 1928, Raman publicou um artigo com suas observações (RAMAN; KRISHNAN, 1928).

O espalhamento Raman é a forma fundamental de espectroscopia molecular; é utilizado quando se pretende obter informações sobre as estruturas e as propriedades moleculares provenientes das transições vibracionais (LEWIS; EDWARDS, 2001). O diagrama de nível de energia para o espalhamento Raman é demonstrado na Figura 15.

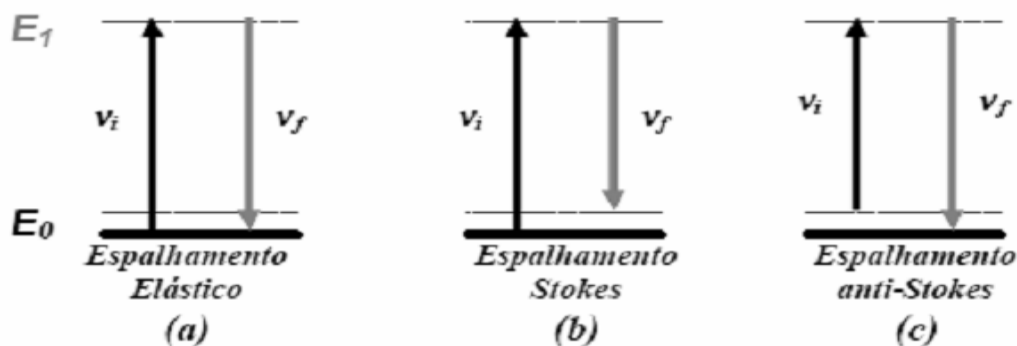


Figura 15 – Diagrama do nível de energia, transição vibracional. (a) espalhamento elástico, (b) espalhamento inelástico - Raman Stokes e (c) espalhamento Anti-Stokes (LEWIS; EDWARDS, 2001).

A Espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) usa a radiação laser com energia próxima à do infravermelho para excitar uma dada amostra e medir a luz espalhada pela mesma. Grande parte da luz espalhada pode ter a mesma frequência que a luz incidente (espalhamento Rayleigh - elástico). Entretanto, uma pequena fração da luz incidente ( $h\nu_i$ ) pode ter sua energia diminuída ( $h(\nu_i - \nu_R)$  - Stokes) ou aumentada ( $h(\nu_i + \nu_R)$  Anti-Stokes). Este tipo de espalhamento inelástico da luz com a matéria é conhecido como espalhamento Raman. Visto que a energia da luz é proporcional à frequência, a mudança de frequência da luz espalhada inelasticamente é proporcional à frequência vibracional da molécula espalhada. Esse processo de troca inelástica de energia entre a molécula, luz espalhada e luz incidente, é conhecido como efeito Raman. Do ponto de vista energético, o processo de espalhamento Raman pode ser descrito como a transição de uma molécula do estado fundamental para um estado vibracional excitado, acompanhada por uma absorção simultânea de um fóton incidente e emissão de um fóton espalhado (Raman). Cada amostra biológica possui seu próprio conjunto vibracional molecular, portanto o espectro Raman de uma amostra em particular consistirá de uma série de picos, cada um deslocado pela frequência vibracional característica daquela molécula, fornecendo assim a identificação para a molécula estudada. O deslocamento Raman é frequentemente medido em comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), uma unidade conveniente para relacionar a mudança de frequência da luz espalhada em relação à luz incidente (FABIANO et al., 2003).

Desde 1961, o efeito Raman foi aplicado em estudos de espectros vibracionais de gases, líquidos e sólidos, e também em espectro rotacional de gases (LEWIS; EDWARDS, 2001). A Espectroscopia Raman, que é uma técnica que se fundamenta na identificação e quantificação de constituintes moleculares, vem sendo aplicada em amostras biológicas com a vantagem de não necessitar de preparação prévia da mesma, podendo ser utilizada para análises não destrutivas de substâncias sólidas, líquidas e também gasosas.

A molécula poliatômica consiste em  $N$  átomos; a presença de  $N$  átomos resulta em  $3N$  graus de liberdade, número das coordenadas necessárias para especificar as posições de todos os  $N$  átomos. Três coordenadas são suficientes para descrever o movimento translacional da molécula. Além disso, para as moléculas não lineares, existem três coordenadas adicionais (como ângulos Euler's)

que são necessárias para especificar a orientação da molécula no espaço. Em resumo,  $3N$  (total) – 3 (translacional) – 3 (orientacional) =  $3N - 6$  graus de liberdade para avaliação da molécula não linear. Para molécula linear, os resultados correspondem a  $3N - 5$ . (TURRELL; CORSET, 1996).

Vários tipos de vibrações moleculares característicos de diferentes moléculas podem ser encontrados na espectroscopia Raman. Elas podem ser simplesmente agrupadas em estiramento vibracional, deformações vibracionais e torções ou estruturas vibracionais. O movimento molecular envolvido depende da extensão de ligação e mudanças do ângulo de ligação, os quais movem individualmente átomos ou grupos de átomos levemente para fora de posição de equilíbrio. Este evento de complexa movimentação dos átomos das moléculas envolve multiplicidade de fontes de energia, especialmente se os átomos possuem diferentes massas e estão conectados a diferentes tipos de ligações, tais como ligações únicas, duplas ou triplas. Espectroscopistas desenvolveram a chamada teoria de grupo que permite descrever e identificar os grupos funcionais de moléculas, assim como, de aminoácidos. Certas bandas observadas na região espectral podem definir classes de substâncias presentes na amostra (SCHULTZ, 2002).

A Figura 16 descreve os modos de vibrações fundamentais. O estiramento vibracional é associado com o movimento dos átomos causando estiramento e encurtamento da ligação química. Para o sistema com movimento de três átomos, a vibração pode ser simétrica ou assimétrica. O modo curvo ou em tesoura ocorre mudança de ângulo entre as ligações durante o plano de movimento; a vibração em balanço, os átomos balançam em fase para trás e adiante no plano simétrico da molécula. A vibração em sacudida está em fase, fora do plano de movimento dos átomos; os demais átomos estão no plano, se durante o movimento dos átomos o plano é rodado, a vibração é denominada vibração em torção (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

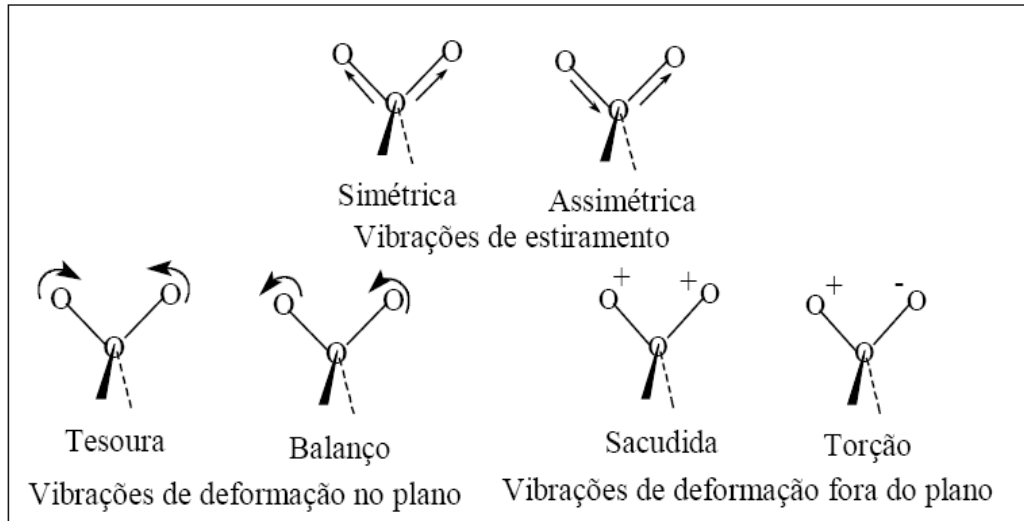


Figura 16 – Vibrações de um grupo de átomos (+ e – significam vibrações perpendiculares ao plano do papel) (NASCIMENTO, 2003).

Diversas descrições espectrais e excelentes correlações estrutura-espectro podem ser obtidas na literatura sobre macromoléculas biológicas. Há grande tentativa de interpretação do espectro vibracional para moléculas biológicas e busca de correlações estrutura-espectro baseada principalmente nos conhecimentos que se tem das estruturas, nas análises das coordenadas normais e mudança dos experimentos isótopos (GREMLICH; YAN, 2001).

Constituintes de células, tecidos e fluidos corpóreos podem ser vistos na figura espectral FT- Raman (Figura 17) de um espécime biológico; da mesma forma, algumas destas bandas foram numeradas na tentativa de transferir os dados para tabela (Tabela 1) (GREMLICH; YAN, 2001).

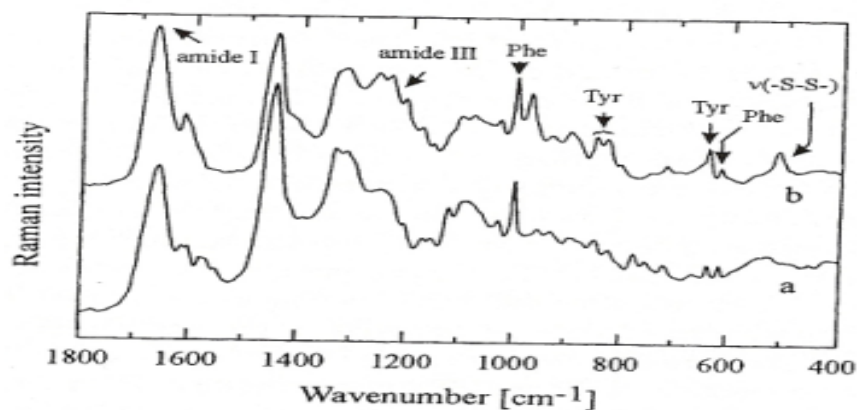


Figura 17 – Espectro FT-Raman obtido de complexa espécime biológica (*Escherichia coli*). (GREMLICH; YAN, 2001).

Tabela 1 – Transferência de dados em algumas bandas encontradas no espectro FT-Raman de espécime biológica (GREMLICH; YAN, 2001).

Band numbering (cf. Fig. 1B)	Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Assignment <sup>a</sup>
1	~3059	(C=C—H) <sub>(asym.)</sub> str
2	~2975	CH <sub>3</sub> str
3	~2935	CH <sub>3</sub> and CH <sub>2</sub> str
4	~2870–2890	CH <sub>2</sub> str
5	~1735	>C=O ester str
6	~1650–1680	Amide I
7	~1614	Tyrosine
8	~1606	Phenylalanine
9	~1575	Guanine, adenine (ring stretching)
10	~1440–1460	C—H def
11	~1295	CH <sub>2</sub> def
12	~1230–1295	Amide III
13	~1129	C—N and C—C str
14	~1102	>PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> str (sym)
15	~1085	C—O str
16	~1061	C—N and C—C str
17	~1004	Phenylalanine
18	~852	“Buried” tyrosine
19	~829	“Exposed” tyrosine
20	~785	Cytosine, uracil (ring, str)
21	~720	Adenine
22	~665	Guanine
23	~640	Tyrosine (skeletal)
24	~620	Phenylalanine (skeletal)
25	~520–540	S—S str

str= stretching; def = deformation; sym= symmetric

Várias biomoléculas de células e tecidos contêm mais de 100 átomos relacionados, cada um produzindo um complexo espectro formado por diferentes vibrações. As células contêm infinitos números de moléculas as quais formam um espectro com infinitos números vibracionais. É lógico que estas diversas células se apresentam em diferentes estados de desenvolvimento, gerando alterações espectrais. A identificação do tipo e do estado de desenvolvimento celular em uma amostra baseia-se nas mudanças bioquímicas (SCHULTZ, 2002).

### 3.4.1 Sistema Raman

Os instrumentos usados para coleta dos espectros vibracionais são chamados espectrômetros. (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

Foi demonstrado em 1986 que o espectro Raman excitado pelo laser Nd-YAG pode registrar, comparado com instrumento Raman dispersivo, espectros sem fluorescência. Desde então, diversos instrumentos foram desenvolvidos com a possibilidade de unir um módulo simples FT-Raman a um equipamento FT-IR. Deste objetivo, foi construído o instrumento FT-Raman (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

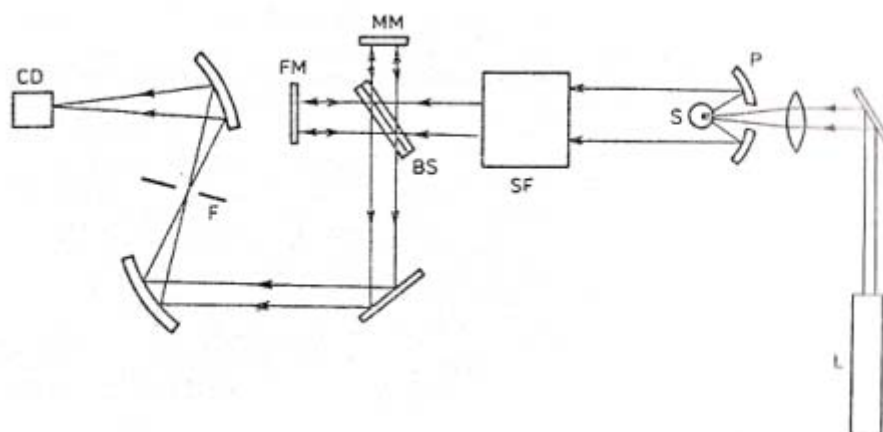


Figura 18 – Diagrama esquemático do espectrômetro Raman com transformada de Fourier. L– Laser Nd:YAG, S – amostra, P – coleção de espelhos parabólicos, SF – filtro secundário, BS – separador de saída dos feixes de luz, FM, MM – espelhos fixos e móveis respectivamente, F – filtro regional, CD– detector refrigerado (TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994).

O equipamento FT-Raman (Figuras 18 e 19) utiliza o laser de excitação Nd-YAG em 1064nm. O sinal Raman espalhado na amostra é coletado utilizando-se filtros de rejeição do tipo *notch* e focalizados na entrada da fenda do espectrógrafo. Os filtros *notch* eliminam a luz *Rayleigh* espalhada e transmitem o sinal Raman para o espectrógrafo. A luz espalhada inelasticamente pelo espectrógrafo é detectada por um detector de Germânio refrigerado por nitrogênio líquido. O sinal passa pela placa controladora convertendo os sinais que podem ser visualizados no software (OPUS) no microcomputador (Figura 20).



Figura 19 - FT-Raman RFS 100, Bruker. (1) detector de Germânio resfriado por nitrogênio líquido, (2) caixa óptica – corpo do equipamento, (3) estágio motorizado controlador do eixos X, Y e Z do porta-amostra do equipamento, (4) micro-Raman, (5) porta-amostra (6) câmara do porta-amostra (MORENO, 2006).

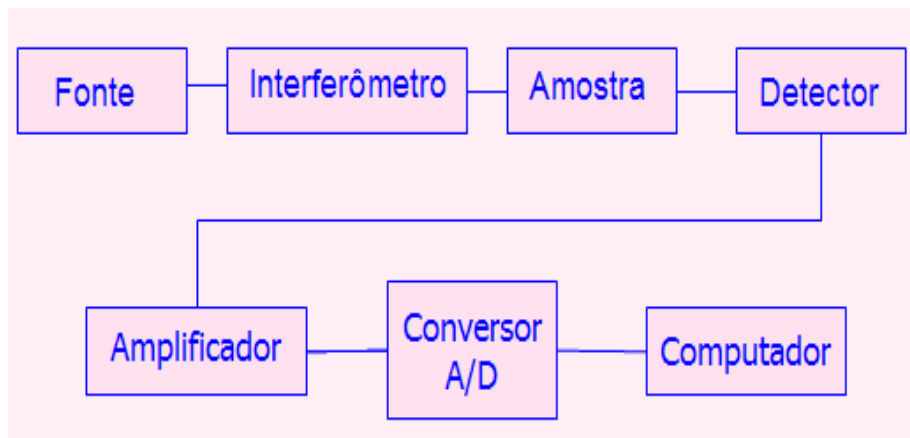


Figura 20 – Esquema de aquisição de dados em Espectroscopia Raman (LYNX,2007).

### 3.5 Utilização da Espectroscopia Raman e Diagnóstico de Câncer

O uso da espectroscopia óptica vem se tornando viável para o diagnóstico precoce do câncer por possuir vantagens sobre a técnica histopatológica tradicional, com resultados em tempo real, existindo ainda a possibilidade de se obter diagnósticos não-invasivos ou minimamente invasivos. Estudo realizado por Nunes et al. (2003), demonstraram que a espectroscopia FT-Raman é adequada para aplicações em pele humana. Nesse estudo foram analisadas 39 amostras de pele,



dentre elas, 18 amostras diagnosticadas como normais e 21 amostras diagnosticadas como lesões malignas. Foram observadas diferenças espectrais entre os tecidos normais e malignos pela intensidade dos modos vibracionais (picos) com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 83%.

Em outro estudo realizado por Moreno (2006), avaliou-se o diagnóstico vibracional molecular de doenças mamárias, em um total de 859 espectros, incluindo diagnósticos como tecido mamário normal, alterações funcionais benignas da mama (AFBM), fibroadenoma (FBD), neoplasia intra-epitelial ductal e diferentes tipos de carcinomas mamários. A Espectroscopia Raman diferenciou com uma sensibilidade e especificidade de 100%, as seguintes doenças: CDI de carcinoma ductal *in situ*; carcinoma ductal inflamatório de carcinoma medular e mucinoso; CDIS de Doença de Paget mamária; CDIS de AFBM; CDIS de FBD e mama normal de AFBM e FBD. Também diferenciou: Doença de Paget e AFBM de CDI; FBD de CDI; CDIS de CDI com sensibilidade e especificidade de 95,24% e 100%; 94,92% e 81,82%; 100% e 93,02%; 99,58% e 85,19%, respectivamente.

Krafft e Sergo (2006), descreveram diferentes aplicações biomédicas utilizando FT-Raman na última década. Os espectros vibracionais foram discutidos neste estudo para tecidos mineralizados (ossos, dentes), pele, tecidos cerebrais, trato gastrointestinal (boca, esôfago, cólon), tórax, artérias, cartilagens, colo do útero, trato urinário, próstata, bexiga, tecido ocular, fígado, coração e baço. Foi possível demonstrar as possibilidades e perspectivas deste método para biodiagnósticos, detectando e caracterizando doenças, tumores e outras patologias.

Recentemente, Liu et al. (2005), investigaram tecidos da tireóide, pulmão, ovário, cervice e tecido uterino. A tireóide e o tecido uterino exibiram maior número de bandas Raman que os demais tecidos analisados. Consideráveis diferenças foram percebidas entre o tecido normal da tireóide e o câncer folicular na região espectral de 1.585 e 1.634  $\text{cm}^{-1}$ . Entretanto, outras lesões de tireóide não foram estudadas, como, por exemplo, as lesões benignas.

Tecido de biópsias e punção aspirativa por agulha fina (PAAF) em pacientes com suspeita de neoplasias benignas e malignas foi investigado por microscopia no infravermelho e métodos de estatística multivariados. Os grupos analisados revelaram quatro espectros diferentes correspondendo a bócio colóide, adenoma, carcinomas e diagnósticos negativos. O material obtido pela biópsia durante o processo cirúrgico para remoção do tecido glandular foi suficiente para gerar uma

estatística significativa para se distinguir a neoplasia do tecido normal. A plotagem do histograma bivariado demonstrou dois parâmetros, DNA e proteína; estes são suficientes para separar o tecido normal de adenoma e carcinomas (SCHULTZ et al., 1999).

Alvarez, Farias e Hidelbrant (2004) realizaram importante estudo de comparação vibracional entre os hormônios tireoidianos utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho e espectroscopia Raman. No espectro Raman, conseguiu determinar que modos incluindo estiramento C – O coordenados pelo grupo fenol e suas pontes se localizavam entre 1100 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ . Para T2 e T3, a razão C – O ( $\alpha$ )/ C – OH representam média intensidade em 1239 e 1229  $\text{cm}^{-1}$  enquanto que, em T4 o modo C – O ( $\beta$ ) se mostra a 1.180  $\text{cm}^{-1}$ . O modo de estiramento C – N encontra-se nas bandas de 1055, 1058 e 1053  $\text{cm}^{-1}$  para T2, T3 e T4, respectivamente (Figura 21). O modo do anel  $\beta(9)$  apresenta-se em 1029, 1027 e 1038  $\text{cm}^{-1}$  no espectro Raman (ALVAREZ; FARIAS; HIDELEBRANT, 2004).

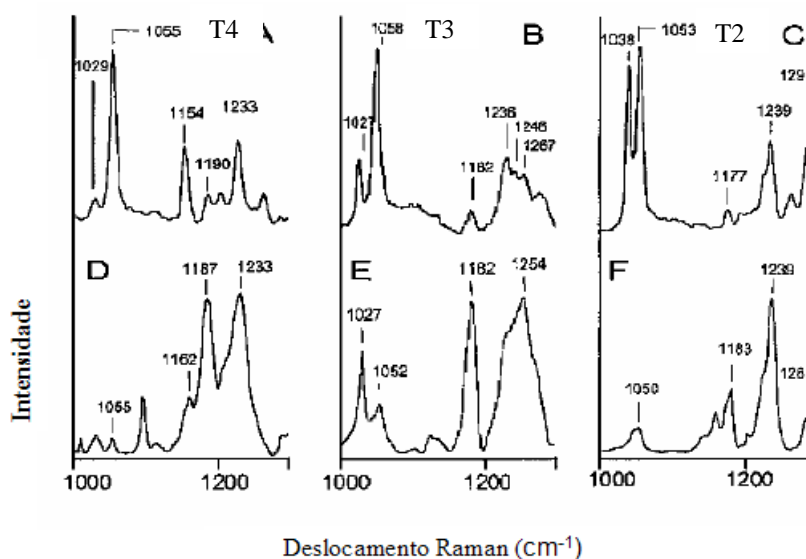


Figura 21 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C) T2 na região entre 1.000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ . Espectro Infravermelho (D) T4, (E) T3 e (F) T2 na região entre 1.000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  (ALVAREZ; FARIAS; HIDELEBRANT, 2004).

No mesmo estudo foram observadas vibrações dos anéis aromáticos com bandas Raman médias e fortes entre 1530 e 1620  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 22) (ALVAREZ; FARIAS; HIDELEBRANT, 2004).

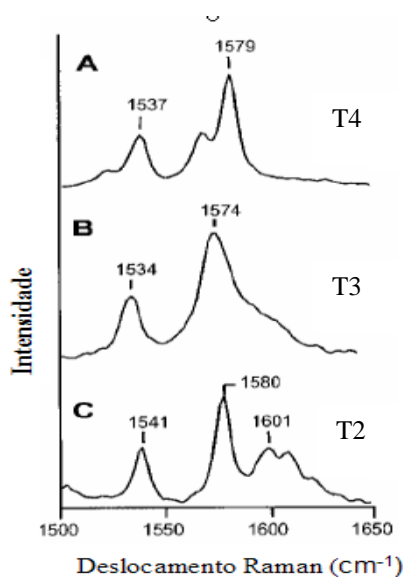


Figura 22 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C) T2 na região entre 1.500 a 1650  $\text{cm}^{-1}$  (ALVAREZ; FARIAS; HIDELEBRANT, 2004).

A Tirosina e moléculas relacionadas manifestaram-se no espectro Raman na região entre 850-830  $\text{cm}^{-1}$ . O T2 apresenta uma frequência de comprimento de onda na faixa de 850-863  $\text{cm}^{-1}$ , o modo  $\beta(12)$  de forma similar caracterizado no espectro Raman do hormônio T4 em 850-857  $\text{cm}^{-1}$ . Existe uma relação entre T2 e T4 nestas regiões devido às ligações de iodo aos anéis fenólicos. No espectro Raman de T3, verifica-se um pico central assimétrico de 834  $\text{cm}^{-1}$  originado pela deformação dos anéis  $\alpha/\beta$  nos modos  $\beta(12)$  e  $\beta(14a)/\beta(14b)$  (Figura 23) (ALVAREZ; FARIAS; HIDELEBRANT, 2004).

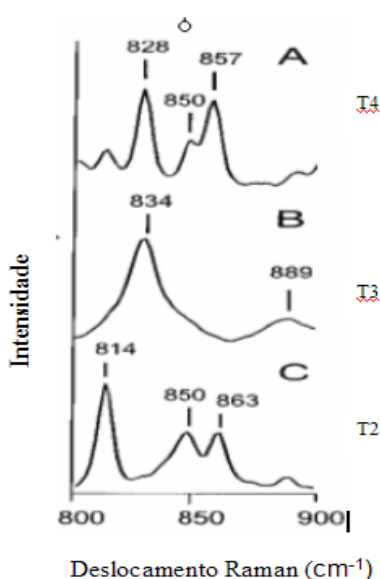


Figura 23 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C) T2 na região entre 800 a 900  $\text{cm}^{-1}$  (ALVAREZ; FARIAS; HIDELEBRANT, 2004).

A maior banda espectral de iodotirosinas foi encontrada entre  $150$  e  $250\text{ cm}^{-1}$  e são atribuídas ao modo de estiramento C – I (Figura 24), com vibrações diferenciadas entre os três hormônios refletindo as diferenças de substituintes dos iodetos. Os dois modos C – I em T2 apresentam bandas vibracionais em  $246$  e  $184\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que o hormônio T3 apresentou característica similar em  $245$  e  $187\text{ cm}^{-1}$  e o espectro T4 apresentou dois picos de alta intensidade em  $220$  e  $190\text{ cm}^{-1}$  (ALVAREZ; FARIAS; HIDELBRANT, 2004).

Os autores concluíram em seus estudos que a análise vibracional das iodotirosinas é possível pela análise dos constituintes básicos extraídos de sua forma estrutural representada no espectro dos hormônios e complexos lipídicos. A conformação e adaptação depende da energia rotacional, particularmente dos anéis  $\alpha/ \beta$ . A diferenciação entre T2, T3 e T4 pode ser identificada pelos modos principalmente pela ligação de estiramento do modo C – I (Figura24).

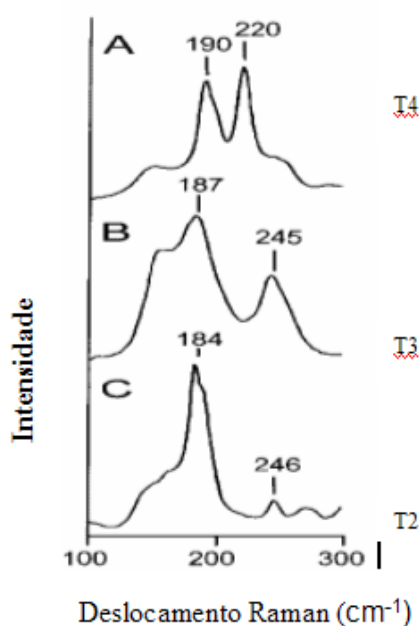


Figura 24 – Espectro Raman de (A) T4, (B) T3 e (C) T2 na região entre  $100$  a  $300\text{ cm}^{-1}$  (ALVAREZ; FARIAS; HIDELBRANT, 2004).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sob o número H281/CEP/2007 ( ANEXO A).

### **4.2 Obtenção das amostras**

As amostras dos tecidos da tireóide com doença benigna, pré-maligna e diferentes tipos de neoplasias malignas foram obtidas na Clínica de Cirurgia de Cabeça e Pescoço São Paulo - SP. A coleta das amostras foi realizada através de procedimento cirúrgico denominado Tireoidectomia. O paciente foi informado de que parte do material seria utilizado para pesquisa, ou seja, todos os pacientes aceitaram ceder fragmentos da tireóide para esta pesquisa através de Consentimento Pós-informado (ANEXO B).

Após o procedimento cirúrgico (Tireodectomia), foram coletados trinta e seis fragmentos de tireóide, duas amostras provenientes de cada um dos dezoito pacientes (uma fragmento de margem de lesão e outro representativo do tecido patológico ou centro de lesão). É importante relatar que dezessete dos pacientes pertencia ao gênero feminino e apenas um ao masculino.

Do total de amostras, foram utilizados apenas vinte e sete dos espécimes para pesquisa por não haver a necessidade de se utilizar todas as amostras de margem de lesão. Desta forma, formou-se os seguintes grupos histológicos: tecido adjacente à lesão (bco), região nodular do bócio (BCO), adenoma folicular (adFOL), carcinoma folicular (FOL) e carcinoma papilífero (PAP).

#### 4.2.1 Preparação das amostras

As amostras removidas foram armazenadas em tubos criogênicos Nalgene<sup>®</sup> mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento da análise espectroscópica.

Para o experimento Raman, os espécimes foram descongelados em soro fisiológico (0.9 %) em temperatura ambiente, em seguida cortados em fragmentos utilizando o bisturi lâmina número 15 e posicionados na porção central de um porta-amostra de alumínio para proceder a aquisição dos espectros.

Os hormônios T3 (Liotironina Sódica) e T4 (Levotiroxina Sódica Mono) foram obtidos comercialmente por meio do fabricante Pharma Nostra. Os hormônios T3 e T4 sintéticos (em pó) também foram acondicionados na abertura de 2 mm<sup>3</sup> de um porta-amostra de alumínio.

#### 4.3 Obtenção dos espectros FT-Raman

Os espectros dos tecidos patológicos foram obtidos através do espectrômetro FT-Raman RFS 100/S da Bruker<sup>®</sup> (Alemanha). A potência do laser foi ajustada de forma que fossem extraídos os sinais com melhor razão sinal/ruído, sem que houvesse aquecimento ou degradação do material biológico exposto à luz.

##### 4.3.1 Parâmetros para análise FT-Raman

O laser de excitação do FT-Raman utilizado foi o Nd-YAG (1064nm) com uma potência de saída de 300 mW, 600 varreduras e resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. A amostra de 2mm de diâmetro foi submetida à análise, sendo que a leitura foi realizada em 3 pontos diferentes, cada ponto resultando em um espectro (Figura 25).

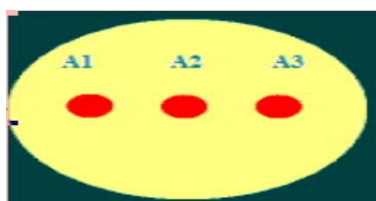


Figura 25 – Amostra do tecido da tireóide e A1, A2, A3 - pontos de leitura pelo FT-Raman.

A Tabela 02 demonstra o número de espécimes utilizados para este estudo, considerando que foram obtidos 03 espectros por amostra; ao final obteve-se o total de 80 espectros, sendo: 33 bco, 27 BCO, 03 de adFOL, 03 referentes ao FOL e 14 PAP. Em especial, foi excluído um espectro de carcinoma papilífero pela grande interferência sinal ruído.

Tabela 02 – Relação entre o número de amostras e número de espectros obtidos por lesão.

<i>Tipo de Lesão</i>	<i>Amostras</i>	<i>Espectros</i>
Tecido adjacente à lesão	11	33
Bócio região nodular	09	27
Adenoma Folicular	01	03
Carcinoma Papilífero	05	14
Carcinoma Folicular	01	03
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>80</b>

Com relação aos espectros dos hormônios, para estes, foram coletados dois espectros, sendo um para cada hormônio, na região de deslocamento Raman de 400 a 3020  $\text{cm}^{-1}$ . Os parâmetros utilizados foram: 100 mW de potência de saída do laser de excitação (Nd:YAG), 200 varreduras, resolução espectral de 1  $\text{cm}^{-1}$  para cada um dos espectros.

## 4.4 Análise Estatística dos Espectros Raman

### 4.4.1 Pré-processamento

O pré-processamento dos espectros dos espécimes teciduais realizou-se da seguinte forma: os sinais obtidos no espectrômetro foram convertidos e visualizados no software OPUS; estes dados permanecendo armazenados no microcomputador. Todos os espectros foram pré-processados automaticamente por meio de uma rotina construída no software Matlab 6.1. (Vanderbilt University, Tennessee, EUA). O procedimento incluído nesta rotina envolve o uso de polinômio de 5º grau para subtração da linha de base seguida de normalização com relação ao modo em 1.462  $\text{cm}^{-1}$ . A análise estatística posterior foi realizada com auxílio do software Minitab.

De forma similar, foi realizado o pré-processamento dos espectros hormonais, também por meio da rotina do Matlab 6.1. Para a região I de deslocamento Raman

de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , a linha de base foi corrigida por meio de um polinômio de grau 2, e para região II de 2800 a 3020  $\text{cm}^{-1}$ , por uma reta. Posteriormente, foi possível construir uma tabela onde foram relatados os modos vibracionais relevantes na diferenciação destes hormônios comparados os dados espectrais de tecidos patológicos.

#### 4.4.2 Análise Qualitativa

Para este estudo, foi definido um nível de significância de 0,05 (5%). É importante ressaltar que todos os intervalos de confiança elaborados ao longo do trabalho foram construídos com 95% de confiança estatística.

Os resultados estatísticos foram desenvolvidos por análise multivariada, ou seja, uma técnica de análise exploratória que permite a estruturação dos dados de diversas formas e combinações. Foi possível a realização de três comparações para discriminações e classificações das lesões de tireóide: tecido adjacente à lesão *versus* bócio região nodular (bco vs BCO); em seguida, estes dois grupos anteriores foram unidos representando o grupo de bócio total *versus* carcinoma papilífero (BCO vs PAP); e por fim, houve a união de todos os dados coletados (tecido adjacente à lesão, bócio região nodular, adenoma folicular, carcinoma papilífero e carcinoma folicular) na tentativa de classificação e discriminação entre lesões benignas *versus* malignas (Benigno vs Maligno).

A primeira análise desenvolvida foi Análise de Componentes Principais (PCA); com base nos componentes, foram utilizadas duas outras técnicas de análise multivariada exploratória: Cluster e Discriminante, ou seja, os espectros FT-Raman neste estudo através do software MINITAB® Release 14.20 são normalizados na região de 1.462  $\text{cm}^{-1}$  e submetidos à “clusterização”, utilizando o cálculo do coeficiente de correlação entre os dados na forma de dendrogramas. Em seguida, são analisados os componentes principais dos espectros para determinar o potencial discriminativo e a especificidade dos sinais Raman coletados.



#### **4.5 Diagnóstico Histopatológico**

Após a realização dos experimentos, as amostras teciduais foram armazenadas em solução formalina 10 % e submetidas ao procedimento padrão para confecção de lâminas HE a partir de blocos de parafina. Para confirmação do diagnóstico, as amostras foram encaminhadas a patologistas para avaliação histopatológica, seguindo os critérios de diagnóstico para neoplasias de tireóide da Sociedade Brasileira de Patologia.

## 5 RESULTADOS

Neste capítulo foram expostos os resultados deste estudo: (a) hipótese diagnóstica, relatada pelo cirurgião especialista em cabeça e pescoço no momento do procedimento cirúrgico através da análise macroscópica do tecido excisado, (b) laudo histopatológico realizado pelos médicos patologistas do espécime utilizado para espectroscopia Raman e (c) laudo anátomo patológico descrito pelo médico patologista sendo o laudo oficial do paciente. Posteriormente, foram inseridos os (d) dados espectrais por meio dos gráficos *box-plot* de cada grupo experimental com seus respectivos dendogramas e (e) gráficos de classificação discriminante.

### 5.1 Histologia

Após a cirurgia para excisão da tireóide, as amostras foram randomizadas e, em seguida, numeradas em ordem seqüencial crescente, obtendo-se o total de 27 amostras provenientes de 18 pacientes.

Na Tabela 3 na primeira coluna mostra a identificação dos pacientes; em seguida, a segunda coluna, evidencia o diagnóstico clínico descrito pelo médico no momento da cirurgia de acordo com a observação dos padrões macroscópicos. Na terceira coluna, as análises histológicas das amostras que foram utilizadas no experimento, e na última coluna à direita, o laudo anátomo-patológico oficial do paciente.

Tabela 03 – Relaciona os fragmentos obtidos para experimento com o diagnóstico clínico, análise histológica e laudo anátomo-patológico dos respectivos pacientes.

FRAGMENTO	DIAG. CLINICO	ANALISE HISTOLOGICA	LAUDO ANATOMO-PATOLOGICO
1A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso	1. Bócio adenomatoso em lobo direito e istmo com nódulo hiperplásico dominante de células de Hurtle de 0,6 cm em lobo direito. 2. Bócio adenomatoso em lobo esquerdo.
2A	Câncer insular Folicular	-----	1. Carcinoma pouco diferenciado medindo 1,6 cm em lobo tireoidiano direito. Presença de extensa invasão de parênquima adjacente. Cápsula tireoidiana livre. Margens cirúrgicas livres de neoplasia.
2B	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso + Foco de tireoidite linfocitária	2. Bócio adenomatoso em lobo esquerdo.

3A	Bócio	Bócio adenomatoso + Fibrose	A- Lobo direito da tireóide com bócio adenomatoso multinodular associada à tireoidite linfocítica. B- Istmo da tireóide com bócio adenomatoso multinodular multinodular associada à tireoidite linfocítica. C- Lobo esquerdo da tireóide com bócio adenomatoso multinodular multinodular associada à tireoidite linfocítica.
3B	Bócio	Bócio adenomatoso + Fibrose + Foco Tireoidite linfocitária	
4A	Câncer Papilífero	Suspeito para Ca Papilífero	1- Lobo esquerdo da tireóide: microcarcinoma papilífero, variante folicular, não encapsulado, medindo 0,6cm de diâmetro. 2- Istmo da tireóide: Bócio adenomatoso multinodular associado à tireoidite linfocítica. 3- Lobo direito da tireóide: Bócio adenomatoso multinodular associado à tireoidite linfocítica.
5A	Bócio	Bócio adenomatoso	A- Lobo direito da tireóide com bócio adenomatoso multinodular associada à tireoidite linfocítica. B- Istmo da tireóide com bócio adenomatoso multinodular multinodular associada à tireoidite linfocítica. C- Lobo esquerdo da tireóide com bócio adenomatoso multinodular multinodular associada à tireoidite linfocítica.
5B	Bócio	-----	
6A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso	A- Lobo direito da tireóide com bócio adenomatoso multinodular. B- Istmo da tireóide com bócio adenomatoso multinodular. C- Lobo esquerdo da tireóide com bócio adenomatoso multinodular com hiperplasia de células.
6C	Bócio	Bócio adenomatoso + Fibrose	
6D	Bócio	Tecido tireoidiano com fibrose	
7B	Bócio	Bócio adenomatoso	A- Lobo direito da tireóide com bócio colóide nodular, tireoidite linfocitária. B- Istmo da tireóide com bócio colóide nodular. C- Lobo esquerdo da tireóide com bócio colóide nodular.
8A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso	A- Lobo direito da tireóide com bócio colóide nodular. B- Istmo da tireóide com bócio colóide nodular. C- Lobo esquerdo da tireóide com bócio colóide nodular.
8B	Bócio	Neoplasia folicular (Bócio Adenomatoso x Adenoma folicular)	
9A	Tireóide Normal	-----	1. Carcinoma papilífero (0,4cm) em lobo esquerdo de tireóide. 2. Bócio adenomatoso em lobo direito e istmo. 3. Linfonodo recorrential esquerdo livre de neoplasia. 4. Linfonodos peri-ístimicos livres de neoplasia.
10A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso + Foco de tireoidite linfocitária	1- Microcarcinoma papilífero (nódulo lateral) com 0,6cm e outro foco de microcarcinoma papilífero com 0,3cm (nódulo anterior) em lobo direito de tireóide. 2- Bócio adenomatoso em lobo esquerdo.
10B	Câncer Papilífero	Material insuficiente (escasso e com	

		artefatos)	
11A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso + Foco de tireoidite linfocitária	A- Lobo direito da tireóide com bócio colóide nodular. Tireoidite linfocitária. B- Istmo da tireóide com bócio colóide nodular. Tireoidite linfocitária. C- Lobo esquerdo da tireóide com bócio colóide nodular. Tireoidite linfocitária. D- Linfonodo com linfadenite crônica inespecífica.
12A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso	A- Lobo direito da tireóide com carcinoma papilífero tipo clássico, não encapsulado que mede 0,7 cm de diâmetro, margens cirúrgicas livres.
12B	Câncer Papilífero	Insuficiente (fibrose e focos hemorrágicos)	B- Istmo da tireóide com Tireoidite linfocitária. C- Lobo esquerdo da tireóide com carcinoma papilífero tipo clássico que mede 1,8 cm de diâmetro, não encapsulado, multicêntrico, margens cirúrgicas livres. D- Esvaziamento recorrential: linfonodos livres de neoplasia.
13A	Câncer Folicular	Bócio Adenomatoso	A- Lobo esquerdo da tireóide com adenoma folicular.
13B	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso	B- Istmo da tireóide com fibrose intersticial. C- Lobo direito da tireóide com fibrose intersticial.
15B	Bócio	Bócio adenomatoso	A- Lobo direito da tireóide com bócio colóide. B- Istmo da tireóide com bócio colóide. C- Lobo esquerdo da tireóide com tireoidite linfocitária, bócio colóide. D- Linfonodos aderidos ao istmo com linfadenite crônica inespecífica.
16B	Bócio	Bócio adenomatoso	
17A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso	A- Lobo esquerdo da tireóide com carcinoma papilífero bem diferenciado, parcialmente capsulado. Infiltração capsular presente.
17B	Câncer Papilífero	Sugestivo para Ca Papilífero	B- Remanescente de lobo direito da tireóide: Bócio nodular colóide.
18B	Câncer Papilífero	Bócio Adenomatoso	1. Carcinoma papilífero, variante folicular bem diferenciado de lobo esquerdo, restrito à tireóide medindo 0,7cm. 2. Bócio adenomatoso de lobo direito e istmo de tireóide. 3. Carcinoma papilífero metastático para 2 linfonodos peri-tireoidianos.
21A	Tireóide Normal	Bócio adenomatoso	A - Lobo direito da tireóide com carcinoma papilífero de padrão clássico medindo 1,5cm de diâmetro, grau II histológico e nuclear. Margens cirúrgicas livres. B- Istmo da tireóide livre de comprometimento neoplásico. C-Lobo esquerdo livre de comprometimento neoplásico. D- Linfonodos recorrentiais livres de comprometimento neoplásico.

## 5.2 Espectros Raman

Para análise e diferenciação das patologias foi necessário a conjugação dos espectros de diferentes formas. A primeira forma de análise estatística prova classificar o tecido adjacente à lesão da região nodular do bócio, onde foi possível verificar a similaridade entre estes tecidos. Para segunda análise foi realizada a caracterização das lesões benignas e malignas pelo método de espectroscopia Raman, inicialmente pela classificação de bócio total (periferia e região nodular) versus carcinoma papilífero, e por fim, com a união de todos os dados, benigno (bócio total e adenoma folicular) e maligno (carcinoma papilífero e carcinoma folicular).

Adicionalmente, foi realizado o estudo descritivo dos espectros de bócio, adenoma folicular e carcinoma folicular devido à dificuldade histopatológica para diferenciação do “padrão folicular”. Em seguida, apresentado o estudo dos espectros dos hormônios sintéticos (T3 e T4) associados aos espectros de tecidos patológicos que permitiu reconhecer os picos dos hormônios presentes nos espectros característicos de tecido glandular, fato importante, para se definir os picos de interferência dos hormônios.

### 5.2.1 Análise Estatística

#### 5.2.1.1 Bócio tecido adjacente à lesão *versus* bócio região nodular

A Figura 26 apresenta a média dos espectros (em preto) de tecidos adjacentes às lesões, em geral, são os tecidos próximos à lesão de bócio adenomatoso, desta forma, denominado bco. O espectro em vermelho representa a média dos espectros dos tecidos de bócio adenomatoso região nodular, sendo denominado BCO.

Os dados foram dispostos desta forma porque as amostras do tecido adjacente à lesão pertenciam ao denominado grupo controle deste estudo; no entanto, todas as amostras teoricamente normais receberam o laudo histopatológico de bócio adenomatoso (Tabela 3).

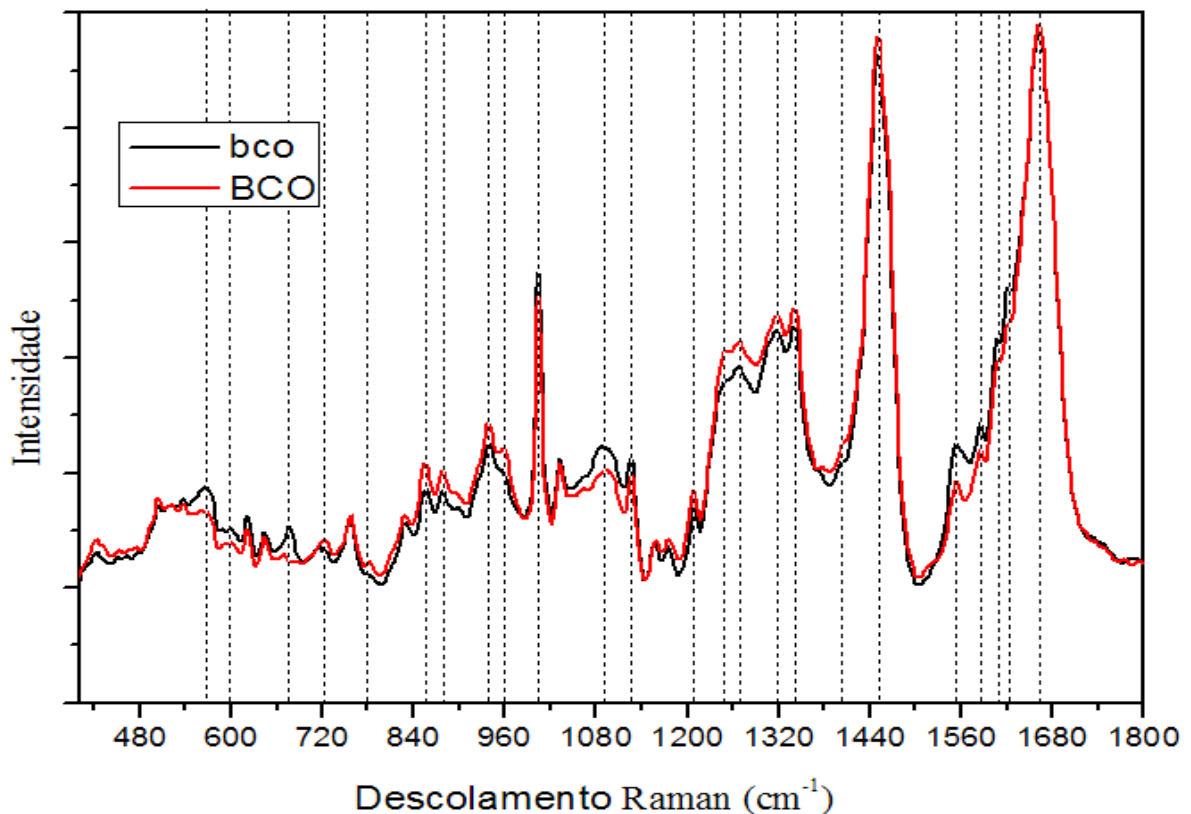


Figura 26 – Média dos espectros de bócio tecido adjacente linha preta e bócio região nodular em vermelho na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise dos compostos presentes nas amostras devido ao modo vibracional das moléculas e seus agrupamentos permite perceber que os modos em  $573\text{cm}^{-1}$  (modo triptofano /citosina e guanina),  $600\text{ cm}^{-1}$  (conformação de nucleotídeos) e  $678\text{ cm}^{-1}$  (Bases de DNA, guanina) apresentam maiores intensidades no espectro de tecido adjacente ao bócio.

No entanto, a  $720\text{ cm}^{-1}$  (DNA),  $780\text{ cm}^{-1}$  (ácidos nucléicos uracil),  $856\text{-}879\text{ cm}^{-1}$  (vibração de aminoácidos prolina e hidroxiprolina, ligação C-C de colágeno tipo I), região de  $937\text{ cm}^{-1}$  (modo de prolina e hidroxiprolina,  $\nu\text{ C-C}$ ) e  $960\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), são regiões do espectro com maior intensidade na região nodular do bócio (Figura 26 e Tabela 4).

O pico de fenilalanina localizado a  $1000\text{ cm}^{-1}$  é mais intenso no espectro do tecido adjacente à lesão, assim como a região de  $1087\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-C e  $\text{PO}_4^{2-}$ ) e  $1123\text{ cm}^{-1}$  (ligação C-C e C-N para proteínas e lipídeos).

Novamente, ocorrem diferenças no conteúdo de colágeno com vibrações de hidroxiprolina e tirosina de  $1205\text{-}1206\text{ cm}^{-1}$  para o espectro da região nodular do bócio que demonstra também intensidades maiores em  $1245\text{ cm}^{-1}$  (Pico Amida III),

1268  $\text{cm}^{-1}$  (fosfolipídeos,  $\delta =\text{C-H}$ ), 1319-1340  $\text{cm}^{-1}$  (deformação  $\text{CH}_3 \text{CH}_2$ ) e a banda de 1401-1409  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_s \text{COO}^-$ ).

O espectro do tecido adjacente ao bório na região de 1555-1585  $\text{cm}^{-1}$  (modo  $\nu \text{C=C}$ ) é mais intenso, assim como, em 1603-1620  $\text{cm}^{-1}$  (modo  $\text{C=C}$ , fenilalanina e tirosina).

Na Tabela 4 estão descritos os modos vibracionais relevantes na diferenciação espectral do tecido adjacente à lesão em comparação com a região nodular do bório. A primeira coluna representa os picos ou as regiões que mais se diferenciaram entre os espectros; a segunda coluna, os modos vibracionais baseados no estudo realizado por Movasaghi, Rehman e Rehman (2007) com os prováveis modos vibracionais de tecidos biológicos. Por fim, na terceira coluna, é possível observar o tecido que obteve de maior intensidade na região analisada.

Tabela 4 – Modos vibracionais relevantes na diferenciação do tecido adjacente à lesão em comparação com o bório região nodular (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

PICO	ATRIBUIÇÃO	PATOLOGIA
573 $\text{cm}^{-1}$	Triptofano/citosina, guanina	Bório tecido adjacente
600 $\text{cm}^{-1}$	Conformação de nucleotídeo	Bório tecido adjacente
678 $\text{cm}^{-1}$	Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA G (Modos de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas de DNA) / C-2' anti-endo	Bório tecido adjacente
720 $\text{cm}^{-1}$	DNA	Bório região nodular
780 $\text{cm}^{-1}$	Modo de respiração do anel aromático da base nitrogenada Uracil	Bório região nodular
856 $\text{cm}^{-1}$	Vibrações dos aminoácidos da cadeia lateral prolina & hidroxiprolina, bem como vibração (C-C) de colágeno backbone Hydroxiprolina (colágeno type I)	Bório região nodular
879 $\text{cm}^{-1}$	Hidroxiprolina, triptofano	Bório região nodular
937 $\text{cm}^{-1}$	Prolina, hidroxiprolina, esquelétrico de colágeno backbone $\nu(\text{C-C})$	Bório região nodular
960 $\text{cm}^{-1}$	Vibração simétrica estiramento $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ (fosfato de HA) Banda de estiramento de fosfato de cálcio (quantidades elevadas de colesterol) Deformação do anel Quinóide em plano	Bório região nodular
1000 $\text{cm}^{-1}$	Fenilalanina NADH ligado & livre	Bório tecido adjacente
1087- 90 $\text{cm}^{-1}$	C-C estiramento $\text{PO}_4^{2-}$ Estiramento simétrico de fosfato	Bório tecido adjacente
1123 $\text{cm}^{-1}$	(C-N), proteínas (atribuição para proteína) Estiramento C-C modo de lipídios & proteínas, estiramento C-N Glicose	Bório tecido adjacente

1208 cm <sup>-1</sup>	$\nu(\text{C-C}_6\text{H}_5)$ , triptofano, fenilalanina (atribuição para proteína) triptofano A,T (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA/RNA)-amida III (proteína)	Bócio região nodular
1246 cm <sup>-1</sup>	Amida III (de colágeno)	Bócio região nodular
1268/9 cm <sup>-1</sup>	Amida III (atribuição para colágeno)	Bócio região nodular
1319 cm <sup>-1</sup>	Guanina (B,Z-marcador) CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> twisting (atribuição para colágeno)	Bócio região nodular
1337/9 cm <sup>-1</sup>	Triptofano CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging, twisting &/or bending Modo de colágenos & lipídeos CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging & twisting Modo em colágeno, ácidos nucleicos & triptofano	Bócio região nodular
1401 cm <sup>-1</sup>	Bending modo do grupo metil (um dos modos vibracionais de colágeno)	Bócio região nodular
1448 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> deformação CH <sub>2</sub> deformação CH <sub>2</sub> Colágeno	Bócio região nodular Bócio tecido adjacente
1552 cm <sup>-1</sup>	Triptofano $\nu(\text{C=C})$ , triptofano (atribuição para proteína)	Bócio tecido adjacente
1585 cm <sup>-1</sup>	C=C bending modo de fenilalanina C=C estiramento olefínico C=C estiramento olefínico (atribuição para proteína)	Bócio tecido adjacente
1603 cm <sup>-1</sup>	C=C modo de fenilalanina em plano & tirosina Anel C-C estiramento de fenil (1)	Bócio tecido adjacente
1618 cm <sup>-1</sup>	$\nu(\text{C=C})$ , triptofano (atribuição para proteína) $\nu(\text{C=C})$ , porfirina triptofano NADH ligado e livre	Bócio tecido adjacente
1665 cm <sup>-1</sup>	Amida I (de colágeno) Amida I Amida I (atribuição para colágeno) Amida I (desordenado estrutura-dissolvida) $\nu_s(\text{C=O})$	Bócio região nodular Bócio tecido adjacente

Resultados importantes foram obtidos pela análise estatística utilizando fundamentalmente a análise de componentes principais dos espectros associada à análise de cluster e análise da discriminante linear. Os valores próprios de cada componente estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Eigenvalue PCA de bócio tecido adjacente (bco) vs Bócio região nodular (BCO).

bco vs BCO	Eigenvalue	Variabilidade	Acumulada
<b>PC1</b>	<b>56,858</b>	<b>94,8%</b>	
<b>PC2</b>	<b>1,286</b>	<b>2,1%</b>	<b>96,9%</b>
PC3	0,381	0,6%	97,5%
PC4	0,321	0,5%	98,0%



Verifica-se na análise de componentes principais que foram selecionadas apenas as duas primeiras componentes, devido ao fato de terem os Eigenvalues (valores próprios) maiores que 1. O interesse é que a componente explique pelo menos tanta variância quanto cada uma das variáveis ortogonais, ou seja, que a componente seja capaz de explicar a si própria e ainda além.

A variabilidade explicada pelas duas componentes selecionadas é elevada, em torno de 96%. Este é um fator positivo, visto que com apenas duas componentes tem-se quase a totalidade da variabilidade original dos dados.

A Tabela 6 expõe os escores de cada componente utilizado para análise estatística multivariada; em seguida, realizou-se a classificação dos espectros obtidos pela análise de cluster e análise discriminante linear.

Tabela 6 – Escores das componentes e classificação do cluster de bco vs BCO.

Espectro	bco vs BCO		
	PC1	PC2	Cluster
boc1a1	0,132	0,013	1
boc1a2	0,132	0,014	1
boc1a3	0,131	0,052	1
boc2b1	0,132	0,056	1
boc2b2	0,126	0,129	1
boc2b3	0,122	0,106	1
boc6a1	0,122	- 0,324	2
boc6a2	0,123	- 0,309	2
boc6a3	0,123	- 0,312	2
boc8a1	0,121	- 0,353	2
boc8a2	0,118	- 0,383	2
boc8a3	0,122	-0,33	2
boc9a1	0,132	0,013	1
boc9a2	0,132	0,014	1
boc9a3	0,131	0,008	1
boc10a1	0,13	-0,15	2
boc10a2	0,129	- 0,178	2
boc10a3	0,126	- 0,218	2
boc11a1	0,131	0,062	1
boc11a2	0,131	0,099	1
boc11a3	0,131	0,101	1
boc12a1	0,131	-0,02	1
boc12a2	0,132	- 0,009	1
boc12a3	0,131	-	1

		0,036	
boc13b1	0,129	0,041	1
boc13b2	0,13	0,088	1
boc13b3	0,129	0,131	1
boc17a1	0,126	0,131	1
boc17a2	0,128	0,038	1
boc17a3	0,128	0,062	1
boc21a1	0,13	0,007	1
boc21a2	0,13	0,1	1
boc21a3	0,131	0,06	1
BOC3A1	0,132	0,066	1
BOC3A2	0,131	0,063	1
BOC3A3	0,131	0,07	1
BOC3B1	0,132	0,036	1
BOC3B2	0,131	0,046	1
BOC3B3	0,131	0,067	1
BOC5A1	0,131	0	1
BOC5A2	0,131	0,005	1
BOC5A3	0,132	0,02	1
BOC6C1	0,129	0,027	1
BOC6C2	0,128	0,138	1
BOC6C3	0,129	0,097	1
BOC6D1	0,129	0,121	1
BOC6D2	0,13	0,108	1
BOC6D3	0,118	0,074	1
BOC7B1	0,124	0,03	1
BOC7B2	0,131	0,046	1
BOC7B3	0,131	0,046	1
BOC8B1	0,132	0,013	1
BOC8B2	0,132	0,022	1
BOC8B3	0,132	0,025	1
BOC15B1	0,131	- 0,014	1
BOC15B2	0,132	- 0,011	1
BOC15B3	0,131	- 0,038	1
BOC16B1	0,131	0,031	1
BOC16B2	0,131	0,022	1
BOC16B3	0,131	0,065	1

Na Tabela 7 pode ser observado o número de espectros por cluster quando PC1 e PC2 foram submetidos à Análise de Cluster (e a porcentagem amostral). O espalhamento dos espectros pode ser visualizado no Dendograma Figura 27.

Ao verificar o dendograma temos um total de 60 espectros, compondo 33 espectros de tecido adjacente à lesão e 27 espectros da região nodular do bócio. Considerando em conjunto os clusteres 1 e 2, tem-se 85% dos espectros no cluster 1 (51 espectros) e 15% do total (9 espectros) no cluster 2. Sendo possível

fazer a separação dos espectros com 70,5% de similaridade (Figura 27).

Tabela 7 – Número de espectros por Cluster e a Distância (Análise Discriminante Linear) no pareamento bócio adj *versus* Bócio.

<b>bócio adj vs Bócio</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Distância</b>
Cluster 1	51 (85%)	0,332
Cluster 2	9 (15%)	

Para avaliação isolada de cada um dos clusters, temos no cluter 1, 24 espectros de tecido adjacente à lesão (73%) e 27 espectros de bócio região nodular (100%), o que conclui-se uma mistura significativa dos espectros neste cluster. No entanto, para o cluster 2 verificou-se apenas espectros de tecido adjacente à lesão com total de 9 espectros deste grupo (27%).

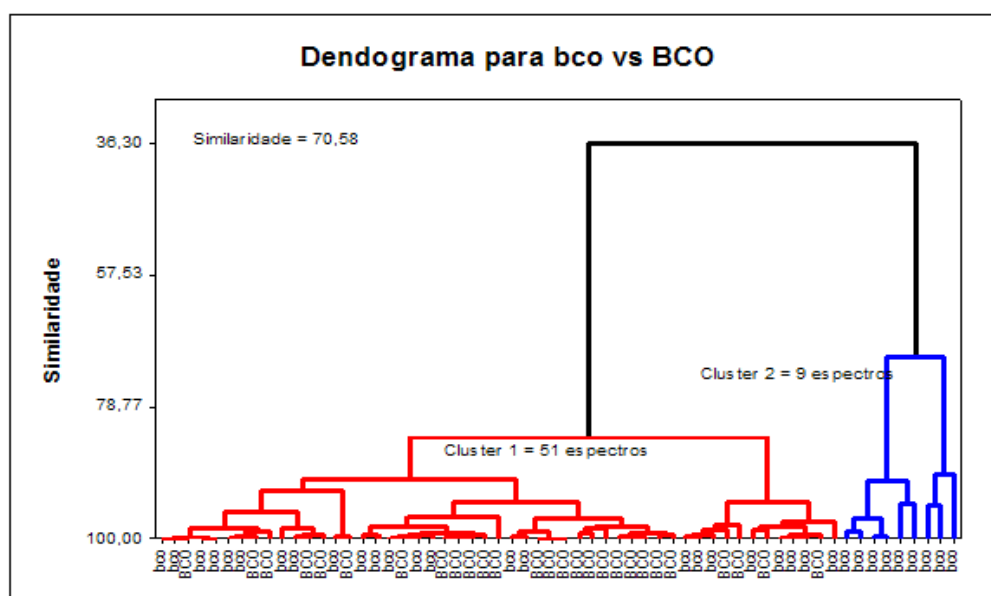


Figura 27 – Dendrograma com análise de cluster para separação de bócio tecido adjacente à lesão e bócio região nodular.

É fundamental entender os espectros dos espécimes de tecido adjacente à lesão que migraram para o cluster 1; para isto, deve-se considerar o laudo médico, a leitura das lâminas realizada e o laudo anátomo-patológico (Tabela 3).

O fragmento 1A é um tecido de tireóide normal pela visão macroscópica do médico cirurgião; no ponto de vista histológico refere-se ao bócio adenomatoso e pela análise anátomo-patológica têm-se o diagnóstico de bócio adenomatoso em

lobo direito e esquerdo, e istmo com nódulo hiperplásico dominante de células de Hurtle de 0,6 cm.

Do paciente 2 existem dois fragmentos para pesquisa, 2A com espectros pertencentes ao grupo de carcinoma papilífero e 2B utilizado para esta análise por ser fragmento de tecido adjacente à lesão. O fragmento 2B foi definido pelo médico cirurgião como fragmento de tireóide normal, enquanto pelo histopatológico recebeu o laudo de bócio adenomatoso com foco de tireoidite linfocitária, e pelo anátomo-patológico há presença de carcinoma pouco diferenciado medindo 1,6 cm em lobo tireoidiano direito e bócio adenomatoso em lobo esquerdo. Pelo exposto, presume-se que este espécime seja fragmento do lobo esquerdo da tireóide.

Da mesma forma, o espécime 9A é um fragmento de tireóide normal pelo médico no momento da cirurgia e pelo laudo anátomo-patológico este fragmento vem de um paciente com carcinoma papilífero (0,4cm) em lobo esquerdo de tireóide e bócio adenomatoso em lobo direito e istmo. O mesmo sucede à amostra 12A, 17A e 21A que são tecidos adjacentes à lesão, ou seja, fragmentos dados clinicamente como tireóide normal, mas pertencentes a pacientes com carcinoma papilífero.

A amostra 13B é também um fragmento pela visão macroscópica do médico cirurgião, de tecido de tireóide normal; pela histologia recebeu o laudo de bócio adenomatoso enquanto o laudo anátomo-patológico o refere como adenoma folicular em lobo esquerdo da tireóide, fibrose intersticial em Istmo da tireóide e também fibrose intersticial presente em lobo direito.

Por fim, a amostra 11A, na visão macroscópica do médico, é um tecido de tireóide normal; pela histologia recebeu o laudo de bócio adenomatoso com foco de tireoidite linfocitária, e na análise anátomo-patológico o lobo direito, istmo e lobo esquerdo da tireóide há presença de bócio colóide nodular e tireoidite linfocitária.

A Figura 28 demonstra a distribuição dos espectros por cluster.

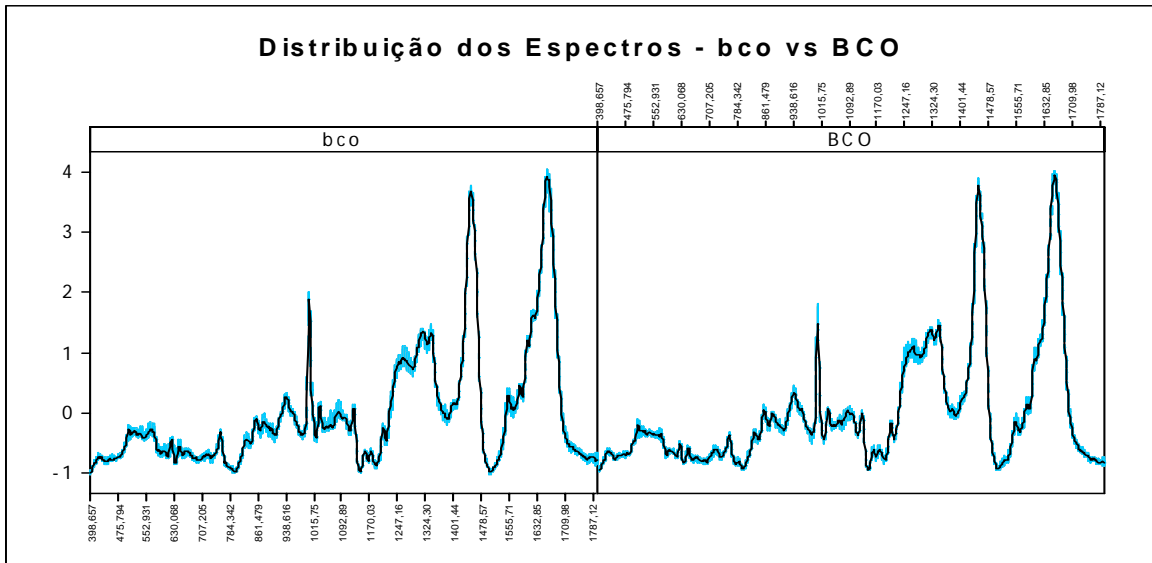


Figura 28 – Distribuição dos espectros para bco vs BCO.

Prosseguindo com a utilização dos escores de componentes principais, uma outra forma de verificar a similaridade ou distinção entre os grupos pode ser feita também através da Análise Discriminante Linear (Figura 29).

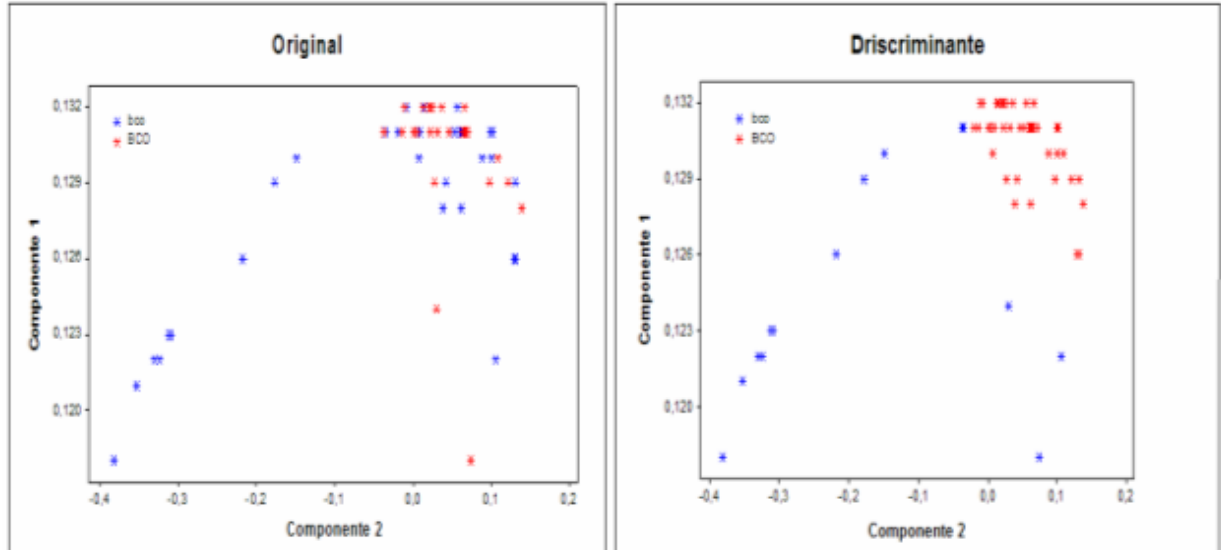


Figura 29 – Dispersão dos grupos na classificação discriminante de bco vs BCO.

Pelos resultados expostos foram observadas alterações bioquímicas entre os dois tipos de tecidos, região adjacente à lesão e bório adenomatoso na região central da lesão. Estas alterações foram observadas pela diferença de conformação dos espectros e seus modos vibracionais (Tabela 4). No entanto, pela análise estatística, estas modificações espectrais não são tão significativas a ponto de haver

uma separação relevante entre eles. Pela análise do dendograma (Figura 27), 85% dos espectros pertencem ao cluster 1 e 15% ao cluster 2, havendo 70% de similaridade entre todos. Pela análise discriminante (Figura 29 e Tabela 8) o percentual geral de classificação entre os espectros foi de 58,3%, percentual de classificação considerado baixo.

Tabela 8 – Percentual de classificação da função discriminante em bório tecido adjacente (bco) versus bório região nodular (BCO).

<b>Classificação Correta</b>	
bco	33,3%
BCO	88,9%
Geral	58,3%

Ficou concluída a similaridade entre tireóide normal e bório adenomatoso; as amostras pela histologia também receberam o laudo de bório adenomatoso e os espectros não se separaram de forma significativa; desta forma, unimos as 11 amostras de tecido adjacente à lesão com as 9 amostras de bório região nodular formando um grupo de 20 amostras de bório adenomatoso (60 espectros) para a realização dos estudos subsequentes.

### **5.2.1.2 Lesões benignas *versus* lesões malignas**

Outro ponto de importância médica e histológica seria a separação correta entre lesões benignas e malignas, pois, muitas vezes, o laudo histológico relata suspeita de malignidade, fornecendo um diagnóstico inconclusivo.

A Figura 30 representa a média dos espectros de bório adenomatoso em preto (BCO), carcinoma papilífero (PAP) linha vermelha e carcinoma folicular (FOL) em verde. O objetivo é a utilização dos dados espectrais para análise bioquímica e estatística das patologias para diferenciação das lesões benignas de malignas.

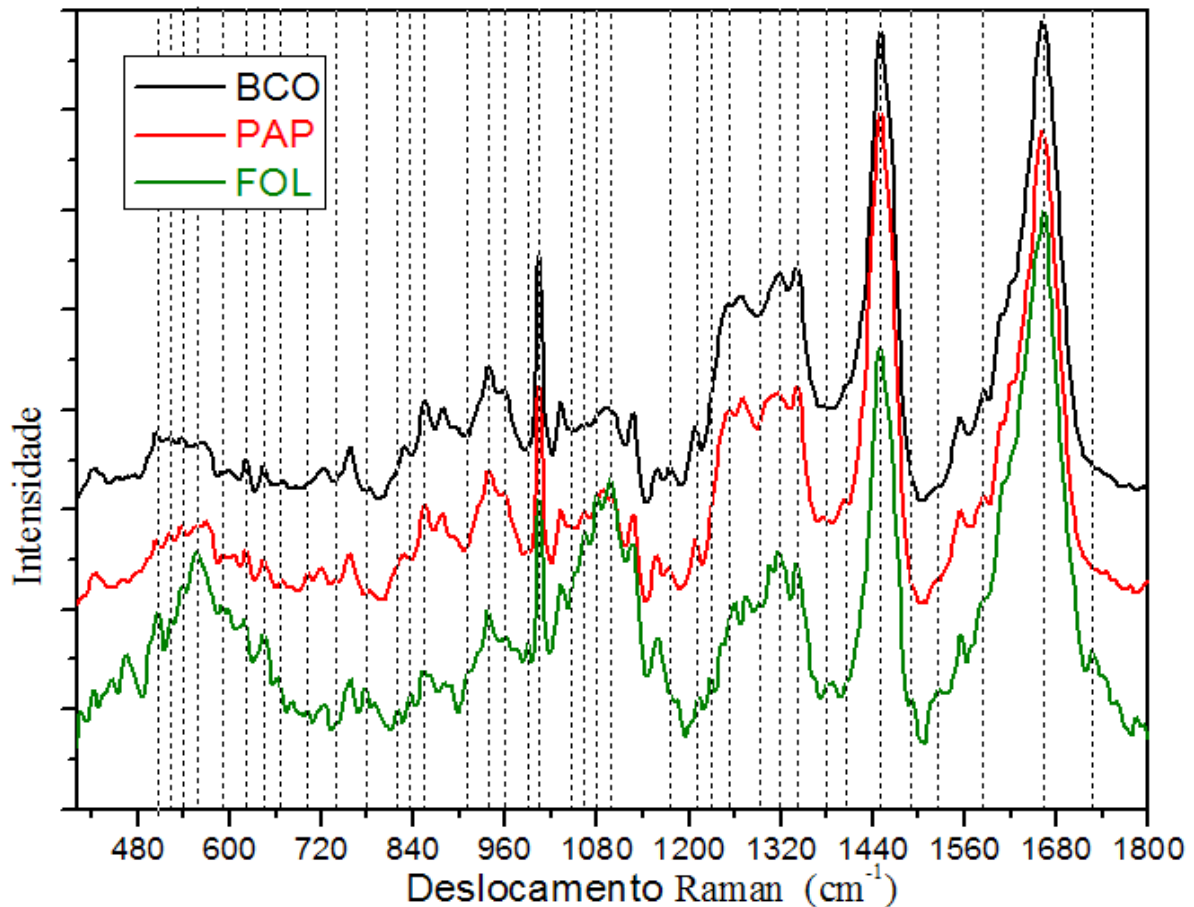


Figura 30 – Média dos espectros de bócio adenomatoso linha preta, carcinoma papilífero linha vermelha e carcinoma folicular linha verde na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 9 – Modos vibracionais relevantes na diferenciação de bócio adenomatoso em comparação com carcinoma papilífero e carcinoma folicular (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

PICO	ATRIBUIÇÃO	PATOLOGIA
509 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento S-S dissulfeto banda de colágeno $\nu(\text{S-S})$ aminoácido cisteína	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
524 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento S-S dissulfeto em proteínas fosfatidilserina $\nu(\text{S-S})$ aminoácido cisteína	Carcinoma Papilífero Carcinoma Folicular Bócio região nodular
540 $\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{S-S})$ aminoácido cisteína	Carcinoma Papilífero Carcinoma Folicular Bócio região nodular
555 $\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{S-S})$	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
600 $\text{cm}^{-1}$	Conformação de nucleotídeos	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
618 $\text{cm}^{-1}$	C-C twist (proteína)	Bócio região nodular Carcinoma Papilífero Carcinoma Folicular
643 $\text{cm}^{-1}$	C-C twist modo de tirosina	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
666 $\text{cm}^{-1}$	G, T (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA)- tirosina-G backbone in RNA	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero

700 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (S-S) <i>trans</i> (aminoácido metionina)	Carcinoma Papilífero Carcinoma Folicular
735 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C-S (um dos três picos de tiocinato, em 2095 & 445 cm <sup>-1</sup> )	Carcinoma Papilífero
780 cm <sup>-1</sup>	Modo de respiração do anel aromático da base Uracil	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
820 cm <sup>-1</sup>	Banda de Proteína Modo da estrutura de proteínas em tumores. Proteínas, incluindo colágeno I	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
831 cm <sup>-1</sup>	Estiramento assimétrico O-P-O, tirosina	Carcinoma Folicular
856 cm <sup>-1</sup>	Aminoácidos de cadeia lateral vibrações prolina e hidroxiprolina, bem como (C-C) vibração de colágeno backbone. Hidroxiprolina (colágeno tipo I)	Carcinoma Papilífero Bócio região nodular Carcinoma Folicular
915 cm <sup>-1</sup>	Vibração de Ribose, modo distinto de RNA (em 915 e 974 cm <sup>-1</sup> )	Carcinoma Folicular
937 cm <sup>-1</sup>	Prolina, hidroxiprolina, $\nu$ (C-C) skeletal em colágeno backbone	Carcinoma Papilífero Bócio região nodular Carcinoma Folicular
960 cm <sup>-1</sup>	Vibração simétrica estiramento $\nu_1$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (fosfato de HA) Banda de estiramento de fosfato de cálcio (quantidades elevadas de colesterol). Deformação do anel Quinóide em plano.	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
974 cm <sup>-1</sup>	Vibração de Ribose, modo distinto de RNA (em 915 e 974 cm <sup>-1</sup> )	Carcinoma Folicular
980 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C-C $\beta$ - folha pregueada (proteínas) =CH bending (lipídeos)	Carcinoma Folicular
1000 cm <sup>-1</sup>	Fenilalanine NADH ligado & livre	Bócio região nodular Carcinoma Papilífero Carcinoma Folicular
1048 cm <sup>-1</sup>	Glicogênio	Carcinoma Folicular
1064 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C-C skeletal lipídeos Cadeias Acil $\nu$ (C-C) <i>trans</i>	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero
1078 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C) ou $\nu$ (C-O), fosfolipídios Estiramento simétrico fosfato Fosfolipídios Modo de estiramento C-C ou C-O de fosfolipídios  Pico de Carboidrato para sólidos C-C or C-O estiramento (lipídeo), C-C ou PO <sub>2</sub>	Carcinoma Folicular
1095 cm <sup>-1</sup>	Lipídeo C-N PO <sup>2-</sup> em ácidos nucleicos	Carcinoma Folicular
1173 cm <sup>-1</sup>	Citosina, guanina	Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1208 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), triptofano, fenilalanina (atribuição de proteínas) triptofano A,T (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA/RNA)-amida III (proteína)	Carcinoma Papilífero Bócio região nodular Carcinoma Folicular
1224 cm <sup>-1</sup>	Amida III $\beta$ - folha pregueada	Carcinoma Folicular
1258 cm <sup>-1</sup>	Amida III, adenina, citosina	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero



		Bócio região nodular
1290 cm <sup>-1</sup>	Citosina	Carcinoma Folicular
1319 cm <sup>-1</sup>	Guanina (B,Z-marcador) CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> twisting (atribuição de colégeno)	Carcinoma Folicular Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1337/9 cm <sup>-1</sup>	Triptofano CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging, twisting &/or bending modo de colágenos & lipídios CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging & twisting modo em colágeno, ácido nucleico & triptofano	Carcinoma Folicular Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1373 cm <sup>-1</sup>	T,A,G (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA/RNA)	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero
1401 cm <sup>-1</sup>	Bending modos do grupo metil (um dos modos vibracionais de colágeno)	Carcinoma Papilífero
1448 cm <sup>-1</sup>	Deformação CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> Deformação CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Colágeno	Carcinoma Papilífero Bócio região nodular Carcinoma Folicular
1485 cm <sup>-1</sup>	G, A (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA) Nucleotídeo da base purina (guanina and adenina)	Carcinoma Folicular
1525 cm <sup>-1</sup>	Vibração conjugada em plano -C=C-	Carcinoma Folicular
1585 cm <sup>-1</sup>	C=C bending modo de fenilalanine Estiramento C=C olefinico Estiramento C=C olefinico (atribuição de proteína)	Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1665 cm <sup>-1</sup>	Amida I (de colágeno) Amida I Amida I (atribuição de colágeno) Amida I (estrutura-dissolvida desordenada) $\nu_s(C=O)$	Carcinoma Folicular Carcinoma Papilífero Bócio região nodular
1729 cm <sup>-1</sup>	Grupo Ester	Carcinoma Folicular

A Figura 30 demonstra as médias dos espectros de bócio adenomatoso, carcinoma papilífero e carcinoma folicular. A Tabela 9 fornece as intensidades dos picos encontrados nos espectros das patologias em ordem de seqüência (forte, média e pequena intensidade).

As intensidades dos picos foram maiores para o espectro de bócio adenomatoso nas regiões de 618 cm<sup>-1</sup>, 1000 cm<sup>-1</sup>, 1173 cm<sup>-1</sup> e 1585 cm<sup>-1</sup> se comparado com os demais tecidos. No espectro de carcinoma papilífero, as intensidades maiores encontram-se a 524 cm<sup>-1</sup>, 540 cm<sup>-1</sup>, 700 cm<sup>-1</sup>, 735 cm<sup>-1</sup>, 856 cm<sup>-1</sup>, 937 cm<sup>-1</sup>, 1208 cm<sup>-1</sup>, 1401 cm<sup>-1</sup> e 1448 cm<sup>-1</sup>. Sendo os picos de 735 cm<sup>-1</sup> e 1401 picos isolados presentes apenas no espectro de carcinoma papilífero.

O espectro que mais se diferenciou e obteve as maiores intensidades foi o do carcinoma folicular nas seguintes regiões: 509 cm<sup>-1</sup>, 555 cm<sup>-1</sup>, 600 cm<sup>-1</sup>, 643 cm<sup>-1</sup>,

666  $\text{cm}^{-1}$ , 780  $\text{cm}^{-1}$ , 820  $\text{cm}^{-1}$ , 831  $\text{cm}^{-1}$ , 915  $\text{cm}^{-1}$ , 960  $\text{cm}^{-1}$ , 974  $\text{cm}^{-1}$ , 980  $\text{cm}^{-1}$ , 1048  $\text{cm}^{-1}$ , 1064  $\text{cm}^{-1}$ , 1078  $\text{cm}^{-1}$ , 1095  $\text{cm}^{-1}$ , 1224  $\text{cm}^{-1}$ , 1258  $\text{cm}^{-1}$ , 1290  $\text{cm}^{-1}$ , 1319  $\text{cm}^{-1}$ , 1337/9  $\text{cm}^{-1}$ , 1373  $\text{cm}^{-1}$ , 1485  $\text{cm}^{-1}$ , 1525  $\text{cm}^{-1}$ , 1665  $\text{cm}^{-1}$  e 1729. Estes picos podem aparecer com intensidades menores também para o espectro de bócio adenomatoso ou carcinoma papilífero. Os picos que aparecem isolados e são característicos apenas para o carcinoma folicular são os que se encontram na região de 831  $\text{cm}^{-1}$ , 915  $\text{cm}^{-1}$ , 974  $\text{cm}^{-1}$ , 980  $\text{cm}^{-1}$ , 1048  $\text{cm}^{-1}$ , 1078  $\text{cm}^{-1}$ , 1095  $\text{cm}^{-1}$ , 1224  $\text{cm}^{-1}$ , 1290  $\text{cm}^{-1}$ , 1485  $\text{cm}^{-1}$ , 1525  $\text{cm}^{-1}$ , 1729  $\text{cm}^{-1}$ .

Prosseguindo a análise para separação de lesões benignas e malignas, foram utilizados métodos de estatística multivariada para diferenciação. Na primeira análise foram estudadas as amostras de bócio adenomatoso *versus* carcinoma papilífero (PAP) devido ao maior número de amostras presentes em cada grupo. Por fim, na segunda análise, foi realizada a união de todas as amostras: Grupo benigno composto de bócio total (periferia e região nodular) unido com espectros de adenoma folicular *versus* grupo maligno (carcinoma folicular e papilífero).

As Tabelas 10 e 11 demonstram os valores próprios (Eigenvalue) das componentes utilizadas. Na Tabela 10, pode-se observar os valores próprios (Eigenvalue) para o grupo bócio *versus* carcinoma papilífero. Na Tabela 11, observa-se o eigenvalue dos componentes principais para grupo benigno *versus* maligno.

Tabela 10 – Eigenvalue da PCA de BCO vs PAP.

BCO vs PAP	Eigenvalue	Variabilidade	Acumulada
PC1	69,984	94,6%	
PC2	1,549	2,1%	96,7%
PC3	0,604	0,8%	97,5%
PC4	0,396	0,5%	98,0%

Tabela 11 – Eigenvalue da PCA de Benigno vs Maligno.

Benigno vs Maligno	Eigenvalue	Variabilidade	Acumulada
PC1	75,102	93,9%	
PC2	2,168	2,7%	96,6%
PC3	0,636	0,8%	97,4%
PC4	0,414	0,5%	97,9%

A Tabela 12 e 13 expõem os escores de cada componente utilizado para análise estatística multivariada; em seguida, realizou-se a classificação dos espectros obtidos pela análise de cluster e análise discriminante linear.

Tabela 12– Escores das componentes e classificação do cluster de BCO vs PAP.

Espectro	BCO vs PAP		
	PC1	PC2	Cluster
boc1a1	0,119	-0,001	1
boc1a2	0,118	-0,003	1
boc1a3	0,118	-0,039	1
boc2b1	0,119	-0,046	1
boc2b2	0,114	-0,116	1
boc2b3	0,11	-0,092	1
boc6a1	0,11	0,289	2
boc6a2	0,111	0,277	2
boc6a3	0,111	0,287	2
boc8a1	0,109	0,32	2
boc8a2	0,106	0,349	2
boc8a3	0,11	0,296	2
boc9a1	0,119	-0,002	1
boc9a2	0,119	-0,003	1
boc9a3	0,118	0,005	1
boc10a1	0,117	0,135	2
boc10a2	0,116	0,161	2
boc10a3	0,113	0,196	2
boc11a1	0,118	-0,051	1
boc11a2	0,118	-0,088	1
boc11a3	0,118	-0,087	1
boc12a1	0,118	0,028	1
boc12a2	0,119	0,014	1
boc12a3	0,118	0,045	1
boc13b1	0,116	-0,026	1
boc13b2	0,117	-0,07	1
boc13b3	0,116	-0,113	1
boc17a1	0,114	-0,132	1
boc17a2	0,116	-0,033	1
boc17a3	0,116	-0,054	1
boc21a1	0,117	0,009	1
boc21a2	0,117	-0,083	1
boc21a3	0,118	-0,043	1
BOC3A1	0,119	-0,061	1
BOC3A2	0,119	-0,058	1
BOC3A3	0,119	-0,065	1
BOC3B1	0,119	-0,031	1
BOC3B2	0,118	-0,04	1
BOC3B3	0,119	-0,062	1
BOC5A1	0,118	0,014	1
BOC5A2	0,118	0,009	1
BOC5A3	0,118	-0,006	1
BOC6C1	0,117	-0,024	1
BOC6C2	0,116	-0,133	1
BOC6C3	0,116	-0,093	1

BOC6D1	0,116	-0,116	1
BOC6D2	0,117	-0,102	1
BOC6D3	0,107	-0,083	1
BOC7B1	0,112	-0,031	1
BOC7B2	0,118	-0,041	1
BOC7B3	0,118	-0,042	1
BOC8B1	0,119	-0,006	1
BOC8B2	0,119	-0,016	1
BOC8B3	0,119	-0,017	1
BOC15B1	0,118	0,024	1
BOC15B2	0,118	0,02	1
BOC15B3	0,118	0,047	1
BOC16B1	0,118	-0,03	1
BOC16B2	0,119	-0,021	1
BOC16B3	0,118	-0,062	1
PAP4A1	0,114	0,039	1
PAP4A2	0,117	-0,065	1
PAP4A3	0,108	-0,193	1
PAP10B1	0,114	-0,065	1
PAP10B2	0,115	-0,107	1
PAP10B3	0,114	-0,119	1
PAP12B1	0,118	-0,009	1
PAP12B2	0,119	-0,046	1
PAP12B3	0,119	-0,049	1
PAP17B1	0,119	-0,07	1
PAP17B2	0,118	-0,049	1
PAP17B3	0,116	0,156	2
PAP18B1	0,115	0,176	2
PAP18B2	0,115	0,196	2

Tabela 13 – Escores das componentes e classificação do cluster de Benigno vs Maligno.

Espectro	Benigno vs Maligno		
	PC1	PC2	Cluster
boc1a1	0,115	0,018	1
boc1a2	0,114	0,02	1
boc1a3	0,114	0,049	1
boc2b1	0,115	0,05	1
boc2b2	0,11	0,106	1
boc2b3	0,105	0,088	1
boc6a1	0,107	-0,24	2
boc6a2	0,108	-0,23	2
boc6a3	0,108	-0,232	2
boc8a1	0,106	-0,263	2
boc8a2	0,103	-0,287	2
boc8a3	0,106	-0,244	2
boc9a1	0,114	0,017	1
boc9a2	0,114	0,019	1
boc9a3	0,114	0,015	1
boc10a1	0,113	-0,105	2
boc10a2	0,112	-0,126	2
boc10a3	0,11	-0,159	2
boc11a1	0,114	0,055	1
boc11a2	0,114	0,084	1

boc11a3	0,114	0,085	1
boc12a1	0,114	-0,007	1
boc12a2	0,115	0,002	1
boc12a3	0,114	-0,019	1
boc13b1	0,112	0,036	1
boc13b2	0,113	0,075	1
boc13b3	0,112	0,11	1
boc17a1	0,109	0,109	1
boc17a2	0,112	0,033	1
boc17a3	0,112	0,051	1
boc21a1	0,113	0,012	1
boc21a2	0,113	0,085	1
boc21a3	0,114	0,054	1
BOC3A1	0,115	0,059	1
BOC3A2	0,114	0,057	1
BOC3A3	0,114	0,063	1
BOC3B1	0,114	0,035	1
BOC3B2	0,114	0,042	1
BOC3B3	0,114	0,061	1
BOC5A1	0,114	0,007	1
BOC5A2	0,114	0,011	1
BOC5A3	0,114	0,023	1
BOC6C1	0,112	0,03	1
BOC6C2	0,111	0,118	1
BOC6C3	0,112	0,085	1
BOC6D1	0,112	0,103	1
BOC6D2	0,113	0,092	1
BOC6D3	0,103	0,067	1
BOC7B1	0,108	0,029	1
BOC7B2	0,114	0,043	1
BOC7B3	0,114	0,044	1
BOC8B1	0,115	0,018	1
BOC8B2	0,114	0,026	1
BOC8B3	0,115	0,028	1
BOC15B1	0,114	-0,002	1
BOC15B2	0,114	0,001	1
BOC15B3	0,114	-0,023	1
BOC16B1	0,114	0,032	1
BOC16B2	0,114	0,024	1
BOC16B3	0,114	0,058	1
PAP4A1	0,11	-0,02	1
PAP4A2	0,113	0,061	1
PAP4A3	0,104	0,153	1
PAP10B1	0,11	0,049	1
PAP10B2	0,111	0,086	1
PAP10B3	0,11	0,097	1
PAP12B1	0,114	0,023	1
PAP12B2	0,114	0,049	1
PAP12B3	0,115	0,052	1
PAP17B1	0,114	0,07	1
PAP17B2	0,114	0,05	1
PAP17B3	0,112	-0,125	2
PAP18B1	0,112	-0,143	2
PAP18B2	0,111	-0,156	2

FOL2A1	0,102	-0,258	2
FOL2A2	0,097	-0,346	2
FOL2A3	0,1	-0,315	2
ADFOL_13A1	0,113	0,044	1
ADFOL_13A2	0,114	0,015	1
ADFOL_13A3	0,114	0,031	1

A Tabela 14 demonstra o número de espectros por cluster que também pode ser observado no dendograma fig. 33 para o confronto entre bório total e carcinoma papilífero.

Tabela 14 – Quantidade de espectros por cluster e a distância dele em BCO versus PAP.

BCO vs PAP	Quantidade	Distância
Cluster 1	62 (84%)	0,281
Cluster 2	12 (16%)	

Ao verificar o dendograma da Figura 31, temos um total de 74 espectros, compondo 60 espectros representativos do grupo de bório total, lembrando que foram unidos os espectros de tecido adjacente à lesão e bório região nodular com os 14 espectros do grupo de carcinoma papilífero.

Considerando os espectros em conjunto, o cluster 1 e 2, tem-se 84% dos espectros no cluster 1 (62 espectros) e 16% do total (12 espectros) no cluster 2, como representado na Tabela 14.

Para avaliação isolada de cada um dos clusters, temos no cluster 1, 51 espectros de bório (85%) e 11 espectros de carcinoma papilífero (78%). No entanto, para o cluster 2, há 9 espectros de bório (15%) e 3 espectros de carcinoma papilífero (22%). Foi possível fazer a separação com 72,04% de similaridade (Figura 31).

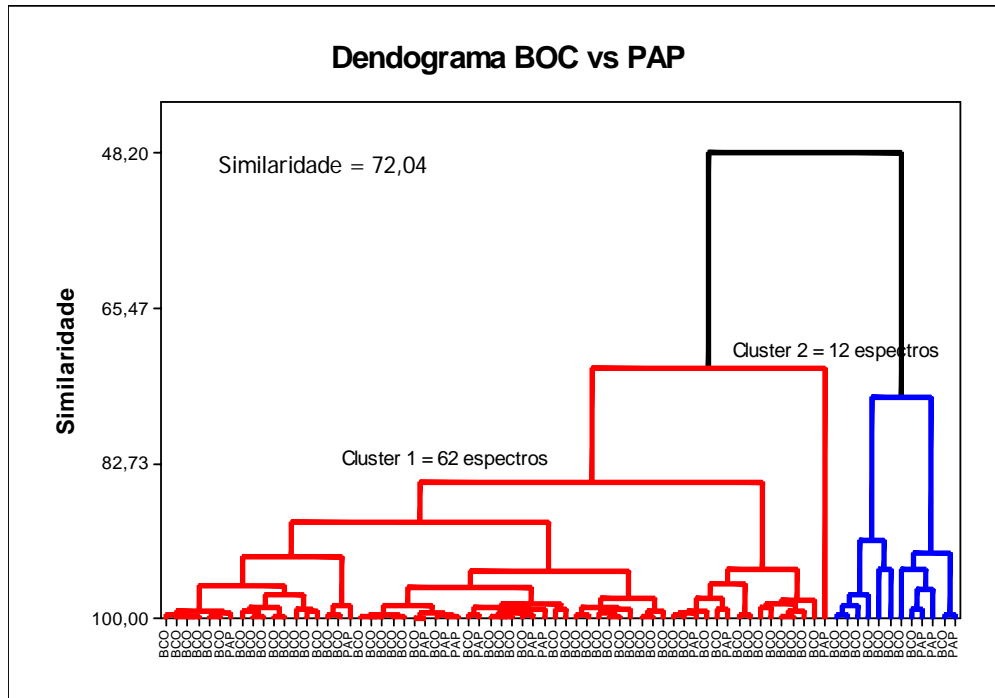


Figura 31 – Dendrograma com análise de cluster para separação de bócio e carcinoma papilífero.

Fez-se necessário avaliar o fragmento utilizado no estudo comparando o resultado estatístico com os laudos médico, histológico e anátomo-patológico (Tabela 3).

No cluster 1, a amostra 4A pela visão macroscópica do médico é um carcinoma papilífero, o laudo histológico descreve suspeita de carcinoma papilífero e o laudo anátomo-patológico relata: Lobo esquerdo da tireóide: microcarcinoma papilífero, variante folicular, não encapsulado, medindo 0,6cm de diâmetro. Istmo da tireóide: Bócio adenomatoso multinodular associado à tireoidite linfocítica. Lobo direito da tireóide: Bócio adenomatoso multinodular associado à tireoidite linfocítica.

Para o espécime 10B, pelo médico cirurgião, refere-se a um fragmento de carcinoma papilífero, a amostra enviada a análise histopatológica não foi considerada suficiente para análise e no exame anátomo-patológico foi relatado microcarcinoma papilífero em lobo direito e bócio adenomatoso em lobo esquerdo. O fragmento 12B pelo médico cirurgião é um carcinoma papilífero; da mesma forma, o material é insuficiente para histopatologia que observa apenas fibrose e focos hemorrágicos, o laudo anátomo-patológico reconhece no lobo direito da tireóide o carcinoma papilífero que mede 0,7cm, istmo com tireoidite linfocitária e lobo esquerdo com carcinoma papilífero medindo 1,8cm.

De cada um dos fragmentos foram retirados três espectros em regiões diferentes, dois espectros do espécime 17B se posicionaram no cluster 1 e um espectro no cluster 2. Na visão macroscópica do médico, este é um fragmento de carcinoma papilífero; pela histopatologia, o laudo é sugestivo de carcinoma papilífero; e para o exame anátomo-patológico, há presença de carcinoma papilífero em lobo esquerdo e bócio nodular colóide em lobo direito da tireóide.

No cluster 2, os espectros de bócio que receberem o laudo falso-positivo pertencem às amostras 6A, 8A, e 10A. O fragmento 6A é um tecido de tireóide normal pela visão macroscópica do médico cirurgião, recebeu o laudo de bócio adenomatoso pela análise histopatológica e no laudo anátomo-patológico verifica-se no lobo direito, istmo e lobo esquerdo da tireóide, bócio adenomatoso multinodular. O fragmento 8A, da mesma forma, pela visão do médico, refere-se ao tecido normal da tireóide pela histopatologia bócio adenomatoso e pelo laudo anátomo-patológico o lobo esquerdo, istmo e lobo direito há presença de bócio colóide. A amostra 10A é um fragmento de tireóide normal retirado de um paciente com carcinoma papilífero, amostra 10B.

Em seguida, na Figura 32, foi representada a distribuição dos espectros por cluster.

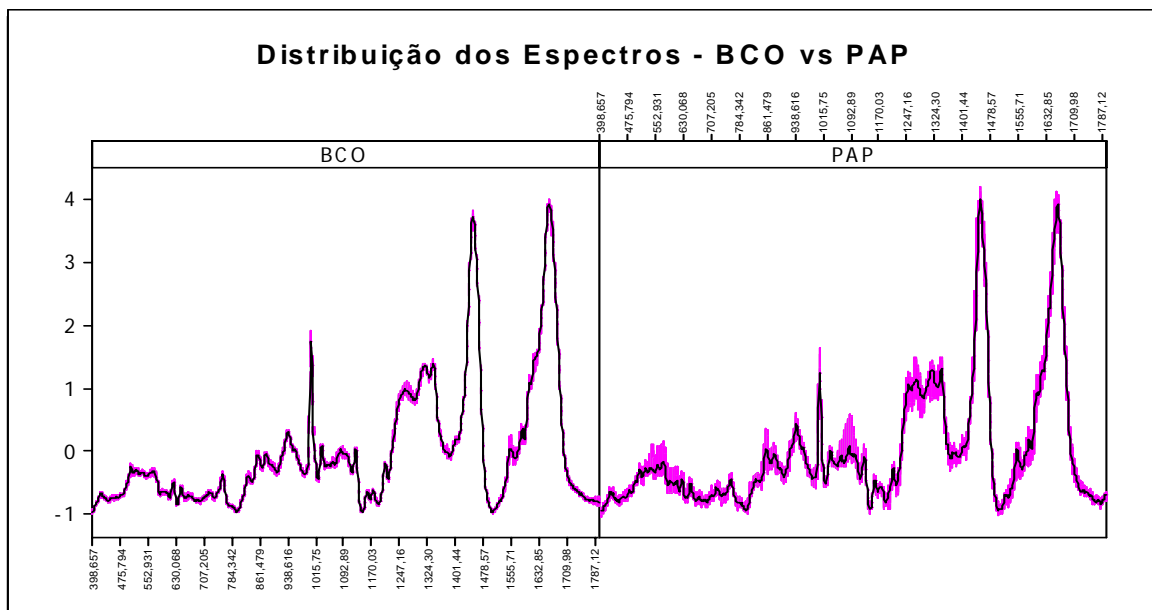


Figura 32 – Distribuição dos espectros para BCO vs PAP

Seguindo o mesmo método de análise dos dados, realizou-se a mesma análise de cluster e construção do gráfico de dendograma para as lesões benignas



*versus* malignas, onde há a união de todos os espectros coletados para este estudo, incluindo os espécimes de adenoma folicular e carcinoma folicular.

Tabela 15 – Quantidade de espectros por cluster e a distância dele em Benigno vs Maligno.

<b>Benigno vs Maligno</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Distância</b>
Cluster 1	65 (81%)	0,262
Cluster 2	15 (19%)	

A distância entre os clusters foi diminuída à medida que agregamos mais dados espectrais; para a Tabela 14 que apresenta a distância entre bócio e carcinoma papilífero o resultado foi de 0,281, e para Tabela 15, este resultado foi 0,262 o que indica diminuição do espalhamento dos espectros principalmente na análise de lesões benignas *versus* malignas, possibilitando fazer a separação com 73,37% de similaridade (Figura 31).

Para esta análise tem-se um total de 80 espectros compostos por 60 espectros de bócio adenomatoso (33 espectros de tecido adjacente à lesão conjuntamente com os 27 espectros de bócio região nodular), 03 espectros de adenoma folicular, 14 espectros de carcinoma papilífero e 03 espectros de carcinoma folicular.

Considerando os espectros em conjunto, o cluster 1 e 2, tem-se 81% dos espectros no cluster 1 (65 espectros) e 19% do total (15 espectros) no cluster 2, como representado na Tabela 15.

Para avaliação isolada de cada um dos clusters, temos no cluster 1, 51 espectros de bócio (85%), 3 espectros de adenoma folicular (100%) e 11 espectros de carcinoma papilífero (78%). No entanto, para o cluster 2, estão presentes 9 espectros de bócio (15%), 3 espectros de carcinoma papilífero (22%) e 3 espectros de carcinoma folicular (100%); ou seja, no cluster 1 tem-se 86% dos espectros de lesões benignas e 65% de malignas. O cluster 2, possui 14% das lesões benignas e 35% de lesões malignas.

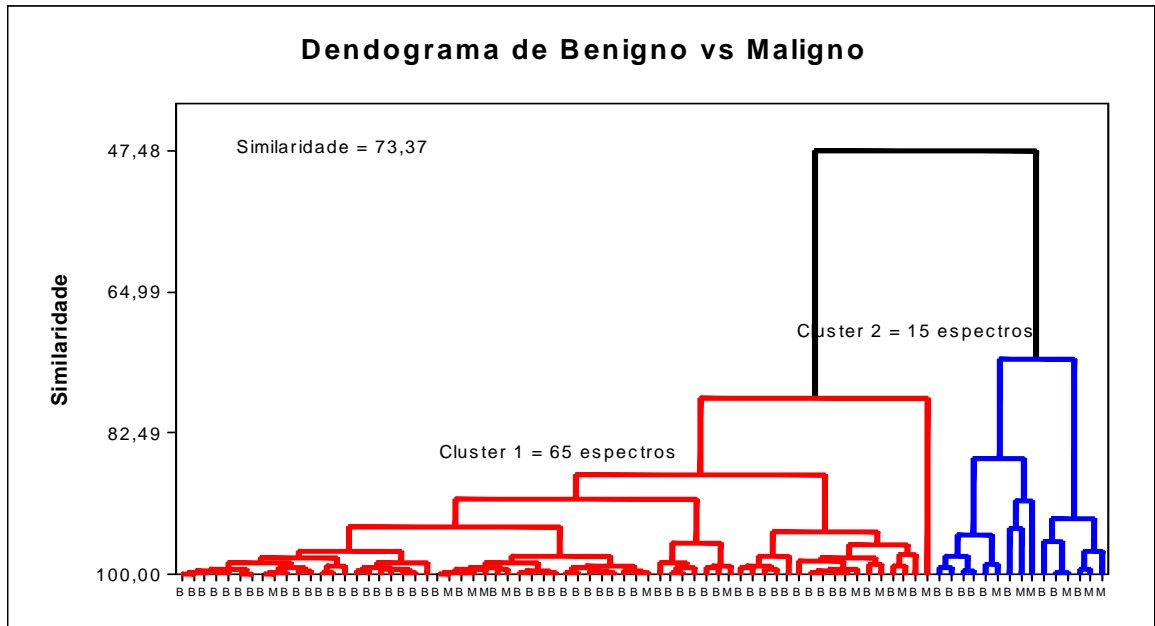


Figura 33 – Dendrograma com análise de cluster para separação das lesões benignas e malignas.

Os espectros com resultado falso-negativo e falso-positivo desta análise foram idênticos à análise anterior (bócio total *versus* carcinoma papilífero), visto que foram acrescentados apenas 06 espectros. Os 03 espectros de adenoma folicular se posicionaram-se corretamente no cluster 1 representativo de lesões benignas e os 03 espectros de carcinoma folicular também se posicionou em 100% no cluster 2, representativo das lesões malignas. Perante o exposto, a descrição das lâminas encontra-se na Tabela 3.

A Figura 34, abaixo, demonstra a distribuição dos espectros, ou seja, a diferença dos espectros para cada cluster (cluster 1 e 2) durante a análise do grupo de lesões benignas *versus* lesões malignas.

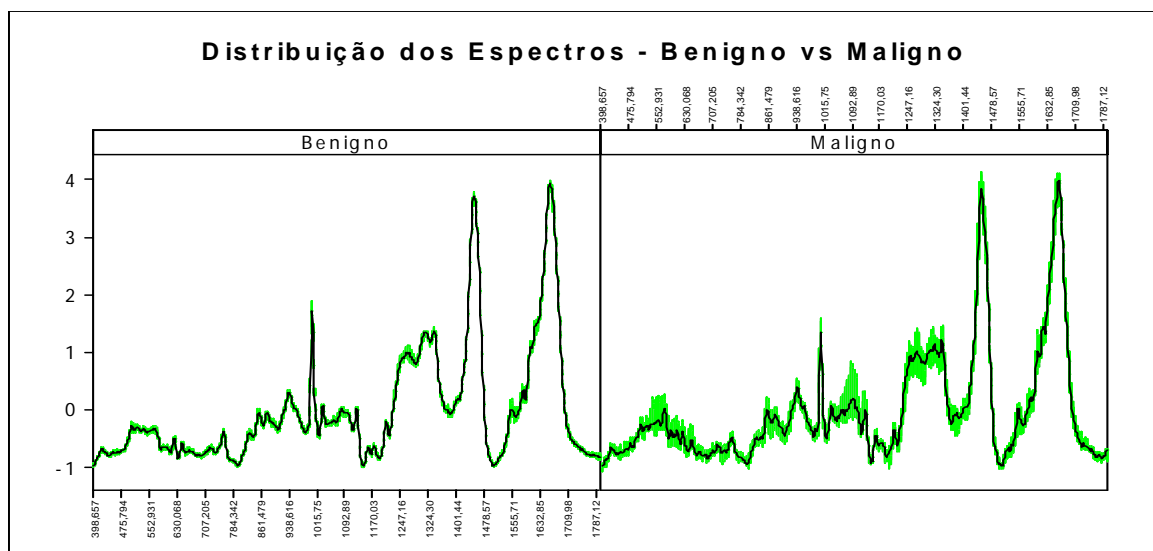


Figura 34 – Distribuição dos espectros para Benigno vs Maligno.

Após realizada a análise das componentes principais, análise de cluster com estruturação dos dendogramas, prosseguiu-se ainda a análise estatística multivariada, utilizando um outro método onde a utilização destas variáveis cria um “índice” ou “função discriminante” que representa de forma parcimoniosa as diferenças entre os grupos.

A Figura 35 representa a dispersão do grupo bócio *versus* carcinoma papilífero na classificação original. Em sequência, demonstra o gráfico após a classificação discriminante deste grupo.

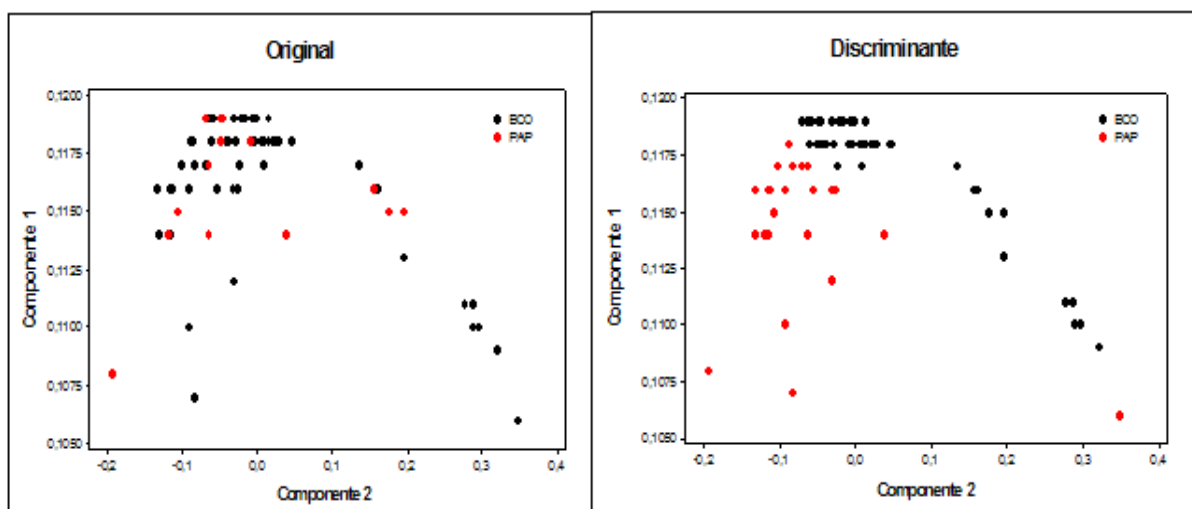


Figura 35 – Dispersão dos grupos na classificação discriminante de BCO vs PAP.

Dados importantes fornecidos pela análise discriminante que precisam ser verificados são os percentuais individuais de cada grupo (Tabela 16).

Tabela 16: Percentual de classificação da função discriminante em BCO vs PAP

Classificação Correta	
Bócio	70,0%
PAP	42,9%
Geral	64,9%

Comparando os métodos estatísticos, o melhor resultado foi obtido pela análise discriminante. Na análise de Benigno vs Maligno (Figura 36), os percentuais de classificação correta individual mostram-se maiores, chegando a quase 80% no grupo de espectros de lesões benignas (Tabela 18).

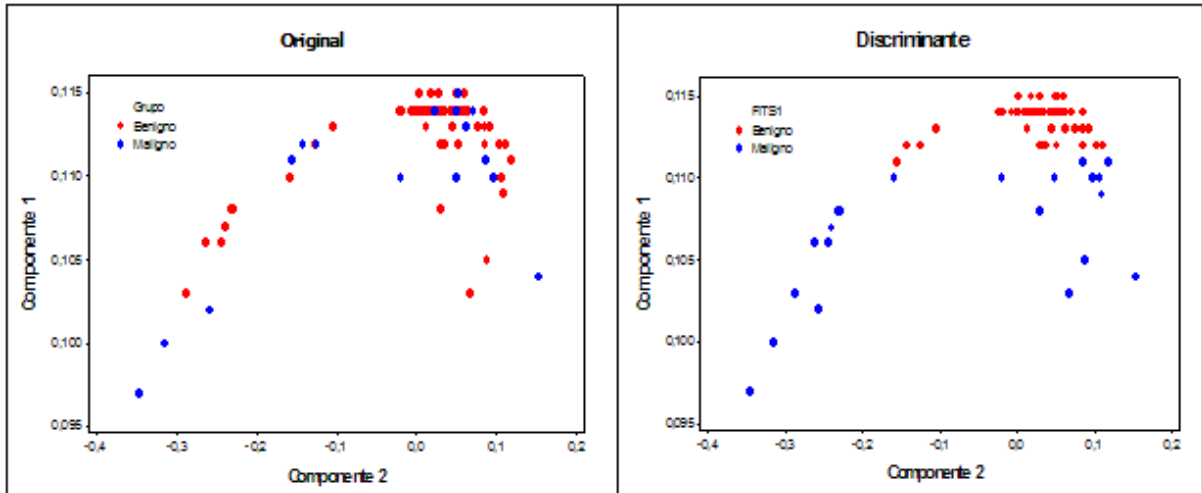


Figura 36 – Dispersão dos grupos na classificação discriminante de Benigno vs Maligno.

Analisando as Tabelas 8, 16 e 17 com os percentuais de classificação correta para o geral, fica nítido que com o decorrer da conjugação entre os grupos este percentual apresentou-se aumentado. Como resultado para o confronto entre os grupos tecido adjacente ao bócio *versus* região nodular do bócio, obteve-se o índice de 58.3 % de classificação correta; este percentual se mostrou baixo, não sendo possível discriminar os espectros Raman destes dois grupos. Entre bócio (região nodular e periferia) *versus* carcinoma papilífero, o índice de classificação correta foi de 64.9 %, sendo considerado bom. No entanto, resultado relevante foi obtido na análise dos espectros de tecidos Benignos (Bócio e Adenoma Folicular) *versus* Malignos (Carcinomas Papilífero e Folicular), cujo percentual foi 72.5 %, considerado bom.

Tabela 17: Percentual de classificação da função discriminante em Benigno vs Maligno

<b>Classificação Correta</b>	
Benigno	79,4%
Maligno	47,1%
Geral	72,5%

## 5.2.2 Análise Descritiva

### 5.2.2.1 Estudo do “Padrão Folicular”

Outra dificuldade para a histologia é a diferenciação do chamado “padrão folicular”, ou seja, perceber as diferenças entre bócio adenomatoso, adenoma folicular e carcinoma folicular.

A seguir, na Figura 37, encontra-se em preto a média dos espectros de bócio adenomatoso, em vermelho adenoma folicular e em verde representado a média dos espectros de carcinoma folicular. A Tabela 18 apresenta as diferenças entre os modos vibracionais destas patologias.

Em decorrência do baixo número de amostras, não foi realizada a análise estatística desta conjugação. Havia apenas uma amostra para carcinoma folicular e adenoma folicular, fato justificado pela baixa incidência destas patologias. No entanto, faz-se relevante ressaltar a diferença espectral e as modificações bioquímicas presentes nos espectros dos tecidos analisados no presente estudo.

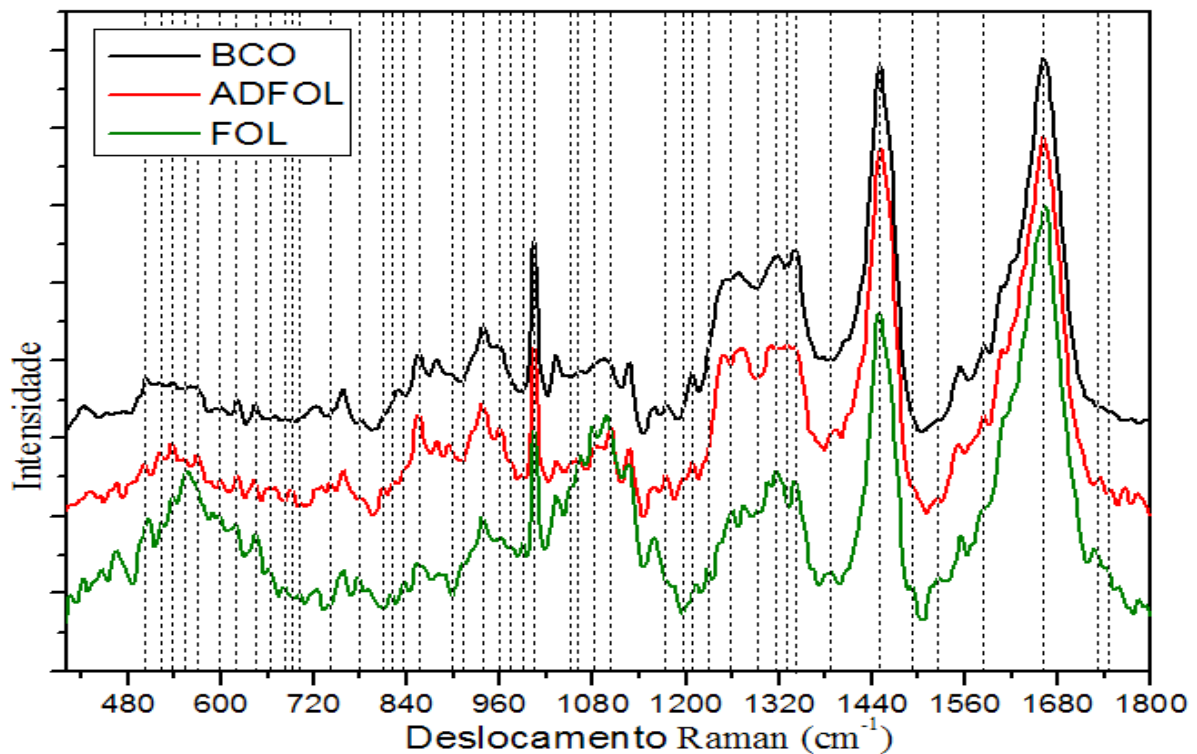


Figura 37 – Média dos espectros de bócio adenomatoso linha preta, adenoma folicular linha vermelha e carcinoma folicular verde na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800  $\text{cm}^{-1}$ .

Tabela 18 – Modos vibracionais relevantes na diferenciação de bócio adenomatoso em comparação com adenoma folicular e carcinoma folicular (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

PICO	ATRIBUIÇÃO	PATOLOGIA
509 cm <sup>-1</sup>	Estiramento S-S dissulfeto banda de colágeno ν(S-S) aminoácido cisteína	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular Bócio região nodular
524 cm <sup>-1</sup>	Estiramento S-S dissulfeto em proteínas fosfatidilserina ν(S-S) aminoácido cisteína	Adenoma Folicular Carcinoma Folicular Bócio região nodular
540 cm <sup>-1</sup>	ν(S-S) aminoácido cisteína	Adenoma Folicular Carcinoma Folicular Bócio região nodular
555 cm <sup>-1</sup>	ν(S-S)	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular Bócio região nodular
573 cm <sup>-1</sup>	Triptofano/citosina, guanina	Adenoma Folicular
600 cm <sup>-1</sup>	Conformação de nucleotídeo	Adenoma Folicular Carcinoma Folicular Bócio região nodular
618 cm <sup>-1</sup>	C-C twist (proteína)	Bócio região nodular Adenoma Folicular Carcinoma Folicular
643 cm <sup>-1</sup>	C-C twist modo de tirosina	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular Bócio região nodular
666 cm <sup>-1</sup>	G, T (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA)- tirosina-G backbone in RNA	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular
678 cm <sup>-1</sup>	Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA G (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA)/ C-2'-endo-anti	Carcinoma Folicular
690 cm <sup>-1</sup>	Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA	Adenoma Folicular
700 cm <sup>-1</sup>	ν(S-S) <i>trans</i> (aminoácido metionina)	Carcinoma Folicular
735 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C-S (um dos três picos de tiocinato, em 2095 & 445 cm <sup>-1</sup> )	Adenoma Folicular
780 cm <sup>-1</sup>	Modo de respiração do anel aromático da base Uracil	Carcinoma Folicular Bócio região nodular Adenoma Folicular
811 cm <sup>-1</sup>	O-P-O estiramento RNA	Adenoma Folicular Bócio região nodular
820 cm <sup>-1</sup>	Banda de Proteína Modo da estrutura de proteínas em tumores. Proteínas, incluindo colágeno I	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular Bócio região nodular
831 cm <sup>-1</sup>	Estiramento assimétrico O-P-O, tirosina	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular
856 cm <sup>-1</sup>	Aminoácidos de cadeia lateral vibrações prolina e hidroxiprolina, bem como (C-C) vibração de colágeno backbone. Hidroxiprolina (colágeno tipo I)	Adenoma Folicular Bócio região nodular Carcinoma Folicular
893/5/6 cm <sup>-1</sup>	Fosfodiéster, deoxiribose	Adenoma Folicular
915 cm <sup>-1</sup>	Vibração de Ribose, modo distinto de RNA (em 915 e 974 cm <sup>-1</sup> )	Carcinoma Folicular
937 cm <sup>-1</sup>	Prolina, hidroxiprolina, ν(C-C) skeletal em colágeno backbone	Adenoma Folicular Bócio região nodular Carcinoma Folicular

960 cm <sup>-1</sup>	Vibração simétrica estiramento $\nu_1$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (fosfato de HA) Banda de estiramento de fosfato de cálcio (quantidades elevadas de colesterol). Deformação do anel Quinóide em plano.	Adenoma Folicular Carcinoma Folicular Bócio região nodular
974 cm <sup>-1</sup>	Vibração de Ribose, modo distinto de RNA (em 915 e 974 cm <sup>-1</sup> )	Carcinoma Folicular
980 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C-C $\beta$ - folha pregueada (proteínas) =CH bending (lipídeos)	Carcinoma Folicular
1000 cm <sup>-1</sup>	Fenilalanine NADH ligado & livre	Bócio região nodular Adenoma Folicular Carcinoma Folicular
1048 cm <sup>-1</sup>	Glicogênio	Carcinoma Folicular
1064 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C-C skeletal em lipídeos Cadeias Acil $\nu$ (C-C) <i>trans</i>	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular
1078 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C) ou $\nu$ (C-O), fosfolipídios Estiramento simétrico fosfato Fosfolipídios Modo de estiramento C-C ou C-O de fosfolipídios Pico de Carboidrato para sólidos C-C ou C-O estiramento (lipídeo), C-C ou PO <sub>2</sub>	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular
1095 cm <sup>-1</sup>	Lípido C-N PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> em ácidos nucleicos	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular
1173 cm <sup>-1</sup>	Cytosina, guanina	Adenoma Folicular Bócio região nodular
1200 cm <sup>-1</sup>	Ácidos nucleicos e fosfatos Anel aromático C-O e C-N	Adenoma Folicular
1208 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), triptofano, fenilalanina (atribuição de proteínas) triptofano A,T (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA/RNA)-amida III (proteína)	Bócio região nodular Adenoma Folicular Carcinoma Folicular
1224 cm <sup>-1</sup>	Amida III $\beta$ - folha pregueada	Carcinoma Folicular
1258 cm <sup>-1</sup>	Amida III, adenina, citosina	Carcinoma Folicular Bócio região nodular
1290 cm <sup>-1</sup>	Citosina	Carcinoma Folicular
1319 cm <sup>-1</sup>	Guanina (B,Z-marcador) CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> twist (atribuição de colágeno)	Carcinoma Folicular Bócio região nodular
1330 cm <sup>-1</sup>	Fosfolipídios típicos Região associada ao DNA & fosfolipídios Colágeno Ácidos Nucleicos fosfatos	Adenoma Folicular
1337/9 cm <sup>-1</sup>	Triptofano CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging, twisting &/or bending modo de colágenos & lipídios CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging & twisting modo de colágeno, ácido nucleico & triptofano	Carcinoma Folicular Bócio região nodular Adenoma Folicular
1386 cm <sup>-1</sup>	Banda CH <sub>3</sub>	Adenoma Folicular Carcinoma Folicular
1448 cm <sup>-1</sup>	Deformação CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> Deformação CH <sub>2</sub>	Bócio região nodular Adenoma Folicular

	CH <sub>2</sub> Colágeno	Carcinoma Folicular
1485 cm <sup>-1</sup>	G, A (Modo de respiração do anel aromático das bases nitrogenadas do DNA) Nucleotídeo base de purina (guanina and adenina)	Carcinoma Folicular
1525 cm <sup>-1</sup>	Vibração conjugada em plano -C=C-	Carcinoma Folicular
1585 cm <sup>-1</sup>	C=C bending modo de fenilalanine Estiramento C=C olefinico Estiramento C=C olefinico (atribuição de proteína)	Bócio região nodular Adenoma Folicular
1665 cm <sup>-1</sup>	Amida I (de colágeno) Amida I Amida I (atribuição de colágeno) Amida I (estrutura-dissolvida desordenada) $\nu_s(C=O)$	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular Bócio região nodular
1729 cm <sup>-1</sup>	Grupo Ester	Carcinoma Folicular Adenoma Folicular
1747 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> bending modo de proteínas&lipídios Deformação CH <sub>2</sub> (proteína) $\delta$ as (CH <sub>3</sub> ) $\delta$ (CH <sub>2</sub> ) de proteínas	Adenoma Folicular Carcinoma Folicular

Pela Tabela 18 é possível perceber alguns picos presentes em todos os três espectros, ou seja, ligações químicas presentes em todos os três tipos de tecidos, porém, com diferentes intensidades entre eles. Estas regiões podem ser as regiões similares consideradas até mesmo características do tecido tireoidiano normal. No entanto, também há presença de picos característicos para apenas um ou dois tipos de lesão, sendo estes modos os de maior destaque para diferenciação das patologias por serem picos exclusivos e representativos de alterações teciduais.

O Bócio adenomatoso é a lesão que mais se assemelha ao tecido normal, e no espectro todos os seus picos principais aparecem associados à patologia. Por sua vez, já o adenoma folicular, por exemplo, possui picos isolados em 573 cm<sup>-1</sup>, 690 cm<sup>-1</sup>, 735 cm<sup>-1</sup>, 893 cm<sup>-1</sup> e 1330 cm<sup>-1</sup>. Os picos característicos do carcinoma folicular aparecem em 678 cm<sup>-1</sup>, 700 cm<sup>-1</sup>, 915 cm<sup>-1</sup>, 974 cm<sup>-1</sup>, 980 cm<sup>-1</sup>, 1224 cm<sup>-1</sup>, 1290 cm<sup>-1</sup>, 1485 cm<sup>-1</sup> e 1525 cm<sup>-1</sup>. Estas regiões descritas e a diferença de intensidade entre os picos de cada uma das patologias podem auxiliar o diagnóstico do “padrão folicular”.



### 5.2.2.2 Análise dos hormônios (T3 e T4) sintéticos

Continuando o estudo da glândula tireóide, verificamos que é fundamental ainda a análise dos hormônios. A tireóide tem como principal função a síntese de T3 e T4, componentes que ficam armazenados como reserva extracelular polipeptídica no colóide dentro do lúmen folicular das células da tireóide.

Utilizando os hormônios sintéticos obtidos comercialmente, foram coletados os espectros característicos de T3 e T4, posteriormente, estes espectros obtidos foram comparados com os espectros de tecidos biológicos, ou seja, sobrepostos aos espectros de bócio tecido adjacente à lesão, bócio região nodular e carcinoma papilífero (Figura 38).

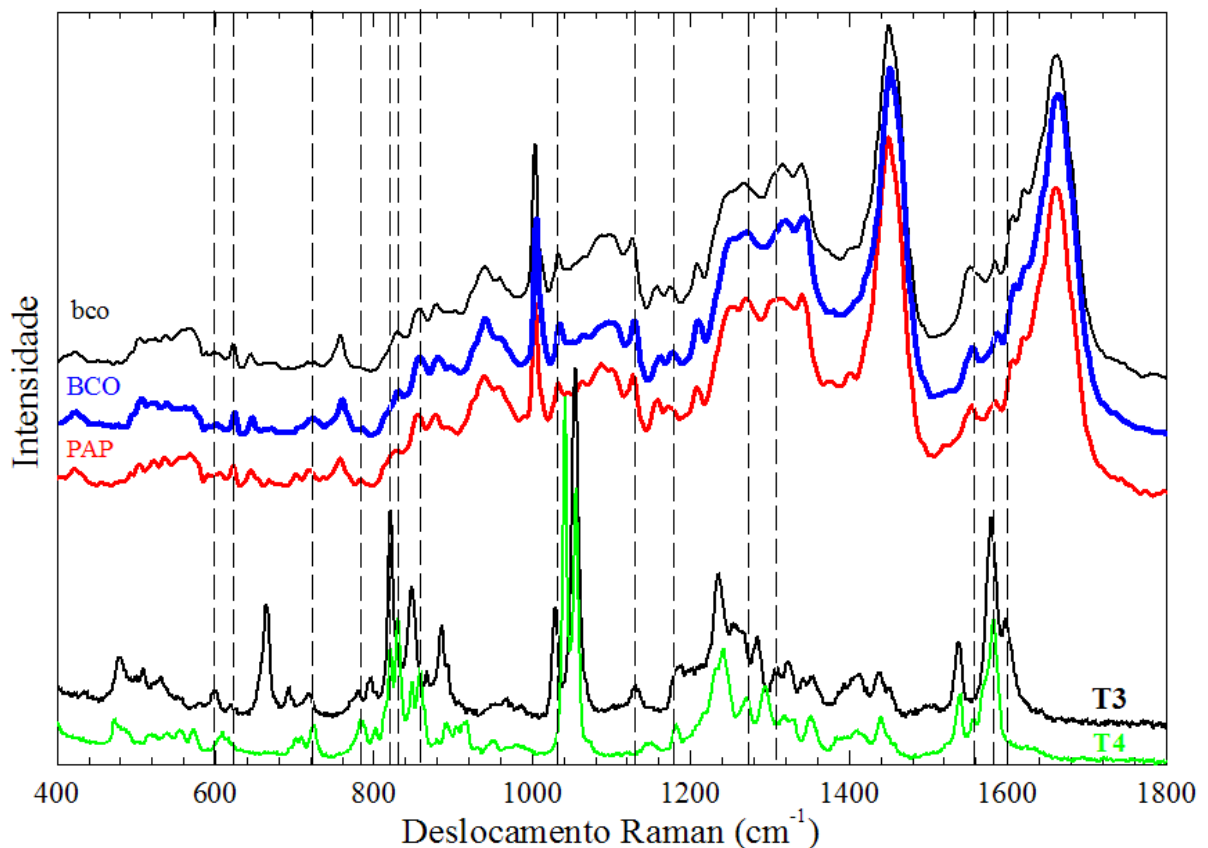


Figura 38 – Média dos espectros dos hormônios T3 e T4 - linha espectral preta e verde na região inferior do gráfico. Média dos espectros do tecido de adjacente à lesão linha preta, bócio região nodular em azul e carcinoma papilífero (vermelho) parte superior do gráfico na região de deslocamento Raman de 400 à 1.800  $\text{cm}^{-1}$ .

Na Tabela 19 estão identificadas as bandas de compostos hormonais, como caracterizado no estudo de Alvarez, Farias e Hidelbrant (2004). Neste estudo, os modos vibracionais hormonais mais importantes foram correlacionados com regiões

espectrais obtidas em tecidos patológicos. Os modos vibracionais prováveis em tecidos biológicos, como anteriormente, basearam-se no estudo realizado por Movasaghi, Rehman e Rehman (2007). Ou seja, na Tabela 19 encontram-se os modos vibracionais para os picos similares nos espectros de tecidos patológicos e dos hormônios (T3 e T4) construindo hipóteses com relação ao modo vibracional atuante em cada região.

Tabela 19 – Modos vibracionais dos hormônios T3 e T4 juntamente com tecido adjacente à lesão, bócio região nodular e carcinoma papilífero (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; ALVAREZ; FARIAS; HIDELBRANT, 2004)

PICO	ATRIBUIÇÃO	PATOLOGIA
600 cm <sup>-1</sup>	Conformação de nucleotídeo	T3 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
618 cm <sup>-1</sup>	C-C twist (proteína)	T3 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
722 cm <sup>-1</sup>	DNA β (15)	T4 T3 Carcinoma Papilífero Bócio região nodular Bócio tecido adjacente
782 cm <sup>-1</sup>	DNA NH <sub>3</sub> +wag	T4 T3 Carcinoma Papilífero Bócio região nodular Bócio tecido adjacente
820-30 cm <sup>-1</sup>	Banda de proteína Modo da estrutura de proteínas em tumores. Proteínas, incluindo colágeno I Anel α/β deformação	T4 T3 Bócio região nodular Bócio tecido adjacente Carcinoma Papilífero
856 cm <sup>-1</sup>	Aminoácidos de cadeia lateral vibrações prolina e hidroxiprolina, bem como, (C-C) vibração de colágeno backbone. Hidroxiprolina (colágeno tipo I)β (12)	T4 Bócio região nodular Carcinoma Papilífero Bócio tecido adjacente
1030 cm <sup>-1</sup>	Fenilalanina de colágeno ν(C-C) skeletral, Queratina (proteína) δ (C-H), Fenilalanina (proteína) α (9)	T3 Bócio região nodular Bócio tecido adjacente Carcinoma Papilífero
1130 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C-C skeletral transconformação Fosfolípido mudança estrutural (trans versus gauche isomerismo) δOH <sub>i,p</sub>	T3 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1180 cm <sup>-1</sup>	Citosina, Guanina νCβ-O	T3 T4 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular

		Carcinoma Papilífero
1270 cm <sup>-1</sup>	Fosfolípidios Típicos Amida III banda em proteínas  CH <sub>2</sub> twist	T4 Carcinoma Papilífero Bócio região nodular Bócio tecido adjacente
1290 cm <sup>-1</sup>	Citosina β(6)	T3 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1560 cm <sup>-1</sup>	Triptofano  α (1); α (1)-β (2); β (2)	T4 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1582 cm <sup>-1</sup>	δ(C=C), fenilalanina  β (2); β (2)+ α (1); β (1)-α (1)	T3 T4 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular Carcinoma Papilífero
1598 cm <sup>-1</sup>	Estiramento C=N e C=C em anel Quinóide  β (1); β (1); β (1)+ α (1);	T3 Bócio tecido adjacente Bócio região nodular Carcinoma Papilífero

Na Tabela 19 observa-se a identificação da presença dos hormônios T3 e T4 nos espectros de tecido adjacente à lesão, região nodular do bócio e carcinoma papilífero.

Os picos que sugerem ter influência apenas do hormônio T3 se encontram nas seguintes regiões: 600 cm<sup>-1</sup>, 618 cm<sup>-1</sup>, 1030 cm<sup>-1</sup>, 1130 cm<sup>-1</sup>, 1290 cm<sup>-1</sup> e 1598 cm<sup>-1</sup>. Todos estes picos aparecem com maior intensidade nos espectros de tecido adjacente à lesão; apenas o pico de 1030 cm<sup>-1</sup> recebe a maior intensidade no espectro de bócio região nodular.

Pode-se perceber os picos relacionados ao hormônio T4 nas regiões de 856 cm<sup>-1</sup>, 1270 cm<sup>-1</sup> e 1560 cm<sup>-1</sup>; este hormônio quando correlacionado com os tecidos glandulares tem uma variação de intensidade. A intensidade dos picos sobressai para o bócio região nodular, carcinoma papilífero e tecido adjacente à lesão consecutivamente.

Existem picos que aparecem nas mesmas regiões do espectro tanto para o hormônio T3 como para o hormônio T4, ainda assim, estes picos podem ser observados nos espectros de tecidos patológicos da tireóide com diferentes intensidades. Estes picos coincidentes se apresentam nas regiões de 722 cm<sup>-1</sup> com maior intensidade para o hormônio T4 e no espectro de carcinoma papilífero se comparado com hormônio T3. Na região de 782 cm<sup>-1</sup> da mesma forma, observaram-se maiores intensidades para T4 e no carcinoma papilífero. Sobresae a intensidade

para T4 e similarmente no espectro de região nodular do bócio na região de 820-830  $\text{cm}^{-1}$ . Entretanto, na região de 1180  $\text{cm}^{-1}$  destaca-se uma maior intensidade para o hormônio T3 e tecido adjacente à lesão se comparado o espectro de T4, novamente, na região de 1582  $\text{cm}^{-1}$  destaca-se maior intensidade em T3 e tecido adjacente à lesão.

Verifica-se, em suma, que de alguma forma o tecido adjacente à lesão ou a lesão mais próxima do normal recebe uma influência maior do hormônio T3 e, em hipótese, o hormônio T4 está correlacionado com o carcinoma papilífero.

## 6 DISCUSSÃO

A grande heterogeneidade existente nos componentes teciduais da glândula tireóide ficou evidenciada durante a execução do presente estudo. Em um mesmo fragmento analisado, estão presentes dois ou três tipos de lesões conjuntamente, o que dificulta o laudo citopatológico e histopatológico. Esta dificuldade também esteve presente na aplicação da análise dos espécimes por espectroscopia FT-Raman, sugerindo a utilização da técnica para complementação do diagnóstico de patologias de tireóide.

Para o diagnóstico das doenças da tireóide é necessária a união de várias informações sobre as lesões. As discussões sobre as diferenças entre as patologias podem estar relacionadas às diferentes escolas de patologistas. As mesmas características morfológicas (macro e micro) podem ser associadas à diferentes patologias, dificultando o diagnóstico diferencial. Desta forma, poderia ser útil encontrar novas informações sobre estas doenças na tentativa de estabelecer mais facilmente alguns padrões que facilitem o diagnóstico de lesões incipientes e intermediárias.

O laudo citopatológico e histopatológico depende da experiência do profissional que faz a leitura do fragmento, que é usualmente descritiva no relato do acometimento celular. Quando há incertezas para o laudo das lesões da tireóide, qualquer informação adicional agregará e terá grande utilidade para o conhecimento deste complexo órgão endócrino, assim como complementará o diagnóstico final e influenciará a opinião médica com relação à patologia apresentada.

Após verificar as dificuldades histológicas, percebeu-se a necessidade de três tipos de conjugação dos dados. A primeira dificuldade enfrentada foi a similaridade do tecido normal ou de margem de lesão com os nódulos hiperplásicos denominados bócio adenomatoso. Por fim, foi colocado o propósito de maior destaque deste estudo, que era a diferenciação das neoplasias benignas das malignas. Posteriormente, observou-se a dificuldade de análise do “padrão folicular”, como a diferenciação entre bócio adenomatoso, adenoma folicular e carcinoma folicular.

Entre os 18 casos estudados, com um total de 27 amostras, 11 dos fragmentos foram classificados pelo médico cirurgião como tireóide normal, tendo

recebido o diagnóstico histopatológico de bócio adenomatoso. Todos os tecidos foram obtidos a partir de pacientes com diferentes patologias. Praticamente nenhum tecido de paciente normal estava disponível para o presente estudo. Em vista disso, o tecido que serviria como controle seria retirado de regiões adjacentes ao tecido alterado que apresentassem aspectos de normalidade. Desta forma, foi despertada a necessidade de análise dos tecidos denominados como “tireóide normal” ou tecido adjacente à lesão, conjuntamente com os fragmentos de bócio da região central da lesão. O objetivo desta análise foi verificar se o tecido de tireóide normal, ou margem de lesão, realmente era similar ao bócio adenomatoso, como descrito pela histopatologia.

Segundo Layfield, Wax e Jones (2003), existem estudos e critérios que tentam separar os neoplasmas foliculares dos nódulos hiperplásicos e bócio colóide, porém, um critério para separação das hiperplasias e dos bócios nodulares de tecido normal da tireóide raramente tem sido discutido na literatura. O bócio colóide é diagnosticado quando há abundância de colóide e lesões significantes estão ausentes. Similarmente, um nódulo hiperplásico ou adenomatoso é diagnosticado por pequena quantidade de colóide e grau superior de lesões também não são encontrados.

Alcântara-Jones et al. (2006), desenvolveram um estudo observacional para verificar o padrão citológico do tecido tireoidiano normal obtido através de punções aspirativa e não-aspirativas em 38 cadáveres, nos quais se procedeu a dissecação anatômica da tireóide normal e citoaspiração. Dois patologistas cegos para a metodologia do estudo, sem conhecer a correspondência entre citologia e histologia, analisaram os esfregaços e os cortes histológicos. As tireóides normais forneceram diagnóstico citológico de bócio adenomatoso em 70,4% das vezes por um observador e 92,6% para outro. Como conclusão, é possível dizer que o aspecto citológico da tireóide normal em cadáveres foi semelhante ao do bócio adenomatoso.

O estudo descrito reflete bem as dúvidas relacionadas à citologia e à histopatologia da tireóide, onde nem mesmo o tecido normal consegue ser diferenciado de uma neoplasia benigna como o bócio adenomatoso.

Verificando os resultados obtidos neste confronto, o percentual geral de classificação entre os espectros de tecido adjacente à lesão e região nodular do bócio foi considerado baixo pela análise discriminante. Este percentual confirma a dificuldade de diferenciação da região periférica com relação à região central do

nódulo. Entretanto, pela análise dos espectros observaram-se alterações bioquímicas entre os dois tipos de tecidos. Estas alterações foram observadas pela diferença na forma de apresentação dos espectros e seus modos vibracionais.

Os espectros de tecido adjacente à lesão na análise de cluster que acabaram sendo transferidos para o cluster 1 se misturando com o grupo de bócio adenomatoso são, na realidade, tecidos que margeiam alguma lesão importante, como bócio colóide, adenoma e carcinomas. Nas áreas próximas das patologias as alterações bioquímicas já estão presentes, embora não sejam detectáveis macroscopicamente e microscopicamente. O método de espectroscopia Raman é capaz de detectá-las. Este pensamento leva a crer que uma lesão da tireóide não é um foco isolado; esta lesão acaba por desencadear modificações celulares e bioquímicas em toda a glândula (lobo direito, esquerdo e istmo).

Na metodologia, buscamos respeitar o diagnóstico histopatológico com a intenção de analisarmos se pela espectroscopia Raman podemos verificar uma graduação destes nódulos hiperplásicos e nódulos colóides, buscando também encontrar o tecido menos lesado e mais próximo do normal. Na análise do dendograma (Figura 27) existe uma mistura das amostras de tecido adjacente à lesão e bócio região nodular. O resultado obtido no cluster 1 fornece informações que sugerem que neste cluster estejam presentes as amostras teciduais com lesões mais antigas, extensas e consideráveis. Já o cluster 2 representa as lesões recentes e menores; afinal, para o cluster 2, não migrou nenhum espectro de bócio região central da lesão.

O bócio é uma lesão benigna, nodular, e na região central pode haver um líquido viscoso, resultado de anos de degradação de células. Pode haver hemorragia no bócio, e macrófagos normalmente estão presentes, sendo vistos com hemossiderina, resultante da degradação das hemácias pelas células de defesa. Isso quer dizer que houve tempo para o macrófago chegar até o ponto de lesão, fagocitar esses elementos do sangue e degradá-los; estas características que fecham o diagnóstico de lesão antiga. Quando há mais elementos de células nas amostras, os patologistas fecham como bócio adenomatoso. Quando o componente colóide é predominante, o diagnóstico final é de bócio colóide.

Do ponto de vista cirúrgico, o tratamento é similar e as implicações pós-operatórias também. Na maioria dos casos, retira-se a glândula totalmente quando o diagnóstico final refere-se à neoplasia benigna, principalmente se o nódulo acometer

os dois lobos da glândula tireóide. Por outro lado, no caso de carcinomas malignos, obviamente por medida de precaução contra recidivas e chances haver algum foco de disseminação da doença, também é retirada a glândula por completo. Esta é a conduta mais frequente entre os médicos especialistas em cabeça e pescoço; porém, depende do julgamento individual de cada médico e das condições gerais do paciente.

Atualmente o que a medicina almeja é evitar que cirurgias agressivas sejam realizadas, o que seria possível se houvesse a certeza de diferenciação entre neoplasias benignas e malignas. No entanto, os atuais métodos diagnósticos não permitem essa certeza e não conseguem delimitar o ponto exato de extensão das alterações celulares.

O que a espectroscopia Raman pretende diferir do diagnóstico convencional é o fato da leitura por espectroscopia Raman fornecer informações a nível molecular, detectando alterações bioquímicas dessas lesões pela percepção das naturezas de ligações.

Portanto, a espectroscopia Raman apresentou sensibilidade para estabelecer uma graduação entre as patologias de tireóide estudadas nesta pesquisa, o que não ocorre com os atuais métodos de diagnóstico. Além disso, as lesões desse tecido apresentam diferentes evoluções, sendo possível que um pequeno nódulo de bócio permaneça de tamanho estável por muitos anos, embora outros possam apresentar crescimento rápido, originando áreas de degeneração das estruturas císticas que caracterizam sua morfologia.

A graduação das patologias é importante e necessária para se saber a distância da área central da lesão para a sua margem, que significa tecido livre da patologia, além de possibilitar quantificar o tamanho da região da tireóide acometida.

Os métodos de diagnósticos expõem as formas de análise da glândula tireóide, o que é fundamental para o entendimento fisiológico deste complexo sistema. Um método de diagnóstico insuficiente proporcionará escassas e radicais opções de tratamento, isto se as lesões não se mantiverem ocultas.

Dando continuidade a essa linha de pesquisa pretende-se estudar o denominado “padrão folicular” visto que, pela análise citológica, é difícil a diferenciação entre adenoma folicular (lesão benigna) e carcinoma folicular (lesão maligna). Isto determina que, muitas vezes, indivíduos são submetidos à



tireoidectomia de urgência sem a certeza da gravidade da patologia pelo fato das lesões benignas serem, histopatologicamente, semelhantes às lesões malignas.

O adenoma folicular e o carcinoma folicular são neoplasias de baixa incidência. Devido ao pequeno número de amostras e, conseqüentemente, de espectros, não foram realizados testes estatísticos, optando-se apenas pela análise espectral e identificação dos modos vibracionais destas lesões da glândula tireóide.

Os resultados apresentados permitiram detectar picos presentes em todos os três espectros, ou seja, ligações químicas que se apresentavam nesses três tipos de lesões, porém com diferentes intensidades em cada uma delas. Estas regiões podem ser de regiões similares consideradas até mesmo características do tecido tireoidiano normal. No entanto, também há a presença de picos característicos para apenas um ou dois tipos de lesões, sendo estes modos os de maior destaque na busca da diferenciação entre as patologias estudadas por serem picos exclusivos e representativos de alteração tecidual.

Propõe-se que a análise destas regiões do espectro favoreçam o laudo médico usual; afinal, o adenoma folicular é uma neoplasia benigna e se não tiver indício de malignidade, o tratamento muitas vezes será apenas reposição hormonal, opção terapêutica que dificilmente ocorre atualmente pela similaridade com histológica do tecido com o carcinoma folicular.

Não está definido se o adenoma folicular pode evoluir para carcinoma; o que se afirma apenas é que certamente o bócio não evolui, mas pode existir uma lesão de bócio próximo a uma neoplasia maligna. Neste estudo, todos os fragmentos retirados de regiões vizinhas aos carcinomas receberam o laudo histopatológico de bócio adenomatoso. No entanto, se pela histologia não existe uma distinção real entre tecido normal e bócio adenomatoso, fica difícil afirmar que estas patologias frequentemente estão associadas.

Outro ponto de importância médica e histológica seria o entendimento das lesões benignas e malignas, pois muitas vezes o laudo histológico relata suspeita de malignidade, fornecendo um diagnóstico inconclusivo. A consistência do laudo é um fator primordial para conduta médica e prognóstico da doença. De acordo com o exposto, os dados foram conjugados para análise dos espectros de lesões benignas composta por espectros de bócio adenomatoso (periferia e região central da lesão) e adenoma folicular, conjuntamente com espectros de lesões malignas (carcinoma papilífero e carcinoma folicular).

Na primeira análise foram estudadas as amostras de bócio adenomatoso com carcinoma papilífero (PAP) devido ao maior número de amostras presentes em cada grupo. Por fim, analisaram-se todas as amostras: bócio adenomatoso, adenoma folicular, carcinoma folicular e carcinoma papilífero (grupo benigno vs maligno). Pela análise de cluster, observou-se que a distância entre os clusters diminuía à medida que eram agregados mais dados espectrais; para a tabela 14 com espectros de bócio versus carcinoma papilífero, a distância foi de 0,281 e para tabela 15 este resultado foi 0,262 o que indica diminuição do espalhamento dos espectros principalmente na análise de lesões benignas versus malignas.

Analisando as tabelas com os percentuais de classificação correta para o geral, fica nítido que com o decorrer da conjugação entre os grupos este percentual apresentou-se aumentado. Como resultado para o confronto entre os grupos tecido adjacente ao bócio *versus* bócio região nodular obteve-se o índice de 58.3 % de classificação correta; este percentual se mostrou baixo, não sendo possível discriminar os espectros Raman destes dois grupos. Entre bócio (região nodular e periferia) *versus* carcinoma papilífero, o índice de classificação correta foi de 64.9 %, considerado bom. No entanto, resultado relevante foi obtido na análise de dos espectros de tecidos Benignos (Bócio e Adenoma Folicular) *versus* Malignos (Carcinomas Papilífero e Folicular), cujo percentual foi 72.5 %, considerado bom.

Ao analisar a média dos espectros Raman com os modos vibracionais de bócio, carcinoma papilífero e carcinoma folicular verificaram-se diferenças bioquímicas entre as lesões. Algumas intensidades apresentaram-se maiores no espectro de bócio adenomatoso se comparado com os demais tecidos. Houveram ainda picos isolados presentes apenas no espectro de carcinoma papilífero e picos característicos representativos de carcinoma folicular.

Como complementação desta pesquisa, foi fundamental ainda a análise dos hormônios, considerando que este órgão tem com principal função a síntese de T3 e T4, componentes que ficam armazenados como reserva extracelular polipeptídica no colóide dentro do lúmen folicular das células da tiróide.

Utilizando o hormônio sintético, foram coletados os espectros característicos de T3 e T4; estes foram comparados com os espectros de bócio tecido adjacente à lesão, bócio região nodular e carcinoma papilífero.

A frequência de ligação ou vibração dos átomos geralmente se acoplam originando espectros de difícil entendimento; por isso que nas tabelas dos modos

vibracionais relatamos os diversos modos prováveis de cada região trabalhando com hipóteses. Por exemplo, a região de  $722\text{ cm}^{-1}$  para os tecidos biológicos pode ser atribuída ao modo de vibração de DNA ou ao modo  $\beta$  (15) dos hormônios T3 e T4 presentes no colóide ou folículos.

Verificar as intensidades dos picos coincidentes é importante quando se sabe que as dosagens destes hormônios podem ou não sofrer variações na síntese. Estas variações hormonais decorrem de modificações na função glândular desencadeadas pelo progresso patológico, no entanto, o carcinoma pode existir sem alterações na dosagem de T3 e T4.

Verificou-se nesta pesquisa que o tecido adjacente à lesão, ou tecido mais próximo à região de normalidade, recebe maior influência do hormônio T3. Os picos isolados de T3 encontram-se em maior intensidade no espectro de tecido adjacente a lesão se comparado com os espectros da região nodular do bócio e do carcinoma papilífero. O hormônio T3 encontra-se em maior quantidade no organismo, tanto que, quando necessário ao organismo, o hormônio T4 é revertido em T3.

Na análise de L-tiroxina, o hormônio T4 aparece com picos de maiores intensidades associado ao espectro de carcinoma papilífero nas regiões de  $722\text{ cm}^{-1}$ ,  $782\text{ cm}^{-1}$  e  $1270\text{ cm}^{-1}$ . Esta informação deve ser considerada para o diagnóstico de carcinoma papilífero, visto que, o carcinoma papilífero quando analisados os modos vibracionais dos hormônios, é a patologia que freqüentemente aparece com as menores intensidades. Segundo Saito et al. (1998) o Iodeto é menos concentrado em menor quantidade no carcinoma papilífero da tireóide em comparação com a glândula normal. A relação Na<sup>+</sup> / I-sympporter (NIS) é a principal responsável pela captação de iodo pelas células da tireóide. Além disso, altos níveis séricos de tireotrofina (TSH) são exigidos para o aumento da captação de radioiodeto em carcinoma metastático da tireóide, sugerindo igualmente uma reduzida resposta do TSH ao carcinoma da tireóide.

Este estudo sugere a análise dos espectros patológicos; no entanto, se análise dos espectros patológicos for realizada em conjunto com os espectros hormonais, existirão informações bioquímicas adicionais, que podem complementar o diagnóstico por espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman permite, se necessário, estudar o tecido isoladamente, ou seja, analisar os espectros patológicos excluindo os picos e as bandas de interferência hormonal, pois os presentes resultados permitiram

caracterizar os modos vibracionais de hormônios presentes tecidos em alterações patológicas da tireóide.

Este estudo procurou contribuir como fonte de informação adicional para identificação de tireóides normais, bócio e suas fases de progressão, doenças inflamatórias e finalmente para subclassificação entre os tumores. A observação dos dados analisados permite diferenciar as neoplasias benignas de malignas com 72% de classificação correta pela função discriminante. Ao estabelecer estas diferenças entre os compostos patológicos abre-se para a discussão de uma propedêutica menos agressiva.

O presente estudo esclarece por espectroscopia Raman, as controvérsias clínicas das patologias que acometem a glândula tireóide. Ainda assim, os resultados obtidos em hormônios permitirão futuramente realizar a dosagem de hormônios utilizando a técnica de espectroscopia Raman, e da mesma forma, perceber a interferência dos hormônios para análise de tecidos isoladamente.

## 7 CONCLUSÃO

Foi possível caracterizar os espectros Raman de tecidos patológicos de tireóide dos seguintes grupos histológicos: bócio tecido adjacente à lesão, bócio região nodular, adenoma folicular, carcinoma folicular e carcinoma papilífero. Ainda assim, obtidos os espectros Raman de hormônios sintéticos T3 (triiodotironina) e T4 (tetraiodotironina). Avaliando essas características, foi possível estabelecer os modos vibracionais referentes a cada um dos grupos.

Por meio do pareamento dos grupos foi realizada análise de componentes principais seguida da análise de cluster e discriminante linear. Estatisticamente estabeleceu-se o percentual de classificação correta entre os grupos, para o confronto entre bócio tecido adjacente à lesão versus bócio região nodular o percentual de classificação correta foi de 58,3%, entre bócio total (periferia e região nodular) versus carcinoma papilífero este percentual foi de 64,9%, e finalmente, para separação de lesões benignas (bócio total e adenoma folicular) versus malignas (carcinoma folicular e carcinoma papilífero) o percentual de classificação foi aumentado obtendo o índice de 72,5%.

Conclui-se ainda que os picos representativos dos modos vibracionais dos hormônios podem trazer informações adicionais, afinal, os hormônios fazem parte do conteúdo glandular. Ademais, deduz-se dos dados empíricos, que a análise dos espectros patológicos realizada em conjunto com os espectros hormonais, pode complementar o diagnóstico por espectroscopia Raman.

Mais estudos serão necessários para que se configure uma homogeneidade de classificação histológica de forma que as diferenças encontradas neste estudo possam ser melhoradas. Para que o método de espectroscopia Raman se imponha, definitivamente, é preciso ainda aperfeiçoamento da técnica e um maior banco de amostras, adicionando ainda os carcinomas anaplásicos de baixíssima incidência. Com base no exposto, é possível aumentar o índice de distinção correta dos tecidos patológicos da Tireóide e se fazer ciência na área de engenharia biomédica dedicada a biópsia óptica.

## REFERENCIAS

ALCÂNTARA-JONES, D. M.; MIRANDA, J. S.; MATOS, S. S.; QUEIROZ, C. M. P.; ARÁUJO, L. M. B.; RÉGO, M. A. V.; SANTANA A. M.; LESSA B. F.; NUNES C. E. M. Padrão citológico de punção aspirativa do tecido morfológicamente normal. **Bras Patol e Med Lab.**, v.42, n.1, p.45-50, 2006.

ALVAREZ, R.M.S.; FARIAS R.N.; HIDELBRANT P. Comparative vibrational analysis of thyronine hormones using infrared and Raman spectroscopy and density functional theory calculations. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.35, p.947-255, 2004.

BARRA, G.B.; VELASCO, L.F.R.; PESSANHA R.P.; CAMPOS A.M.; MOURA F.N.; DIAS S.M.G.; POLIKARPOV I.; RIBEIRO R.C.J.; SIMEONI L.A.; NEVES F.A.R. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoidiano. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.48, n.1, p.25-36, 2004.

BITAR R. A.; MARTINHO H. S.; CRIOLLO C. J. T.; RAMALHO L. N. Z.; NETTO M. M.; MARTIN A. A. Biochemical analysis of human breast tissues using FT-Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v.11, p.540001, 2006.

COELI, C. M.; BRITO A. S.; BARBOSA F. S.; RIBEIRO M. G.; SIEIRO A. P. A. V.; VAISMAN M. Incidência e Mortalidade por Câncer de Tireóide no Brasil. **Arq. Bras. de Endocrinol. e Metab.**, v. 49, n.4, p.503-509, 2005.

DI FIORE, M.S.H. **Atlas de Histologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 205.

DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicada à saúde**. 5.ed. São Paulo: Robe Editorial, 2002. p.1211-1212.

FABIANO, B.S; PACHECO, M. T.T.; VILA VERDE, A.B.; SILVEIRA JR, L.; MARCOS, R.L.; MARTINS, R.A.B.L. Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte. **Rev. Bras. Méd. Esporte**, v.9, n.6, nov/dez, 2003.

FERRAZ, A. R.; ARAUJO, F. V. J. F.; GONÇALVES A. J.; FAVA A. S.; LIMA R. A. Diagnóstico e Tratamento do câncer da tireóide. **Associação Médica Brasileira e Conselho federal de Medicina**, p.4, 2001.

GREENSPAN, F.S; STREWLER, G. J. **Basic & Clinical Endocrinology**. Stamford: Appleton and Lange, 1997.p.142.

GREMLICH, H.; YAN, B. **Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials**. New York: Marcel Dekker, 2001.p.329-336.

HEDINGER, C.; WILLIAMS, E.D.; SOBIN, L.H. **Histological typing of thyroid tumours**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, WHO International Histological Classification of Tumors, 1998.p.3-14.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde; Câncer da Tireóide - Conduas do INCA/MS. **Rev. Bras. de Cancerologia**. v.48, n.2, p.181-185, 2002.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. **Câncer da Tireóide**. Rio de Janeiro, 2007. Banco de dados. Disponível em:  
< [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=2187](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2187)> Acesso em: jun.2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.U. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999. p.339 – 340.

KAARLE,O.; FRANSSILA, M.D.Is the differentiation between papillary and follicular thyroid carcinoma valid? **Cancer**, v.32, p.853-863, 1973.

KRAFFT, C.; SERGO V. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. **Spectroscopy-an International Journal**, v.20, n. 5-6, p.195-218, 2006.

LAYFIELD L.J.; WAX T.; JONES C. Cytologic distinction of goiterous nodules from morfologically normal thyroid. **Cancer (cancer cytopathology)**, v.99, p.217-222, 2003.

LEWIS, I.R.; EDWARDS, G.M. **Handbook of Raman Spectroscopy** : from the Research Laboratory to the Process Line. New York: Marcel Dekker, 2001. p.1-2.

LIU, G.; LIU, J. H.; ZHANG, L.; YU, F.; SUN, S. Z. Raman spectroscopic study of human tissues. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v.25, n.5, p.723-725, 2005.

LIU, K.Z.; SCHULTZ, C.P.; SALAMON, E. A.; MAN, A.; MANTSCH,H.H. Infrared spectroscopic diagnosis of thyroid tumors. **Journal of Molecular Structure**, v.661, p.397-404, 2003.

LYNX – Tecnologia, 2007. Disponível em:  
< [http://www.lynxtec.com.br/tutor\\_aqd1.htm](http://www.lynxtec.com.br/tutor_aqd1.htm)> Acesso em: nov.2007.

MARCIEL, R. M. B. Citologia aspirativa da tiróide: Utilidade diagnóstica atual e perspectivas futuras. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.45, n.3, p.218, 2001.

MATSUO, S; MARTINS L.; LEONI, S.G.; HAJJAR, D.; RICARTE-FILHO, J.C.; EBINA, K.N.; KIMURA E.T. Marcadores biológicos de tumores tireoidianos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v 48, n.1, p.114-124, 2004.

MORENO, M. **Espectroscopia Raman em câncer de mama**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

MOVASAGHI Z.; REHMAN S.; REHMAN I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Appl. Spectrosc.**, v.42, p.493-541, 2007.

NASCIMENTO, A.R. **Avaliação do desempenho do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) em areia por detecção no infravermelho.** 2003. Dissertação (Mestrado em Metrologia para Qualidade Industrial) – Centro Técnico Científico, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2003.

NETTER F.H. **Atlas de anatomia humana.** 2. ed. Porto Alegre : Artmed, 2000. p.68.

NUNES, L. O.; MARTIN, A. A. ; SIVEIRA J. L. ; ZAMPIERI, M. FT-Raman Spectroscopy Study For Skin Cancer Diagnosis. **Spectroscopy-An International Journal**, v. 17, n. 2-3, p. 597-602, 2003.

PECCIN, S.; FURLANETTO T. W.; CASTRO, J. A. S.; FURTADO A. P. A.; BRASIL, B. A.; CZEPIELEWSKI, M. A. Nódulos de tireóide: valor da ultra-sonografia e da biópsia por punção aspirativa no diagnóstico de câncer. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.49, n.2, p.145-149, 2003.

RAMAN, C.V.; KRISHNAN, K.S. A new type of secondary radiation. **Nature**, n.121, p.501, 1928.

ROBBINS S. L.; COTRAN R.S.; KUMAR V. **Pathologic Basis of Disease**, Philadelphia: WB Saunders, 1984.p.1224.

RODRIGUES, C.F. **Rastreo molecular do gene da peroxidase da tiróide em doentes com hipotireoidismo congénito.** 2004. Dissertação (Mestrado Genética Molecular) - Universidade do Minho, Braga, 2004.

ROUT, P.; SHARIFF S. Diagnostic value of qualitative and quantitative variables in thyroid lesions. **Cytopathology**. v.10, p.171-179, 1999.

SAITO T.; ENDO T.; KAWAGUCHI A.; IKEDA M.; KATOH R.; KAWAOI A.; MURAMATSU A.; ONAYA T. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. **J. Clin. Invest.**, v.101, n.7, p.1296-1300, 1998.

SANTOS, G.C. Citologia da Tireóide – Punção Aspirativa por Agulha Fina. Instituto Fleury Medicina e Saúde. Disponível em:  
<<http://www.institutofleury.org.br>> Acesso em: mai.2007.

SANTOS, A.B.O.; MOYSES, R.A.; POTENZA, A.S.; NETO, J. S. B.; INOUE, M; BENTO, G. N.; NASCIMENTO, C. P.; ARAUJO, C. E. N.; DUTENHEFNER, S.E.; JUNIOR, P.M.; FERRAZ, A.R. Análise crítica dos exames iniciais de seguimento pós tireoidectomia total por carcinoma bem diferenciado. **Rev. Bras. de Cirurgia da Cab. e Pescoço**, v. 36, n.1, p. 2-5, 2007.

SCHLUMBERGER, M.J. Papillary and follicular thyroid carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v.338, n.5, p.205-306, 1998.



SCHULTZ, C.P. The potential role of fourier transform infrared spectroscopy and imaging in cancer diagnosis incorporating complex mathematical methods. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v.1, n.2, p.95-104, 2002.

SCHULTZ C. P.; LIU K.Z.; SALAMON E. A.; RIESE K. T.; MANTSCH H. H. Application of FT-IR microspectroscopy in diagnosing thyroid neoplasms. **Journal of Molecular Structure**, v. 480-481, p. 369-377, 1999.

TURRELL, G.; CORSET, J. **Raman Microscopy** : developments and applications. London: Academic Press, 1996. p.8-11.

TWARDOWSKI, J.; ANZENBACHER, P. **Raman and IR Spectroscopy in Biology and Biochemistry**. New york: Ellis horwood, 1994. p.22-23, 83-85.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol. Rev.**, v.81, p.1097-142, 2001.

**ANEXO A – Certificado do comitê de ética e pesquisa da UNIVAP**



## **ANEXO B – Termo de consentimento livre esclarecido**

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o Corpo Clínico desenvolve pesquisas clínico-científicas, as quais possibilitam conhecer melhor os mecanismos da doença, oferecendo novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Estes estudos são realizados em fragmentos de tumores removido em cirurgias. Você está sendo admitido nesta Clínica para estabelecimento de diagnóstico e tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há necessidade da remoção do tumor para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo, principalmente o diagnóstico histopatológico. O restante do tumor que é retirado, não é utilizado, sendo descartado, conforme Legislação Sanitária regulamentada sobre o assunto.

Um fragmento do tumor será encaminhado para um projeto de pesquisa, previamente submetido à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa da Clínica de Cirurgia de Cabeça e Pescoço São Paulo, através da utilização da Espectroscopia Raman para estudos de materiais biológicos, com ênfase em tecidos com câncer de tireóide, a qual fornece informações bioquímicas detalhadas, diferenciando tecidos benignos de tecidos malignos, através de alterações microscópicas detectadas por espectroscopia óptica. O fragmento do tumor será identificado no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordamos com o uso do material para fins acima descritos, é necessário esclarece-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar materiais para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, no seu tratamento.

Dúvidas ou questões sobre o Termo de Consentimento poderão ser esclarecidos pelo seu médico.

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 concordando com o teor.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável ou Paciente

Nome:

RG:

RGH:

## ANEXO C – Artigo enviado para publicação

# Thyroid tissue analysis through Raman spectroscopy

Caroline S. B. Teixeira,<sup>\*,a</sup> Renata A. Bitar,<sup>a</sup> André B. O. Santos,<sup>a</sup> Marco A. V. Kulcsar,<sup>a</sup> Celso U. M. Friguglietti,<sup>a</sup> Herculano S. Martinho,<sup>b</sup> Emilia Â. L. Arisawa,<sup>a</sup> Ricardo B. da Costa<sup>a</sup> and Airton A. Martin<sup>a</sup>

Received 15th December 2008, Accepted 15th January 2009

First published on the web Xth XXXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b000000x

The diagnosis of thyroid pathologies is usually made by cytologic analysis of the fine needle aspiration (FNA) material. However, this procedure has a low sensitivity at times, presenting a variation of 2% to 37%. The application of optical spectroscopy in the characterisation of alterations could result in the development of a minimally invasive and non-destructive method for the diagnosis of thyroid diseases. Thus, the objective of this work was to study the biochemical alterations of tissues and hormones (T3 and T4) of the thyroid gland by means of molecular vibrations of the FT-Raman spectra. Through the discriminative linear analysis of the Raman spectra of the tissue, it was possible to establish (in percentages) the correct classification index among the groups: goitre adjacent tissue, goitre nodular region, follicular adenoma, follicular carcinoma and papillary carcinoma. As a result of the comparison between the groups goitre adjacent tissue *versus* goitre nodular region, an index of 58.3% of correct classification was obtained; this percentage was considered low, and it was not possible to distinguish the Raman spectra of these groups. Between goitre (nodular region and around) *versus* papillary carcinoma, the index of correct classification was 64.9%, which was considered good. A relevant result was obtained in the analysis of the benign tissues (goitre and follicular adenoma) *versus* malignant tissues (papillary and follicular carcinomas), for which the index was 72.5% and considered good. It was also possible, by means of visual observation, to find similar vibrational modes in the hormones and pathologic tissues. In conclusion, it was possible to identify some biochemical alterations, represented by the FT-Raman spectra, that could possibly be used to classify histologic groups of the thyroid. However, more studies are necessary due to the difficulty in setting a standard for pathologic groups.

## Introduction

The thyroid is considered the most important organ of endocrine function in the body. Its hormone secretions play an important role in the normal growth and development, as well as contribute to the homeostasis, which controls heat and energy production. Any alteration in the synthesis and secretion of the thyroidal hormones can result in growth retardation, vascular diseases, lung and kidney dysfunctions, chronic constipation, neuromuscular alterations, central neural system related symptoms, and anaemia, among other related pathologies.<sup>1</sup> Apart from the complex hormonal action that is reflected in a secondary form in many organs of the body, the gland itself can be injured; for example, neoplasias, which have been considered more important, can damage the gland and are more difficult to diagnose. The thyroid is one of the most reactive organs of the body and, of all the endocrine glands, is the one that contains the most important hormones. The thyroid responds to many stimuli and is in a constant state of adaptation. During puberty, pregnancy and

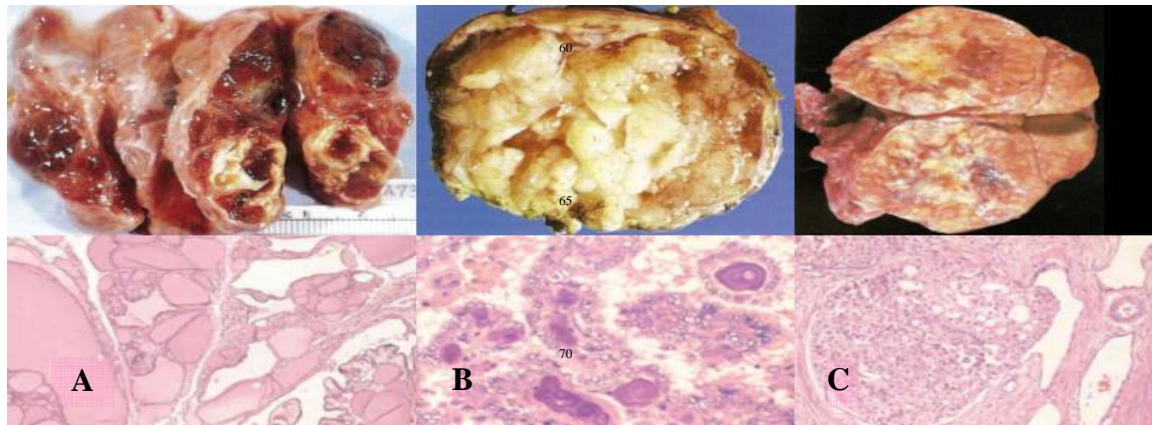
psychological stress of any description, the gland increases its size and becomes more active. This functional instability reflects on the hyperplasia of the thyroidal epithelium. At that moment, the thyroglobulin is re-absorbed, and the follicle cells become higher and columnar, sometimes forming small crooked buttons or papilla. When the stress disappears the involution of the gland occurs; that is, the height of the epithelium decreases, colloid accumulates and the follicle cells regain their normal shape and size. Alterations in this equilibrium between hyperplasia and involution could cause changes, accentuated or not, in the normal histologic standard.<sup>2</sup>

The occurrence rate of the thyroidal palpable nodule, in general, is between 4% and 7%; however, with the advent of the ultrasonography, the occurrence increases to 30%, proving the high mitogenic capacity of the tissue. The nodules are mostly benign injures, either toxic or nontoxic, such as the colloid goitre or follicular adenomas, and only a small amount corresponds to cancer. The thyroidal carcinomas have their origin in two types of cells: medullary carcinoma, originating from the parafollicular cells; and the neoplasias of the follicular epithelium, with around 1% corresponding to anaplastic carcinoma, the most deadly thyroidal follicular carcinoma. The Hurtle adenomas and carcinomas, also of follicular origin, represent the most common form of endocrine neoplasia.<sup>3</sup>

<sup>a</sup>Universidade do Vale do Paraíba/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Av. Shishima Hifumi 2911 Urbanova CEP 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil; Tel: +55 12 3947-116.

E-mail: carolsbt@uol.com.br

<sup>b</sup> Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, 09090-400, Santo André, São Paulo, Brazil.



**Fig. 1** A: Nodular goitre. The gland shows rough nodules and contains fibrous areas and cystic alterations. B: thyroid papillary carcinoma. It contains well-formed papillas covered in cells for which the nuclei appear to be hollow, called nuclei in “orphan Annie eye”. C: follicular carcinoma. The tumor has a pale beige colour and contains small haemorrhage foci.

The diagnosis of thyroid pathologies usually occurs in the following order: anamnesis, ultrasonography and laboratory exams. Recently, a fine needle aspiration (FNA) could be required, where the cells collected are cytologically analyzed. From the FNA, if the suspected malignancy is confirmed, a surgical procedure (partial or total thyroidectomy) is advised so that, after the material is sent for histologic analysis (anatomical pathologic analysis), the medical diagnostic can be concluded.

The FNA is currently the most accepted procedure for diagnosing thyroid injuries, as it is a very useful and cost-effective tool. However, the sensitivity of this procedure for the thyroid is at times poor, with a high rate of false-negative results, and the variation ranges from 7% to 37%.<sup>4</sup> The differentiation of hyperplastic nodule (goitre), follicular adenoma or follicular carcinoma is difficult. The accuracy of the method is doubtful in these cases, and other alternatives and further methods are necessary to make the diagnosis more precise for such obscure injuries to the cytopathologic diagnosis.<sup>4</sup> False-negative results occur due to an ordinary mistake in sampling, which may occur in small tumours and samples associated with inflammations and degenerative changes next to the thyroidal parenchyma. In addition, some groups of injuries are difficult to interpret as being malignant or benign, and thus, the follicular injuries of colloid goitre are difficult to determine. The cytopathologic diagnoses of follicular adenoma and follicular carcinoma are complicated due to the fact that they depend on the histologic access to the capsular and vascular invasion perception. It is, therefore, vital to find new ways to detect the biochemical and cellular changes, in order to perfect the diagnosis and prognosis of thyroidal diseases. This is especially essential where the cytological diagnosis fails because the tumour cells were not extracted with FNA, and the cancer remains undiagnosed.<sup>5</sup>

It is important to note that at times the incorrect diagnosis leads the patient to surgery without appropriate urgency and indication. Because of its complex function, the thyroid has infinite controversies since the diagnosis until the medical opinion, not only regarding the cytologic and histologic analyses, but also regarding the clinical conduct (hormone regulation) and surgical procedure (partial or total thyroidectomy). As for the histologic

difficulty, the fact is justified by the interpretative similarity of the tissue and its pathologies. According to Hedinger, Williams and Sobin (1998)<sup>6</sup>, there are variations among the thyroidal diseases, and the pleomorphism of the follicular cells can be contradictory when indicating malignancy. These cells are characterised by nuclear alterations in shape and size that become hyperchromatic. This can occur in hyperplasias, chronic thyroiditis, and in glands that might have been exposed to external radiation or radiotherapy.<sup>6</sup>

Considering the variations of the thyroid diseases and the difficulty of the morphologic diagnosis, the necessity of further techniques to distinguish benign and malignant characteristics of the thyroid lesion is evident. It is known that these diseases, with no exception, are caused by biochemical changes in the cells and/or tissues. Thus, the current challenge of modern medicine is to find an analytic technique that investigates these alterations through minimally invasive and non-destructive methods. Few analytic methods fulfil these requirements and are sensitive enough to reveal details of the biochemical composition and structure.<sup>7</sup>

Among the new techniques recently presented, optical biopsy by Raman spectroscopy is one of the most promising ones, due to the biochemical alterations that can be detected by the optical spectroscopy through the disease's characteristic spectral signs. This study was intended to reduce the disadvantages of the conventional biopsy and aimed to analyse the biochemical alterations in thyroidal tissues through Raman spectroscopy. In addition, an analysis of the synthetic thyroid hormones (T3 and T4) was performed, with the purpose of characterizing them in the spectra of tissues with pathologic alterations. Different aspects could be detected by the Raman spectroscopy method that can contribute and complement the clinic diagnosis of thyroidal pathologies.

## Materials and methods

The experimental procedure was submitted to analysis and accepted by the Research Ethics Committee under protocol number H281/CEP/2007. All patients agreed to provide thyroid fragments for this research under Post-Informed Consent.

After the surgical procedure (thyroidectomy), 27 fragments of the thyroid were collected from 18 patients, comprising the following histologic groups: goitre adjacent tissue, goitre nodular tissue, follicular adenoma, follicular carcinoma and papillary carcinoma.

The removed samples were conserved in Nalgene® cryogenic tubes in liquid nitrogen (-196°C) until the spectroscopic analysis. For the FT-Raman experiment, the samples were thawed in physiologic saline (0.9%) at room temperature and then cut in fragments with scalpel blade number 15. The samples were positioned in the centre of an aluminium sample holder for the spectral acquisition. The equipment utilised was a FT-Raman spectrometer (Bruker RFS 100/S; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany), with an Nd-YAG excitation laser centred at 1064 nm, with an intensity of 300mW. For the experiment, 600 scans were performed, with spectral resolution of 4 cm<sup>-1</sup>.

Three spectra of each fragment were collected, for 80 spectra total; these were classified as follows: 33 for goitre adjacent tissue, 27 for goitre nodular region, 3 for follicular adenoma and 14 for papillary carcinoma, as shown in Table 1.

**Table 1** Relation between final histopathologic report, number of samples and spectra acquired per sample.

Sample Type	Samples	Spectra
Goitre adjacent tissue	11	33
Goitre nodular region	09	27
Follicular Adenoma	01	03
Papillary Carcinoma	05	14
Follicular Carcinoma	01	03
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>80</b>

All the spectra were pre-processed automatically using a routine constructed in the software Matlab 6.1. (Vanderbilt University, Tennessee, USA). The procedure included in this routine involved the calculation of the mobile median and the use of the fifth degree polynomial to subtract the base line, followed by vector normalization. The post-statistical analysis was performed using the software Minitab.

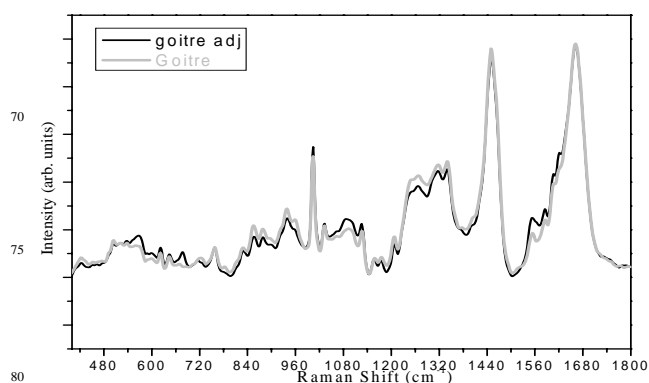
After the experiments, the samples were stocked in 10% formaldehyde and submitted to the standard procedure of lamination HE. In order to confirm the diagnosis, the samples were then sent to two pathologists for cytopathologic evaluation, according to the Brazilian Society of Clinical Pathology thyroid neoplasia diagnosis criteria.

The hormones T3 (Liothyronine sodium) and T4 (Levothyroxine sodium) were obtained commercially from the supplier Pharma Nostra. The synthetic T3 and T4 hormones in powder form were placed in the 2mm<sup>3</sup> gap of an aluminium sample holder. Two spectra were collected, one for each hormone, in the 400 to 3020 cm<sup>-1</sup> FT-Raman band. The parameters used for each of the spectra were as follows: 100 mW intensity of the excitation laser (Nd:YAG), 200 scans, laser beam width of 7 mm, and spectral resolution of 1 cm<sup>-1</sup>. The pre-processing of the spectra was also performed with the Matlab 6.1 routine. For the FT-Raman band I at 400 to 1800 cm<sup>-1</sup>, the baseline was corrected using a second-degree polynomial, and for band II at 2800 to 3020 cm<sup>-1</sup>, a first-degree polynomial was used. It was then possible to construct a chart where the relevant vibrational modes in the differentiation

of the hormones were related (Table 14), when comparing the spectral data of the pathologic tissues.

## Results and Discussion

For the analysis and differentiation of the pathologies, it was necessary to conjugate the spectra in different forms. Figure 2 represents the median between the goitre adjacent tissue spectrum, named goitre adj and shown in black, and the goitre nodular region spectrum (goitre) shown in grey. The data were disposed in this way because the samples of the tissue adjacent to the injury belong to the control group of this study; however, all of the samples that are theoretically normal would receive a histologic report of adenomatous goitre. As the doubt between normal thyroid and adenomatous goitre regarding histology and cytology is real and the articles about the real differentiation of both are scarce, this study also must verify the difference between both tissues in the FT-Raman spectroscopy.



**Fig. 2** Median between the spectra of the goitre adjacent tissue, black line, and the nodular region goitre, grey line.

In Table 2, the relevant vibrational modes are described for the differentiation of the adjacent tissue to the injury and nodular goitre region. The first column represent the peaks or the regions that were the most differentiated between the spectra, and the second column shows the vibrational modes based on the study performed by Movasaghi, Rehman and Rehman (2007) <sup>10</sup> with the probable vibrational modes in biologic tissue. Lastly, in the third column, the tissue of most intensity can be observed.

**Table 2** Vibrational modes in the differentiation of the injury adjacent tissue and goitre nodular region.<sup>10</sup>

PEAK	ASSIGNMENT	PATHOLOGY
573 cm <sup>-1</sup>	Tryptophan/cytosine, guanine	Goitre adjacent tissue
600 cm <sup>-1</sup>	Nucleotide conformation	Goitre adjacent tissue
678 cm <sup>-1</sup>	Ring breathing modes in the DNA bases G (ring breathing modes in the DNA bases)/ C-2'-endo-anti	Goitre adjacent tissue
720 cm <sup>-1</sup>	DNA	Goitre nodular region
780 cm <sup>-1</sup>	Uracil-based ring breathing mode	Goitre nodular region
856 cm <sup>-1</sup>	Amino acid side chain vibrations of proline &	Goitre nodular region



	hydroxyproline, as well as a (C-C) vibration of the collagen backbone Hydroxyproline (collagen type I)	
879 cm <sup>-1</sup>	Hydroxyproline, tryptophan	Goitre nodular region
937 cm <sup>-1</sup>	Proline, hydroxyproline, $\nu$ (C-C) skeletal of collagen backbone	Goitre nodular region
960 cm <sup>-1</sup>	Symmetric stretching vibration of $\nu_1$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (phosphate of HA) Calcium-phosphate stretch band (high quantities of cholesterol) Quinoid ring in-plane deformation	Goitre nodular region
1000 cm <sup>-1</sup>	Phenylalanine Bound & free NADH	Goitre adjacent tissue
1087- 90 cm <sup>-1</sup>	C-C stretch PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> Symmetric phosphate stretching vibrations	Goitre adjacent tissue
1123 cm <sup>-1</sup>	(C-N), proteins (protein assignment) C-C stretching mode of lipids & protein, C-N stretch Glucose	Goitre adjacent tissue
1208 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), tryptophan, phenylalanine (protein assignment) tryptophan A,T (ring breathing modes of the DNA/RNA bases)-amide III (protein)	Goitre nodular region
1246 cm <sup>-1</sup>	Amide III (of collagen)	Goitre nodular region
1268/9 cm <sup>-1</sup>	Amide III (collagen assignment)	Goitre nodular region
1319 cm <sup>-1</sup>	Guanine (B,Z-marker) CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> twisting (collagen assignment)	Goitre nodular region
1337/9 cm <sup>-1</sup>	Tryptophan CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging, twisting and/or bending mode of collagens & lipids CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging & twisting mode in collagen, nucleic acid & tryptophan	Goitre nodular region
1401 cm <sup>-1</sup>	Bending modes of methyl groups (one of vibrational modes of collagen)	Goitre nodular region
1448 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> deformation CH <sub>2</sub> deformation CH <sub>2</sub> Collagen	Goitre nodular region Goitre adjacent tissue
1552 cm <sup>-1</sup>	Tryptophan $\nu$ (C=C), tryptophan (protein assignment)	Goitre adjacent tissue
1585 cm <sup>-1</sup>	C=C bending mode of phenylalanine C=C olefinic stretch C=C olefinic stretch (protein assignment)	Goitre adjacent tissue
1603 cm <sup>-1</sup>	C=C in plane mode of phenylalanine & tyrosine Ring C-C stretch of phenyl (I)	Goitre adjacent tissue
1618 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C=C), tryptophan (protein assignment) $\nu$ (C=C), porphyrin tryptophan	Goitre adjacent tissue

	Bound & free NADH	
1665 cm <sup>-1</sup>	Amide I (of collagen) Amide I Amide I (collagen assignment) Amide I (disordered structure-solvated) $\nu_s$ (C=O)	Goitre nodular region Goitre adjacent tissue

Important results were obtained by the statistical analysis by fundamentally using the analysis of the main components of the spectra, associated with the cluster analysis and linear discriminative analysis. The values for each component are expressed in Table 3.

**Table 3** Eigenvalue PCA of Goitre adj vs. Goitre

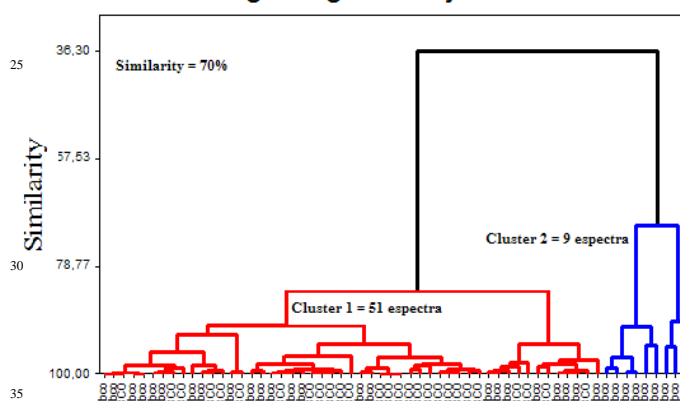
Goitre adj vs. Goitre	Eigenvalue	Variability	Accumulated
PC1	56.8	94.8%	
PC2	1.3	2.1%	96.9%
PC3	0.381	0.6%	97.5%
PC4	0.321	0.5%	98.0%

In Table 4, the number of spectra per cluster (and the sample percentage per cluster) are shown when PC1 and PC2 were submitted to the cluster analysis. The classification performed by clusters is justified by the fact that there are two groups of injuries in the analysis, and in this way, it is possible to verify if the groups are similar or distinct. The spectral-spread can be visualised in the dendrogram in figure 3.

**Table 4** Number of spectra per Cluster and the Distance (Linear Discriminant Analysis) in the goitre adj. versus goitre comparison.

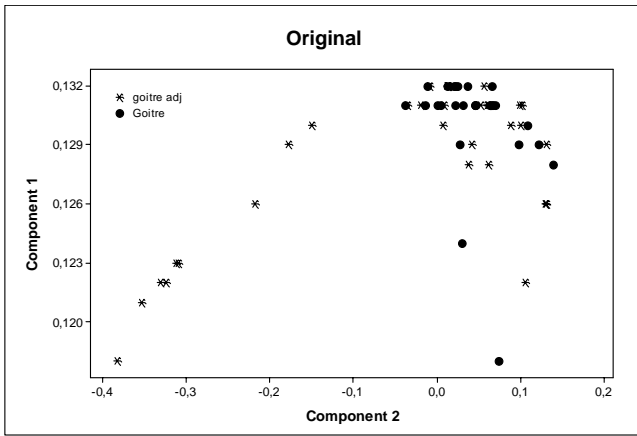
Goitre adj vs. Goitre	Quantity	Distance
Cluster 1	51 (85%)	0.332
Cluster 2	9 (15%)	

**Dendrogram goitre adj X Goitre**

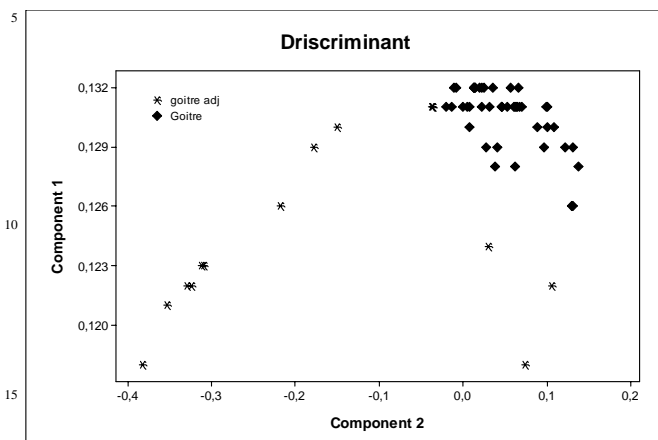


**Fig. 3** Dendrogram figure with cluster analysis of the adjacent tissue and goitre nodular region.

Continuing with the use of the component scores, another way to verify the similarity or distinction of the groups can be done by the Discriminant Analysis (Figs. 4 and 5).



**Fig. 4** Chart of the dispersion of groups in the original classification for the adjacent tissue and goitre nodular region.



**Fig. 5** Chart of the discriminant analysis for the adjacent tissue and goitre nodular region.

According to Layfield Wax and Jones (2003)<sup>8</sup>, there are studies and criteria that attempt to separate the follicular neoplasms of the hyperplastic nodules and colloid goitre, but the criteria to differentiate hyperplasias and nodular goitre from the normal thyroidal tissue are seldom discussed in the literature. Colloidal goitre is diagnosed when there is abundant colloid but significant injuries do not exist. Similarly, hyperplastic nodules or adenomatous nodules are diagnosed by small amounts of colloid and a lack of superior degrees of injuries.<sup>8</sup>

In accordance with the obtained results, there are some biochemical alterations between the two kinds of tissue, injury adjacent area and adenomatous goitre central area. These alterations were observed through the difference between the vibrational modes that compose the spectra (Table 2); however, according to the statistical analysis, these spectral modifications are not significant enough to represent a relevant separation between them.

By the Cluster analysis, represented in the dendrogram in Figure 3, 85% of the spectra belong to Cluster 1 and 15% to Cluster 2, representing a 70% similarity rate among all spectra. By the discriminant analysis (Figure 5 and Table 5), the general percentage of classification among the spectra was 58.3%, which was a low classification percentage.

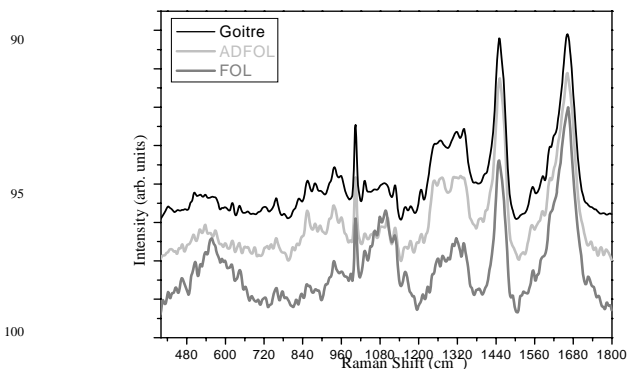
**Table 5** Classification percentage of the discriminant function in goitre adj. vs. goitre.

Correct Classification	
goitre adj	33 %
Goitre	88.9%
Geral	58.3%

The data described justify the statement of Layfield, Wax and Jones (2003)<sup>8</sup> that adenomatous goitre is a hyperplasia, with no considerable cellular alterations; this also justifies the similarity between normal thyroid and adenomatous goitre, or adjacent and central tissues of a goitre injury. Alcântra-Jones et al. (2006)<sup>9</sup> developed an observational study to verify the cytologic standard of the normal thyroidal tissue obtained through aspiration and nonaspiration punctures in corpses, in which an anatomic dissection of the thyroid was proceeded and the cytoaspiration performed in 38 cases. Two pathologists, not knowing the correspondence between cytology and histology, in a double-blind study, analysed the smears and histologic cuts. The normal thyroid was given a cytologic diagnosis of adenomatous goitre in 70.4% of cases for one observer and 92.6% for the other. It can be concluded that the cytologic aspect of the normal thyroid in corpses was similar to the adenomatous goitre.<sup>9</sup> This study reflects very well the doubt related to the cytology and histopathology of the thyroid, where not even the normal tissue can be differentiated from the pathologic tissue, making it very difficult to merge. In addition, this justifies the fact that head/neck doctors defend the total thyroidectomy, considering that the partial thyroidectomy is a risky method.

In this study, it was also concluded that there is similarity between the normal thyroid and the adenomatous goitre, as the samples also received a histologic report of adenomatous goitre and the spectra did not separate them in a relevant manner. As a result, uniting the 11 samples of injury adjacent tissue and the 9 samples of goitre nodular area, we formed a group of 20 samples of adenomatous goitre.

Another difficulty for the histology is to differentiate the “follicular standard”; that is, it is difficult to note the difference between adenomatous goitre, follicular adenoma and follicular carcinoma. In Figure 6, the black line represents the median of the adenomatous goitre spectra, the grey line represents the median of the follicular adenoma spectra and the dark grey line represents the median of follicular carcinoma spectra.



**Fig. 6** Median of the adenomatous goitre spectra (black line), follicular adenoma (grey line) and follicular carcinoma (dark grey line).

Table 6 presents the differences between the vibrational modes of these pathologies. Due to the low number of samples, justified by the low occurrence of follicular carcinoma, the statistical analysis of this conjugation was not performed. However, it is important to point out the spectral difference and biochemical modifications present in the spectra of the tissues analysed in this study.

**Table 6** Relevant vibrational modes in the differing of adenomatous goitre in comparison to follicular adenoma and follicular carcinoma.<sup>10</sup>

PEAK	ASSIGNMENT	PATHOLOGY
509 cm <sup>-1</sup>	S-S disulfide stretching band of collagen $\nu$ (S-S) <i>gauche-gauche-gauche</i> (amino acid cysteine)	Follicular carcinoma Follicular adenoma Goitre nodular region
524 cm <sup>-1</sup>	S-S disulfide stretching in proteins Phosphatidylserine $\nu$ (S-S) <i>gauche-gauche-gauche</i> (amino acid cysteine)	Follicular adenoma Follicular carcinoma Goitre nodular region
540 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (S-S) <i>gauche-gauche-gauche</i> (amino acid cysteine)	Follicular adenoma Follicular carcinoma Goitre nodular region
555 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (S-S)	Follicular carcinoma Follicular adenoma Goitre nodular region
573 cm <sup>-1</sup>	Tryptophan/cytosine, guanine	Follicular adenoma
600 cm <sup>-1</sup>	Nucleotide conformation	Follicular adenoma Follicular carcinoma Goitre nodular region
618 cm <sup>-1</sup>	C-C twisting (protein)	Goitre nodular region Follicular adenoma Follicular carcinoma
643 cm <sup>-1</sup>	C-C twisting mode of tyrosine	Follicular carcinoma Follicular adenoma Goitre nodular region
666 cm <sup>-1</sup>	G, T (ring breathing modes in the DNA bases)- tyrosine-G backbone in RNA	Follicular carcinoma Follicular adenoma
678 cm <sup>-1</sup>	Ring breathing modes in the DNA bases G (ring breathing modes in the DNA bases)/ C-2'-endo-anti	Follicular carcinoma
690 cm <sup>-1</sup>	Ring breathing modes in the DNA bases	Follicular adenoma
700 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (S-S) <i>trans</i> (amino acid methionine)	Follicular carcinoma
735 cm <sup>-1</sup>	C-S stretch (one of three thiocyanate peaks, with 2095 & 445 cm <sup>-1</sup> )	Follicular adenoma
780 cm <sup>-1</sup>	Uracil-based ring breathing mode	Follicular carcinoma Goitre nodular region Follicular adenoma
811 cm <sup>-1</sup>	O-P-O stretching RNA	Follicular adenoma Goitre nodular region
820 cm <sup>-1</sup>	Protein band Structural protein modes of tumours Proteins, including collagen I	Follicular carcinoma Follicular adenoma Goitre nodular region
831 cm <sup>-1</sup>	Asymmetric O-P-O stretching, tyrosine	Follicular carcinoma Follicular adenoma
856 cm <sup>-1</sup>	Amino acid side chain vibrations of proline & hydroxyproline, as well as a (C-C) vibration of the collagen backbone Hydroxyproline (collagen type I)	Follicular adenoma Goitre nodular region Follicular carcinoma

893/5/6 cm <sup>-1</sup>	Phosphodiester, deoxyribose	Follicular adenoma
915 cm <sup>-1</sup>	Ribose vibration, one of the distinct RNA modes (with 915 and 974 cm <sup>-1</sup> )	Follicular carcinoma
937 cm <sup>-1</sup>	Proline, hydroxyproline, $\nu$ (C-C) skeletal of collagen backbone	Follicular adenoma Goitre nodular region Follicular carcinoma
960 cm <sup>-1</sup>	Symmetric stretching vibration of $\nu_1$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (phosphate of HA) Calcium-phosphate stretch band (high quantities of cholesterol) Quinoid ring in-plane deformation	Follicular adenoma Follicular carcinoma Goitre nodular region
974 cm <sup>-1</sup>	Ribose vibration, one of the distinct RNA modes (with 915 and 974 cm <sup>-1</sup> )	Follicular carcinoma
980 cm <sup>-1</sup>	C-C stretching $\beta$ - sheet (proteins) =CH bending (lipids)	Follicular carcinoma
1000 cm <sup>-1</sup>	Phenylalanine Bound & free NADH	Goitre nodular region Follicular adenoma Follicular carcinoma
1048 cm <sup>-1</sup>	Glycogen	Follicular carcinoma
1064 cm <sup>-1</sup>	Skeletal C-C stretch of lipids Acyl chains $\nu$ (C-C) <i>trans</i>	Follicular carcinoma Follicular adenoma
1078 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C) or $\nu$ (C-O), phospholipids Pronounced symmetric phosphate stretch Phospholipids C-C or C-O stretch mode of phospholipids Carbohydrate peak for solids C-C or C-O stretch (lipid), C-C or PO <sub>2</sub>	Follicular carcinoma Follicular adenoma
1095 cm <sup>-1</sup>	Lipid C-N Phosphodioxy group (PO <sup>2-</sup> in nucleic acids)	Follicular carcinoma Follicular adenoma
1173 cm <sup>-1</sup>	Cytosine, guanine	Follicular adenoma Goitre nodular region
1200 cm <sup>-1</sup>	Nucleic acids and phosphates Aromatic C-O and C-N	Follicular adenoma
1208 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), tryptophan, phenylalanine (protein assignment) tryptophan A,T (ring breathing modes of the DNA/RNA bases)-amide III (protein)	Goitre nodular region Follicular adenoma Follicular carcinoma
1224 cm <sup>-1</sup>	Amide III $\beta$ - sheet structure	Follicular carcinoma
1258 cm <sup>-1</sup>	Amide III, adenine, cytosine	Follicular carcinoma Goitre nodular region
1290 cm <sup>-1</sup>	Cytosine	Follicular carcinoma
1319 cm <sup>-1</sup>	Guanine (B,Z-marker) CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> twisting (collagen assignment)	Follicular carcinoma Goitre nodular region
1330 cm <sup>-1</sup>	Typical phospholipids Region associated with DNA & phospholipids Collagen Nucleic acids phosphates	Follicular adenoma
1337/9 cm <sup>-1</sup>	Tryptophan CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging, twisting and/or bending mode of collagens & lipids CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging & twisting	Follicular carcinoma Goitre nodular region Follicular adenoma

	mode in collagen, nucleic acid & tryptophan	
1386 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>3</sub> band	Follicular adenoma Follicular carcinoma
1448 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> deformation CH <sub>2</sub> deformation CH <sub>2</sub> Collagen	Goitre nodular region Adenoma Follicular Follicular carcinoma
1485 cm <sup>-1</sup>	G, A (ring breathing modes in the DNA bases) Nucleotide acid purine bases (guanine and adenine)	Follicular carcinoma
1525 cm <sup>-1</sup>	In-plane vibrations of the conjugated -C=C-	Follicular carcinoma
1585 cm <sup>-1</sup>	C=C bending mode of phenylalanine C=C olefinic stretch C=C olefinic stretch (protein assignment)	Goitre nodular region Follicular adenoma
1665 cm <sup>-1</sup>	Amide I (of collagen) Amide I Amide I (collagen assignment) Amide I (disordered structure-solvated) ν <sub>s</sub> (C=O)	Follicular carcinoma Follicular adenoma Goitre nodular region
1729 cm <sup>-1</sup>	Ester group	Follicular carcinoma Follicular adenoma
1747 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> bending mode of proteins & lipids CH <sub>2</sub> deformation (protein vibration) δ as (CH <sub>3</sub> ) δ(CH <sub>2</sub> ) of proteins	Follicular adenoma Follicular carcinoma

According to Table 6, it can be noted that some peaks appear in all three spectra, that is, the chemical conjugations are present in all three tissue types, although with different intensities among them. These regions could be similar to those considered characteristic of the normal thyroidal tissue. However, there are also characteristic peaks for only one or two types of injuries, those being the modes of more relevance to differentiate the pathologies for they are exclusive and representative peaks of tissue alteration.

The adenomatous goitre is the most similar injury to the normal tissue, and in the spectra, all of its main peaks are associated with the injury. The follicular adenoma, on the other hand, has isolated peaks at 573 cm<sup>-1</sup>, 690 cm<sup>-1</sup>, 735 cm<sup>-1</sup>, 893 cm<sup>-1</sup> and 1330 cm<sup>-1</sup>, for example. The characteristic peaks for follicular carcinoma are at 678 cm<sup>-1</sup>, 700 cm<sup>-1</sup>, 915 cm<sup>-1</sup>, 974 cm<sup>-1</sup>, 980 cm<sup>-1</sup>, 1224 cm<sup>-1</sup>, 1290 cm<sup>-1</sup>, 1485 cm<sup>-1</sup> and 1525 cm<sup>-1</sup>.

Another important point for medicine and histology would be the greater understanding of malignant and benign injuries, since many times the histologic report relates malignancy suspicion, causing an inconclusive diagnostic. The consistency of the report is essential for the medical conduct and prognostic of the disease. According to the point exposed, the data were conjugated to analyse the adenomatous goitre, papillary carcinoma and follicular carcinoma (Fig. 7 and Table 7).

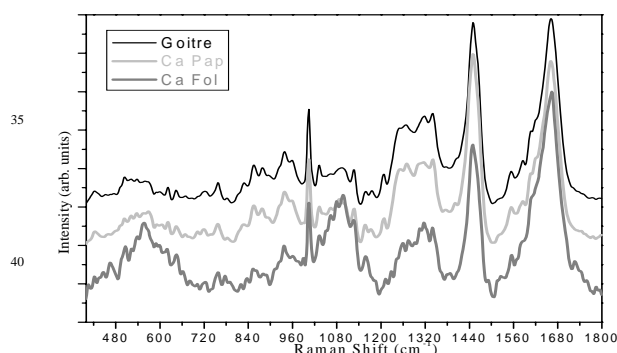


Fig. 7 Median of the adenomatous goitre spectra (black line), papillary carcinoma (grey line) and follicular carcinoma (dark grey line).

Table 7 Relevant vibrational modes of the adenomatous goitre in comparison to the papillary carcinoma and follicular carcinoma.

PEAK	ASSIGNMENT	PATHOLOGY
509 cm <sup>-1</sup>	S-S disulfide stretching band of collagen ν(S-S) <i>gauche-gauche-gauche</i> (amino acid cysteine)	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
524 cm <sup>-1</sup>	S-S disulfide stretching in proteins Phosphatidylserine ν(S-S) <i>gauche-gauche-gauche</i> (amino acid cysteine)	Papillary carcinoma Follicular carcinoma Goitre nodular region
540 cm <sup>-1</sup>	ν(S-S) <i>gauche-gauche-gauche</i> (amino acid cysteine)	Papillary carcinoma Follicular carcinoma Goitre nodular region
555 cm <sup>-1</sup>	ν(S-S)	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
600 cm <sup>-1</sup>	Nucleotide conformation	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
618 cm <sup>-1</sup>	C-C twisting (protein)	Goitre nodular region Papillary carcinoma Follicular carcinoma
643 cm <sup>-1</sup>	C-C twisting mode of tyrosine	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
666 cm <sup>-1</sup>	G, T (ring breathing modes in the DNA bases)- tyrosine-G backbone in RNA	Follicular carcinoma Papillary carcinoma
700 cm <sup>-1</sup>	ν(S-S) <i>trans</i> (amino acid methionine)	Papillary carcinoma Follicular carcinoma
735 cm <sup>-1</sup>	C-S stretch (one of three thiocyanate peaks, with 2095 & 445 cm <sup>-1</sup> )	Papillary carcinoma
780 cm <sup>-1</sup>	Uracil-based ring breathing mode	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
820 cm <sup>-1</sup>	Protein band Structural protein modes of tumours Proteins, including collagen I	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
831 cm <sup>-1</sup>	Asymmetric O-P-O stretching, tyrosine	Follicular carcinoma
856 cm <sup>-1</sup>	Amino acid side chain vibrations of proline & hydroxyproline, as well as a (C-C) vibration of the collagen backbone Hydroxyproline (collagen type I)	Papillary carcinoma Goitre nodular region Follicular carcinoma
915 cm <sup>-1</sup>	Ribose vibration, one of the	Follicular carcinoma

	distinct RNA modes (with 915 and 974 cm <sup>-1</sup> )	
937 cm <sup>-1</sup>	Proline, hydroxyproline, $\nu$ (C-C) skeletal of collagen backbone	Papillary carcinoma Goitre nodular region Follicular carcinoma
960 cm <sup>-1</sup>	Symmetric stretching vibration of $\nu_1$ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (phosphate of HA) Calcium-phosphate stretch band (high quantities of cholesterol) Quinoid ring in-plane deformation	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
974 cm <sup>-1</sup>	Ribose vibration, one of the distinct RNA modes (with 915 and 974 cm <sup>-1</sup> )	Follicular carcinoma
980 cm <sup>-1</sup>	C-C stretching $\beta$ -sheet (proteins) =CH bending (lipids)	Follicular carcinoma
1000 cm <sup>-1</sup>	Phenylalanine Bound & free NADH	Goitre nodular region Papillary carcinoma Follicular carcinoma
1048 cm <sup>-1</sup>	Glycogen	Follicular carcinoma
1064 cm <sup>-1</sup>	Skeletal C-C stretch of lipids Acyl chains $\nu$ (C-C) <i>trans</i>	Follicular carcinoma Papillary carcinoma
1078 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C) or $\nu$ (C-O), phospholipids Pronounced symmetric phosphate stretch Phospholipids C-C or C-O stretch mode of phospholipids Carbohydrate peak for solids C-C or C-O stretch (lipid), C-C or PO <sub>2</sub>	Follicular carcinoma
1095 cm <sup>-1</sup>	Lipid C-N Phosphodioxo group (PO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> in nucleic acids)	Follicular carcinoma
1173 cm <sup>-1</sup>	Cytosine, guanine	Goitre nodular region Papillary carcinoma
1208 cm <sup>-1</sup>	$\nu$ (C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ), tryptophan, phenylalanine (protein assignment) tryptophan A,T (ring breathing modes of the DNA/RNA bases)-amide III (protein)	Papillary carcinoma Goitre nodular region Follicular carcinoma
1224 cm <sup>-1</sup>	Amide III $\beta$ -sheet structure	Follicular carcinoma
1258 cm <sup>-1</sup>	Amide III, adenine, cytosine	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
1290 cm <sup>-1</sup>	Cytosine	Follicular carcinoma
1319 cm <sup>-1</sup>	Guanine (B,Z-marker) CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> twisting (collagen assignment)	Follicular carcinoma Goitre nodular region Papillary carcinoma
1337/9 cm <sup>-1</sup>	Tryptophan CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging, twisting and/or bending mode of collagens & lipids CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> wagging & twisting mode in collagen, nucleic acid & tryptophan	Follicular carcinoma Goitre nodular region Papillary carcinoma
1373 cm <sup>-1</sup>	T,A,G (ring breathing modes of the DNA/RNA bases)	Follicular carcinoma Papillary carcinoma
1401 cm <sup>-1</sup>	Bending modes of methyl groups (one of vibrational modes of collagen)	Papillary carcinoma
1448 cm <sup>-1</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> deformation CH <sub>2</sub> deformation	Papillary carcinoma Goitre nodular

	CH <sub>2</sub> Collagen	Follicular carcinoma
1485 cm <sup>-1</sup>	G, A (ring breathing modes in the DNA bases) Nucleotide acid purine bases (guanine and adenine)	Follicular carcinoma
1525 cm <sup>-1</sup>	In-plane vibrations of the conjugated -C=C-	Follicular carcinoma
1585 cm <sup>-1</sup>	C=C bending mode of phenylalanine C=C olefinic stretch C=C olefinic stretch (protein assignment)	Goitre nodular region Papillary carcinoma
1665 cm <sup>-1</sup>	Amide I (of collagen) Amide I Amide I (collagen assignment) Amide I (disordered structure-solvated) $\nu_s$ (C=O)	Follicular carcinoma Papillary carcinoma Goitre nodular region
1729 cm <sup>-1</sup>	Ester group	Follicular carcinoma

Proceeding with the analysis to separate the benign and malignant injuries, the multivariate statistical methods were used for the differentiation. In the first analysis, samples of adenomatous goitre and papillary carcinoma (PAP) were studied due to the higher amount of samples present in each group. Lastly, an analysis of all the samples was performed: adenomatous goitre, follicular adenoma, follicular carcinoma and papillary carcinoma (benign group vs. malignant group).

10

**Table 8** Eigenvalue of the PCA of Goitre vs. PAP.

Goitre vs. PAP	Eigenvalue	Variability	Accumulated
PC1	69.9	94.6%	
PC2	1.5	2.1%	96.7%
PC3	0.604	0.8%	97.5%
PC4	0.396	0.5%	98.0%

**Table 9** Eigenvalue of the PCA of Benign vs. Malignant.

Benign vs Malign	Eigenvalue	Variability	Accumulated
PC1	75,1	93,9%	
PC2	2,2	2,7%	96,6%
PC3	0,636	0,8%	97,4%
PC4	0,414	0,5%	97,9%

15 Tables 10 and 11 demonstrate the number of spectra per cluster, which can also be observed in the dendrogram in Figs. 8 and 9.

**Table 10** Quantity of spectra per cluster and its distance in Goitre vs. PAP.

Goitre vs. PAP	Quantity	Distance
Cluster 1	62 (84%)	0.281
Cluster 2	12 (16%)	

20

**Table 11** Quantity of spectra per cluster and its distance in Benign vs. Malignant.

Benign vs. Malignant	Quantity	Distance
Cluster 1	65 (81%)	0.262
Cluster 2	15 (19%)	

By the analysis of the cluster using the main components presented in Tables 8 and 9, it can be noted that the distance between the clusters diminished as we aggregated the mode spectral data. In Table 10, the distance was 0.281, while in Table 11 the result was 0.62, showing the diminishing of the spectral spread, especially in the analysis of the malignant versus benign injuries. A separation was reached with 73.37% similarity (Fig.9).

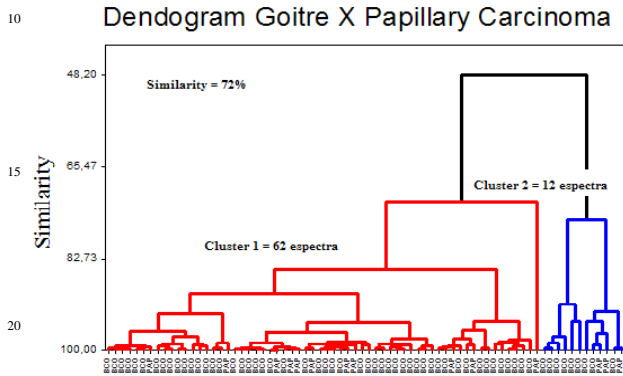


Fig. 8 Dendrogram with the cluster analysis of the adenomatous goitre and papillary carcinoma.

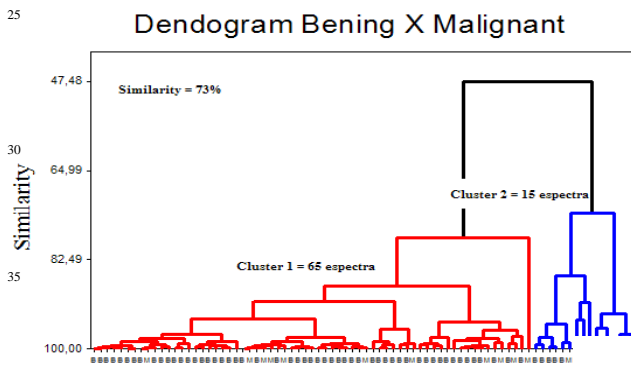


Fig. 9 Dendrogram of the cluster analysis to separate the malignant and benign injuries.

Figures 11 and 13 show the discriminative analysis. The use of these variables creates an “index” or “discriminant function” that represents, with parsimony, the difference between the groups.

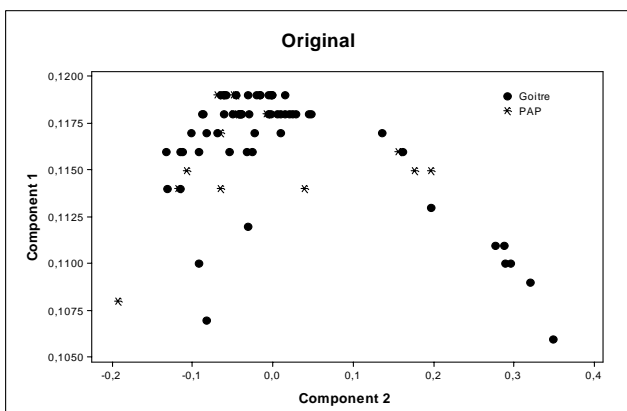


Fig. 10 Chart of the dispersion of groups in the original classification for the goitre and papillary carcinoma.

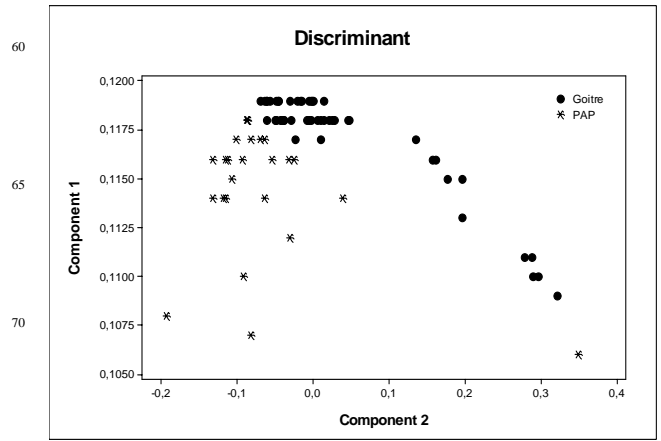


Fig. 11 Graph of the discriminant analysis of the adenomatous goitre and papillary carcinoma.

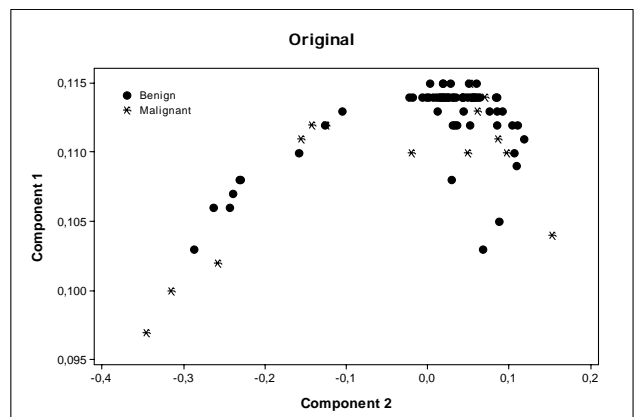


Fig. 12 Chart of the dispersion of groups in the original classification for the benign and malignant injuries.

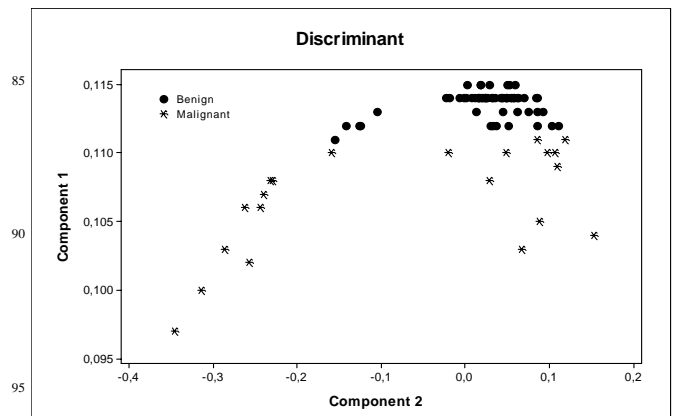


Fig. 13 Graphic of the discriminant analysis between benign and malignant injuries.

Table 12 Classification percentage of the discriminant function in goitre vs. PAP.

Correct Classification	
Goitre	70.0%
PAP	42.9%
General	64.9%

Comparing the statistical methods, the best result was obtained by the discriminant analysis, since when analysing the clusters and its dendograms, the classification was not favourable. Important data that need to be verified are the individual percentages of each group. In the benign vs. malignant analysis, these percentages were higher, reaching nearly 80% in the benign injuries (Table 13).

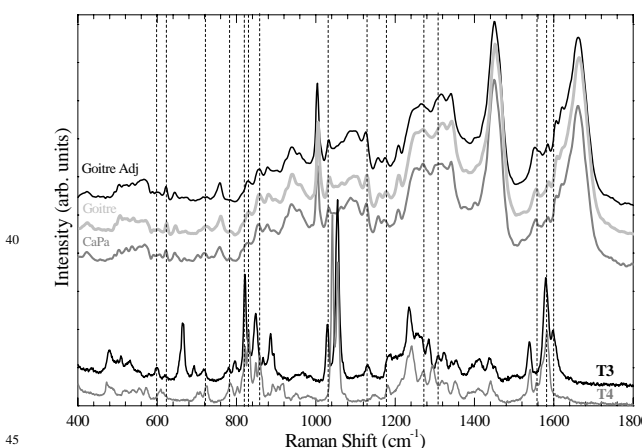
**Table 13** Classification percentage of the discriminant function in benign vs. malignant.

Correct Classification	
Benign	79.4%
Malignant	47.1%
General	72.5%

Analysing Tables 5, 12 and 13 with the correct classification percentages for the general group, it is clear that with the conjugation between the groups, this percentage increased. For the groups goitre adjacent tissue versus goitre nodular region, a result of 58.3% of correct classification was obtained; this percentage was low, and it was not possible to discriminate the FT-Raman spectra of these two groups. Between goitre (nodular region and periphery) and papillary carcinoma, the correct classification index was 64.9%, which was considered good. However, relevant results were obtained in the analysis of the spectra in the benign tissues (goitre and follicular adenoma) versus malignant tissues (papillary and follicular carcinomas) analysis, for which the percentage was 75.5%, which was considered very good.

Continuing with the study of the thyroid gland, it was verified that it is also important to analyse the hormones, considering that the main function of this organ is to synthesise T3 and T4, components that are utilised as polypeptidic extracellular reserves in the colloid inside the follicular lumen of the thyroidal cells.

Utilising the synthetic hormones, the characteristic spectra for the T3 and T4 were collected for comparison with the spectra of goitre adjacent tissue, goitre nodular goitre and papillary carcinoma.



**Fig. 14** Median of the spectra of T3 and T4 hormones – the black and dark grey spectral lines in the lower part of the graph. Median of the spectra for the goitre adjacent tissue (black line), goitre nodular region (grey line) and papillary carcinoma (dark grey line) in the upper part of the graph.

In figure 14, the bands of the hormonal compounds correlated well to different tissues. The vibrational spectroscopy appears from the vibration of the atoms in molecules; that is, this method gives information on a molecular level. The spectra could bring direct information related to the biochemical composition of the constituents, allowing the study of functional groups, native chemical ligation and molecular conformation. Certain groups of atoms form a band that occurs at the same frequency independent of the molecule structure, which is called the characteristic band. For this reason, in Table 14, the vibrational modes of the T3 and T4 hormones and also gland tissue are shown.

**Table 14** Vibrational mode of T3 and T4 hormones, as well as goitre adjacent tissue, goitre nodular region and papillary carcinoma.<sup>10,11</sup>

PEAK	ASSIGNMENT	PATHOLOGY
600 cm <sup>-1</sup>	Nucleotide conformation	T3 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma
618 cm <sup>-1</sup>	C-C twisting (protein)	T3 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma
722 cm <sup>-1</sup>	DNA β (15)	T4 T3 Papillary carcinoma Goitre nodular region Goitre adj tissue
782 cm <sup>-1</sup>	DNA NH <sub>3</sub> +wag	T4 T3 Papillary carcinoma Goitre nodular region Goitre adj tissue
820-30 cm <sup>-1</sup>	Protein band Structural protein modes of tumours Proteins, including collagen I α/β ring deformation	T4 T3 Goitre nodular region Goitre adj tissue Papillary carcinoma
856 cm <sup>-1</sup>	Amino acid side chain vibrations of proline & hydroxyproline, as well as a (C-C) vibration of the collagen backbone Hydroxyproline (collagen type I) β (12)	T4 Goitre nodular region Papillary carcinoma Goitre adj tissue
1030 cm <sup>-1</sup>	Phenylalanine of collagen ν(C-C) skeletal, keratin (protein) δ (C-H), phenylalanine (protein) α (9)	T3 Goitre nodular region Goitre adj tissue Papillary carcinoma
1130 cm <sup>-1</sup>	C-C skeletal stretch transconformation Phospholipid structural changes (trans versus gauche isomerism) δOH <sub>i,p</sub>	T3 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma
1180 cm <sup>-1</sup>	Cytosine, Guanine νCβ-O	T3 T4 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma
1270 cm <sup>-1</sup>	Typical phospholipids Amide III band in proteins  CH <sub>2</sub> twist	T4 Papillary carcinoma Goitre nodular region Goitre adj tissue

1290 cm <sup>-1</sup>	Cytosine β(6)	T3 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma
1560 cm <sup>-1</sup>	Tryptophan α (1); α (1)-β (2); β (2)	T4 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma
1582 cm <sup>-1</sup>	δ(C=C), phenylalanine β (2); β (2)+ α (1); β (1)-α (1)	T3 T4 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma
1598 cm <sup>-1</sup>	C=N and C=C stretching in quinoid ring β (1); β (1); β (1)+ α (1);	T3 Goitre adj tissue Goitre nodular region Papillary carcinoma

The spectra in figure 14 were included to enable the analysis of the hormone peaks with similar vibrations to those found on the biological tissues. The ligation frequency or atomic vibrations normally merge, forming spectra that are difficult to understand. For that reason, the many probable modes for each region were related as hypotheses; for example, the region of 722 cm<sup>-1</sup> for biological tissues could be attributed to the DNA vibrational mode or mode β (15) of hormones T3 and T4 present on colloids or follicles. It is also important to verify the intensity of these coincident peaks when it is known that the level of these hormones can vary according to the pathology.

## Conclusions

The heterogeneity of the thyroid gland should be noted in this study. In the same sample, two or three injuries were analysed together, which makes it difficult to cytopathologically and histopathologically report on the injuries when a consolidated difference between them cannot be found. This difficulty was also present in the FT-Raman spectroscopy method, suggesting the use of this technique as a complement of the diagnosis of pathologies.

By the discriminative analysis of the spectra obtained through the FT-Raman spectroscopy method, the goitre adjacent tissue and goitre nodular region are considered similar, as described by the histology, due to the low classification percentage. Uniting these data (goitre adjacent tissue and goitre nodular region), another group was formed, total goitre versus papillary carcinoma, and there was a good discrimination between goitre and papillary carcinoma. The classification index became bold and considerable when the spectra of follicular adenoma and follicular carcinoma were included. Therefore, benign injuries (goitre adjacent tissue, goitre nodular region and follicular adenoma) and malignant injuries (follicular and papillary carcinoma) could be classified.

Regarding the difficulty in differentiating what is called the "follicular standard", some differences were noted in the spectral conformation of the adenomatous goitre group compared to the follicular adenoma and follicular carcinoma group. The adenomatous goitre is the injury most similar to the normal tissue, and in the spectra obtained in this study, the main peaks were associated with another pathology. On the other hand, the

follicular adenoma presented isolated peaks at 573 cm<sup>-1</sup>, 690 cm<sup>-1</sup>, 735 cm<sup>-1</sup>, 893 cm<sup>-1</sup> and 1330 cm<sup>-1</sup>, as well as the follicular carcinoma, which presented characteristic peaks at 678 cm<sup>-1</sup>, 700 cm<sup>-1</sup>, 915 cm<sup>-1</sup>, 974 cm<sup>-1</sup>, 980 cm<sup>-1</sup>, 1224 cm<sup>-1</sup>, 1290 cm<sup>-1</sup>, 1485 cm<sup>-1</sup> and 1525 cm<sup>-1</sup>. These data are nothing but the native ligation nature modifications present in each injury, which brings relevant data to differentiate and complement the "follicular standard" studies.

The gland tissue is in fact very complex. Any modification or mutation that may occur, combined with the hormone synthesis, interferes in the spectral analysis, as it generates clashing information due to the high number of functional groups vibrating at the same time. However, in Figure 14, it is possible to verify the hormones' vibrating peaks which, in the future, will allow the dosage through the FT-Raman spectroscopy method and at the same time study its isolated interference on the tissues.

## Acknowledgements

The authors thank Prof.<sup>a</sup> Anita Mahadevan-Jansen for fruitful discussions and also for the background subtraction routine. The authors also thank for Brazilian agencies FAPESP (01/14384-8) and CNPQ.

## References

- 1 F.S Greenspan, G. J Strewler, *Basic & Clinical Endocrinology*, Appleton and Lange, Stamford, 1997.
- 2 S.L Robbins, R.S Cotran, V Kumar, *Pathologic Basis of Disease*, WB Saunders, Philadelphia, , 1984.
- 3 S. Matsuo, L. Martins, S.G. Leoni, D. Hajjar, J.C. Ricarte-Filho, K.N. Ebina, and E.T. Kimura, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*, 2004, **48**, 114-124.
- 4 P. Rout and S. Shariff, *Cytopathology*, 1999, **10**, 171-179.
- 5 K.Z. Liu, C.P. Schultz, E. A. Salamon, A. Man, and H.H. Mantsch, *Journal of Molecular Structure*, 2003, **661**, p.397-404.
- 6 C. Hedinger, E.D. Williams, L.H. Sobin, *Histological typing of thyroid tumours*, Springer-Verlag, WHO International Histological Classification of Tumors, Berlin, 1998.
- 7 R. A. Bitar, H. S. Martinho, C. J. T. Criollo, L. N. Z. Ramalho, M. M. Netto., A. A. Martin, *Journal of Biomedical Optics*, 2006, **11**, 540001.
- 8 L.J. Layfield, T. Wax, C. Jones, *Cancer (cancer cytopathology)*, 2003, **99**, 217-222.
- 9 D. M. Alcântara-Jones, J. S. Miranda, S. S. Matos, C. M. P. Queiroz, L. M. B. Araújo, M. A. V. Rêgo, A. M. Santana, B. F. Lessa, and C. E. M. Nunes, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2006, **42**, 45-50.
- 10 Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, *Appl. Spectrosc.*, 2007, **42**, 493-541.
- 11 R.M.S Alvarez, R.N. Farias, and P. Hildebrandt, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2004, **35**, 947-255.