

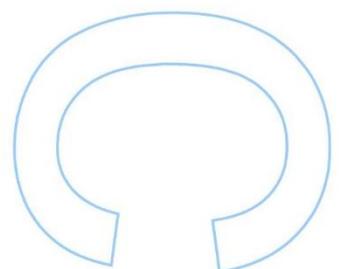
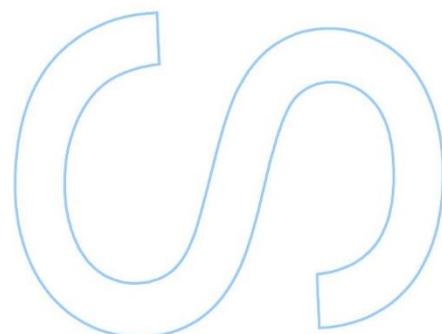
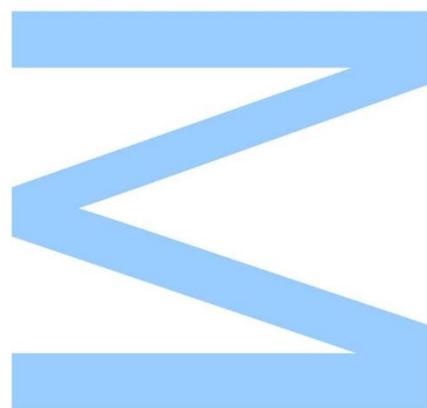
Discriminação de lesões cancerosas do estômago por espectroscopia Raman

Joana Filipa Ferreira Moreira

Física Médica
Departamento de Física e Astronomia
2016

Orientador

Joaquim Agostinho Gomes Moreira, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

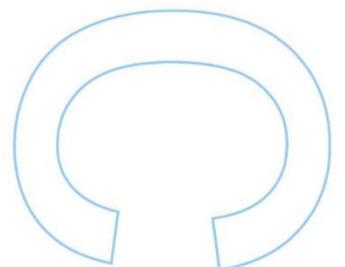
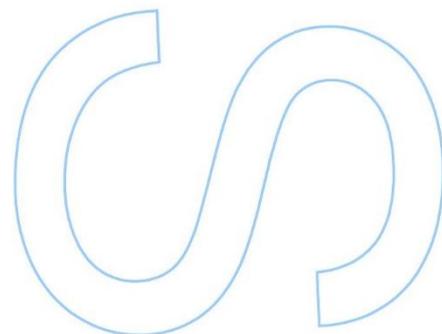
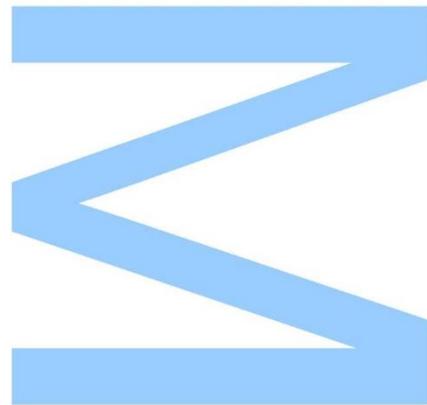




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Em primeiro lugar, o meu sincero agradecimento ao Prof. Doutor Joaquim Agostinho Moreira, pela sua orientação e apoio ao longo do desenvolvimento desta dissertação. Obrigada pela constante motivação e disponibilidade.

Gostaria ainda de agradecer:

À Prof^a. Doutora Cristina Ribeiro, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha dissertação e por permitir a minha integração num centro de investigação de tão elevada qualidade e exigência.

À Doutora Maria Lázaro, pela simpatia, por todas as vezes que preparou o equipamento e ajudou a solucionar algum problema técnico.

Ao Prof. Doutor Abílio Almeida por ter estabelecido um elo de ligação essencial com o médico especialista do Instituto Português de Oncologia Professor Francisco Gentil, do Porto, e pelo conhecimento partilhado.

Ao Prof. Doutor Rui Henriques pela disponibilidade e prontidão em facultar as amostras e pelas lições de histologia.

Aos meus colegas, Diana e Juan, por se manterem nesta caminhada comigo até ao fim.

Às minhas amigas, Maria e Marisa, pelo companheirismo e força, por estarem sempre do meu lado.

Ao Artur, pelo carinho e por tudo o que representa para mim.

Por último, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, pelo enorme esforço que fizeram para que eu chegasse aqui, pelo apoio, incentivo, e paciência ao longo deste último ano. A eles devo tudo e dedico este trabalho.

Resumo

Atualmente, a endoscopia digestiva alta com biópsia é a técnica padrão para o diagnóstico do cancro gástrico. É uma técnica invasiva, ineficiente no caso de pacientes com múltiplas lesões suspeitas e, por vezes, atrasa a deteção precoce, fator crucial no aumento da taxa de sobrevivência a esta doença. A espectroscopia Raman é uma técnica ótica de difusão inelástica de luz, sensível aos modos vibracionais das biomoléculas, que fornece informação específica e detalhada acerca da composição molecular estrutural dos tecidos biológicos. Esta técnica espectroscópica é inofensiva, não ionizante e não invasiva, tendo sido já demonstrada a sua aplicabilidade em ambiente clínico, como instrumento acessório de um aparelho endoscópico convencional.

O presente trabalho teve como objetivos o estudo das condições ótimas de aquisição de espectros de difusão Raman em amostras excisadas cirurgicamente do estômago e a comparação dos dados experimentais no sentido de avaliar a adequação da técnica para a discriminação do adenocarcinoma do estômago e dos diferentes estadios da doença. Para o efeito, foram analisadas 9 amostras diferentes de tecido do estômago humano, afetado com adenocarcinoma. Registaram-se espectros na gama espectral 800 – 1800 cm^{-1} , onde se observam modos vibracionais com origem em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos.

A análise das intensidades das bandas permitiu identificar diferenças significativas entre tecido saudável e tumoral. Destacaram-se bandas Raman na região espectral entre 1200 e 1800 cm^{-1} , com origem em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos.

Comparando os espectros de difusão Raman de três grupos de estadiamento (I, III e IV) é possível verificar diferenças significativas entre os espectros de cada grupo, em particular nas gamas espectrais 800 – 1000 cm^{-1} e 1400 – 1800 cm^{-1} . Para além disso, observa-se um aumento na indefinição das bandas Raman à medida que o estadio aumenta.

Abstract

Currently, endoscopic biopsy is the standard criterion for gastric cancer diagnosis but is invasive, impractical for screening patients who may have multiple suspicious lesions and delayed although early detection and early treatment is the most important policy. Raman spectroscopy is a nondestructive, inelastic light scattering technique, capable of providing specific spectroscopic fingerprints of molecular compositions and structures of biological tissues. This spectroscopic technique is non-ionizing and non-invasive, and already have been demonstrated in clinical environment as an accessory of a conventional endoscopic device.

The purpose of this study was finding the optimal conditions for the acquisition of Raman spectra, differentiating cancer from normal tissue and discriminating between various stages of the disease. A total of 9 gastric tissues obtained from 9 patients were used. Raman spectra in the range of 800 – 1800 cm^{-1} were acquired.

Raman spectra showed significant differences between normal and cancer tissue, particularly in the range of 1200 – 1800 cm^{-1} , which contained signals related to proteins, lipids and nucleic acids.

Comparing the Raman spectra of three groups of stages (I, III and IV) it was easy to see significant differences between the spectra of each group, particularly in the spectral range of 800 – 1000 cm^{-1} and 1400 – 1800 cm^{-1} . In addition, there is an increased blurring of the Raman bands as the stage increases.

Keywords: Raman spectroscopy, Gastric cancer

Índice

1. Introdução.....	13
2. Aplicabilidade da Espetroscopia de difusão Raman.....	15
2.1 O Estômago.....	15
2.1.1. Anatomia do Estômago	17
2.1.2 Histologia do Estômago.....	17
2.2 O Cancro do Estômago	19
2.2.1 Meios de diagnóstico	19
2.2.2 Subtipos e Estadiamento	20
2.3 Espetroscopia de difusão Raman: princípios físicos	22
2.3.1 Espetros Raman das principais biomoléculas	28
2.4 Aplicações da espectroscopia Raman no estudo de neoplasias do estômago 40	
2.4.1 Aplicações <i>in vivo</i>	40
2.4.2 Aplicações <i>ex vivo</i>	48
2.4.3 Tratamento de dados e análise estatística.....	52
2.5 Objetivos da dissertação	54
3. Materiais e Procedimento Experimental	55
3.1 Caracterização das amostras.....	55
3.2 Instrumentação	56
3.2.1 Condições de aquisição	57
4. Resultados e Discussão.....	59
4.1 Fatores que influenciam o registo do sinal de difusão Raman	59
4.2 Pré-processamento espectral.....	60
4.3 Apresentação dos espetros e discussão	64
4.3.1 Comparação dos espetros Raman da região saudável: músculo <i>versus</i> mucosa 64	
4.3.2 Discriminação entre tecido saudável e tecido tumoral	65
4.3.3 Discriminação do estadiamento	85
5. Considerações finais, conclusões e perspetivas futuras	90
Referências Bibliográficas.....	93

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tipos de estadio do cancro do estômago (versão simplificada). Adaptado de https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-estomago/estadiamento	20
Tabela 2: Bandas de vibração das amidas. Adaptado da Ref. 13.	30
Tabela 3: Bandas Raman em cm^{-1} das diversas conformações de ADN: A-ADN, B-ADN, Z-ADN. Adaptado da Ref. 17.....	34
Tabela 4: Características das amostras utilizadas neste trabalho.	55
Tabela 5: Características das amostras utilizadas, incluindo características histopatológicas.....	65
Tabela 6: Identificações prováveis dos principais modos vibracionais dos espectros Raman apresentados [1, 3, 4, 5, 13, 16, 19, 24, 25, 27].....	82

Lista da Figuras

Figura 1: Esquema do sistema digestivo humano. Adaptado de http://www.colegiovascodagama.pt/ciencias3c/nono/morfologiadigestivo.html	15
Figura 2: Esquema da morfologia do estômago com indicação das principais partes anatómicas. A secção de corte mostra as camadas musculares e anatomia interna. Adaptado da Ref. 6.....	17
Figura 3: Secção transversal da parede do estômago que ilustra a sua histologia. Adaptado da Ref. 6.....	18
Figura 4: Esquema de corte transversal da parede do estômago e diferentes tipos de estadio do cancro do estômago. Adaptado de https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-estomago/estadiamento	20
Figura 5: Processos de difusão: (a) Sistema material não vibrante: difusão elástica ou de Rayleigh (b) Sistema material elástico: difusão Stokes ($\omega_0 - \Omega k$) e difusão Antistokes ($\omega_0 + \Omega k$).....	25
Figura 6: Três tipos de difusão: Rayleigh, Stokes e Antistokes. Adaptado da Ref. 1... 26	26
Figura 7: Esquema geral de um espectro Raman. Adaptado da Ref. 12.....	27
Figura 8: Modos de vibração da amida I (a) e amida III (b), e relação das posições das respetivas bandas com o tipo de conformação proteica. Adaptado da Ref. 14.	30
Figura 9: Bandas espectrais do triptofano (a) e da tirosina (b). Adaptado da Ref. 15. ..	31
Figura 10: Bandas Raman de lípidos de membrana; PC – L- α -Phosphatidylcholine, PE – L- α -Phosphatidylethanolamine, SM – Sphingomyelin. Adaptado da Ref. 16.....	33
Figura 11: Conformações do ADN: A-ADN, B-ADN e Z-ADN. Adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Z-DNA	35
Figura 12: Bandas Raman do B-ADN, A-ADN e Z-ADN. Adaptado da Ref. 18.	36
Figura 13: Modos vibracionais internos da molécula de água: modo de extensão simétrico ν_1 , modo de extensão assimétrico ν_3 e modo de flexão ν_2 . Adaptado de http://slideplayer.com.br/slide/43519/	37
Figura 14: Espectro de Raman da água com os modos de vibração: o modo de extensão simétrico (ν_1), o modo de flexão (ν_2) e o modo de extensão assimétrico (ν_3). Adaptado de http://rswater.phys.msu.ru/englishVersion/Science/water.html	38
Figura 15: Espectro Raman da água confinada no tecido normal e canceroso da mama comparado com o espectro Raman da água. Adaptado da Ref. 21.....	39

Figura 16: Esquema do sistema de endoscopia Raman guiado por imagem para medições in vivo. WLR, white light reflectance; AFI, autofluorescence imaging; NBI, narrow-band imaging. Adaptado da Ref. 24.....	41
Figura 17: Espectros Raman in vivo do tecido normal (n = 934) e cancerígeno (n = 129). Adaptado da Ref. 24.....	42
Figura 18: Espectros Raman de referência adquiridos da actina, albumina, colagénio, ADN, histonas, pepsinogénio, fosfolípidos e trioleína para modulação bioquímica do tecido gástrico (A); Comparação dos espectros simulados com os espectros medidos para o tecido normal (B) e tecido cancerígeno (C). Adaptado da Ref. 24.....	44
Figura 19: Árvore de classificação ideal gerada pelo método CART utilizando quatro constituintes biomoleculares (albumina, ADN, fosfolípidos e histonas). A árvore de classificação binária é composta por cinco classificadores e seis subgrupos terminais. O processo de tomada de decisão envolve a avaliação do caso em cada nó, atingindo eventualmente um nó terminal com a classificação: normal (B) ou cancro (C). Adaptado da Ref. 24.....	45
Figura 20: Espectros Raman médios da mucosa normal (n=924), úlceras benignas (n=111) e úlceras malignas (67). Adaptado da Ref. 23.....	46
Figura 21: Histograma das intensidades Raman para a mucosa normal (branco), úlcera benigna (tracejado) e úlcera maligna (preto). Adaptado da Ref. 23.....	47
Figura 22: (A) Comparação entre o espectro de Raman médio e normalizado do tecido normal (n=55) e displasia (n=21); (B) Espectro diferença (displasia – normal). Adaptado da Ref. 26.....	49
Figura 23: (a) Comparação dos espectros médios de 70 amostras de estômago normal, 18 de adenocarcinoma de tipo intestinal e 12 adenocarcinoma de tipo difuso; (b) Espectro diferença. Adaptado da Ref. 19.....	50
Figura 24: Espectros Raman da mucosa normal e tumoral. Adaptado da Ref. 4.....	51
Figura 25: Esquema simplificado da desconvolução espectral e combinação linear.....	53
Figura 26: Algumas das amostras de tecidos do estômago, cedidas pelo IPOPGF-Porto.....	56
Figura 27: Ilustração esquemática do sistema micro Raman utilizado e seus principais constituintes. Adaptado da Ref. 22.....	56
Figura 28: Micro espectrómetro Raman utilizado: Raman LabRAM HR800 (Horiba-Jobin), do Instituto de Investigação e Inovação na Saúde (i3S).....	57
Figura 29: Subtração da linha de base da amostra 2: Espectro experimental e resultado do melhor ajuste de um polinómio de 5ª ordem (a); Espectro após a subtração do polinómio (b). Imagens recolhidas através do software LabSpec®.....	62

Figura 30: Correção de intensidade da amostra 2, com indicação da area under curve e parte dos cálculos realizados. Imagens recolhidas através do software KaleidaGraph®.	63
Figura 31: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável das amostras 2, 3, 4 e 9. Os espectros das Amostra 2 e 9 foram adquiridos em zona muscular e os espectros das amostras 3 e 4 foram adquiridos em zona de mucosa. Amostra 2, 3, 4 e 9 com os locais das aquisições espectrais.....	64
Figura 32: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 2 (Adenocarcinoma tubular, estadiamento III) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (azul) e tumoral (verde) da Amostra 2. Os espectros foram selecionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.	68
Figura 33: Espectro diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável da amostra 2: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).....	70
Figura 34: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 3 (Adenocarcinoma misto, tubular e de células pouco coesas, estadiamento I) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (azul) e tumoral (verde) da Amostra 3. Os espectros foram selecionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.....	72
Figura 35: Espectros médios normalizados do tecido normal e tecido com displasia de amostras da mucosa gástrica. Adaptado da Ref. 27.	73
Figura 36: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 4 (Adenocarcinoma tubular, estadiamento IV) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (azul) e tumoral (verde) da Amostra 4. Os espectros foram selecionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.	76
Figura 37: Espectro diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável da amostra 4: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).....	78
Figura 38: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 9 (Adenocarcinoma de células pouco coesas, estadiamento IV) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (vermelho) e tumoral (preto) da Amostra 9. Os espectros foram selecionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.....	80
Figura 39: Espectro diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável da amostra 9: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).....	81
Figura 40: Espectros diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável das amostras 2, 3, 4 e 9: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).	84

Figura 41: Comparação entre os espectros tumorais da amostra 3 (verde) e amostra 6 (amarelo).	85
Figura 42: Comparação entre os espectros tumorais da amostra 7 (rosa) e 8 (cinza). .	86
Figura 43: Comparação entre os espectros tumorais da amostra 4 (verde) e amostra 9 (preto).	87
Figura 44: Comparação dos espectros Raman dos grupos de estadiamento I, III e IV. Espectros selecionados das Figuras 41, 42 e 43 mantendo o mesmo código de cores.	88

Lista de Abreviaturas

UV	Ultravioleta
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
IV	Infravermelho
NIR	Near-infrared
CART	Classification and Regression Tree
ROC	Receiver Operating Characteristic
ACO	Ant Colony Optimization
LDA	Linear Discriminant Analysis
PCA	Principal Component Analysis
PCs	Principal Components
LVs	Latent Variables
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
CCD	Charged-Coupled Device

1. Introdução

O cancro gástrico é um dos cancros mais comuns no mundo e a segunda causa de morte mais comum relacionada com a doença [1]. Em Portugal, no ano de 2014, o tumor maligno do estômago matou 2290 indivíduos, representando uma taxa de mortalidade de 22% [2]. Quando a patologia é detetada num estadio avançado, a taxa de sobrevivência a 5 anos situa-se entre 10% a 20% [1]. Assim, a deteção precoce é de extrema importância no aumento da sobrevivência, pois pacientes nos primeiros estadios da doença, limitada à mucosa ou submucosa, possuem uma probabilidade de sobrevivência de 99% e 96%, respetivamente [1].

Atualmente, a biópsia endoscópica é a técnica padrão para o diagnóstico do cancro gástrico [1]. É uma prática invasiva e ineficiente no caso de pacientes com múltiplas lesões suspeitas. As biópsias são pequenas (cerca de 3 mm de diâmetro) o que pode levar a resultados inconclusivos no diagnóstico e no tipo de adenocarcinoma [1]. Para além disso, o tempo de espera entre o procedimento cirúrgico e a apresentação dos resultados da análise histológica pode ser relativamente longo, o que constitui mais uma desvantagem. Ainda, a técnica pode, em alguns casos, contribuir para a disseminação de células tumorais [3]. Por estes motivos, existe a clara necessidade de investimento no desenvolvimento de métodos de rastreio eficientes na deteção desta patologia.

Técnicas de difusão espectral do sinal eletromagnético resultantes da interação da radiação infravermelha ou visível com tecido biológico, como a espectroscopia infravermelha, de fluorescência e de Raman, têm interessado aos investigadores na área das ciências biomédicas graças à sua rapidez, não invasibilidade, deteção *in situ* e em tempo real e redução dos custos associados à biópsia. Além disto, estas técnicas de análise utilizam radiação não ionizante e não são destrutivas, fornecendo informação dos tecidos ao nível microestrutural e molecular [3]. Em particular, a espectroscopia de difusão Raman apresenta várias vantagens, tais como a alta resolução, alta sensibilidade e especificidade, e alta automação, o que faz com que tenha um elevado potencial na deteção e diagnóstico médico [4]. A difusão Raman tem sido aplicada com sucesso no diagnóstico de diversos tipos de tecidos biológicos, com lesões oncológicas, quer *in vivo* quer *ex vivo*. Em particular na pele e mucosas da boca, onde a exposição do tecido a analisar facilita a aquisição do sinal difundido. O aparelho digestivo representa também um alvo privilegiado, devido ao seu fácil acesso por via endoscópica.

A espectroscopia de difusão Raman é uma técnica de ótica baseada na difusão inelástica da luz por vibrações moleculares, onde a luz incidente é alterada em frequência, dependendo das frequências vibracionais específicas das moléculas do tecido [1, 5]. O espectro Raman apresenta informação relevante quanto à composição química e estrutura molecular dos tecidos biológicos permitindo distinguir entre diferentes tipos de tecidos [5]. Os estudos publicados mostram que este tipo de espectroscopia aplicada a testes biomédicos consegue reproduzir eficazmente mudanças na estrutura de ácidos nucleicos, proteínas, carotenoides, lípidos e outras substâncias depois do aparecimento do cancro, e revelar as diferenças entre tecidos normais e cancerosos a nível molecular [4]. Esta técnica de espectroscopia pode ser implementada num sistema de endoscopia convencional, não havendo necessidade de pré-tratamento das amostras nem de corantes ou marcadores [3].

O presente trabalho teve como objetivos o estudo das condições ótimas de aquisição de espectros de difusão Raman em amostras excisadas cirurgicamente do estômago e a comparação dos dados experimentais no sentido de avaliar a adequação da técnica para a discriminação do adenocarcinoma do estômago e dos diferentes estadios da doença.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos: o Capítulo 1 é uma introdução ao tema estudado, dando ênfase aos objetivos do trabalho. O Capítulo 2 é resultado de um trabalho de pesquisa e revisão bibliográfica, de forma a contextualizar o tema, nomeadamente o órgão em estudo, a patologia, os princípios da técnica utilizada e a sua aplicabilidade na área oncológica. O Capítulo 3 apresenta detalhadamente o procedimento experimental bem como as amostras utilizadas. O Capítulo 4 engloba os resultados experimentais obtidos e a sua respetiva interpretação. Por último, no Capítulo 5 são discutidas as conclusões do trabalho bem como algumas perspetivas futuras.

2. Aplicabilidade da Espectroscopia de difusão Raman

Neste capítulo serão abordados os principais conceitos e apresentada uma revisão crítica do estado de arte sobre a aplicação da espectroscopia de difusão Raman na discriminação de lesões cancerosas do estômago. Primeiramente, será feita uma abordagem muito sucinta da morfologia do estômago e da patologia em estudo. Posteriormente serão abordados os princípios físicos em que a espectroscopia de difusão Raman se baseia, bem como a sua aplicabilidade no campo oncológico, dando ênfase ao cancro gástrico.

2.1 O Estômago

O estômago é um órgão que pertence ao sistema digestivo e encontra-se localizado na parte superior esquerda do abdómen (Figura 1). A sua configuração e tamanho variam de pessoa para pessoa. No mesmo indivíduo, o seu tamanho e forma variam com o decorrer do tempo, dependendo do conteúdo do estômago e postura corporal [6].

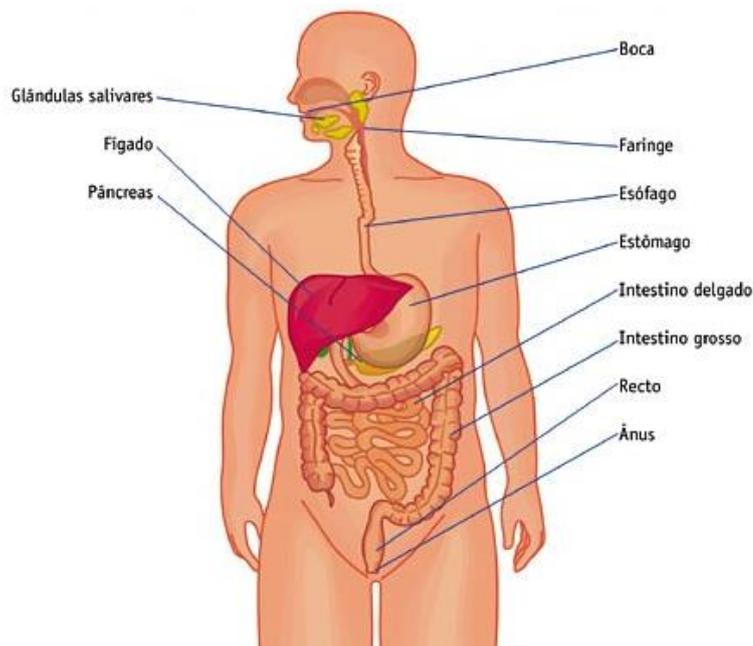


Figura 1: Esquema do sistema digestivo humano. Adaptado de <http://www.colegiovascodagama.pt/ciencias3c/nono/morfologiadigestivo.html>.

Este órgão tem as seguintes funções [6]:

- Armazenamento dos alimentos até que possam ser digeridos;
- Digestão;
- Absorção (por exemplo, água e álcool);
- Mistura e propulsão;
- Proteção (o muco lubrifica e impede a digestão das paredes do estômago; os ácidos gástricos destroem a maioria dos microrganismos).

2.1.1. Anatomia do Estômago

A Figura 2 mostra um esquema da morfologia do estômago e a indicação das principais partes anatómicas deste órgão. Depois de mastigados os alimentos e formado o bolo alimentar, este é engolido e desce pelo esófago. O esófago abre-se para o estômago através do orifício gastro-esofágico inferior ou orifício do cárdia, também denominado esfíncter esofágico inferior, ou cárdia. A região à esquerda do cárdia, designado por fundo, situa-se acima do nível do esfíncter esofágico. A maior região do estômago é o corpo, que curva para a direita, definindo a grande curvatura e a pequena curvatura. O corpo estreita-se, em forma de funil, e forma a região pilórica que se abre para o intestino delgado. A porção mais larga do funil constitui o antro pilórico e a mais estreita, o canal pilórico. À abertura entre o estômago e o intestino delgado dá-se o nome de piloro, e é circundado por um anel de músculo liso relativamente espesso, denominado por esfíncter pilórico, que ajuda a regular o movimento do conteúdo gástrico para o intestino delgado [6].

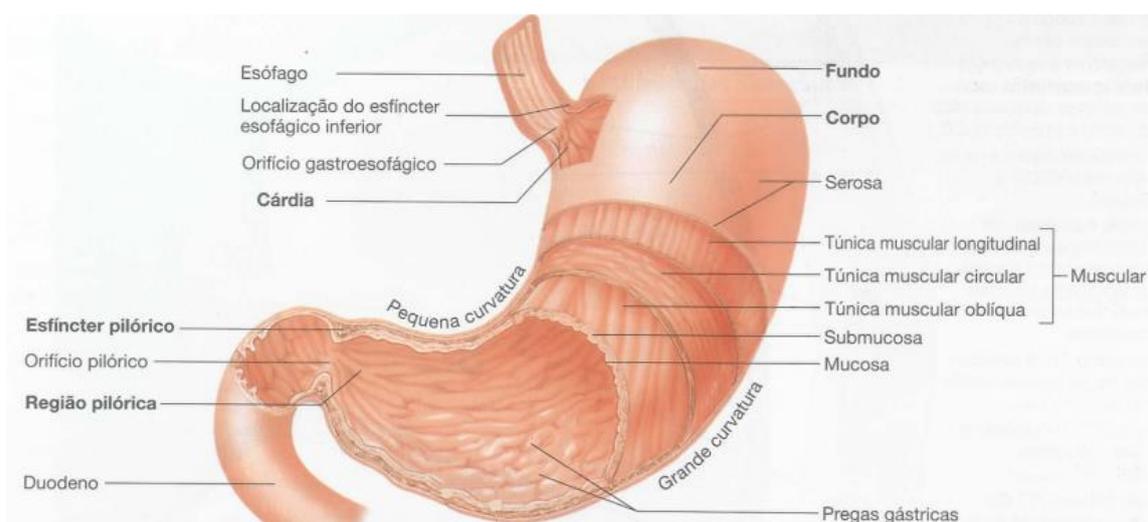


Figura 2: Esquema da morfologia do estômago com indicação das principais partes anatómicas. A secção de corte mostra as camadas musculares e anatomia interna. Adaptado da Ref. 6.

2.1.2 Histologia do Estômago

A Figura 3 mostra um esquema da secção transversal da parede do estômago, evidenciando os diferentes tecidos que a constituem. O estômago é constituído essencialmente por quatro camadas: serosa, muscular, submucosa e mucosa. A serosa é a camada mais externa do estômago e é constituída por uma camada interna de tecido

conjuntivo e por uma camada externa de epitélio pavimentoso simples. A camada muscular é composta por três túnicas: uma externa longitudinal, uma média circular e uma interna oblíqua [6]. Mais profundamente encontram-se a submucosa e a mucosa, sendo esta última a que contacta com os alimentos e segrega o suco gástrico [6]. O estômago é revestido por epitélio cilíndrico simples e as células epiteliais podem ser divididas em cinco grupos. O primeiro é constituído pelas células mucosas de superfície que produzem muco e revestem os orifícios gástricos, protegendo a parede gástrica da agressão dos ácidos e das enzimas digestivas [6]. Os restantes quatro tipos de células epiteliais situam-se nas glândulas gástricas e apresentam funções distintas. As células mucosas do colo são as que produzem o muco, as células parietais produzem ácido clorídrico e fator intrínseco, as células principais produzem pepsinogénio, e as células endócrinas produzem hormonas reguladoras [6].

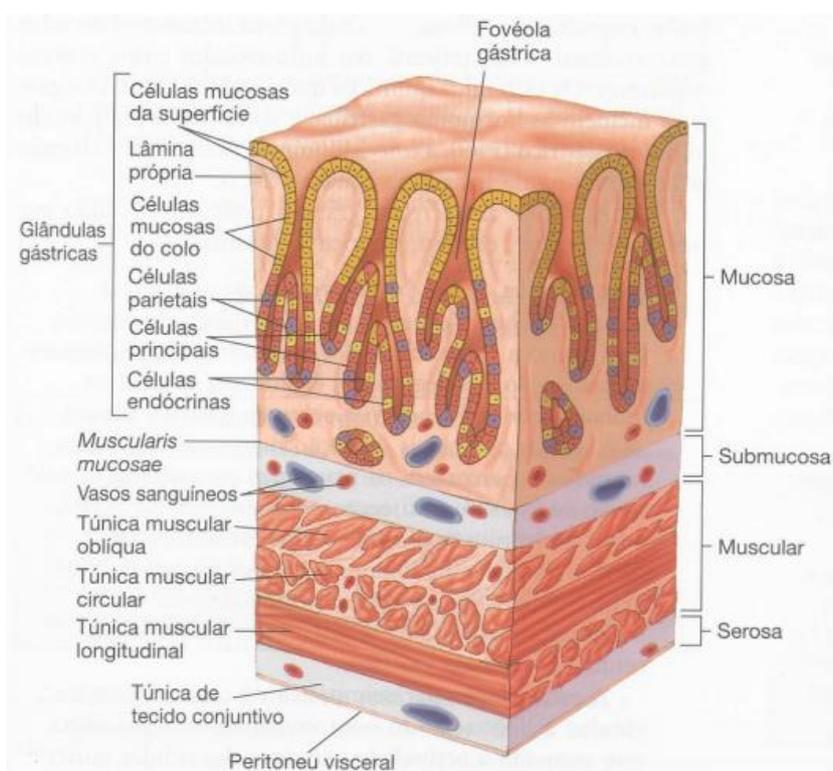


Figura 3: Secção transversal da parede do estômago que ilustra a sua histologia. Adaptado da Ref. 6.

2.2 O Cancro do Estômago

O cancro do estômago é o quarto cancro mais comum a nível mundial e representa uma das piores sobrevivências aos 5 anos para a doença oncológica, sendo responsável por 107 000 mortes anualmente [7, 8]. A maior incidência de casos ocorre no leste da Ásia, América do Sul e leste da Europa, enquanto que os Estados Unidos da América e Europa Ocidental apresentam a menor incidência a nível mundial [7]. A nível nacional, o maior número de casos ocorre no norte e interior do país [2]. A incidência tem diminuído ao longo das últimas décadas e está associada a um conjunto de fatores resultantes da melhoria do nível de vida das populações, nomeadamente o aumento da refrigeração, maior facilidade no acesso a frutas e vegetais frescos, diminuição no consumo de sal, decréscimo no consumo de tabaco e diminuição da frequência da infeção por *Helicobacter pylori* [7, 8]. O aumento da refrigeração para além de garantir uma melhor conservação dos alimentos evita a salga e o fumeiro, métodos de conservação que se têm verificado como responsáveis no desenvolvimento de lesões cancerosas no estômago, entre outras patologias.

Existe uma maior predisposição para o sexo masculino e para a raça negra [2, 8]. Em Portugal, no ano de 2010, a taxa bruta de incidência de tumores malignos do estômago por 100 000 habitantes, para o sexo masculino foi de 34,8%, cerca de 13,5% superior ao sexo feminino [2]. Uma pequena percentagem de pacientes pode ter predisposição genética hereditária [7].

2.2.1 Meios de diagnóstico

Não existe nenhum teste laboratorial simples que facilite o diagnóstico e a deteção do cancro gástrico [8]. As modalidades de eleição para a deteção são a endoscopia digestiva alta, com luz branca, onde, no caso de o médico observar alguma alteração suspeita no estômago, pode efetuar uma biópsia gástrica, e o exame baritado [8, 9]. A endoscopia digestiva alta é um exame que permite analisar, através da boca, o tubo digestivo alto (esófago, estômago e duodeno), sendo que para tal é utilizado um tubo flexível, o gastroscópio, com uma pequena câmara que faz a transmissão de imagens de elevada definição do tubo digestivo para um monitor. O exame baritado consiste num exame radiológico do tubo digestivo após ingestão de um meio de contraste. O médico pode também proceder a um exame físico, palpando o abdómen

para detetar a presença de fluidos, inchaço ou outras alterações, bem como verificar a existência de gânglios linfáticos aumentados. Podem também ser solicitados exames adicionais, como tomografia computadorizada, tomografia por emissão de positrões e análises para verificar, por exemplo, a existência de sangue oculto nas fezes.

2.2.2 Subtipos e Estadiamento

O cancro do estômago pode ser de vários tipos, sendo os mais comuns os adenocarcinomas, linfomas do estômago e sarcomas do estroma gastrointestinal [10].

O adenocarcinoma é o tipo mais frequente (cerca de 90% dos casos) e tem origem no epitélio [7]. Pode subdividir-se em intestinal e difuso, de acordo com a sua aparência histológica [7]. O linfoma tem origem nas células do tecido linfóide do estômago. O sarcoma do estroma gastrointestinal tem origem no tecido conjuntivo [10].

O estadiamento é o processo pelo qual se avalia se as células do cancro se espalharam do estômago para outras estruturas próximas ou mais distantes [10]. A Figura 4 apresenta um esquema de corte transversal da parede do estômago e dos diferentes estádios da doença. O estádio do cancro do estômago pode ser classificado em 0, I, II, III e IV e cada um destes apresenta as suas características específicas, que estão sumarizadas na Tabela 1.

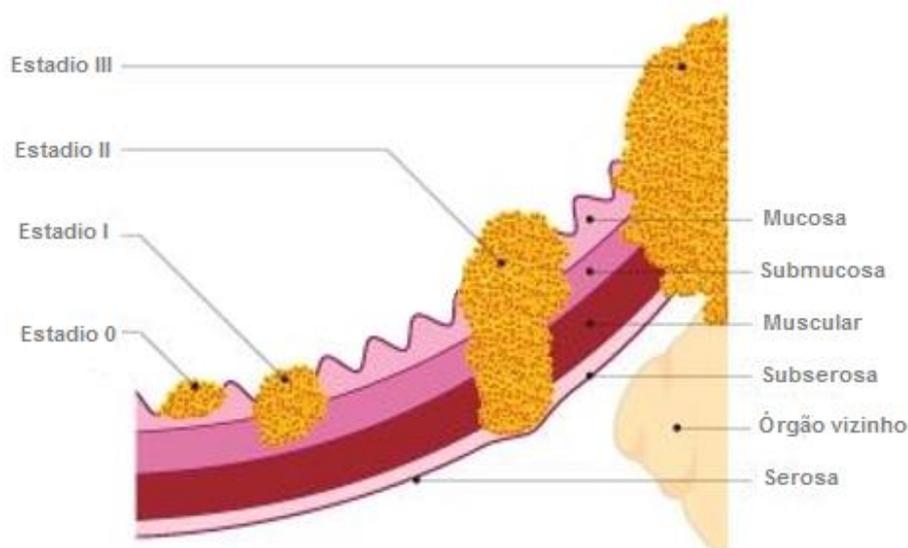


Figura 4: Esquema de corte transversal da parede do estômago e diferentes tipos de estádio do cancro do estômago. Adaptado de <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-estomago/estadiamento>.

Tabela 1: Tipos de estadios do cancro do estômago (versão simplificada). Adaptado de <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-estomago/estadiamento>.

Estadio	Características
0	Cancro localizado apenas na mucosa; pequena dimensão.
I	Cancro invadiu até à submucosa; pode ter invadido 1 ou 2 gânglios linfáticos.
II	Cancro invadiu até à camada serosa; pode ter invadido 7 ou mais gânglios linfáticos.
III	Cancro invadiu órgãos vizinhos.
IV	Cancro espalhou-se para órgãos à distância.

2.3 Espetroscopia de difusão Raman: princípios físicos

A espectroscopia de difusão Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional baseada na difusão inelástica de luz. A difusão inelástica é um fenómeno onde a frequência dos fótons muda em consequência da interação com a amostra. No caso da difusão Raman, a radiação incidente interatua com a amostra provocando a excitação de vibrações moleculares ou fonões. As diferenças de frequência dos fótons difundidos e incidentes são pequenas, comparativamente à frequência dos próprios fótons. Estas diferenças de frequência são iguais às frequências próprias dos modos vibracionais internos (vibrações intramoleculares), modos de rede (movimentos intermoleculares) em sólidos, ou modos rotacionais de moléculas em líquidos e gases [3]. A mudança de frequência, direção de propagação e estado de polarização da radiação incidente providencia informação relevante acerca da constituição química e estrutural da amostra [1].

O processo físico subjacente à difusão Raman é facilmente descrito a partir de um modelo clássico, embora este apresente algumas limitações que adiante serão discutidas. O princípio físico pode ser resumido como se segue. Quando a luz monocromática, normalmente com origem num laser, incide num material, o seu campo elétrico oscilante força oscilações no sistema formado pelos átomos que constituem o material, gerando momentos dipolares oscilantes. A amplitude de oscilação dos dipolos induzidos é modulada pelas vibrações atómicas que têm valores de frequência muito inferiores à frequência da radiação utilizada [3]. A título exemplificativo, a frequência da luz laser vermelha é 450 THz, enquanto que a frequência do fonão é apenas 10 THz. A radiação difundida tem origem na radiação dipolar. No que se segue, considera-se que o campo elétrico da radiação incidente é descrito por uma onda plana e monocromática:

$$\vec{E}_{inc}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 \cdot e^{-i(\omega_0 t - \vec{k} \cdot \vec{r})} + c. c. \quad (1)$$

sendo $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ o módulo do vetor de propagação, $\omega_0 = kc$ a frequência angular da onda eletromagnética, e \vec{E}_0 o vetor amplitude que define o estado de polarização da radiação incidente. De um modo geral, \vec{E}_0 tem componentes complexas. No que se segue, e sem perda de generalidade, admitiremos que \vec{E}_0 tem componentes reais, estando a onda eletromagnética linearmente polarizada.

O campo elétrico da onda incidente, ao interatuar com a amostra, induz dipolos elétricos. Na situação mais simples, pode admitir-se que os dipolos induzidos são proporcionais ao campo elétrico. Deste modo, a componente i do momento dipolar \vec{p} pode ser escrita da seguinte forma [3]:

$$p_i(\vec{r}, t) = \sum_j \alpha_{ij} E_j(\vec{r}, t) \quad (2)$$

sendo α_{ij} os elementos do tensor de polarizabilidade do meio material e E_j as componentes cartesianas do campo elétrico. Os elementos do tensor de polarizabilidade elétrica são funções das coordenadas normais de vibração [3]. Considerando que a amplitude da vibração atômica é pequena, pode expandir-se cada elemento α_{ij} numa série de potência dos modos normais:

$$\alpha_{ij}(Q) = \alpha_{ij}^0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots \quad (3)$$

Na equação 3, α_{ij}^0 corresponde ao elemento do tensor de polarizabilidade do sistema na configuração de equilíbrio, as derivadas dos elementos do tensor de polarizabilidade em ordem às coordenadas normais de vibração são calculadas em relação à configuração de equilíbrio, e os somatórios estendem-se a todos os modos normais Q_k do sistema material. Os termos lineares nas coordenadas normais dão origem ao processo de difusão Raman, enquanto que os termos de ordem superior à primeira dão origem à difusão híper-Raman. No que se segue, apenas se consideram os termos de expansão em série até à primeira ordem, inclusive.

Antes de avançar com o desenvolvimento do modelo, é importante citar que o comprimento de onda da radiação que é comum utilizar em experiências de difusão Raman é da ordem de 10^4 a 10^5 nm. Este valor é várias ordens de grandeza superior à distância interatômica em moléculas ou aos parâmetros da célula unitária de cristais ($1 - 10 \text{ \AA}$). Assim sendo, pode admitir-se que o campo elétrico da radiação eletromagnética tem variações espaciais muito suaves em distâncias correspondentes aos comprimentos de ligação ou à célula unitária, podendo, numa boa aproximação, considerar-se uniforme e apenas ter em atenção a sua dependência temporal. Para

além disto, pode-se considerar que, a temperatura constante e para vibrações de pequena amplitude, os modos normais são harmónicos, de frequência angular Ω_k .

$$Q_k(t) = Q_{0k} e^{-i(\Omega_k t + \phi_k)} \quad (4)$$

Sendo Q_{0k} a amplitude do modo normal e ϕ_k a sua fase.

Deste modo, a componente i do momento dipolar induzido pode ser escrito da seguinte forma:

$$p_i(t) \cong \sum_j \alpha_{ij}^0 E_j \cdot e^{-i\omega_0 t} + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 E_j Q_{k0} \cdot (e^{-i[(\omega_0 + \Omega_k)t + \phi_k]} + e^{-i[(\omega_0 - \Omega_k)t + \phi_k]} + c. c. \quad (5)$$

A primeira parcela da equação 5 corresponde a um dipolo que oscila à frequência da radiação incidente ω_0 , radiando a ω_0 . Esta contribuição para a radiação difundida é conhecida por difusão elástica ou de Rayleigh. Neste caso, a radiação difundida difere da radiação incidente na sua direção de propagação. A segunda parcela corresponde a dipolos que oscilam à frequência $\omega_0 + \Omega_k$ ou $\omega_0 - \Omega_k$, contribuindo para a componente inelástica da luz difundida. O termo $\omega_0 - \Omega_k$ dá origem à radiação Stokes, enquanto que o termo $\omega_0 + \Omega_k$ corresponde à radiação Antistokes. A frequência da radiação difundida pelo processo inelástico difere da frequência da radiação incidente de uma quantidade que é igual à frequência do modo normal responsável pela difusão. Se a vibração corresponder a um modo ótico, a radiação é difundida por efeito Raman.

Explica-se agora, de forma pormenorizada, os três tipos de difusão mencionados acima. Para isso, considere-se a Figura 5, que ilustra os processos de difusão aqui discutidos. No caso do sistema material não vibrar, o dipolo induzido oscila à frequência do campo elétrico da radiação incidente. Esta é a situação ilustrada na Figura 5 (a). No entanto se o sistema material for elástico, as vibrações modulam as oscilações forçadas dos dipolos elétricos. A decomposição de Fourier desta oscilação dá três componentes: uma componente elástica, e as componentes $\omega_0 + \Omega_k$ e $\omega_0 - \Omega_k$, anteriormente descritas. Esta é a situação ilustrada na Figura 5 (b). A formulação clássica, embora seja suficiente para explicar a origem da difusão Raman, não prevê a relação de intensidade entre as bandas Stokes e Antistokes. Para uma melhor descrição do processo é preciso um enquadramento quântico, que está fora do âmbito desta

dissertação. No entanto, é possível descrever o processo de difusão a partir de um diagrama de níveis de energia, representado na Figura 6.

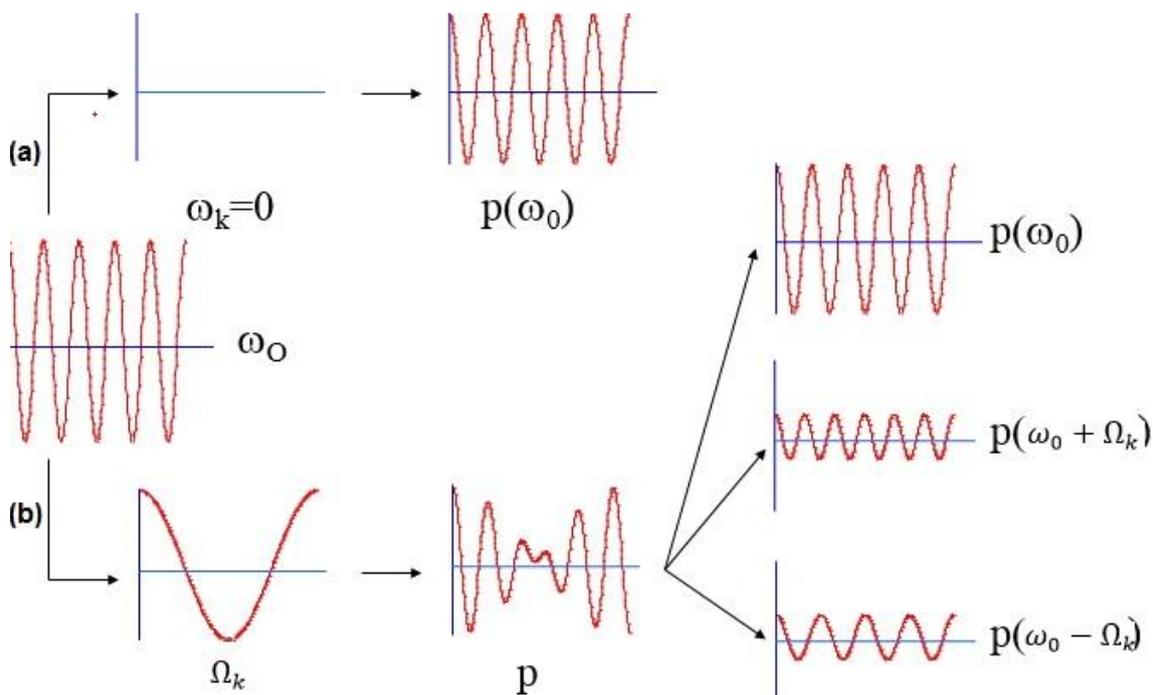


Figura 5: Processos de difusão: (a) Sistema material não vibrante: difusão elástica ou de Rayleigh (b) Sistema material elástico: difusão Stokes ($\omega_0 - \Omega_k$) e difusão Antistokes ($\omega_0 + \Omega_k$).

A difusão Stokes é um fenómeno onde a frequência emitida é menor que a frequência de excitação. Um fóton com frequência ω_0 excita uma molécula com modo de Raman ativo, que, no momento da interação, se encontra no estado vibracional fundamental. Parte da energia do fóton é transferida para o modo de Raman ativo com frequência Ω_m e a frequência resultante da luz difundida é reduzida para $\omega_0 - \Omega_m$. Quando a frequência emitida é maior do que a frequência de excitação, a difusão é chamada de difusão Antistokes. Um fóton com frequência ω_0 excita uma molécula, que, no momento da interação, já se encontra num estado vibracional excitado. A energia em excesso do modo de Raman ativo é libertada, a molécula retorna ao seu estado vibracional básico e a frequência resultante da luz difundida aumenta para $\omega_0 + \Omega_m$. A difusão de Rayleigh é uma interação elástica entre o fóton e a molécula; um fóton de frequência ω_0 é absorvido por uma molécula sem modo de Raman ativo. Posteriormente, a molécula excitada retorna ao seu estado vibracional básico emitindo luz com a mesma frequência do fóton de excitação.

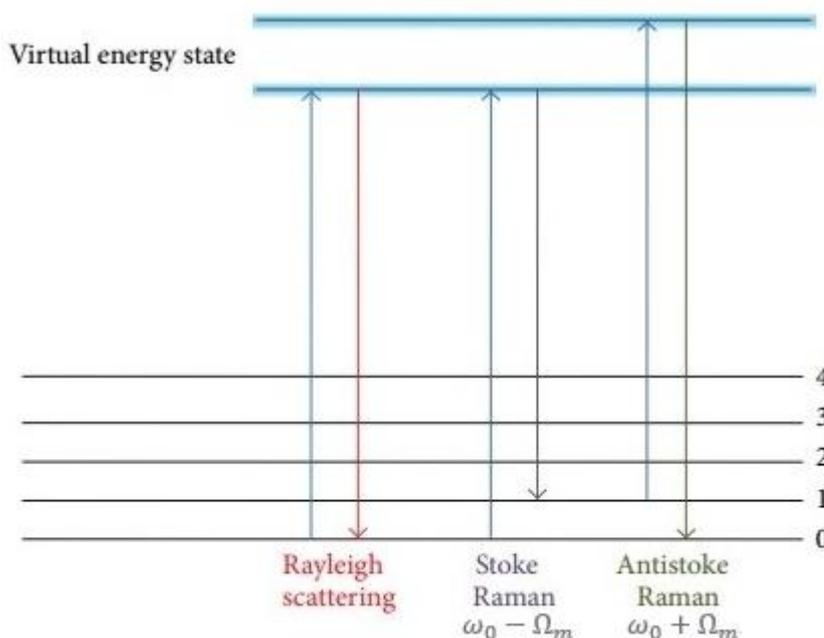


Figura 6: Três tipos de difusão: Rayleigh, Stokes e Antistokes. Adaptado da Ref. 1.

Tendo em conta o diagrama apresentado, verifica-se que o valor Ω_m corresponde à frequência de um modo vibracional, sendo proporcional à diferença de energias entre os dois estados: $|\Omega_m| = \frac{E_1 - E_0}{h}$, onde h é a constante de Planck. Por este motivo, o valor da diferença em frequência é independente da frequência da radiação incidente, dependendo exclusivamente da diferença de energia entre os modos de vibração envolvidos no processo. No entanto, a eficiência da difusão Raman, e consequentemente, a intensidade espectral, varia com a quarta potência da frequência da radiação incidente ($\sim \omega_0^4$); por exemplo, um laser de 488 nm fornece sinal Raman quase sete vezes mais intenso do que um laser de 785 nm [3].

Na Figura 7 está representado um esquema geral de espectro Raman, onde o eixo das abcissas mostra a diferença entre o número de onda da radiação incidente ν_0 e difundida ν_m , chamada de desvio de Raman:

$$\Delta\nu = \nu_m - \nu_0 \quad (6)$$

sendo $\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{\omega}{2\pi c}$ [3]. A unidade é convencionalmente expressa em unidades de inverso de centímetros, cm^{-1} . No eixo das ordenadas está representada a intensidade

espectral, usualmente representada por unidades arbitrárias (u.a.) dependentes de parâmetros experimentais [10]. A maior parte dos fótons incidentes são difundidos elasticamente, dando origem a uma linha de Rayleigh mais intensa do que as linhas de Raman. Apenas 0,001% dos fótons incidentes geram sinais de Raman de frequências $\omega_0 \pm \Omega_m$; aproximadamente 99,999% da luz incidente sofre difusão de Rayleigh, mas esse sinal não é útil para caracterização molecular [1].

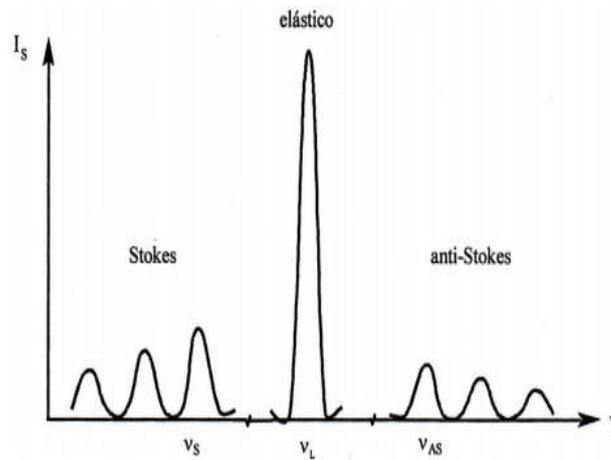


Figura 7: Esquema geral de um espectro Raman. Adaptado da Ref. 12.

Como se pode ver, as bandas Stokes e Antistokes associadas ao mesmo modo estão simetricamente localizadas em relação a ν_L . As intensidades relativas dos dois processos dependem da temperatura [3]:

$$\frac{I_{\text{Stokes}}}{I_{\text{Antistokes}}} = \left(\frac{\omega_0 - \Omega_m}{\omega_0 + \Omega_m} \right)^4 e^{\frac{2h\Omega_k}{k_B T}} \quad (7)$$

À temperatura ambiente, a difusão Antistokes é a mais fraca, devido ao facto da maior parte da população ocupar o estado de menor energia [3].

2.3.1 Espectros Raman das principais biomoléculas

Como foi referido anteriormente, a difusão Raman é sensível quer à composição química quer à estrutura do sistema molecular. A complexidade das estruturas moleculares que compõem as células implicaram complexas ligações químicas intra e intermoleculares. Tal ocorre, por exemplo, na definição das estruturas quaternárias de proteínas, onde as ligações intramoleculares são responsáveis pela conformação da molécula. As ligações intramoleculares e intermoleculares podem envolver pontes de hidrogénio ou interações mais fracas, do tipo Van der Waals. Tais ligações químicas ou interações eletrostáticas podem alterar a frequência das vibrações de grupos funcionais. Contudo, a experiência mostra que a frequência de vibração de grupos funcionais ou de cadeias de moléculas orgânicas não variam de forma dramática, e as bandas relacionadas com estas vibrações surgem em intervalos espectrais bem conhecidos. Desta forma, é possível fazer uma identificação das bandas e a sua associação a vibrações de unidades poliatómicas. Contudo, a variação de frequência de certos grupos funcionais ou de cadeias de carbono permite inferir a estrutura molecular em causa.

Os estudos dos espectros de difusão Raman em moléculas orgânicas, com particular interesse nesta dissertação, em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, permitiram estabelecer relações entre as vibrações de grupos funcionais ou de cadeias atómicas, e as frequências desses modos. Deste modo, a identificação das bandas observadas nos espectros Raman recorre à informação já disponível em bases de dados. No entanto, a complexidade química dos tecidos biológicos acarreta dificuldades adicionais na identificação das bandas em determinadas zonas espectrais, devido à sobreposição de um elevado número de bandas e à resolução limitada dos equipamentos. Mesmo nesses casos, a espectroscopia Raman permite a análise de estruturas recorrendo a variações de intensidade de zonas espectrais bem delimitadas.

No que se segue, irá apresentar-se um sumário dos principais resultados referentes à identificação de alguns modos de vibração de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e água. Não se pretende apresentar uma revisão exaustiva, mas focar nas vibrações que são possíveis de serem observadas, em particular, na gama espectral de estudo nesta dissertação.

a) Proteínas

As proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos e desempenham um vasto conjunto de funções no organismo, sendo estas metabólicas e estruturais [6]. Os aminoácidos são compostos quaternários de carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto ligados entre si através de ligações covalentes [6]. Cada aminoácido tem um grupo amina ($-\text{NH}_2$), um grupo carboxilo ($-\text{COOH}$), um átomo de hidrogénio e uma cadeia lateral, designada por R (de “radical”), ligado ao mesmo átomo de carbono [6]. A cadeia lateral pode ser constituída por diversas estruturas químicas e as diferenças neste grupo tornam os aminoácidos diferentes uns dos outros. O tecido humano contém vinte tipos diferentes de aminoácidos [6]. As ligações covalentes que se formam durante a síntese proteica entre as moléculas de aminoácidos designam-se ligações peptídicas [6].

A estrutura principal de uma proteína é determinada pela sequência de aminoácidos ligados através das ligações peptídicas [6]. Como existem vinte aminoácidos diferentes e cada um deles pode ser colocado em qualquer posição ao longo da cadeia, existem um enorme número de potenciais proteínas. A estrutura secundária é determinada pelas pontes de hidrogénio entre os aminoácidos que levam a proteína a enrolar-se formando estruturas helicoidais ou folhas pregueadas [6]. A título de exemplo, algumas das estruturas mais comuns são designadas por α -helix, β -sheet e random coil [3]. A estrutura terciária resulta da dobragem das hélices ou folhas pregueadas anteriormente formadas. A estrutura quaternária diz respeito às relações espaciais entre subunidades individuais [6]. A espectroscopia de Raman é sensível às duas primeiras estruturas referidas.

Das bandas de vibração das proteínas sobressaem as das vibrações do grupo amida, grupo CONH, referentes aos modos de vibração da amida A, amida B e amida I – VII [13]. A Tabela 2 apresenta de forma sumária as gamas espectralis onde é possível observar as bandas de diversas vibrações de cada amida.

Tabela 2: Bandas de vibração das amidas. Adaptado da Ref. 13.

Amida	Banda Espectral	Comportamento associado
A	3500 cm^{-1}	Extensão NH
B	3100 cm^{-1}	Extensão NH
I	1600 – 1690 cm^{-1}	Extensão C = O
II	1480 – 1580 cm^{-1}	Extensão C – N e flexão N – H
III	1230 – 1300 cm^{-1}	
IV	625 – 770 cm^{-1}	Flexão OCN
V	640 – 800 cm^{-1}	Flexão NH
VI	540 – 600 cm^{-1}	Flexão C = O
VII	200 cm^{-1}	Modo esquelético

Na região espectral analisada neste trabalho (800 – 1800 cm^{-1}) são esperadas as bandas de vibração das amidas I e III.

A Figura 8 mostra os modos de vibração da amida I (a) e da amida III (b) e a relação das posições das respectivas bandas com o tipo de conformação proteica [14]. A vibração da amida I envolve a vibração de extensão da ligação C = O. Já a vibração da amida III corresponde à vibração de extensão C – N e de flexão N – H [13].

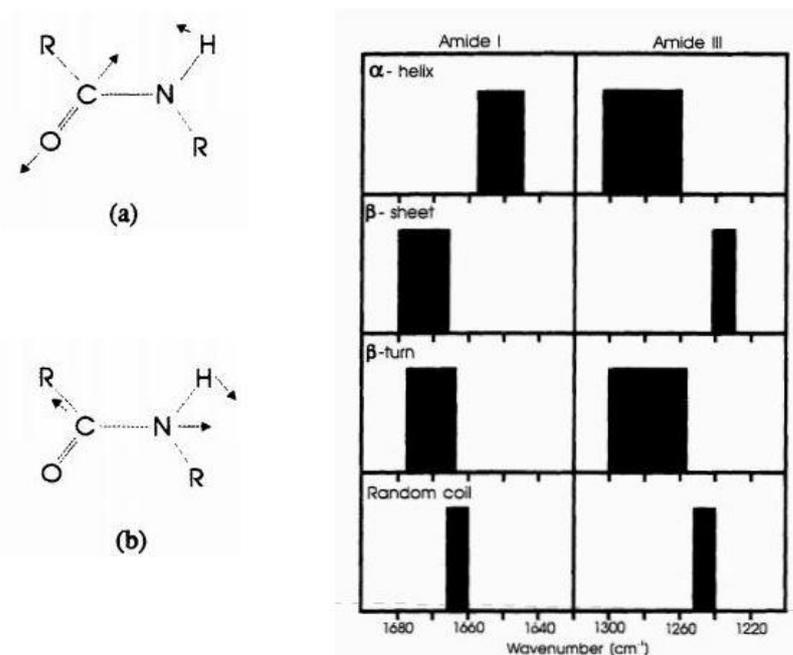


Figura 8: Modos de vibração da amida I (a) e amida III (b), e relação das posições das respectivas bandas com o tipo de conformação proteica. Adaptado da Ref. 14.

Em adição às bandas correspondentes à vibração das amidas, existem informações adicionais no espectro de Raman que permitem a descrição do ambiente de várias cadeias de aminoácidos [13]. As vibrações dos anéis aromáticos do triptofano e da tirosina geram bandas Raman particularmente distintas, e podem ser usadas para obter informação quanto à estrutura da molécula da proteína [3, 13]. A Figura 9 apresenta as bandas espectrais do triptofano e da tirosina, localizadas a 1340/1361 cm^{-1} e 833/860 cm^{-1} , respetivamente [13].

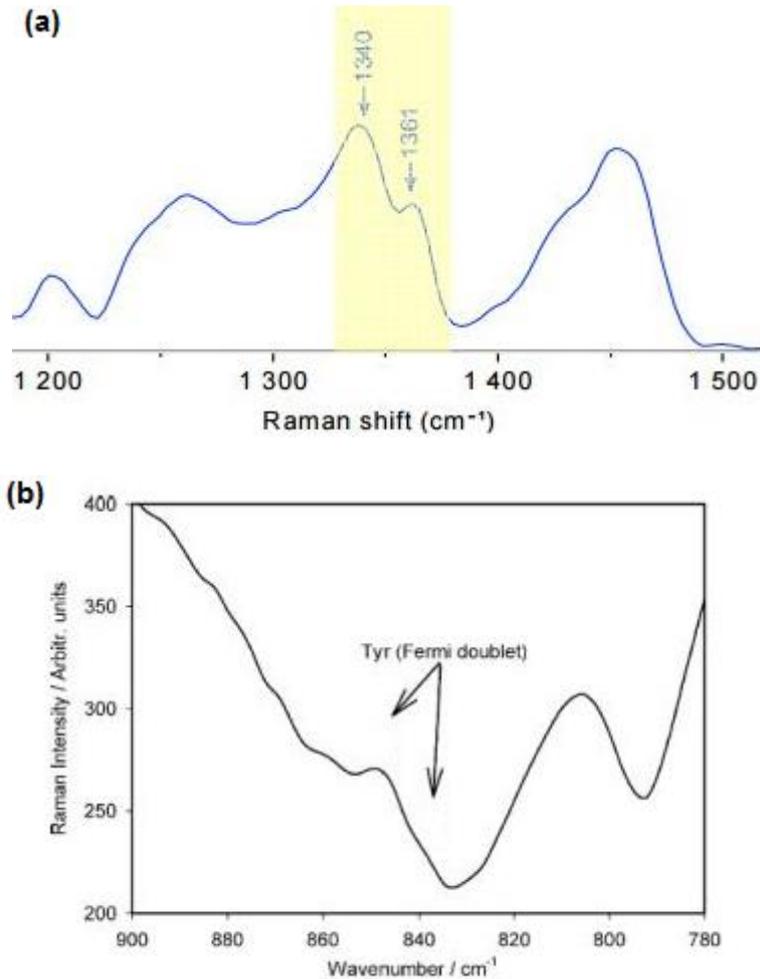


Figura 9: Bandas espectrais do triptofano (a) e da tirosina (b). Adaptado da Ref. 15.

b) Lípidos

Os lípidos são o segundo maior grupo de moléculas orgânicas comuns aos organismos vivos. São compostos principalmente por carbono, hidrogénio e oxigénio mas também por outros elementos, tais como o fósforo e o azoto [6]. Desempenham muitas funções importantes no organismo: protegem, isolam, ajudam a regular muitos

processos fisiológicos, armazenam energia e são constituintes importantes das membranas plasmáticas [6]. A definição de lípido é tão abrangente que pertencem a este grupo diversos tipos de moléculas como as gorduras, os fosfolípidos, os esteroides e as prostaglandinas [6].

A secção eficaz de difusão Raman dos lípidos é elevada devido à presença de longas cadeias não polares de acilo nas suas estruturas [16]. Assim, as bandas características dos lípidos são sempre observadas no espectro Raman de células e tecidos, e em muitos casos, são marcadores de patologias [16]. Um biomarcador é qualquer parâmetro biológico mensurável que permite diagnosticar, por exemplo, o estado de uma doença ou resposta a um fármaco. Devido à presença das bandas dos lípidos nos espectros Raman, é possível determinar se essas bandas podem ser utilizadas para detetar certas patologias através das alterações de frequência, intensidade e largura.

As bandas mais características no espectro Raman devidas aos lípidos estão relacionadas com a presença da cadeia de hidrocarboneto. Todos os lípidos apresentam bandas de vibração nas seguintes regiões: 1400 – 1500, 1250 – 1300 e 1050 – 1200 cm^{-1} . As bandas na gama 1400 – 1500 cm^{-1} e $\sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a modos vibracionais de extensão de grupos CH_2 e CH_3 . Bandas na região 1050 – 1200 cm^{-1} devem-se a modos de extensão C – C. Adicionalmente, um intenso grupo de bandas na gama dos 2800 – 3100 cm^{-1} devido a vibrações de extensão C – H é característico de um espectro de lípidos [16]. Apesar disto, dependendo do grupo funcional e da estrutura de uma dada molécula, o espectro Raman de lípidos individuais pode ser consideravelmente diferente, devido à fase de saturação, isomerismo geométrico, forma politépica/polimórfica e propriedades resultantes da presença de um grupo hidrofílico [16]. A Figura 10 apresenta, a título exemplificativo, um conjunto de bandas Raman de lípidos de membrana obtidas com uma excitação a 532 nm.

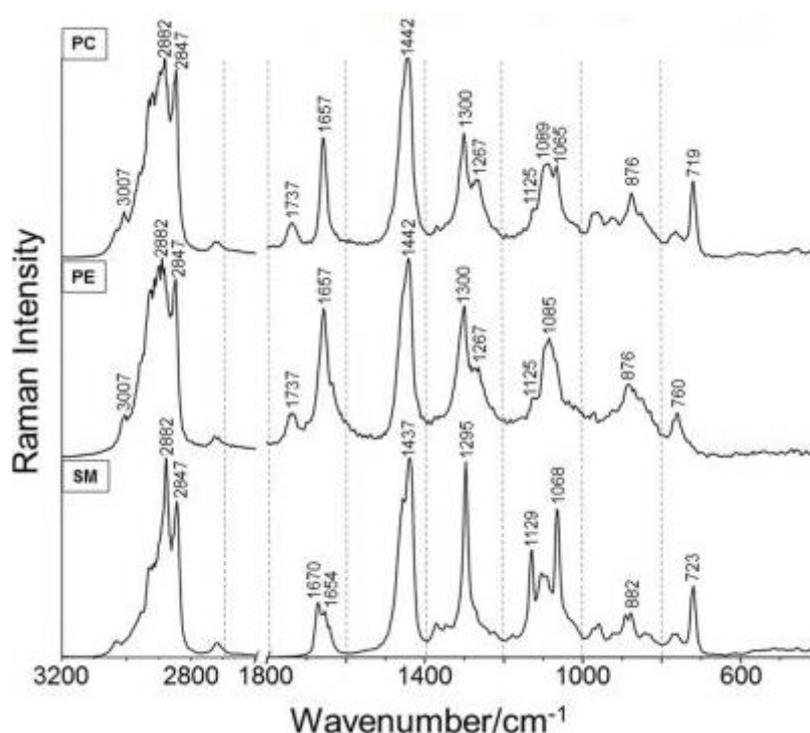


Figura 10: Bandas Raman de lípidos de membrana; PC – L- α -Phosphatidylcholine, PE – L- α -Phosphatidylethanolamine, SM – Sphingomyelin. Adaptado da Ref. 16.

c) Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos armazenam e processam a informação genética e têm uma papel extremamente ativo na regulação de processos metabólicos [14]. Existem dois tipos de moléculas de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico (ADN) e o ácido ribonucleico (ARN). São grandes moléculas compostas por carbono, hidrogénio, oxigénio, azoto e fósforo [6]. São constituídos por blocos unitários denominados nucleótidos. Cada um destes é composto por um monossacarídeo a que se ligam uma base orgânica e um grupo fosfato. O monossacarídeo do ADN é a desoxirribose, e do ARN a ribose.

Aplicações da espectroscopia Raman para investigar ácidos nucleicos e os seus complexos biológicos têm aumentado em número e diversidade até à atualidade [17]. Para um ácido nucleico de N átomos, existem $3N - 6$ modos normais de vibração, o que é de facto um número muito elevado. A maioria desses modos estão localizados em certas gamas espectrais, correspondentes à vibração de um pequeno grupo de átomos da molécula ou de grupos funcionais [17]. Os grupos funcionais ou grupos poliatómicos

similares que se encontram em ambientes químicos semelhantes dentro da mesma molécula dão origem a bandas Raman sobrepostas entre si [17].

O espectro Raman de um tecido biológico é dominado por bandas lipídicas e proteicas. A intensidade das bandas com origem nos ácidos nucleicos é baixa e estas são difíceis de detetar no espectro, especialmente quando a radiação de excitação utilizada cai na zona de infravermelho próximo. Devido à estrutura eletrónica destas macromoléculas, a intensidade de bandas aumenta consideravelmente à medida que a frequência da radiação de excitação aumenta. Em particular, na zona do UV, as bandas dos ácidos nucleicos são particularmente elevadas, devido ao efeito Raman ressonante. O efeito Raman ressonante ocorre quando a energia de excitação é próxima da energia de uma transição eletrónica [14]. Assim, a intensidade dos modos vibracionais associados a essa transição eletrónica aumenta substancialmente relativamente à intensidade da excitação não ressonante. Com esta técnica, excitação UV preferencialmente a 250 nm aumenta-se a intensidade das bandas de difusão Raman proveniente de ácidos nucleicos [14].

Várias bandas Raman foram identificadas tanto para o ADN como para o ARN [17]. A Tabela 3 apresenta um sumário de gamas espetrais onde se observam as bandas de difusão do ADN e respetivos grupos atómicos envolvidos. Da Tabela 3 pode observar-se que a frequência dos modos fosfato é muito dependente da conformação do ADN. Os restantes modos apresentam frequência muito pouco dependente da conformação do ADN. Com base neste comportamento foram definidas duas categorias de bandas: uma relacionada com a estrutura monossacarídeo – fosfato e outra relacionada com a estrutura do nucleótido. A primeira é sensível a alterações nas torções da rede de ligações fosfodiéster ($-P - O5' - C5' - C4' - C3' - O3' - P -$), mas não depende da base ligada a $C1'$ [17].

Tabela 3: Bandas Raman em cm^{-1} das diversas conformações de ADN: A-ADN, B-ADN, Z-ADN. Adaptado da Ref. 17.

Grupo	A-ADN	B-ADN	Z-ADN
C – O	706 ± 5	–	–
O – P – O	807 ± 3	790 ± 5	745 ± 3
O – P – O	–	835 ± 7	–
PO₂⁻	1099 ± 1	1092 ± 1	1095 ± 2
C2'H₂	1418 ± 2	1420 ± 2	1425 ± 2

A ocorrência de bandas únicas para os diferentes tipos de ADN, Z-ADN ($745 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$), A-ADN ($807 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$) e B-ADN ($835 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$) facilita a distinção dos três tipos de conformação através da espectroscopia Raman [17]. A Figura 11 apresenta os três tipos de conformação do ADN.

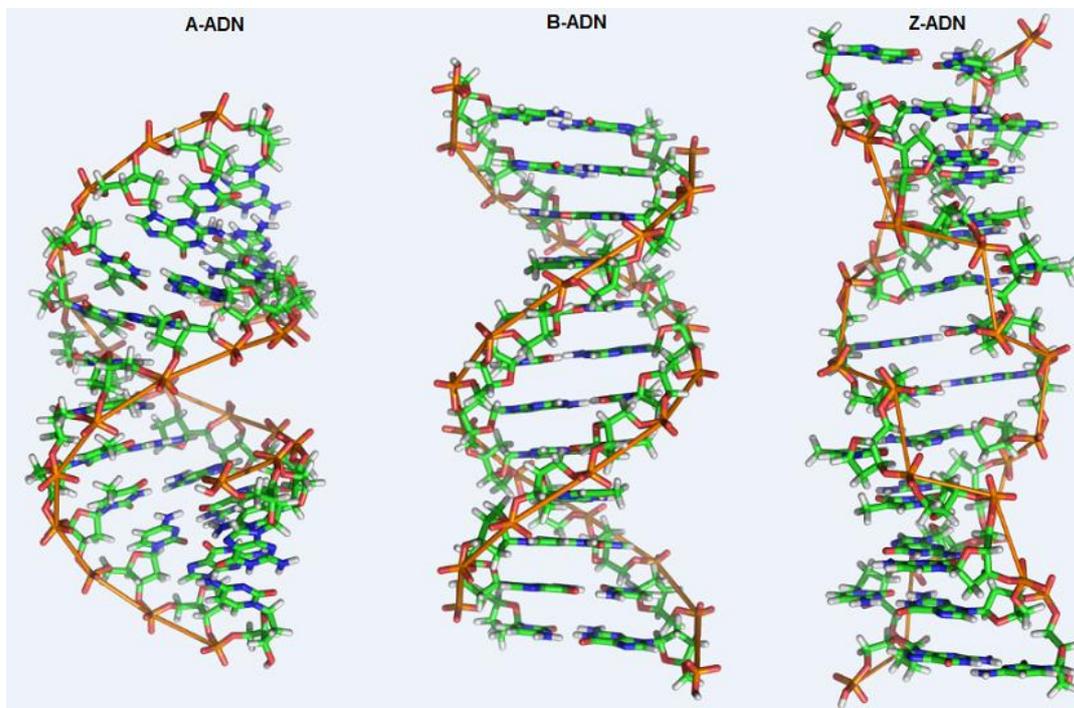


Figura 11: Conformações do ADN: A-ADN, B-ADN e Z-ADN. Adaptado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Z-DNA>.

A frequência das bandas observadas em ADNs com diferentes bases são dependentes dos pares Adenina-Timina (AT) e Guanina-Citosina (GC). Assim, regiões de B-ADN contendo predominantemente o par GC exibem uma banda perto dos 830 cm^{-1} , enquanto que se o par AT predominar a banda aparece a 840 cm^{-1} , aproximadamente [17]. A Figura 12 apresenta espectros Raman para cada uma das três conformações do ADN, tendo em conta as concentrações AT/GC.

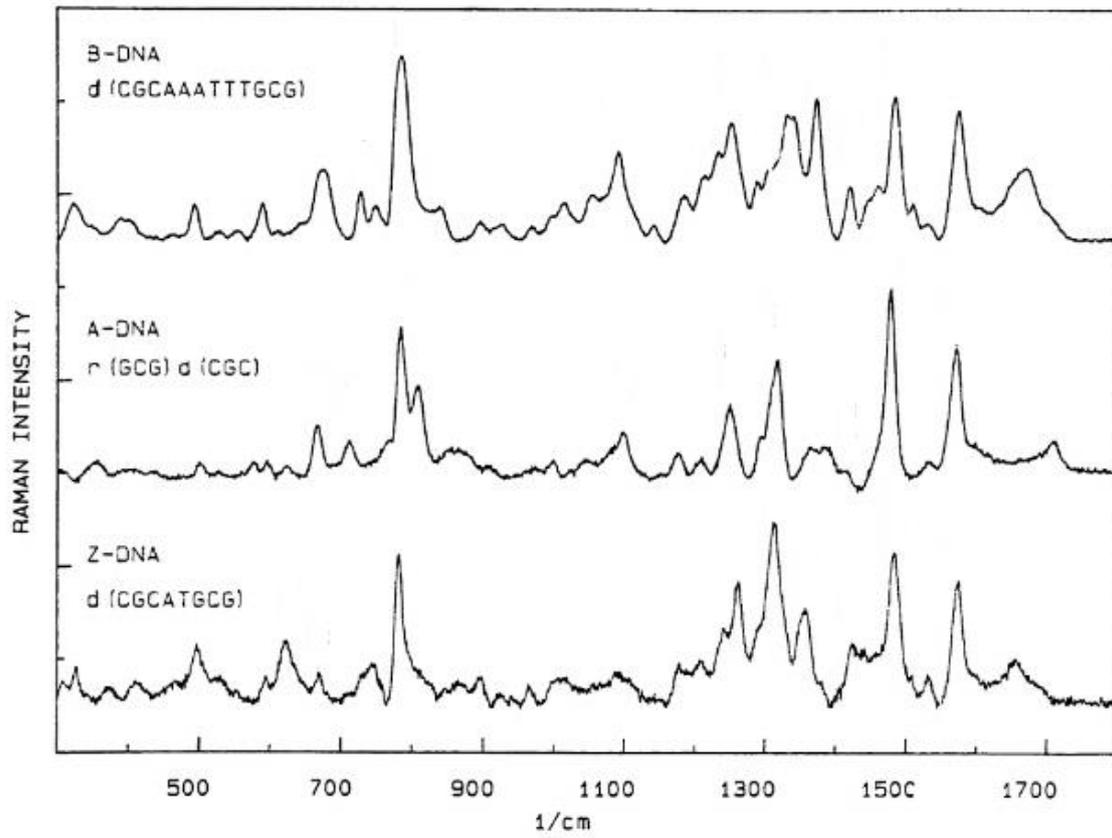


Figura 12: Bandas Raman do B-ADN, A-ADN e Z-ADN. Adaptado da Ref. 18.

2.3.2 Espetroscopia Raman da molécula de água

As propriedades físico-químicas da água têm sido alvo de diversas investigações, graças ao seu importante papel na vida humana, constituindo cerca de 80% do peso total do tecido humano [3]. A sua molécula apresenta uma estrutura muito simples, composta por um átomo de oxigénio ligado a dois átomos de hidrogénio por ligações covalentes. A polaridade da molécula deve-se à assimetria da sua distribuição de carga elétrica e à sua geometria angular: uma carga parcial positiva associada aos átomos de hidrogénio e uma carga parcial negativa associada ao átomo de oxigénio. Devido ao forte carácter polar, as moléculas de água formam com facilidade pontes de hidrogénio entre elas e com outros grupos funcionais.

A absorção da radiação eletromagnética pela água é máxima na região do infravermelho intermédio, devido à polaridade da molécula, o que limita as técnicas de espectroscopia no IV nesta gama espectral [19]. A espectroscopia Raman utilizando excitação no infravermelho próximo é vantajosa relativamente à espectroscopia no IV, visto que a água apresenta baixa absorção nessa gama de comprimentos de onda e os tecidos emitem muito menos fluorescência comparativamente à excitação por luz visível [19]. Uma menor absorção por parte da água torna mais fácil a deteção de outros componentes do tecido bem como resulta numa maior penetração no mesmo [19].

A molécula de água apresenta três modos de vibração: o modo de extensão simétrico (ν_1), o modo de flexão (ν_2) e o modo de extensão assimétrico (ν_3), representados na Figura 13.

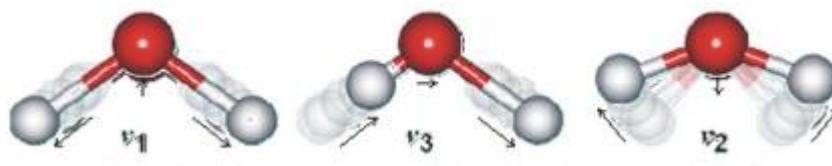


Figura 13: Modos vibracionais internos da molécula de água: modo de extensão simétrico ν_1 , modo de extensão assimétrico ν_3 e modo de flexão ν_2 . Adaptado de <http://slideplayer.com.br/slide/43519/>.

Os modos de extensão simétrico e extensão assimétrico dão origem às bandas fortes no espectro Raman (Figura 14), surgindo ambos na gama espectral entre os 2800 cm^{-1} e os 3600 cm^{-1} respetivamente. O modo ν_2 origina uma banda na gama espectral 1600 ~ 1700 cm^{-1} , que é muito menos intensa e praticamente impercetível nos espectros de tecidos biológicos, ficando sobreposta por bandas espectrais com origem em

vibrações de outras moléculas [3]. As bandas que se encontram na região espectral 50 ~ 200 cm^{-1} têm origem em vibrações intermoleculares, e as que se encontram na região 300 ~ 900 cm^{-1} têm origem em movimentos rotacionais da molécula de água [3].

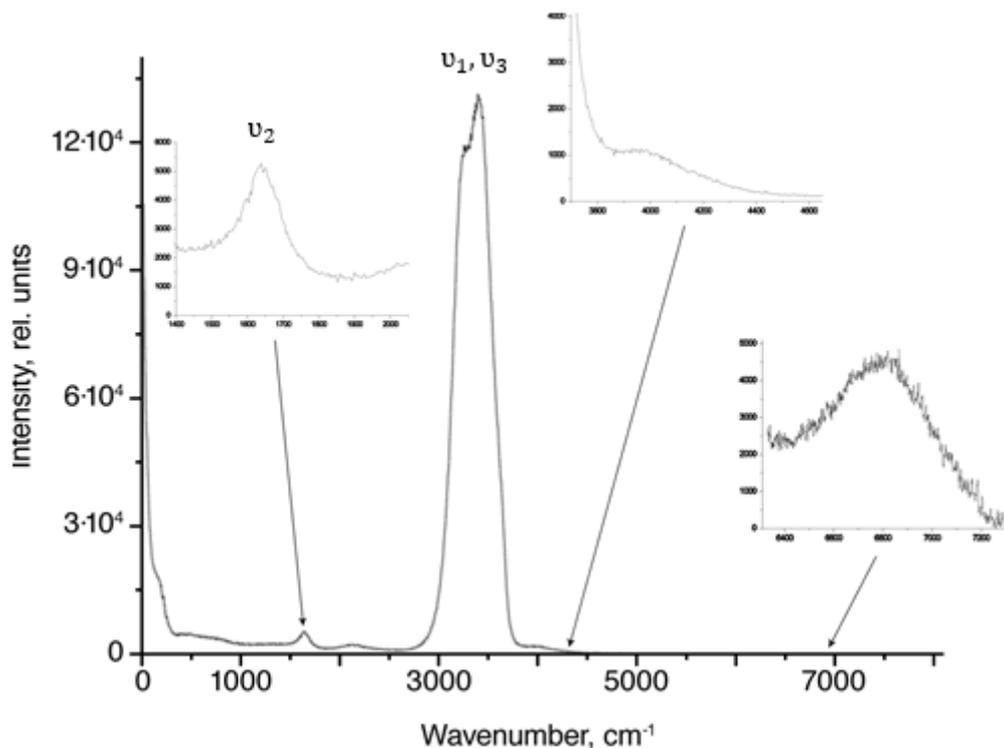


Figura 14: Espectro de Raman da água com os modos de vibração: o modo de extensão simétrico (ν_1), o modo de flexão (ν_2) e o modo de extensão assimétrico (ν_3). Adaptado de <http://rswater.phys.msu.ru/englishVersion/Science/water.html>.

A quantidade de água pode ser um possível fator discriminador entre tumor e tecido saudável [20]. Philipsen *et al*, usando espectroscopia Raman de Transformada de Fourier, utilizando radiação de excitação no infravermelho próximo, mostrou que o diagnóstico de lesões malignas e não malignas na pele é possível devido às significativas diferenças encontradas nas bandas perto de 3250 cm^{-1} , com origem nas vibrações de extensão OH e N - H [20]. Abramczyk *et al* demonstrou através da espectroscopia Raman e no infravermelho, que as propriedades vibracionais da água nas interfaces biológicas de tecidos mamários são sensíveis ao ambiente celular do tecido [20]. Este estudo reporta que o espectro Raman dos modos de extensão OH da água em tecido mamário cancerígeno é um indicador sensível de mudanças patológicas no tecido. A Figura 15 apresenta o espectro de vibração de extensão da água em tecido mamário normal e cancerígeno comparando-os com o espectro Raman da água.

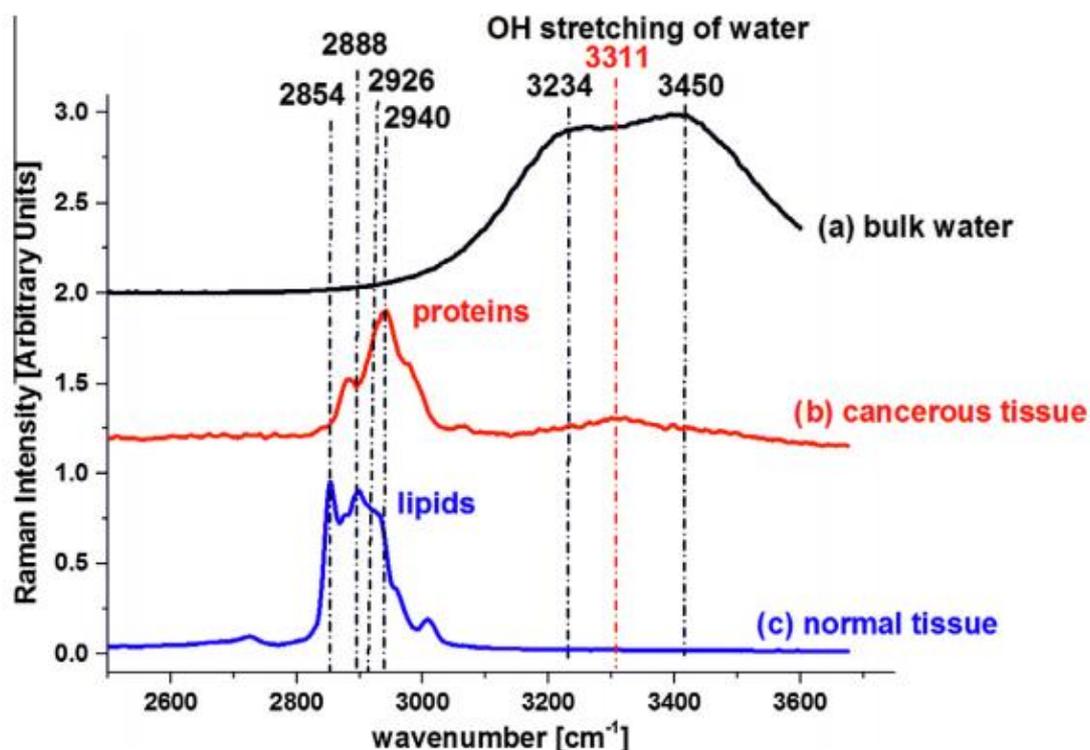


Figura 15: Espectro Raman da água confinada no tecido normal e canceroso da mama comparado com o espectro Raman da água. Adaptado da Ref. 21.

Da Figura 15, é possível observar grandes diferenças no espectro Raman entre a água e a água confinada em tecidos biológicos. O espectro Raman do tecido normal e canceroso apresentam diferenças significativas na região dos modos de extensão OH da água [21]. O sinal Raman da água na região de extensão OH (3200 – 3750 cm⁻¹) no tecido normal é negligenciável, contrariamente ao sinal proveniente do tecido tumoral, concluindo que este último possui mais água [21]. Note-se que as vibrações de extensão da água no tecido com cancro apresentam-se com uma banda única a 3311 cm⁻¹, visivelmente diferente da água que se representa por uma estrutura dupla com bandas a 3234 cm⁻¹ e 3450 cm⁻¹. A maior quantidade de água em tecido tumoral em relação a tecido normal também foi reportada em outros órgãos usando espectroscopia ótica [21]. Foi sugerido que este efeito se encontra associado ao aumento do nível de ADN ou à hidratação deste devido ao seu desdobramento durante a divisão celular [21].

2.4 Aplicações da espectroscopia Raman no estudo de neoplasias do estômago

As características técnicas da espectroscopia de Raman promoveram a sua aplicação biomédica na área oncológica [22]. A sua capacidade de detetar alterações no ADN/ARN, proteínas e lípidos tornou-a uma ferramenta capaz de quantificar as mudanças a nível celular, bem como diferenciar células e tipos de tecidos [22]. A elevada sensibilidade desta técnica à composição química e estrutura molecular é relevante para a análise de tecidos biológicos através da imagiologia por difusão Raman. Esta técnica de imagiologia assenta no princípio da heterogeneidade química, resultante da patologia em estudo. Apesar do interesse que esta técnica desperta, a sua aplicabilidade na análise *in vivo* de lesões cancerosas de órgãos internos do corpo humano tem encontrado diversas dificuldades, em particular a baixa eficiência na deteção do sinal difundido pelas estruturas histológicas e integração de guias de onda em endoscópios para guiagem da luz incidente e difundida. Por outro lado, a limitação do intervalo espectral para a luz incidente ao infravermelho próximo, de modo a evitar a fluorescência, típica de transições eletrónicas em moléculas orgânicas complexas, levanta problemas associados à absorção em guias de onda ou filme ótico. Contudo, apesar das dificuldades técnicas, a espectroscopia de difusão Raman ainda é objeto de estudo no sentido da sua aplicação no diagnóstico de lesões cancerosas, quer *in vivo* quer em *ex vivo*.

No que se segue, apresentar-se-á uma revisão das principais aplicações da técnica, *in vivo* e *ex vivo*, na deteção de várias patologias oncológicas no estômago. A totalidade dos trabalhos publicados na área utilizaram radiação de excitação na região do infravermelho próximo (NIR), com comprimento de onda de 785 nm. A região selecionada para obtenção dos espectros Raman é, sem exceção, interior à região *fingerprint* ($500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$), gama espectral onde surgem as bandas características das principais biomoléculas [22].

2.4.1 Aplicações *in vivo*

As aplicações clínicas da espectroscopia de Raman *in vivo* têm sido limitadas devido à dificuldade de deteção do fraco sinal Raman proveniente dos tecidos. A miniaturização de uma sonda Raman, eficaz na coleção de fótons e adaptável à

instrumentação médica, é ainda um desafio para a endoscopia Raman [23, 24]. Huang *et al* desenvolveram uma sonda com base em fibra ótica, com 1,8 mm de diâmetro, flexível e bifurcada, com revestimentos duplos diretamente depositados na extremidade da fibra, de forma a garantir uma transferência eficaz de luz e uma recolha do sinal Raman durante a endoscopia clínica [24]. Essa sonda possui capacidade de se adaptar ao canal da maioria dos endoscópios. O endoscópio assim constituído foi integrado a um espectrómetro, o que permitiu a análise da luz difundida *in vivo* no estômago, sobre a orientação de modalidades de imagem. A utilidade clínica deste tipo de diagnóstico Raman para displasias ou neoplasias gástricas foi demonstrada com sucesso, pois permitiu a distinção entre tecido normal e tumoral.

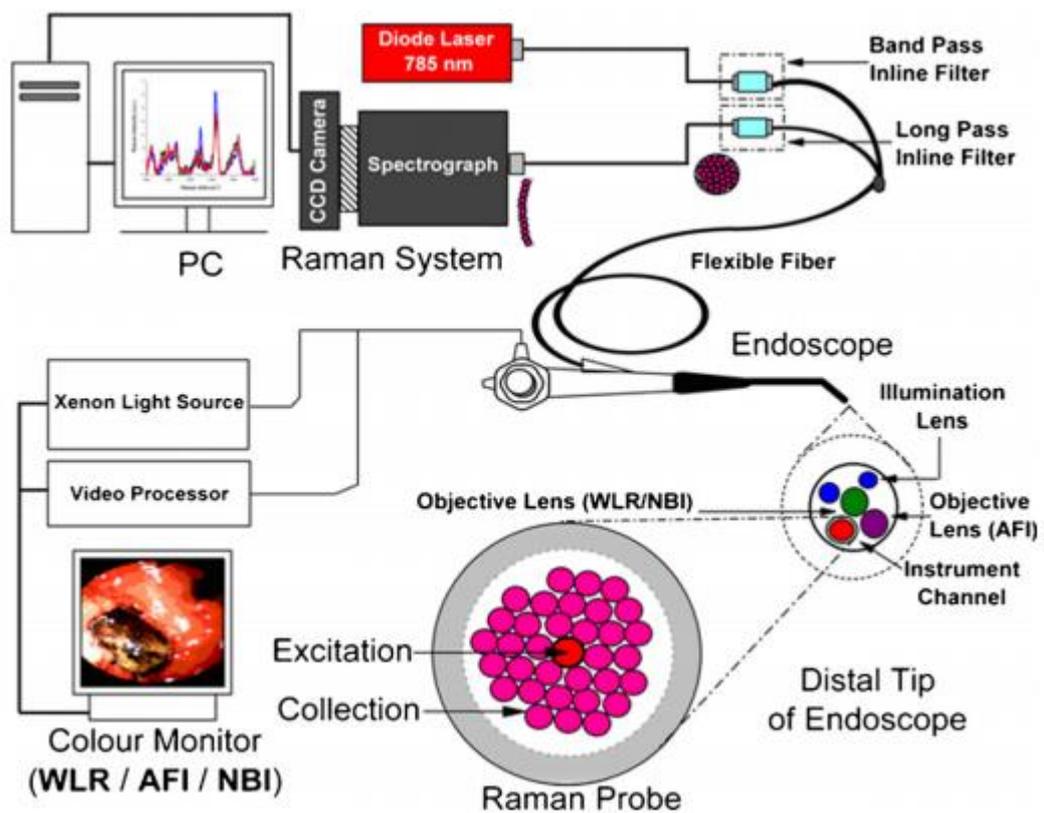


Figura 16: Esquema do sistema de endoscopia Raman guiado por imagem para medições *in vivo*. WLR, white light reflectance; AFI, autofluorescence imaging; NBI, narrow-band imaging. Adaptado da Ref. 24.

A figura 16 mostra um diagrama do sistema de endoscopia com sonda Raman, integrado num sistema de imagem trimodal, para medições *in vivo* durante a endoscopia digestiva alta [24]. Nesta montagem foi utilizado um laser de comprimento de onda de 785 nm e potência $1,5 \text{ W/cm}^2$. O sistema adquire espectros na gama espectral $800 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ em 0,5s com um tamanho de feixe $\sim 200 \mu\text{m}$ a atingir a superfície do tecido. A sonda endoscópica é composta por 32 fibras de recolha de luz que rodeiam uma fibra central

responsável pela excitação. O feixe de luz proveniente do laser é filtrado por um filtro passa banda que maximiza a luz do comprimento de onda pretendido, eliminando outros comprimentos de onda que possam estar presentes. Uma segunda filtragem consiste num filtro de largo espectro, que reduz a interferência provocada pela difusão Rayleigh, fluorescência da fibra e sinal Raman da sílica, maximizando a recolha de sinal Raman [24].

Neste estudo de Huang *et al*, os espectros Raman foram adquiridos em 67 pacientes submetidos a procedimentos endoscópicos para despiste de cancro gástrico. Um total de 1063 espectros foram registados em 238 locais, dos quais 934 foram adquiridos em 121 locais de tecido normal de 67 pacientes, enquanto 129 espectros foram obtidos em 117 locais de tecido neoplásico de 61 pacientes [24]. Imediatamente após as aquisições, foram realizadas biópsias aos locais medidos para exames histológicos. Na Figura 17, apresentam-se os espectros médios, obtidos em condições *in vivo*, relativos a tecido normal (n = 934) e cancerígeno (n = 129).

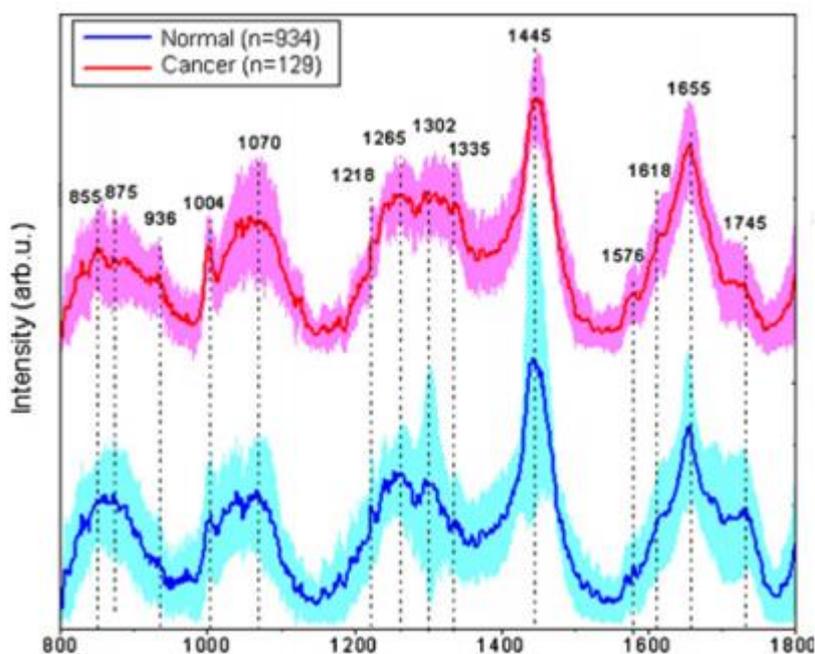


Figura 17: Espectros Raman *in vivo* do tecido normal (n = 934) e cancerígeno (n = 129). Adaptado da Ref. 24.

Foram observadas bandas de difusão Raman distintas localizadas em torno de 855, 875, 936, 1004, 1070, 1218, 1265, 1302, 1335, 1445, 1576, 1618, 1655 e 1745 cm^{-1} , tanto no tecido normal como no tecido cancerígeno. O teste estatístico utilizado (*two sided unpaired t test*) revelou que as intensidades das bandas Raman localizadas a 936 cm^{-1} (vibração de extensão C – C na conformação α das proteínas), 1070 cm^{-1} (modo de

extensão O – P – O dos ácidos nucleicos), 1218 cm^{-1} (extensão C – C₆H₅ das proteínas), 1265 cm^{-1} (extensão C – N e modos de dobragem da amida III das proteínas), 1302 cm^{-1} (CH₃CH₂ *wagging* das proteínas), 1335 cm^{-1} (torção CH₃CH₂ das proteínas e ácidos nucleicos), 1576 cm^{-1} (flexão C = C do anel de pirimidina dos ácidos nucleicos), 1618 cm^{-1} (flexão C = C das proteínas) e 1655 cm^{-1} (extensão C = O da amida I das proteínas), são significativamente maiores para o tecido cancerígeno, mas inferiores para as bandas localizadas a 855 cm^{-1} (respiração do anel $\delta(\text{CHH})$ do colagénio), 875 cm^{-1} (extensão C – C da hidroxiprolina), e 1745 cm^{-1} (extensão C = O dos fosfolípidos) quando comparado com o tecido normal ($p < 0,05$) [24].

Para identificar a origem bioquímica responsável pelas diferenças entre os espectros Raman do tecido normal e cancerígeno, os espectros Raman foram simulados, ajustando os coeficientes de uma combinação linear de espectros Raman tomados como referência. Estes espectros de referência foram obtidos de amostras químicas (actina, albumina, colagénio tipo I, ADN, histonas, pepsinogénio, fosfolípidos e trioleína) correspondentes aos principais constituintes bioquímicos presentes no tecido do estômago. A Figura 18 apresenta espectros de referência (A) e a comparação dos espectros simulados com os espectros medidos para o tecido normal (B) e tecido cancerígeno (C).

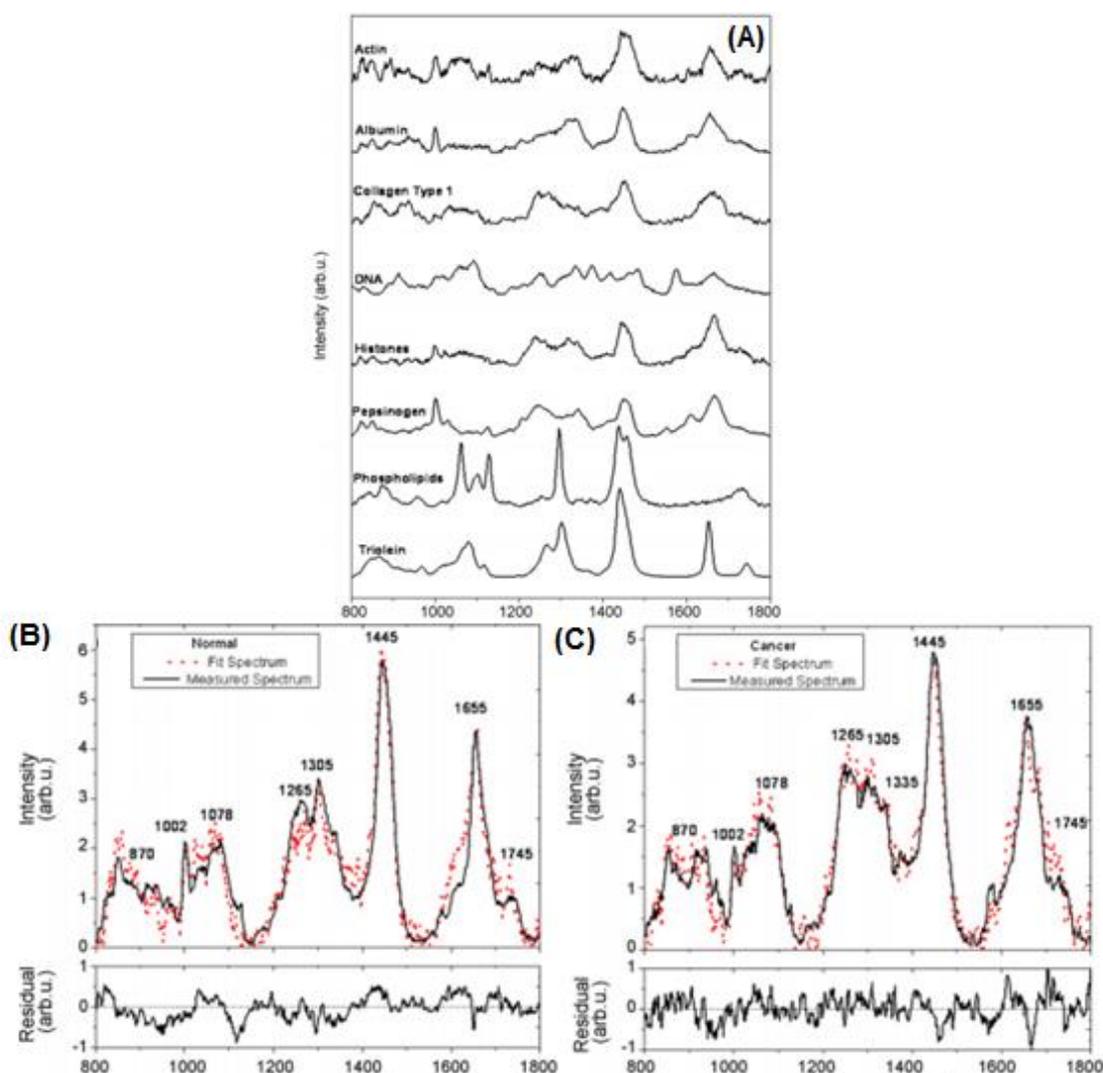


Figura 18: Espectros Raman de referência adquiridos da actina, albumina, colagénio, ADN, histonas, pepsinogénio, fosfolípidos e trioleína para modulação bioquímica do tecido gástrico (A); Comparação dos espectros simulados com os espectros medidos para o tecido normal (B) e tecido cancerígeno (C). Adaptado da Ref. 24.

Os espectros de diferença entre os espectros experimental e simulado, com desvios não superiores a 5%, revelaram que os oito componentes químicos considerados são os essenciais para a discriminação do tecido canceroso [24].

Em cada procedimento de combinação linear podem ser obtidos os coeficientes de todos os componentes espectrais de referência. *Unpaired two-sided Student's t test* ilustra que o tecido tumoral está associado a menores coeficientes pertencentes à actina ($p = 1,071 \times 10^{-3}$), colagénio ($p = 7,336 \times 10^{-2}$), pepsinogénio ($p = 1,460 \times 10^{-4}$), fosfolípidos ($p = 1,750 \times 10^{-15}$) e trioleína ($p = 6,185 \times 10^{-1}$), e maiores coeficientes pertencem à albumina ($p = 3,420 \times 10^{-2}$), ADN ($p = 1,170 \times 10^{-20}$) e histonas ($p = 4,510 \times 10^{-8}$) quando comparado com o tecido normal [24].

De forma a aproveitar as potencialidades dos coeficientes obtidos, foi implementado um algoritmo *CART* (*Classification and Regression Tree*), onde quatro coeficientes relacionados com albumina, ADN, fosfolípidos e histonas foram diferentemente correlacionados de forma a construir os seguintes seis subgrupos: normal – grupos 2, 4 e 6; cancro – grupo 1, 3 e 5, que possibilitam a classificação do tecido. Na Figura 19 observa-se a árvore de classificação gerada pelo método *CART*.

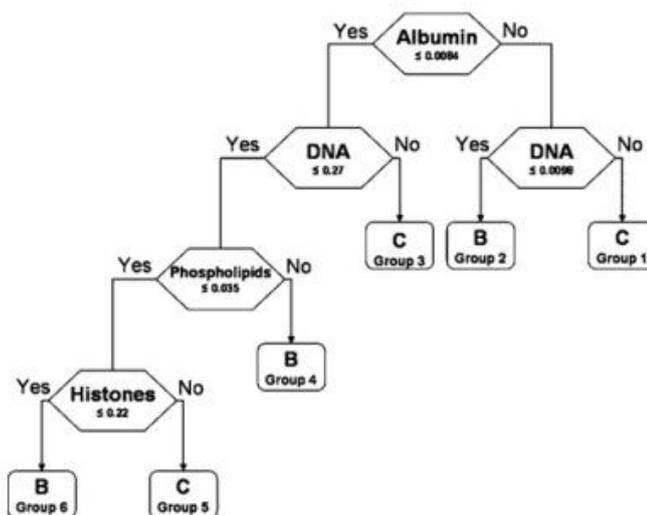


Figura 19: Árvore de classificação ideal gerada pelo método *CART* utilizando quatro constituintes biomoleculares (albumina, ADN, fosfolípidos e histonas). A árvore de classificação binária é composta por cinco classificadores e seis subgrupos terminais. O processo de tomada de decisão envolve a avaliação do caso em cada nó, atingindo eventualmente um nó terminal com a classificação: normal (B) ou cancro (C). Adaptado da Ref. 24.

A curva *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*) provou que o algoritmo baseado no método *CART* é eficiente no diagnóstico de cancro do estômago dando uma área *under de curve* de 0,988. A técnica revela uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 93,4% na identificação de lesões cancerosas de tecido gástrico normal usando a técnica de validação cruzada *leave one out* [1].

Huang *et al* investigaram pela primeira vez as propriedades espectrais do tecido gástrico normal e cancerígeno através da endoscopia Raman, provando as suas significativas diferenças, e afirmando assim, o potencial da técnica para aplicação *in vivo* para deteção de lesões neoplásicas no estômago [24].

Um estudo de Bergholt *et al*, complementar ao apresentado, usando o algoritmo *ant colony optimization* (*ACO*) integrado com a análise linear discriminante (*LDA*), identificou sete bandas relevantes para o diagnóstico de lesões cancerosas do

estômago. As bandas Raman relevantes para a discriminação do tecido canceroso estão localizadas nas regiões 850 – 875, 1090 – 1110, 1120 – 1130, 1170 – 1190, 1320 – 1340, 1655 – 1665 e 1730 – 1745 cm^{-1} [25]. Este estudo permitiu concluir que, com base nestas bandas, a técnica apresenta uma sensibilidade e especificidade de 94,6% [25].

Na área clínica, a distinção entre úlceras malignas e benignas é muito importante, no entanto, a tarefa não é fácil usando apenas a técnica endoscópica convencional [23]. Bergholt *et al* mostraram que a espectroscopia de Raman pode ser útil neste campo, usando o equipamento anteriormente descrito (Figura 16). Um total de 1102 espectros Raman foram obtidos em 71 pacientes com úlceras gástricas (111 espectros de úlceras benignas, 67 espectros de úlceras malignas e 924 espectros de tecido normal) [23]. Foram observadas diferenças de intensidade das bandas Raman dos três tipos de tecidos, particularmente nas gamas espectrais 1000 – 1100, 1245 – 1335, e 1600 – 1800 cm^{-1} [23]. A Figura 20 apresenta os espectros médios obtidos para a mucosa normal, úlceras benignas e úlceras malignas.

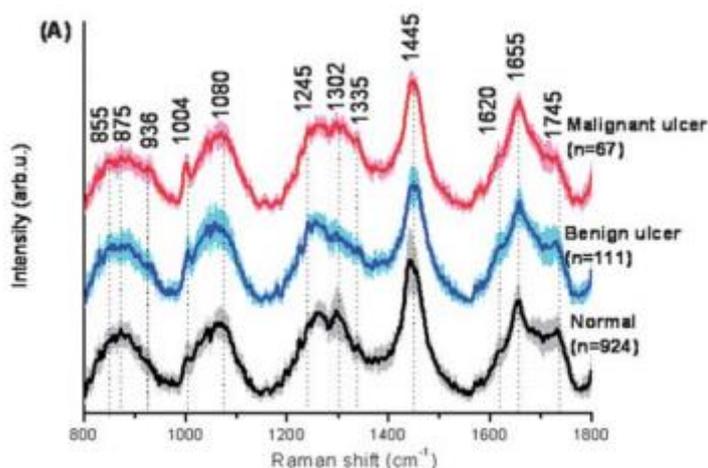


Figura 20: Espectros Raman médios da mucosa normal (n=924), úlceras benignas (n=111) e úlceras malignas (67). Adaptado da Ref. 23.

Os autores do estudo consideraram seis regiões como importantes na distinção dos três tipos de tecido: 875, 1004, 1335, 1620, 1665 e 1745 cm^{-1} . No entanto, por observação direta do espectro Raman da Figura 20, as diferenças entre os tecidos não são assim tão significativas, a não ser a 1004 cm^{-1} entre o tecido normal e úlcera maligna. No entanto, nesta mesma região espectral, é difícil discriminar entre os dois tipos de úlceras. Assim sendo, a apresentação do espectro Raman não é suficiente para discussão de resultados, pelo que é necessário recorrer a métodos estatísticos. Isto

constitui uma desvantagem, na medida em que aumenta o tempo de diagnóstico. Neste estudo de Bergholt *et al*, mesmo o uso de histogramas não revela resultados significativos, pois as diferenças entre mucosa normal, úlcera benigna e úlcera maligna encontram-se dentro das barras de incerteza (Figura 21).

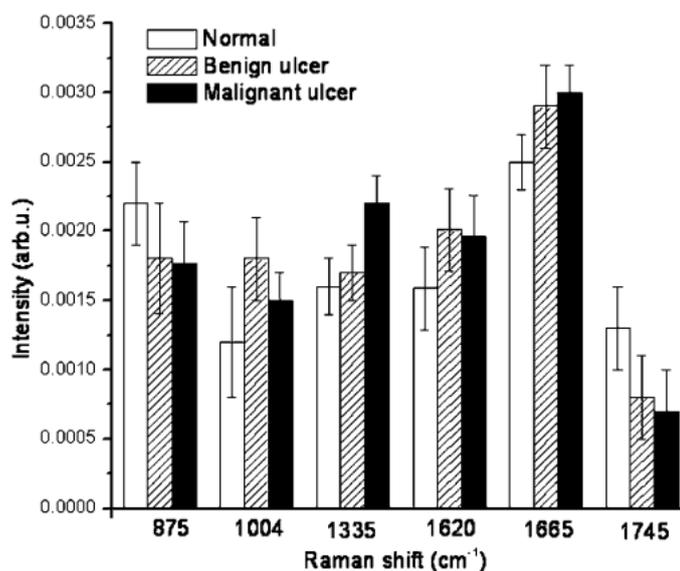


Figura 21: Histograma das intensidades Raman para a mucosa normal (branco), úlcera benigna (tracejado) e úlcera maligna (preto). Adaptado da Ref. 23.

Para reduzir a dimensão dos dados espectrais, por norma, implementa-se a análise de componentes principais (*PCA*), de forma a extrair o conjunto de componentes ortogonais principais (*PCs*) dos espectros [3, 23]. Alternativamente, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (*PLS-DA*) pode ser vantajosa quando se trata de uma multiclassificação [23]. Esta técnica estatística emprega o princípio fundamental da *PCA* mas ainda alterna os componentes (variáveis latentes – *LVs*), maximizando a covariância entre a variação espectral e a afinidade do grupo, para que os *LVs* expliquem as variações relevantes em vez das principais variações no conjunto espectral [23]. A *PLS-DA* juntamente com a validação cruzada *leave one out* revelaram sensibilidades de diagnóstico de 90,8%, 84,7% e 82,1%, e especificidades de 93,8%, 94,5% e 95,3%, para a mucosa normal, úlceras benignas e úlceras malignas respetivamente [23].

2.4.2 Aplicações *ex vivo*

A difusão Raman também é aplicada ao estudo de neoplasias do estômago, em amostras *ex vivo* [19, 25, 26]. Em geral as amostras são obtidas de biópsias ou cirurgias de remoção tumoral sendo imediatamente enviadas para a análise Raman. Em outros estudos, as amostras são primeiramente fixadas em formol, classificadas do ponto de vista histológico e só depois são analisadas por espectroscopia Raman.

Teh *et al* analisaram 76 amostras recolhidas por biópsia, 55 de tecido normal e 21 de tecido neoplásico, de 44 pacientes [26]. Após as biópsias, as amostras de tecido de dimensões aproximadas $3 \times 3 \times 2$ mm, foram imediatamente enviadas para o laboratório para a aquisição dos espectros Raman. O sistema Raman utilizado empregou um laser a emitir no 785 nm, e tempo de aquisição de 5s ($1,56 \text{ W cm}^{-2}$) [26]. Os resultados evidenciaram diferenças específicas entre os espectros do tecido normal e tumoral, particularmente nas gamas espectrais $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ e $1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, onde são esperadas as bandas de vibração da amida III e amida I, o modo de torção CH_3CH_2 das proteínas/ácidos nucleicos, e o modo de alongamento $\text{C} = \text{C}$ dos fosfolípidos, respetivamente [26]. A diferença de intensidades das bandas Raman dos espectros obtidos nos dois tipos de tecido é considerável, o que indica que existe uma diferença significativa de concentração de certo tipo de biomoléculas, relativamente ao total de constituintes Raman ativos no tecido tumoral (Figura 22 (A)). O tecido com displasia apresenta menores intensidades relativamente ao tecido normal nas bandas localizadas a $875, 1004, 1100, 1210$ e 1745 cm^{-1} , trocando esta relação de ordem para as bandas localizadas a $1265, 1335, 1450$ e 1655 cm^{-1} . O espectro diferença, representado na Figura 22 – B, permite uma melhor visualização das diferenças espectrais, revelando as mudanças de intensidade das principais bandas observadas nos espectros de tecidos normais e tecidos doentes.

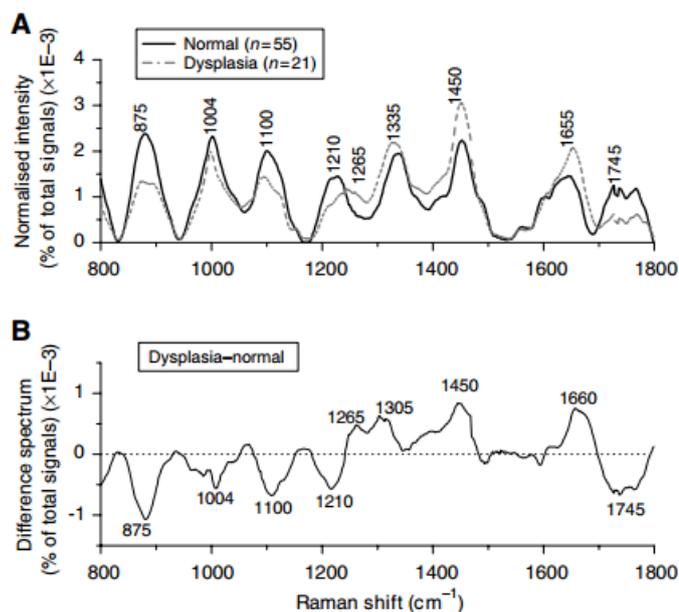


Figura 22: (A) Comparação entre o espectro de Raman médio e normalizado do tecido normal (n=55) e displasia (n=21); (B) Espectro diferença (displasia – normal). Adaptado da Ref. 26.

Posteriormente, os mesmos autores realizaram outro estudo, com o objetivo não só de provar a viabilidade da espectroscopia Raman no infravermelho próximo no diagnóstico de adenocarcinoma no estômago, mas também a sua capacidade de distinguir entre os subtipos da doença: intestinal ou difuso [19]. Foram utilizadas 100 amostras de tecido, provenientes de 62 pacientes submetidos a endoscopia ou gastrectomia (70 espécimes de tecido normal e 30 com adenocarcinoma) [19]. Após a biópsia ou ressecção cirúrgica, as amostras de dimensões aproximadas $3 \times 3 \times 2$ mm foram imediatamente enviadas para a aquisição dos espectros Raman. Foram adquiridos espectros Raman do tecido gástrico, na região $800 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, em 5s (Figura 23) [19].

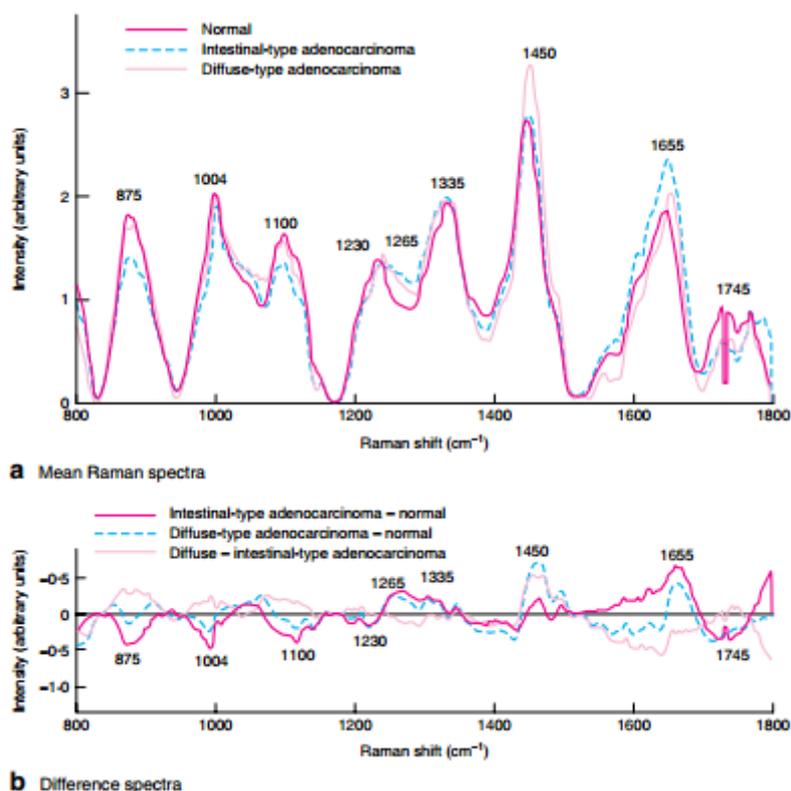


Figura 23: (a) Comparação dos espectros médios de 70 amostras de estômago normal, 18 de adenocarcinoma de tipo intestinal e 12 adenocarcinoma de tipo difuso; (b) Espectro diferença. Adaptado da Ref. 19.

A Figura 23 (a) mostra os espectros médios do tecido normal, adenocarcinoma tipo intestinal e adenocarcinoma tipo difuso [19]. Os dois subtipos de adenocarcinomas revelam diferenças significativas no que diz respeito aos espectros de difusão Raman, em relação ao tecido normal (Figura 23 (b)). Os adenocarcinomas apresentam intensidades mais baixas nas bandas localizadas a 875, 1004, 1100, 1230 e 1745 cm^{-1} , e mais altas nas bandas centradas a 1265, 1335, 1450 e 1655 cm^{-1} [19]. Comparando apenas entre os dois subtipos de adenocarcinoma (intestinal *versus* difuso), o tipo difuso apresenta maiores intensidades nas bandas a 875, 1100 e 1450 cm^{-1} e menor a 1655 cm^{-1} . Estes revelam a existência de diferenças espectrais significativas entre o adenocarcinoma de tipo difuso e o adenocarcinoma de tipo intestinal, confirmando a utilidade da espectroscopia Raman no infravermelho para discriminação do subtipo de adenocarcinoma.

Confrontando os dois estudos apresentados na Figura 22 (A) e 23 (a), as intensidades de banda de tecido normal são superiores, em relação ao tecido tumoral, de 800 a 1230 cm^{-1} e de 1700 a 1800 cm^{-1} . Estes resultados concordam entre si, exceto

no que diz respeito ao adenocarcinoma do tipo difuso, que apresenta maior intensidade de banda de 1780 a 1800 cm^{-1} , aproximadamente.

O trabalho publicado por Xu *et al* reporta um estudo elaborado em 87 amostras de estômago (42 normais e 45 tumorais) coletadas de 43 pacientes durante gastrectomia, utilizando para o efeito uma sonda Raman com transmissão por fibra ótica (105 μm de diâmetro interno), e excitação com um laser de 785 nm, potência 30 mW, e 10s de aquisição por espectro. A área de amostra analisada é de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, e cada uma delas foi limpa com solução salina antes do registo de sinal. Com base nos espectros apresentados na Figura 24, os autores observaram uma menor intensidades das bandas 748, 944 e 1520 cm^{-1} do tecido tumoral comparativamente ao tecido normal, e o contrário para as bandas 807 e 1661 cm^{-1} [4].

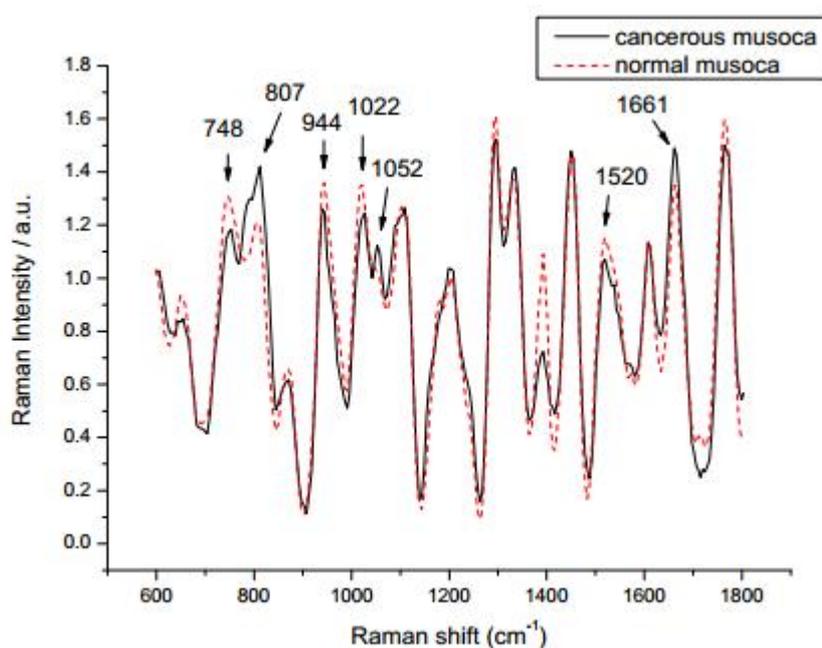


Figura 24: Espectros Raman da mucosa normal e tumoral. Adaptado da Ref. 4.

Neste caso, as diferenças espectrais entre o tecido tumoral e normal não são tão significativas como as encontradas anteriormente. No entanto, a intensidade de banda relativa à mucosa normal é superior a 748, 944 e 1022 cm^{-1} o que está de acordo com os resultados obtidos por Teh *et al*.

2.4.3 Tratamento de dados e análise estatística

A generalidade dos estudos das neoplasias do estômago que utilizam a espectroscopia Raman empregam diversas ferramentas estatísticas multivariadas para diferenciar entre os espectros das regiões saudáveis e afetadas pela doença [4, 17, 25]. A análise por componentes principais (*PCA*) é geralmente o primeiro método a ser aplicado, para reduzir a informação presente na totalidade dos espectros analisados, num número inferior de funções, que contenham a informação mais significativa para a classificação do tecido [3, 26]. Seguidamente, é usual aplicar-se outro tipo de análise estatística, por exemplo, *LDA* [26], *support vector machines* [4] e *multinomial logistic regression* [19], entre outros. Algoritmos de diagnóstico não paramétricos, baseados nas intensidades e larguras de banda também têm sido largamente utilizados para correlacionar as variações entre os espectros de tecido normal e tecido com patologia [26]. Contudo, tendo em conta o trabalho de Teh *et al* apresentado [26], não é claro que as diferenças encontradas entre os espectros médios sejam representativas da totalidade dos espectros experimentais; ou seja, se essas diferenças estão sistematicamente presentes ou não. Para além disto, esta análise simplista apenas utiliza um número limitado de bandas Raman, a maioria da informação contida no espectro não é usada na análise espectral.

Embora os algoritmos de classificação implementem métodos objetivos de diagnóstico, este tipo de análise tem algumas desvantagens e limitações: (1) não possibilita uma correlação bioquímica clara entre os parâmetros relevantes para o diagnóstico e os tecidos analisados; (2) a necessidade de serem testados utilizando grandes bases de dados espectrais como referência, para cada tipo de tecido, para novas classificações; (3) e a falta de controlo sob os parâmetros e as variáveis em causa, por parte do utilizador [3]. Ainda, estes critérios podem depender das condições particulares de aquisição e da normalização dos espectros, o que torna difícil a comparação dos resultados entre estudos independentes [3].

De modo geral, não é feita uma análise por desconvolução espectral para comparar as intensidades de bandas específicas, no que toca ao cancro do estômago. No entanto, a abordagem tem sido aplicada na área do cancro da mama, cancro do pulmão e cancro do colón [3]. A análise por desconvolução espectral é feita através do ajuste por mínimos quadrados da equação seguinte ao espectro, que traduz um modelo de osciladores amortecidos e independentes [3]:

$$I(\nu) = [1 + n(\omega, T)] \sum_{j=1}^N A_{0j} \frac{\omega \Omega_{0j}^2 \Gamma_{0j}}{(\Omega_{0j}^2 - \omega^2)^2 + (\omega \Gamma_{0j})^2} \quad (8)$$

O processo de ajuste da equação a um espectro permite determinar a frequência (Ω_{0j}), a largura a meia altura (Γ_{0j}) e a amplitude (A_{0j}) de cada modo vibracional independente, associado a um oscilador j . A amplitude espectral ajustada, $I(\nu)$, é desta forma modelizada através do somatório dos vários modos que se consideram independentes. Na equação, $n(\omega, T)$ é o fator de Bose-Einstein, que depende da temperatura, T [3]. Apresenta-se agora um esquema simplificado da desconvolução espectral e do seu processo inverso, revelando os problemas que podem advir de cada um deles (Figura 25).

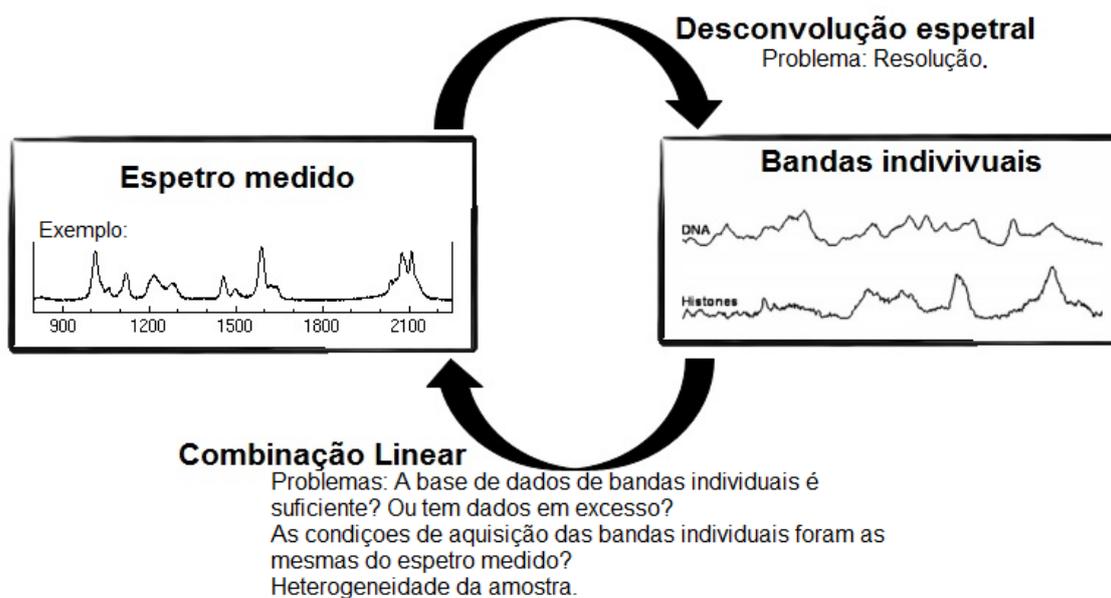


Figura 25: Esquema simplificado da desconvolução espectral e combinação linear.

No método da desconvolução espectral podem-se perder bandas ou introduzir bandas em excesso sem se ter de antemão um modelo definido. O método da combinação linear, utilizado na Figura 18, é um modelo limitado, porque se parte apenas de oito componentes bioquímicos. À partida nada garante que esses componentes serão os suficientes ou até excessivos para o estudo a concretizar. Para além disso, a definição dos pesos de cada componente pode complicar a simulação. Com isto, pode

concluir-se que não existe um método 100% fiável, no entanto, olhando a bibliografia existente o método de desconvolução apresenta soluções quimicamente aceitáveis.

2.5 Objetivos da dissertação

Deve ter-se em atenção que a aquisição de espetros Raman *ex vivo* em tecidos gástricos homogéneos com patologias definidas pode não refletir as condições clínicas *in vivo*, pois o sinal Raman *in vivo* pode conter uma mistura de informação espectral tanto da lesão neoplásica como do tecido gástrico normal circundante [17]. Esta pode ser a razão que justifica a maior diferença nas intensidades de bandas entre tecido tumoral e normal nas aplicações *ex vivo*.

Nenhum estudo publicado até à data desta dissertação se dedicou à discriminação dos estadios do tumor gástrico ou faz distinção entre estes. Esta dissertação pretende dar uma contribuição nesta área de aplicação, confrontando diversos estadios de adenocarcinoma, com o objetivo de verificar se existem diferenças espectrais significativas devidas a essa variável.

3. Materiais e Procedimento Experimental

3.1 Caracterização das amostras

As amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram fornecidas pelo Prof. Doutor Rui Henrique do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia Professor Francisco Gentil, do Porto (IPOPFG-Porto). As amostras foram obtidas através de cortes transversais de porções de tecidos do estômago, excisados cirurgicamente. As dimensões das amostras tomam valores típicos entre 2,5 e 6,8 cm de largura por 1 e 15 mm de espessura. Todas as amostras fornecidas foram previamente analisadas do ponto de vista histológico, tendo-se delineado as zonas saudáveis e cancerosas. As amostras foram conservadas em formol. Neste trabalho foram estudadas 9 amostras de 9 indivíduos diferentes, de idades compreendidas entre os 29 e 84 anos, todas elas contendo regiões normais e tumorais adjacentes. A Tabela 4 apresenta a informação disponível acerca de cada uma das amostras estudadas: género, idade do paciente aquando o diagnóstico, tipo de diagnóstico, estadiamento patológico e grupo de estadiamento. Na Figura 26 apresentam-se algumas das amostras utilizadas.

Tabela 4: Características das amostras utilizadas neste trabalho.

Nº da Amostra	Género	Idade ao Diagnóstico	Diagnóstico (Classificação OMS 2010)	Estadio Patológico	Grupo de Estadiamento
1	Masculino	72 anos	Adenocarcinoma tubular de padrão sólido	pT4aN3a cM0	III
2	Masculino	84 anos	Adenocarcinoma tubular	pT4aN2 cM0	III
3	Masculino	50 anos	Adenocarcinoma misto, tubular e de células pouco coesas	pT2N0 cN0	I
4	Masculino	69 anos	Adenocarcinoma tubular	pT4aN2 cM1	IV
5	Feminino	75 anos	Adenocarcinoma tubular com áreas papilares	pT3N3a cM0	III
6	Masculino	52 anos	Adenocarcinoma tubular com áreas papilares	pT1bN0 cM0	I
7	Masculino	60 anos	Adenocarcinoma de células pouco coesas com células em anel de sinete	pT3N3b cM0	III
8	Masculino	29 anos	Adenocarcinoma misto, tubular e de células pouco coesas	pT3N2 cM0	III
9	Feminino	35 anos	Adenocarcinoma de células pouco coesas	pT4aN3bM1 (M1 peritoneal)	IV

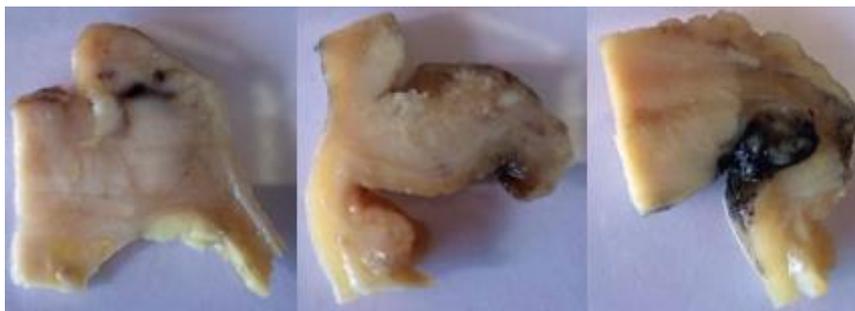


Figura 26: Algumas das amostras de tecidos do estômago, cedidas pelo IPOFG-Porto.

3.2 Instrumentação

Os espectros Raman foram obtidos utilizando um espectrómetro LabRAM HR800 da Horiba-Jobin Yvon, munido de um microscópio confocal Olympus BX41 e cinco lasers de excitação. A radiação utilizada foi gerada por um díodo-laser da Sacher Lasertechnik, emitindo no comprimento de onda de 785 nm. A potência da radiação incidente na amostra foi estimada em 6 mW. A escolha de baixas potências da radiação incidente evita a sua degradação durante o período temporal de análise. Neste trabalho utilizou-se uma objetiva de 50x, distância focal 10,6 mm, e abertura numérica 0,50. A luz difundida pela amostra é dispersada por uma rede de difração com 1800 linhas/mm e o registo do sinal analisado foi feito com uma CCD. A CCD está acoplada a um computador para armazenamento e análise dos dados usando o *software* Labspec® (Horiba Jobin Yvon, Lille, França). A resolução espectral instrumental é de 4 cm^{-1} [28]. A Figura 27 apresenta um esquema de um sistema micro Raman.

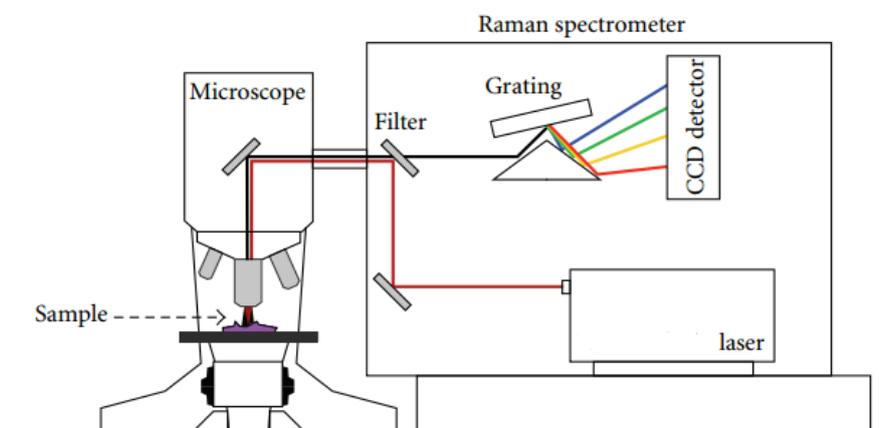


Figura 27: Ilustração esquemática do sistema micro Raman utilizado e seus principais constituintes. Adaptado da Ref. 22.

O feixe laser incide inicialmente num filtro de *notch*, num ângulo tal que permite a sua reflexão total para a objetiva do microscópio, incidindo na superfície da amostra. A luz retro difundida pela amostra é recolhida pela mesma objetiva e incide no filtro de *notch*. Neste passo, o filtro *notch* deixa passar luz com comprimento de onda numa banda espectral com baixas perdas, atenuando fortemente luz com comprimento de onda do laser incidente, minimizando assim a risca de Raleigh. Finalmente, a radiação filtrada segue em direção ao monocromador do espectralógrafo, com rede de difração única, que a dispersa nas suas componentes espectrais. O registo da intensidade, em função do número de onda, é feito por um detetor do tipo CCD (*Charged-Coupled Device*). A câmara CCD é um dispositivo constituído por um bloco de silício segmentado numa matriz de elementos fotossensíveis, que geram e armazenam fotoelétrões, proporcionalmente à quantidade de fótons incidentes no meio. Cada setor comunica independentemente ao computador, permitindo desta forma discriminar as várias frequências da radiação difundida, que vão sendo continuamente acumuladas, durante a exposição à radiação [3]. O equipamento utilizado está ilustrado na Figura 28 e foi utilizado no âmbito de uma colaboração entre o Departamento de Física e Astronomia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e o Instituto de Investigação e Inovação na Saúde (i3S).



Figura 28: Micro espectralógrafo Raman utilizado: Raman LabRAM HR800 (Horiba-Jobin), do Instituto de Investigação e Inovação na Saúde (i3S).

3.2.1 Condições de aquisição

O forte *background* causado pela fluorescência do tecido é um sério problema da espectroscopia Raman, podendo até camuflar o fraco sinal deste tipo de difusão. Uma das soluções passa por utilizar comprimentos de onda no infravermelho próximo como

fonte de excitação, pois existe menos energia para provocar transições eletrônicas nas moléculas [29].

A excitação realizada por luz laser do infravermelho próximo (785 nm) tem-se revelado promissora na deteção de alterações no tecido gástrico, apresentando grande especificidade biomolecular. Por exemplo, sensibilidades e especificidades de diagnóstico na ordem dos ~ 85 – 95% e ~ 90 – 98% têm sido relatadas para a diferenciação entre diferentes tipos patológicos (metaplasia intestinal, infecção por *Helicobacter Pylori*, displasia e adenocarcinoma) [29]. Além do mais, radiação no infravermelho próximo tem menor efeito mutagénico e maior capacidade de penetração do que a radiação na zona espectral do visível ou ultravioleta [1]. A maior absorção de radiação no infravermelho e vermelho por parte da água na região espectral *fingerprint* (500 – 2000 cm^{-1}), importante para a análise de tecidos cancerosos por difusão Raman, é também uma das vantagens da utilização de radiação de comprimento de onda 785 nm pois aumenta a facilidade de deteção de outros componentes do tecido [3, 22, 27]. Neste trabalho optou-se pelo estudo da região espectral limitada entre 800 e 1800 cm^{-1} .

Uma primeira fase deste trabalho consistiu no estudo das condições ótimas de aquisição do espectro Raman. Para isso analisou-se o efeito de diferentes larguras de fendas de entrada do espectrómetro, filtros de intensidade e tempo de aquisição, assim como o número de varrimentos para maximização da razão sinal/ruído. O tempo de aquisição dos espectros foi de 120s por varrimento. A fenda de entrada foi mantida a 100 μm . Todas as condições experimentais foram mantidas no registo dos espectros.

Em geral, a técnica de espectroscopia Raman não requer pré-tratamento das amostras. No entanto, a desidratação da amostra causada pela evaporação da água, enquanto está exposta ao ar, num ambiente laboratorial com baixa humidade, e à intensidade do laser, durante a aquisição dos espectros, pode levar a uma certa retração da superfície da mesma, o que tem implicações à escala micrométrica. Uma vez que a profundidade de campo é da ordem de 20 μm , a intensidade do laser na amostra pode ser significativamente afetada, se o plano focal ficar fora da superfície da mesma, podendo comprometer a qualidade da medida obtida [3]. Para evitar o efeito da desfocagem, as amostras foram mantidas humedecidas no próprio formol no momento da aquisição dos espectros.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos do estudo da difusão Raman de amostras *ex vivo* de excisões de tecido do estômago, conservadas em formol, na região espectral entre 800 e 1800 cm^{-1} . Para este estudo optou-se por registar espectros de difusão Raman na mesma amostra em diferentes localizações de regiões saudáveis e cancerosas, obtendo-se um total de 36 espectros, 18 em cada região. Quatro espectros, nomeadamente 3 de região tumoral e 1 de região normal não foram considerados devido à sua baixa qualidade para identificação de bandas.

4.1 Fatores que influenciam o registo do sinal de difusão Raman

Vários são os fatores que contribuem para a variabilidade dos espectros Raman obtidos nas mesmas condições experimentais de aquisição, quando se trata de amostras tão complexas como os tecidos biológicos [3]. A fluorescência é o principal fator que prejudica a boa aquisição do sinal de difusão Raman. Este efeito depende essencialmente da frequência e da intensidade da radiação de excitação, assim como da localização da zona em estudo em amostras heterogêneas do ponto de vista estrutural e químico [3]. A fluorescência, que se manifesta por um sinal de fundo de elevada largura espectral, sobrepõe-se às bandas de difusão características dos modos normais de vibração molecular, podendo mascarar parte ou toda a informação útil de um espectro. Este problema tende a agravar-se quando a intensidade de excitação é alta (maior número de fótons do feixe incidente na amostra). Para evitar ao máximo a fluorescência, utiliza-se radiação de excitação na gama do infravermelho próximo. Porém, as bandas Raman com origem em vibrações da molécula de água ou ligações O – H exibem baixa intensidade quando se utiliza radiação no infravermelho próximo devido à forte absorção, impossibilitando a sua observação nas melhores condições. Um compromisso é utilizar radiação de excitação na região do vermelho.

Outro fator que influencia o registo do sinal Raman, em particular a relação de intensidade entre bandas, é a qualidade da superfície da amostra. As amostras biológicas apresentam superfícies rugosas e muito heterogêneas. A rugosidade é consequência do corte das amostras, não sendo possível efetuar um polimento adequado. Devido à rugosidade, a radiação não é difundida nas mesmas condições em

localizações da superfície diferentes. A heterogeneidade estrutural associada a estruturas organizadas, como paredes e organitos celulares, diferentes orientações de proteínas e de outras macromoléculas, dá origem a variações significativas da intensidade relativa das bandas Raman, sem que isso signifique alterações da composição química da amostra. Estas diferenças advêm do carácter anisotrópico da difusão Raman. Atualmente com a técnica de microscopia Raman pode estudar-se a difusão Raman em zonas da amostra com dimensões lineares laterais e profundidade de cerca de 20 μm .

Neste estudo foram utilizadas amostras macroscópicas, conservadas em formol, previamente analisadas do ponto de vista histológico por especialistas do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional do Norte. O sinal Raman foi obtido em locais previamente escolhidos, após observação visual e discussão com o histopatologista. Escolheram-se regiões superficiais das amostras, o mais planar e regular possíveis. É importante referir que estudos anteriores provaram que o efeito da conservação das amostras em formol não altera significativamente a localização e perfil das bandas de difusão Raman na região espectral de interesse neste trabalho [3]. Deste modo, as alterações observadas entre os espectros Raman são intrínsecas à composição química e estrutural das zonas analisadas.

4.2 Pré-processamento espectral

Em consequência dos fatores discutidos na secção anterior, o sinal Raman registado em condições experimentais idênticas apresenta variabilidade, em particular no sinal de fundo (*background*) e na intensidade das bandas. Por isso, é necessário adotar medidas de uniformização dos dados, que permitam extrair a informação útil do espectro original, de forma a realizar um estudo comparativo e quantitativo de todo o conjunto de dados disponíveis. O pré-processamento adotado neste trabalho envolveu dois passos fundamentais: (1) subtração do sinal de fundo (*background*) e (2) normalização de intensidade.

A literatura aponta diversos modelos para simular o sinal de fundo. O mais utilizado consiste em simular o sinal de fundo com um polinómio de elevado grau. A escolha do grau do polinómio depende muito do tipo de sinal de fundo existente e da gama espectral em estudo. O critério de escolha reside no melhor ajuste ao sinal de fundo, sem alterar a intensidade e perfil das bandas Raman. Neste trabalho ajustaram-

se polinómios de diferente grau, que variou entre 3 e 8. Os polinómios foram ajustados a cada espectro experimental, com recurso à opção *baseline* do software *LabSpec®*. Analisou-se visualmente não só a qualidade da simulação do sinal de fundo, mas também o efeito na intensidade relativa das bandas Raman. Uma vez que na mesma zona estudada de uma amostra o sinal de fundo é, em geral, diferente, o grau do polinómio ajustado não foi necessariamente igual para espectros obtidos em regiões similares. Contudo, procurou-se escolher o polinómio de menor grau que descrevia melhor o sinal de fundo. O espectro Raman que foi posteriormente analisado foi obtido após a subtração da linha de base ao espectro original.

De seguida, procedeu-se à correção de intensidade, através de uma normalização de cada espectro à área total sob a curva, na gama espectral dos 800 aos 1800 cm^{-1} . Para obtenção das intensidades normalizadas I' , procedeu-se à divisão das intensidades medidas I em função do número de onda, pela área total F sob a curva. Estes cálculos foram efetuados com o recurso do software *KaleidaGraph®*:

$$I' = \frac{I}{F} \quad (9)$$

As Figuras 29 e 30 apresentam um exemplo representativo da simulação do sinal de fundo de um espectro Raman e sua subtração, e posterior normalização de intensidade, respetivamente, para a amostra 2.

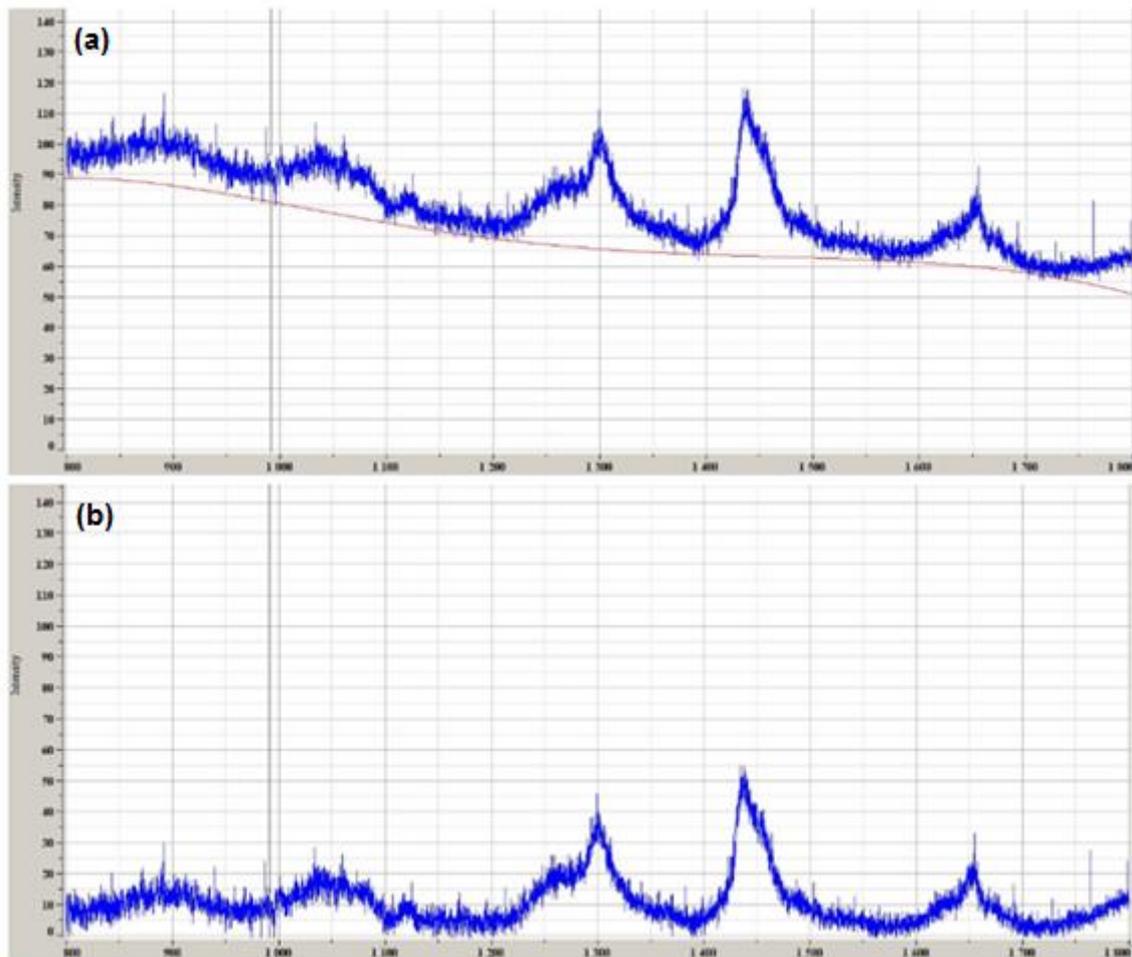


Figura 29: Subtração da linha de base da amostra 2: Espectro experimental e resultado do melhor ajuste de um polinómio de 5ª ordem (a); Espectro após a subtração do polinómio (b). Imagens recolhidas através do *software LabSpec®*.

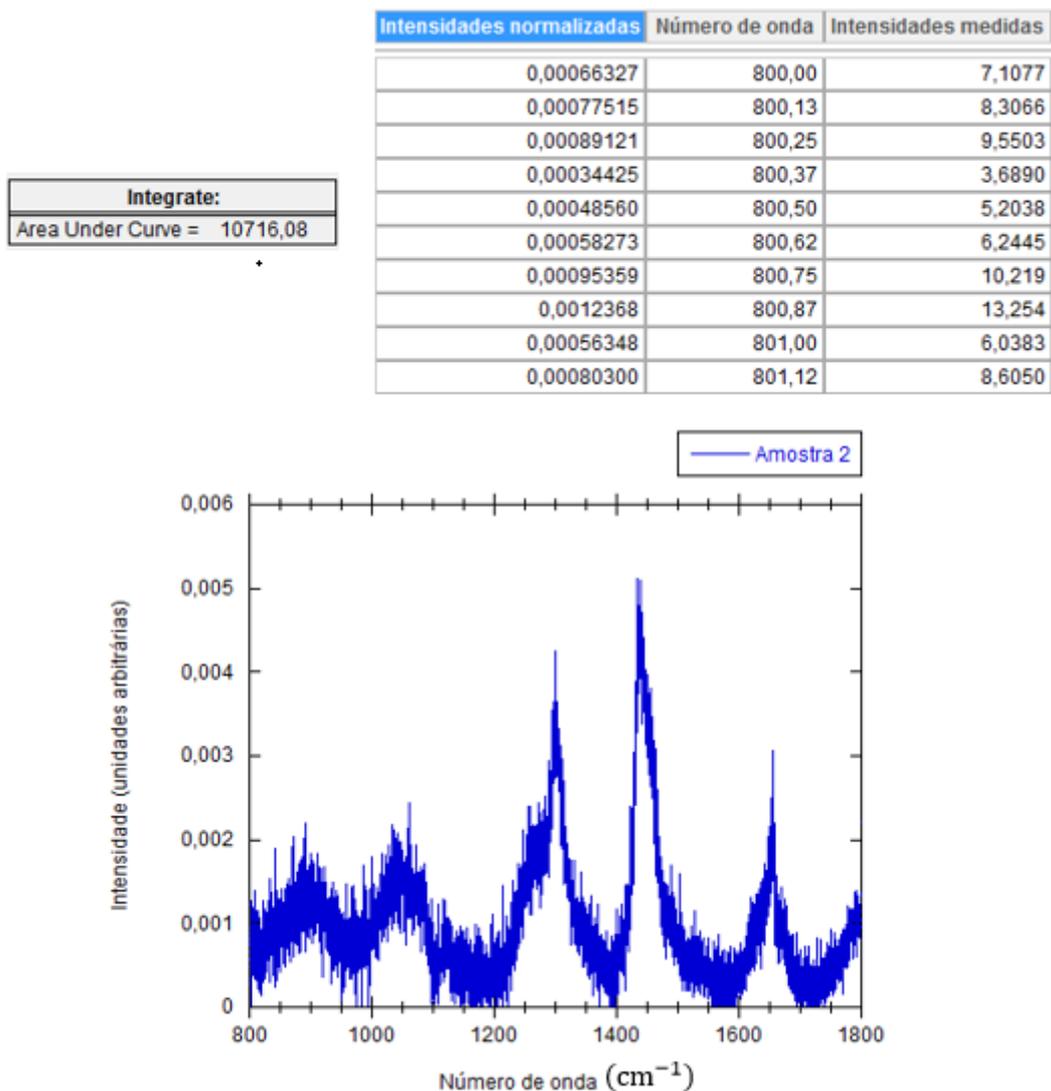


Figura 30: Correção de intensidade da amostra 2, com indicação da *area under curve* e parte dos cálculos realizados. Imagens recolhidas através do *software KaleidaGraph®*.

O caso apresentado na Figura 29 corresponde a um espectro registado na zona tumoral da amostra 2. A linha a contínuo que descreve o sinal de fundo foi determinada a partir do melhor ajuste de um polinómio de 5ª ordem. Embora este seja o polinómio de menor ordem que melhor simula o sinal de fundo, é preciso destacar que não é capaz de simular corretamente a zona espectral entre 1700 e 1800 cm^{-1} . Deste modo, o aumento de intensidade que se observa nessa gama espectral após subtração do sinal de fundo (Figura 29 (b)) não tem significado. Este cuidado foi considerado na comparação dos espectros normalizados. A determinação do número de onda das bandas Raman foi feita através do *software KaleidaGraph®*. Considera-se uma margem de erro no valor do número de onda ventral de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$.

4.3 Apresentação dos espectros e discussão

No que se segue, serão apresentados os resultados do tratamento espectral realizado e a discussão dos mesmos, em função do tipo de tecido analisado (saudável ou tumoral) e do estadio da doença. Começa-se pela comparação dos espectros obtidos em tecido saudável.

4.3.1 Comparação dos espectros Raman da região saudável: músculo *versus* mucosa

Sem perda de informação e de generalidade, e com o intuito de evitar uma descrição redundante de resultados, optou-se nesta secção por mostrar os resultados obtidos apenas nas amostras 2, 3, 4 e 9, que se consideram ser representativos do conjunto estudado. Para além disso, e uma vez que se conhecia a morfologia das amostras, teve-se o cuidado de separar os resultados obtidos na zona saudável em zona da mucosa e zona muscular. A Figura 31 mostra os espectros de difusão Raman registados em diversos pontos da zona saudável das amostras 2, 3, 4 e 9.

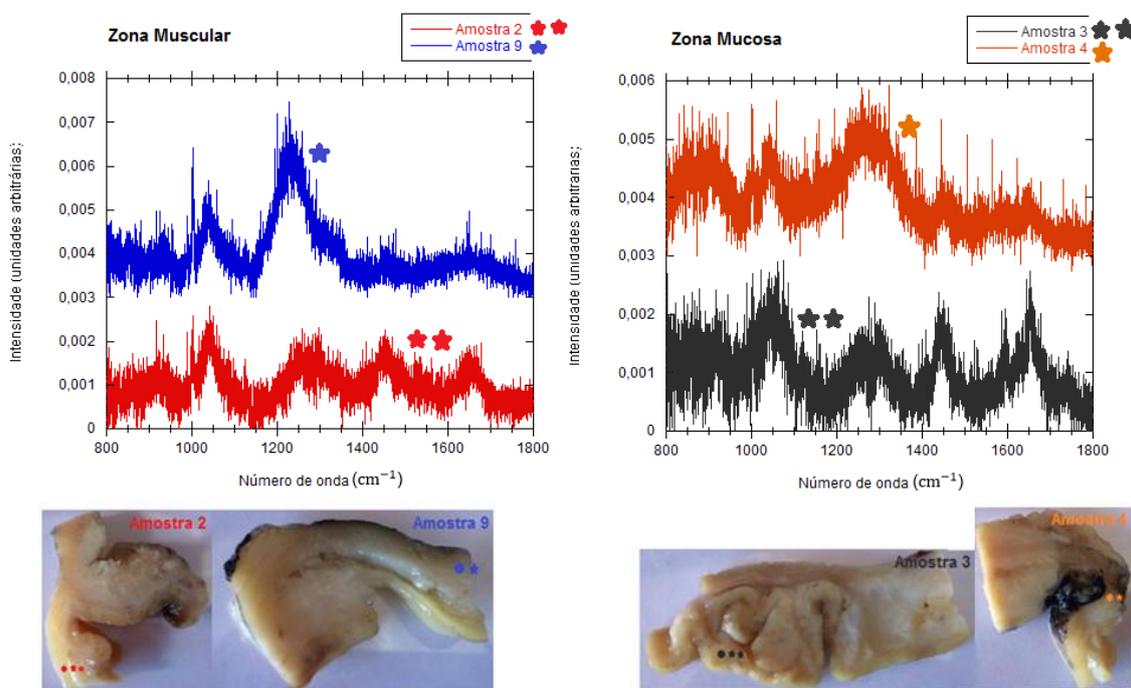


Figura 31: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável das amostras 2, 3, 4 e 9. Os espectros das Amostra 2 e 9 foram adquiridos em zona muscular e os espectros das amostras 3 e 4 foram adquiridos em zona de mucosa. Amostra 2, 3, 4 e 9 com os locais das aquisições espectrais.

Relativamente à zona muscular, e a menos de um fator de intensidade, pode concluir-se que os espectros Raman da amostra 2 e amostra 9 na gama espectral entre 800 e 1400 cm^{-1} , são concordantes. Na zona espectral entre 1400 e 1800 cm^{-1} , pode-se observar pelo menos duas bandas no espectro registado na amostra 2. Uma observação cuidada permite também identificar essas bandas nessa gama espectral para a amostra 9. As diferenças de intensidade referidas devem-se a diferentes concentrações das macromoléculas responsáveis por cada banda Raman identificada. A identificação das bandas Raman será realizada na secção 4.3.2.

Na zona da mucosa, os espectros Raman registados em diferentes amostras são bastante concordantes, a menos de um fator de intensidade, que pode estar associado à heterogeneidade desta região anatómica.

Este primeiro resultado mostra que a técnica Raman permite identificar a mucosa e o tecido muscular saudáveis.

4.3.2 Discriminação entre tecido saudável e tecido tumoral

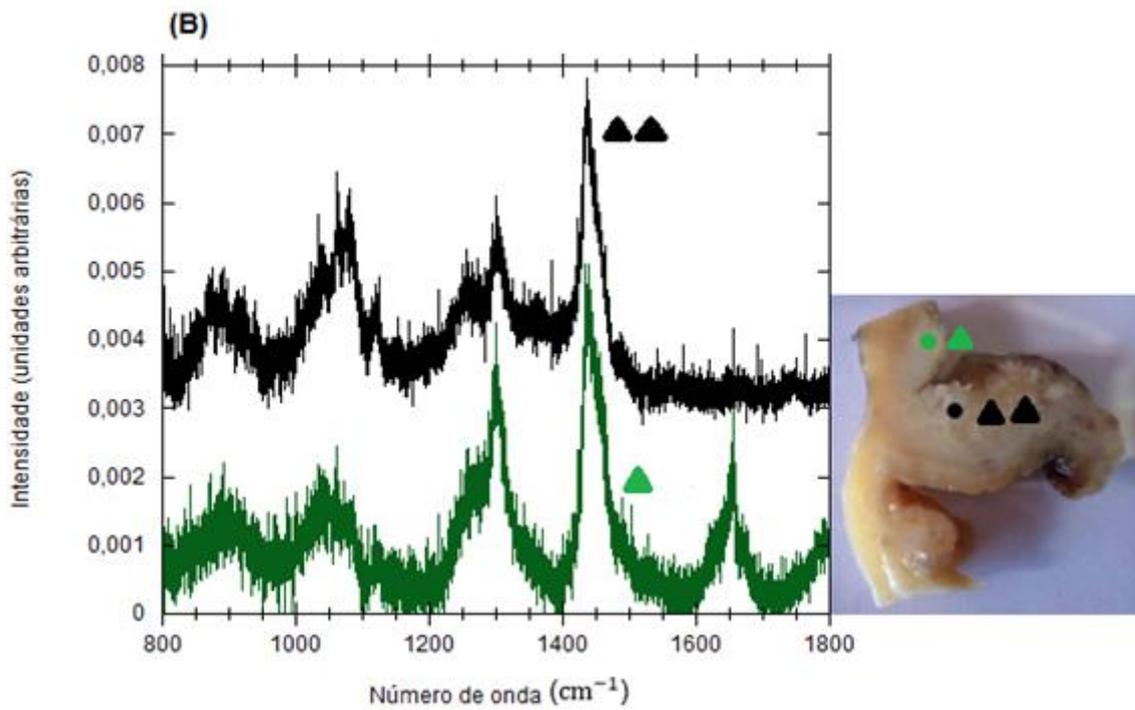
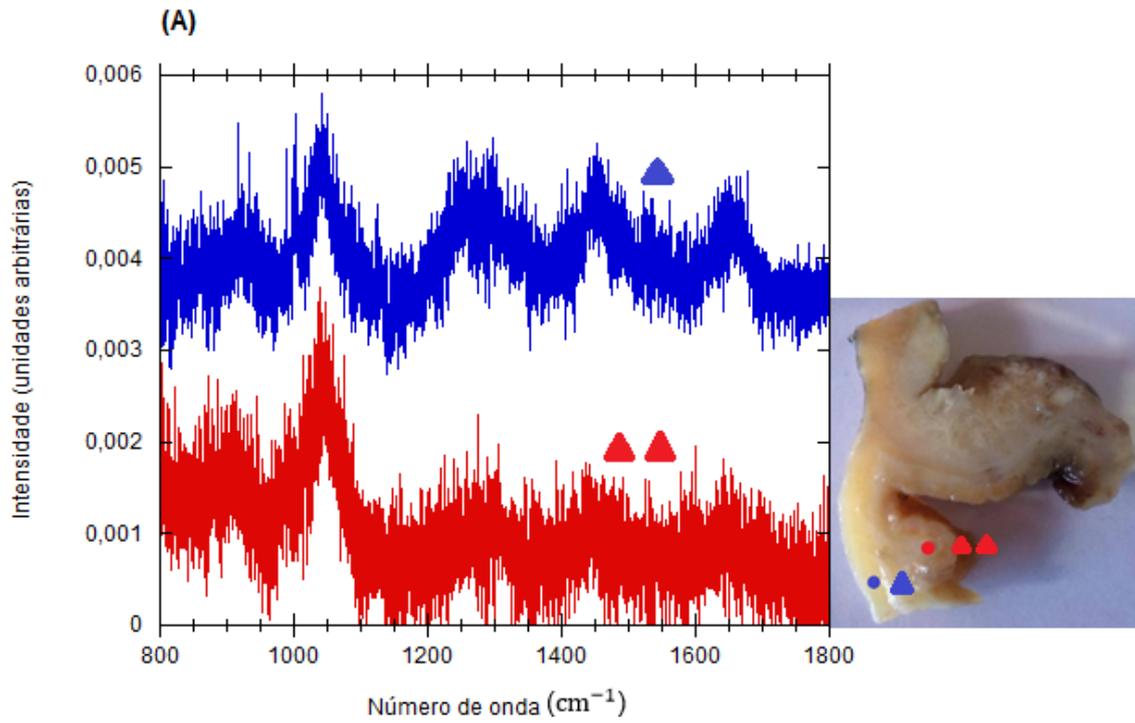
O conjunto dos espectros utilizados para o presente estudo, após pré-processamento, está representado nas Figuras 32, 34, 36 e 38. Nestas figuras apresentam-se os espectros obtidos em regiões de tecido saudável e afetado, das amostras 2, 3, 4 e 9, respetivamente, e faz-se a comparação entre o tecido saudável e o tecido tumoral para cada amostra estudada, após seleção dos espectros com maior qualidade. Devido à variabilidade existente entre as amostras, relativamente ao diagnóstico, estadió patológico e grupo de estadiamento, a análise tecido normal *versus* tecido tumoral foi feita para cada amostra em particular. A Tabela 5 apresenta as características das amostras utilizadas.

Tabela 5: Características das amostras utilizadas, incluindo características histopatológicas.

Nº da Amostra	Género	Idade ao Diagnóstico	Diagnóstico (Classificação OMS 2010)	Estadio Patológico	Grupo de Estadiamento
2	Masculino	84 anos	Adenocarcinoma tubular	pT4aN2 cM0	III
3	Masculino	50 anos	Adenocarcinoma misto, tubular e de células pouco coesas	pT2N0 cN0	I
4	Masculino	69 anos	Adenocarcinoma tubular	pT4aN2 cM1	IV
9	Feminino	35 anos	Adenocarcinoma de células pouco coesas	pT4aN3bM1 (M1 peritoneal)	IV

De seguida, apresenta-se uma discussão de cada situação, procurando evidenciar as principais diferenças entre os dois grupos espectrais obtidos em tecido saudável e tecido tumoral.

4.3.2.1 Amostra 2



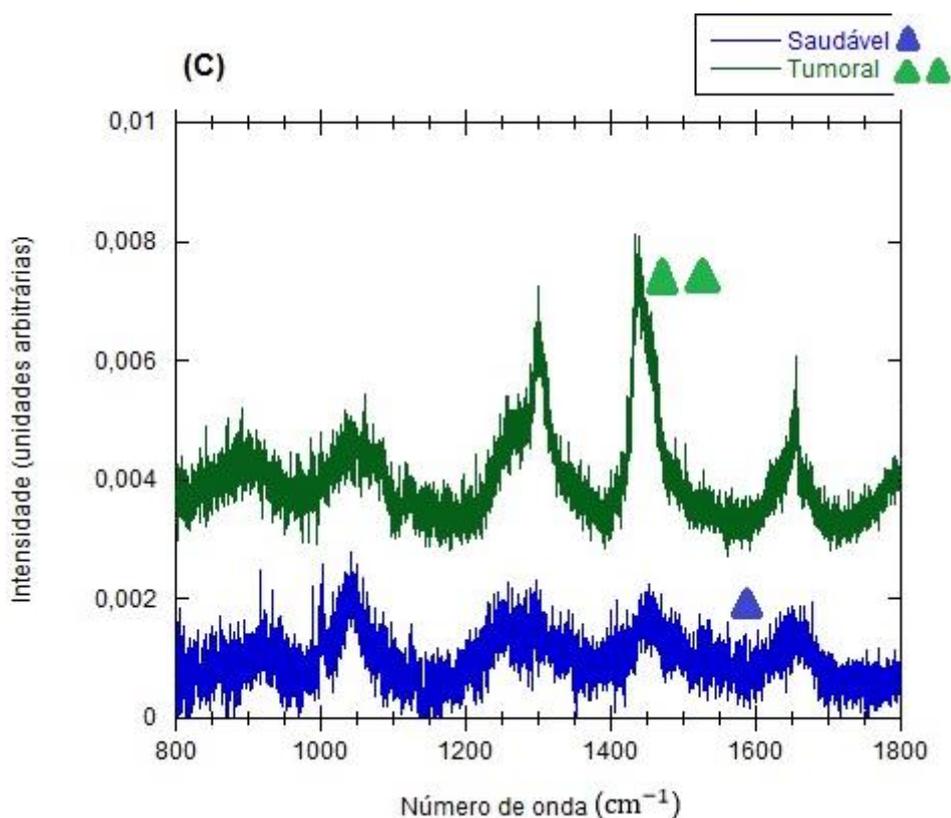


Figura 32: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 2 (Adenocarcinoma tubular, estadiamento III) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (azul) e tumoral (verde) da Amostra 2. Os espectros foram selecionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.

A Figura 32 (A) apresenta os espectros adquiridos na região saudável da amostra 2. O local assinalado a azul (\blacktriangle) diz respeito a tecido muscular enquanto que o local assinalado a vermelho ($\blacktriangle\blacktriangle$) corresponderá, provavelmente, a submucosa. Estes espectros adquiridos na região saudável da amostra não apresentam uma variabilidade significativa entre si, o que indica uma composição química e estrutural semelhante nos pontos onde foram registados os espectros. No que diz respeito aos espectros da região tumoral, apresentados na Figura 32 (B), é possível verificar uma diferença entre eles na região espectral entre 1600 – 1700 cm^{-1} . O espectro registado no local assinalado pelo ponto verde (\blacktriangle) no tecido tumoral (Figura 32 (B)) revela uma banda proeminente a 1655 cm^{-1} , que não é observada no espectro registado no tecido canceroso no local assinalado pelo ponto a negro ($\blacktriangle\blacktriangle$). Esta diferença pode ser justificada por duas hipóteses: (1) a banda tem origem no tipo de tecido analisado (muscular ou mucosa) ou no tipo de tecido circundante devido à difusão lateral; ou (2) devida à heterogeneidade do tecido tumoral (densidade celular normal face à densidade de células neoplásicas e grau de diferenciação do tecido tumoral). Será necessária uma análise histológica mais

detalhada para afirmar qual a hipótese mais provável. Contudo esta banda está associada ao modo de extensão $C = O$ da amida I [27].

Bandas Raman localizadas a 915, 1004, 1040, 1300, 1440 e 1655 cm^{-1} são observadas tanto nos espectros do tecido saudável como do tecido tumoral (Figura 32 (C)). A Figura 33 apresenta o espectro diferença entre o espectro Raman registado no tecido canceroso e no tecido saudável, respetivamente. Como se pode observar, o espectro do adenocarcinoma apresenta bandas com maior amplitude relativamente às bandas do espectro do tecido saudável, localizadas a 1300, 1440 e 1655 cm^{-1} , e com menor intensidade a 1004 cm^{-1} . Este resultado está em acordo com os resultados reportados na literatura, em particular no artigo de Teh *et al* [19, 24, 26]. O aumento das intensidades das bandas Raman acima mencionadas no espectro do tecido canceroso em relação ao do tecido normal, foi atribuído ao aumento da concentração de DNA, lípidos e amida I [26]. Em particular, a literatura indica que a banda localizada a 1655 cm^{-1} depende da fração de histonas em relação ao total de componentes bioquímicos que contribuem para o sinal Raman [19, 25]. Assim, o aumento de intensidade registado no espectro do tecido tumoral a 1655 cm^{-1} corrobora os estudos citológicos de classificação de malignidade, que indicam hiper Cromasia nuclear [25]. A diminuição da intensidade da banda a 1004 cm^{-1} deve-se à redução de concentração de fenilalanina no tecido tumoral [19]. Mudanças nos sinais Raman provenientes de proteínas podem estar relacionadas com atividades proteómicas no citoplasma e núcleo, mas também com mudanças que ocorram na matriz extracelular [19]. As bandas Raman a 915 e 1040 cm^{-1} mantêm-se relativamente constantes, a nível de intensidade, para os dois grupos de tecidos, saudável e tumoral. Este resultado revela que a concentração de lípidos e formalina não se altera significativamente nesta zona espectral no caso de doença.

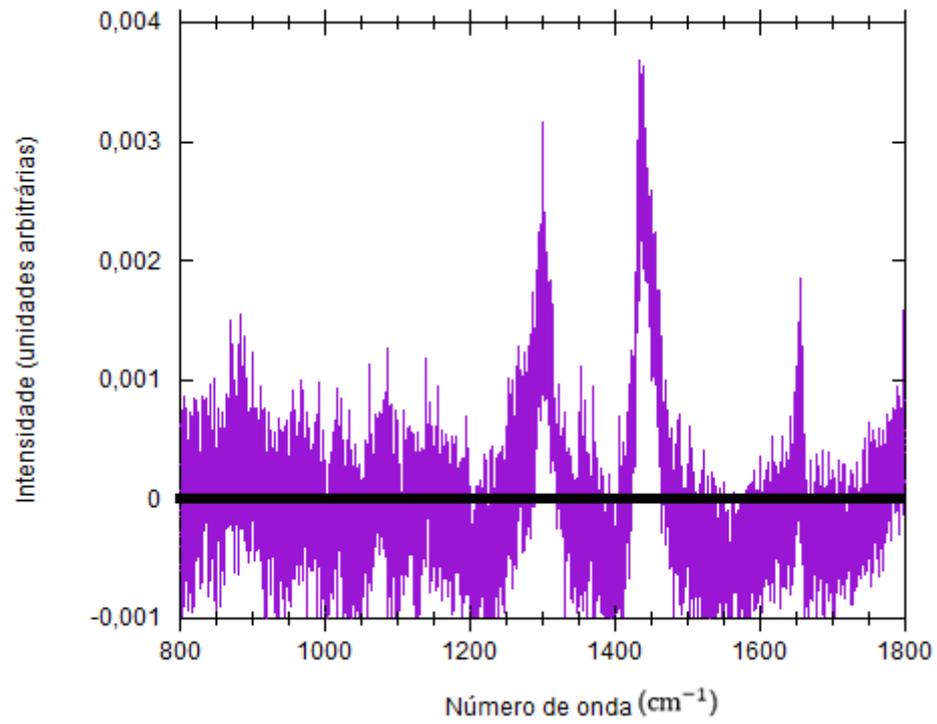
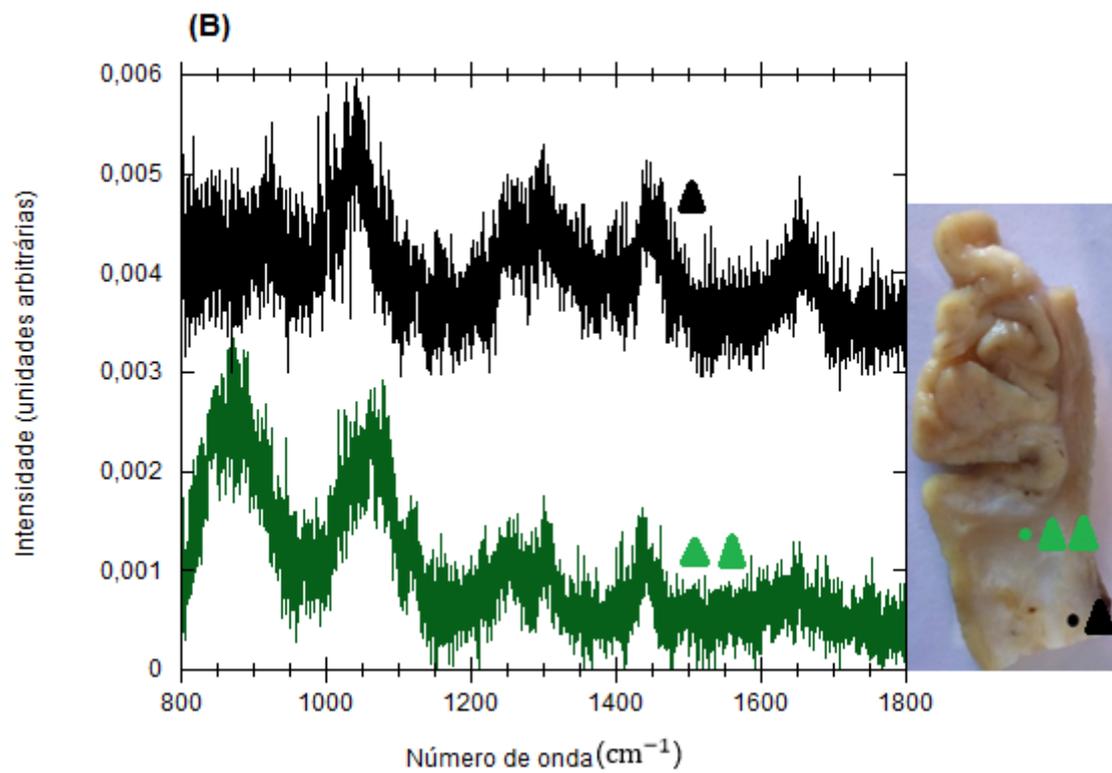
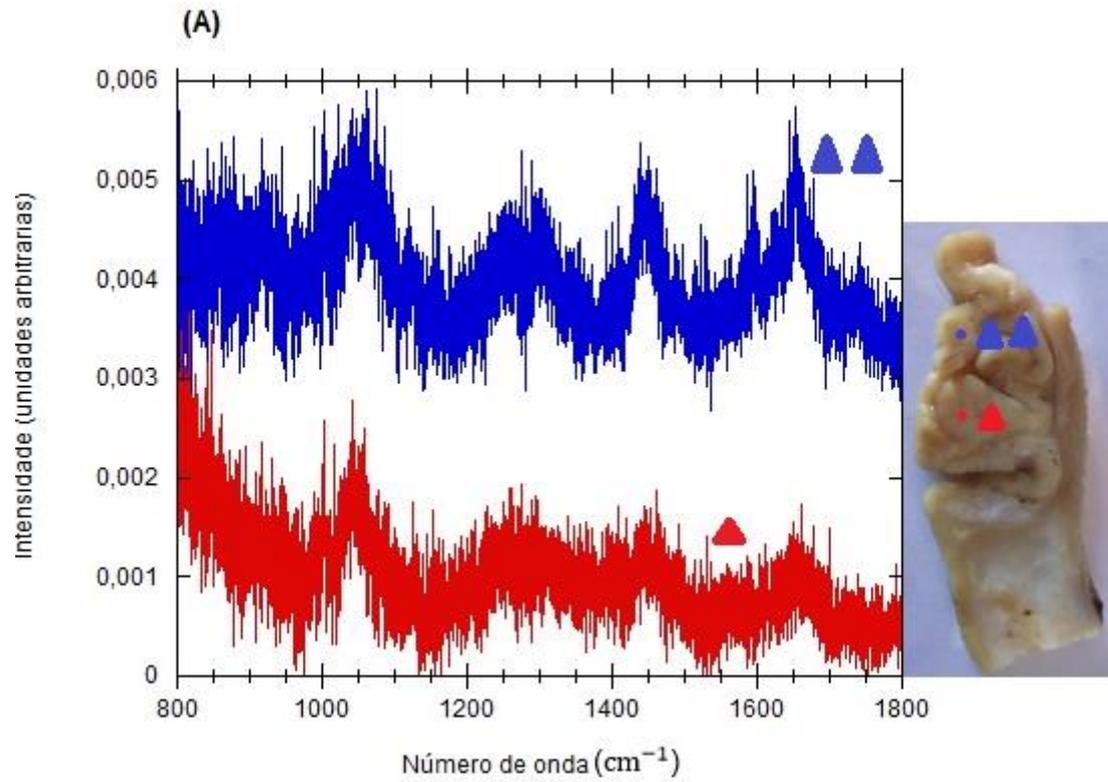


Figura 33: Espectro diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável da amostra 2: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).

4.3.2.2 Amostra 3



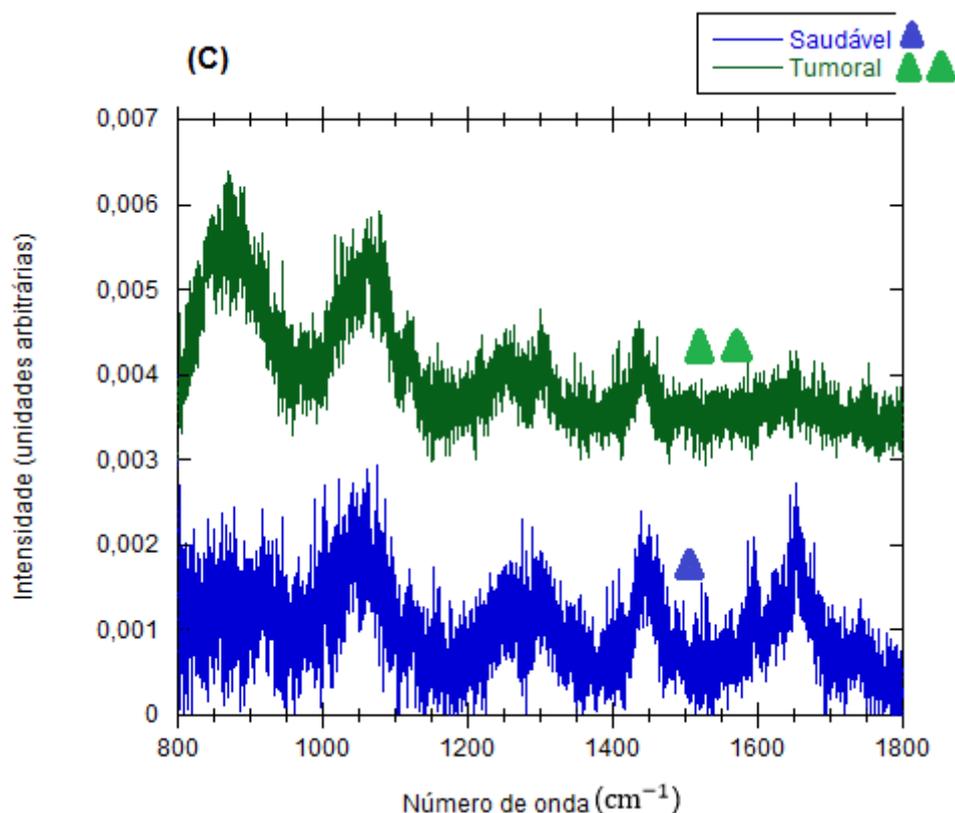


Figura 34: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 3 (Adenocarcinoma misto, tubular e de células pouco coesas, estadiamento I) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (azul) e tumoral (verde) da Amostra 3. Os espectros foram seleccionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.

A Figura 34 (A) mostra os espectros Raman registados em dois pontos distintos da zona saudável da amostra 3, ambos na mucosa. Excetuando a diferença de intensidade na região espectral entre 800 e 1000 cm^{-1} , verifica-se que não há diferenças significativas no número e perfil das bandas entre os espectros registados entre 1000 e 1800 cm^{-1} . A zona cancerosa da amostra 3 consiste num adenocarcinoma misto, tubular e de células pouco coesas. O espectro Raman da zona tumoral apresenta variabilidade na região espectral 800 – 1000 cm^{-1} , que se traduz no aparecimento de uma banda no espectro registado na zona indicada a verde (▲▲) na Figura 34 (B), que não surge no espectro registado na zona indicada a negro (▲) na mesma amostra. Esta banda, situada a 875 cm^{-1} , tem origem em modos de extensão C – C da hidroxiprolina do colagénio [19, 24, 25]. Assim, em ambos os casos, zona saudável e tumoral, encontram-se diferenças significativas intrínsecas a cada grupo na gama espectral 800 a 1000 cm^{-1} . A diferença entre os espectros da zona tumoral pode ser justificada pelo facto do local assinalado a verde estar mais aproximado da zona da mucosa enquanto o espectro registado na zona indicada pelo círculo preto foi adquirido num local mais próximo do músculo. Estes

resultados merecem um estudo mais aprofundado, utilizando diversas amostras e um elevado número de registos espectrais para confirmar a origem destas diferenças observadas abaixo de 1000 cm^{-1} . Neste caso, uma análise comparativa com espectros Raman de biomoléculas e sua combinação linear poderá esclarecer este resultado.

No entanto, entre 1000 e 1800 cm^{-1} , observam-se diferenças significativas na intensidade das bandas dos espectros Raman entre zona saudável e cancerosa. Faz-se agora uma identificação dos movimentos atômicos responsáveis pelas bandas Raman presentes nos espectros de zona saudável e tumoral (Figura 34 (C)). A banda situada a 1004 cm^{-1} , apenas visível para o espectro representativo da região normal, é atribuída a modos de extensão C – C do anel de fenilalanina [19]. A 1061 cm^{-1} , a banda também tem origem em modos de extensão C – C, mas neste caso de lípidos [16]. As bandas Raman situadas a 1300 e 1440 cm^{-1} têm origem na flexão do CH_2 de proteínas e lípidos [24, 27]. Por último, a banda localizada a 1655 cm^{-1} é atribuída à extensão C = O da amida I [19, 24].

Os resultados obtidos na amostra 3 contrastam com os obtidos na amostra 2. De facto, para a amostra 3, o espectro Raman do tecido saudável apresenta maiores intensidades de banda a 1440 e 1655 cm^{-1} (Figura 34 (C)). Na Figura 35 apresentam-se os resultados obtidos por Teh *et al*, com o objetivo de se proceder a uma confrontação com os resultados obtidos na amostra 3.

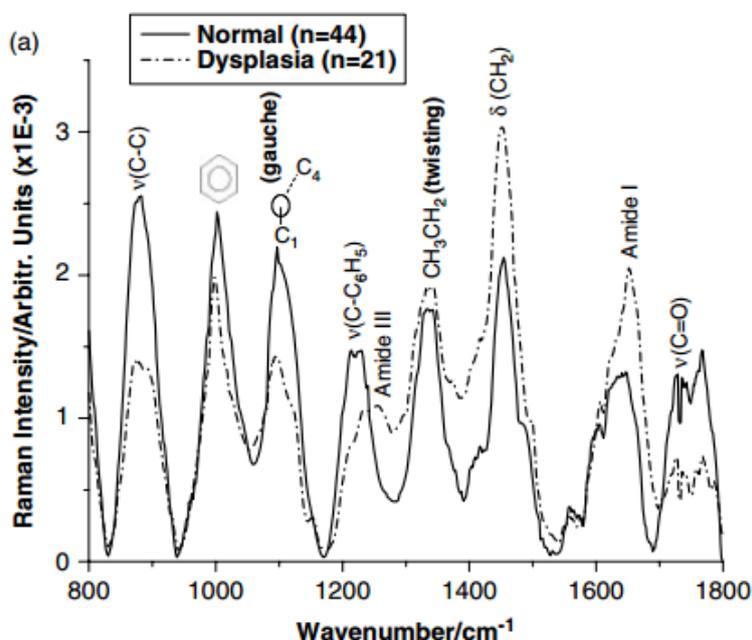
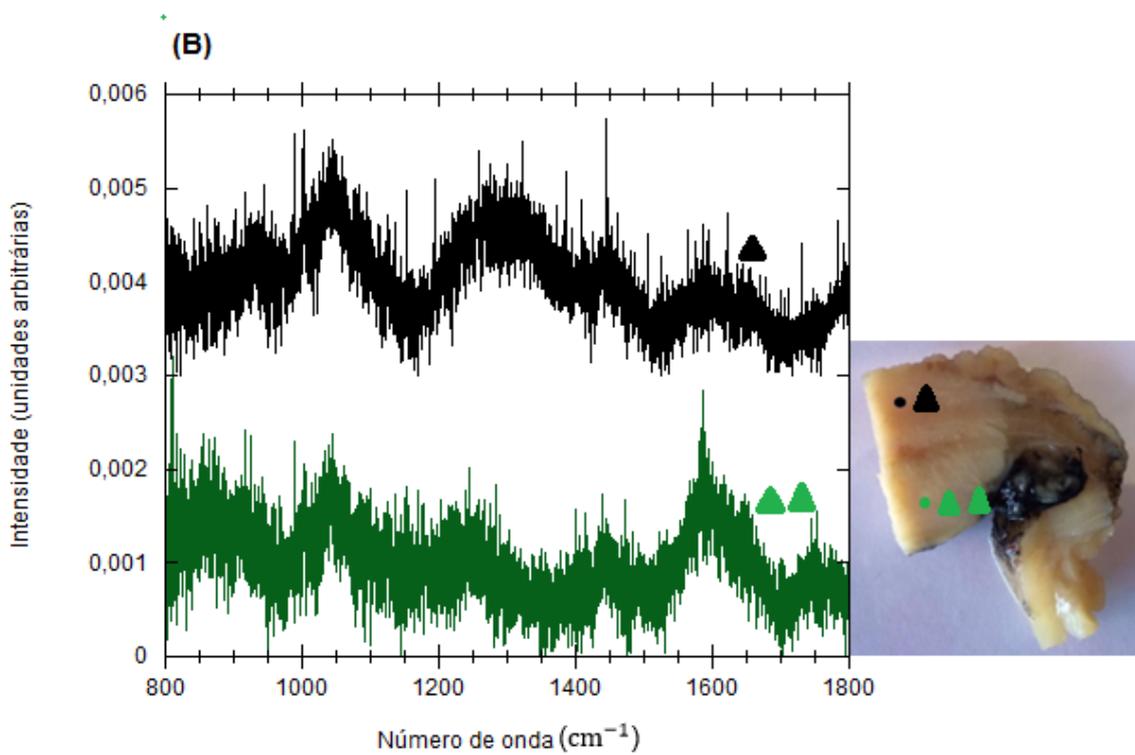
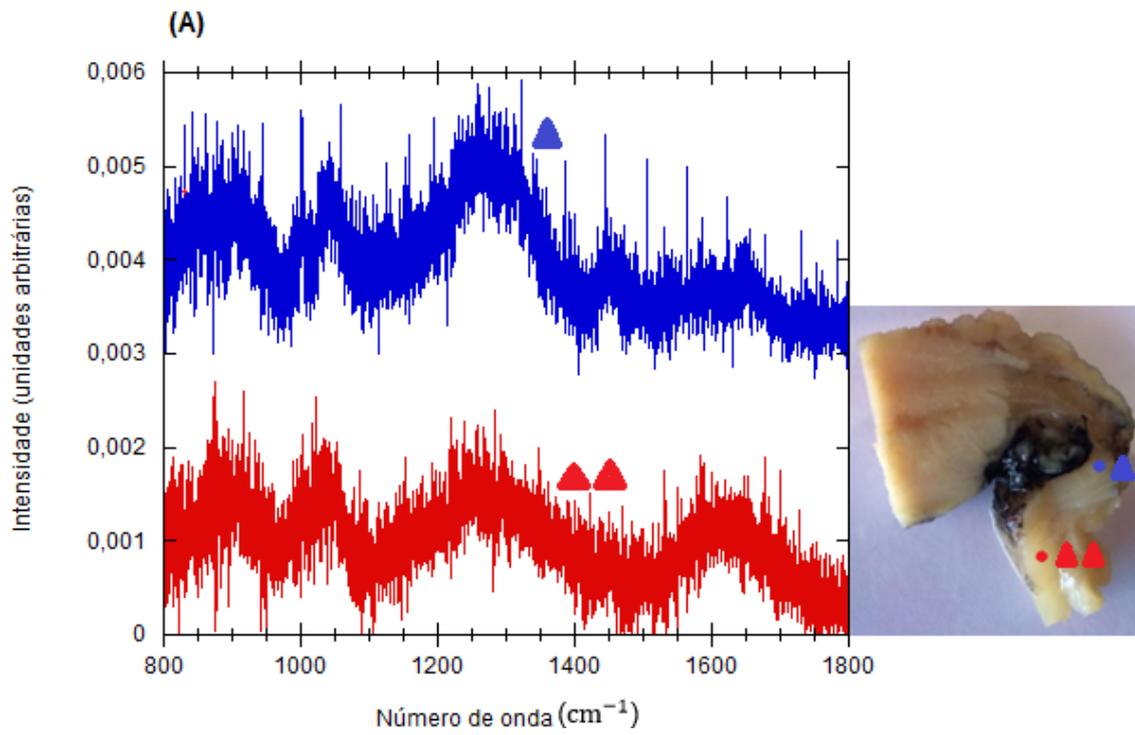


Figura 35: Espectros médios normalizados do tecido normal e tecido com displasia de amostras da mucosa gástrica. Adaptado da Ref. 27.

De acordo com Teh *et al*, seria de esperar que as bandas Raman localizadas a 1440 e 1655 cm^{-1} apresentassem uma maior intensidade para o tecido tumoral devido à maior concentração de proteínas [27], contrariamente ao que se obteve neste trabalho. Teh *et al* observaram ainda que a banda a 875 cm^{-1} tem reduzida intensidade no espectro registado no tecido doente, devido à diminuição da mucina citoplasmática e elevada concentração de metaloproteinase que cliva o colagénio no tecido tumoral [27]. Para além disto, estes autores consideram que o aumento da espessura do epitélio, associado à progressão da doença, pode atenuar a intensidade do laser em contacto com a superfície da amostra e assim camuflar o sinal proveniente do colagénio, localizado a nível mais profundo da membrana basal [27]. A banda a 1004 cm^{-1} , correspondente à fenilalanina, apresenta menor intensidade no tecido tumoral, estando este resultado em concordância com o obtido neste trabalho. A diferença deste caso comparativamente à bibliografia talvez se deva ao facto da localização onde foi adquirido o espectro ser relativamente aproximada da região normal, havendo uma mistura dos dois tecidos.

4.3.2.3 Amostra 4



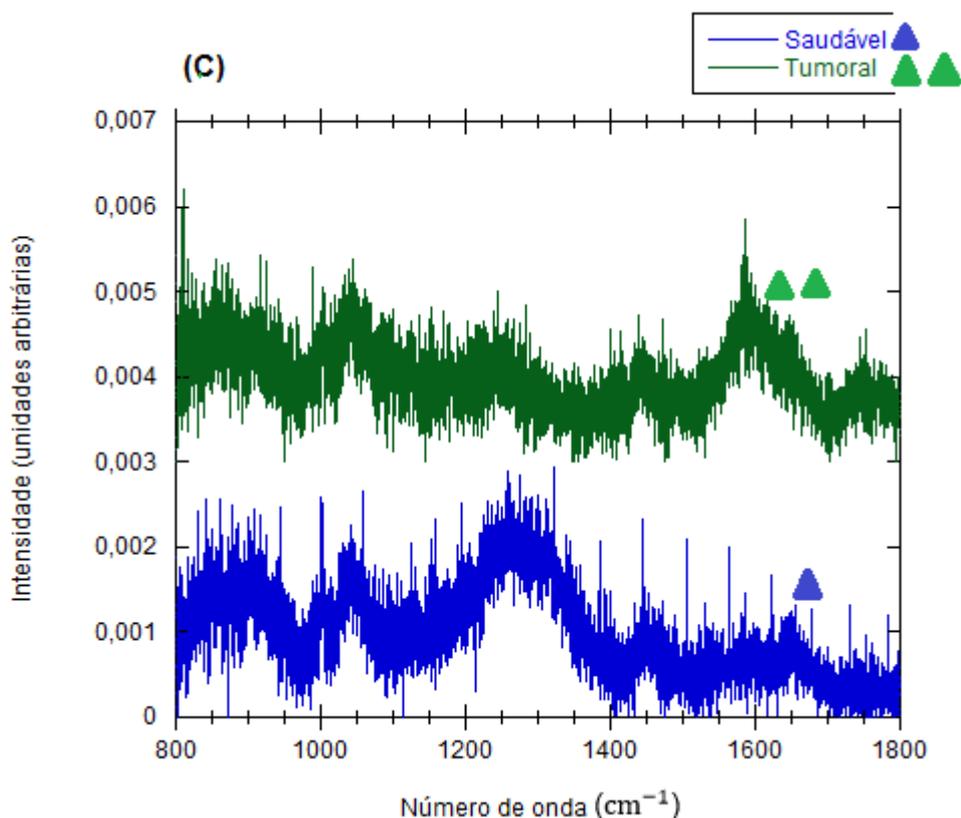


Figura 36: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 4 (Adenocarcinoma tubular, estadiamento IV) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (azul) e tumoral (verde) da Amostra 4. Os espectros foram selecionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.

Dos espectros Raman da amostra 4, foram identificadas bandas localizadas a: 890, 1004, 1040, 1260, 1450, 1586, 1650 e 1750 cm^{-1} , respetivamente. Os espectros obtidos na região de mucosa normal da amostra (Figura 36 (A)) apresentam algumas diferenças, nomeadamente, no espectro registado na zona indicada a azul (\blacktriangle), a banda a 1004 cm^{-1} é mais proeminente. Esta maior amplitude pode ter origem na maior concentração de fenilalanina nesse ponto de aquisição. A banda a 1450 cm^{-1} apenas é visível para o espectro registado na zona indicada pelo círculo azul. Esta banda é atribuída a modos de flexão CH_2 de proteínas e lípidos [27]. Deste modo, poder-se-á levantar a hipótese que esta zona da amostra deverá ser mais rica nestes dois conjuntos de biomoléculas.

Relativamente aos espectros registados na região tumoral, ambos na zona muscular, encontra-se a maior diferença na banda Raman a 1586 cm^{-1} . O local indicado a verde ($\blacktriangle\blacktriangle$) deverá ser mais rico em proteínas constituídas por aminoácidos de fenilalanina e hidroxiprolina comparativamente ao local assinalado a negro (\blacktriangle) [3]. Outra diferença notável encontra-se na gama espectral 1200 – 1300 cm^{-1} . Esta gama

compreende modos de extensão C – N e modos de torção N – H da amida III [27], e modos de ADN, histonas, pepsinogénio e colagénio de tipo I [24].

As bandas Raman observadas a 890, 1004, 1260 cm^{-1} nos espectros registados de zonas do tecido tumoral apresentam sistematicamente menor intensidade comparativamente às correspondentes observadas nos espectros Raman do tecido saudável. Relativamente às bandas localizadas a 1586, 1650 e 1750 cm^{-1} , a sua intensidade aumenta quando se trata do tecido doente. A Figura 37 apresenta o espectro diferença que facilita a observação destes resultados. A banda Raman a 1650 cm^{-1} pode ser associada a histonas, proteínas de conformação α -helix que rodeiam o ADN, sugerindo hipercromatismo no núcleo das células do tecido neoplásico [27]. De acordo com Teh *et al* (rever a Figura 23), também seria de esperar que a banda a 1260 cm^{-1} apresentasse maior intensidade para o tecido tumoral, o que não se verifica neste estudo. Outro resultado que é obtido neste trabalho que é controverso com o reportado na literatura, é relativo à banda localizada a 1750 cm^{-1} associada aos diferentes modos vibracionais das cadeias hidrofóbicas dos fosfolípidos que compõem as membranas celulares e numerosos organelos dentro do citoplasma [27]. Por observação da Figura 36 (C), conclui-se que esta banda Raman apresenta maior intensidade nos espectros registados na zona tumoral, em desacordo com diversos estudos até agora publicados (Figura 35) [24, 25, 26, 27]. Este resultado merece confirmação num estudo mais sistemático utilizando maior número de amostras.

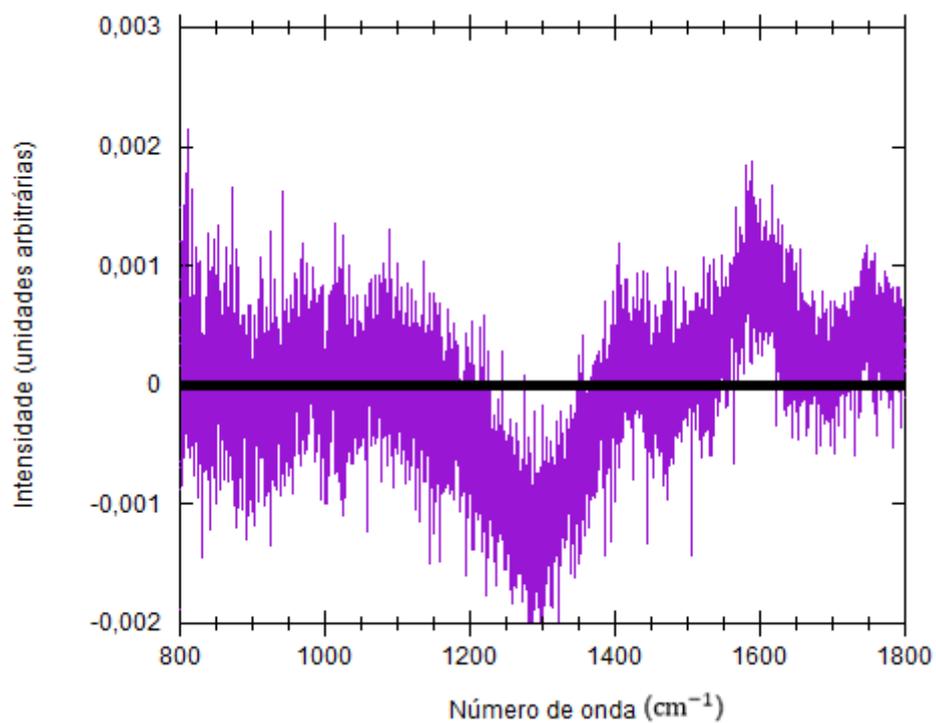
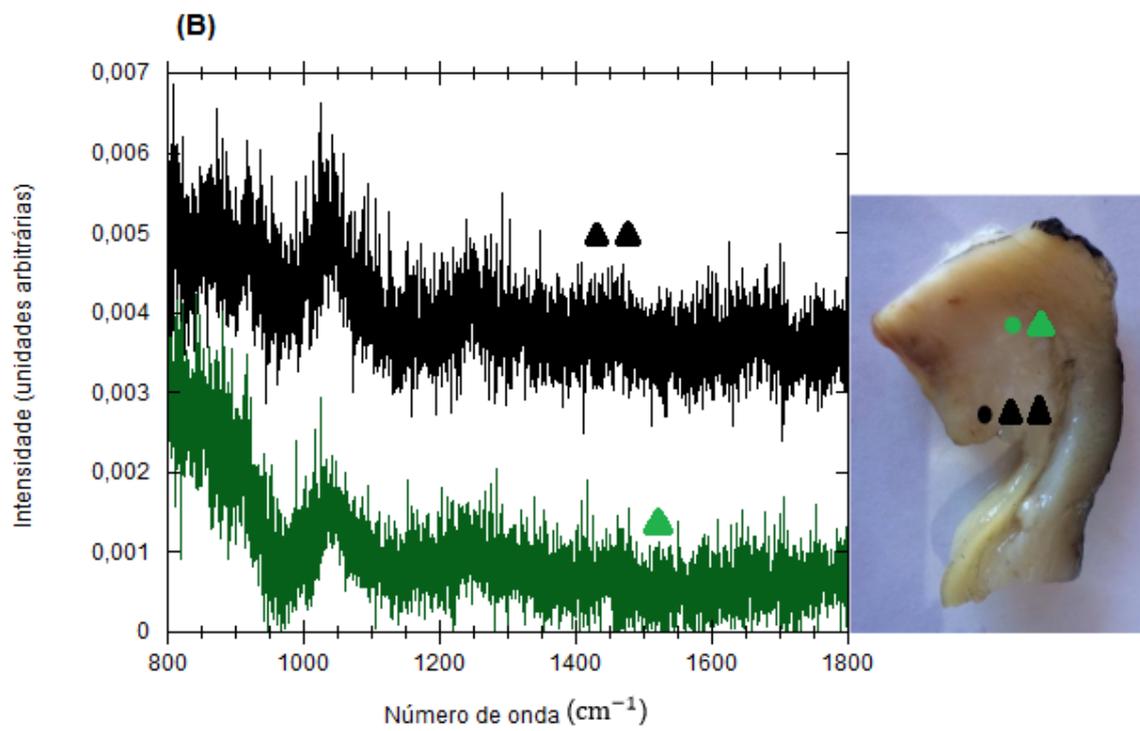
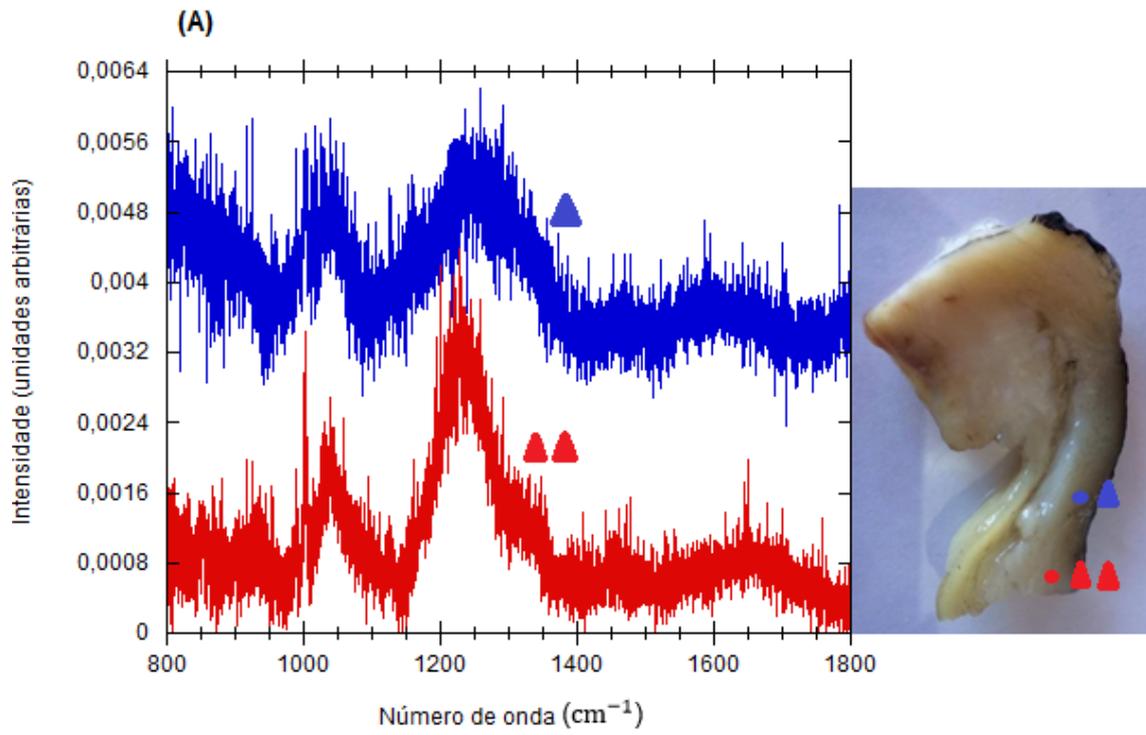


Figura 37: Espectro diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável da amostra 4: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).

4.3.2.4 Amostra 9



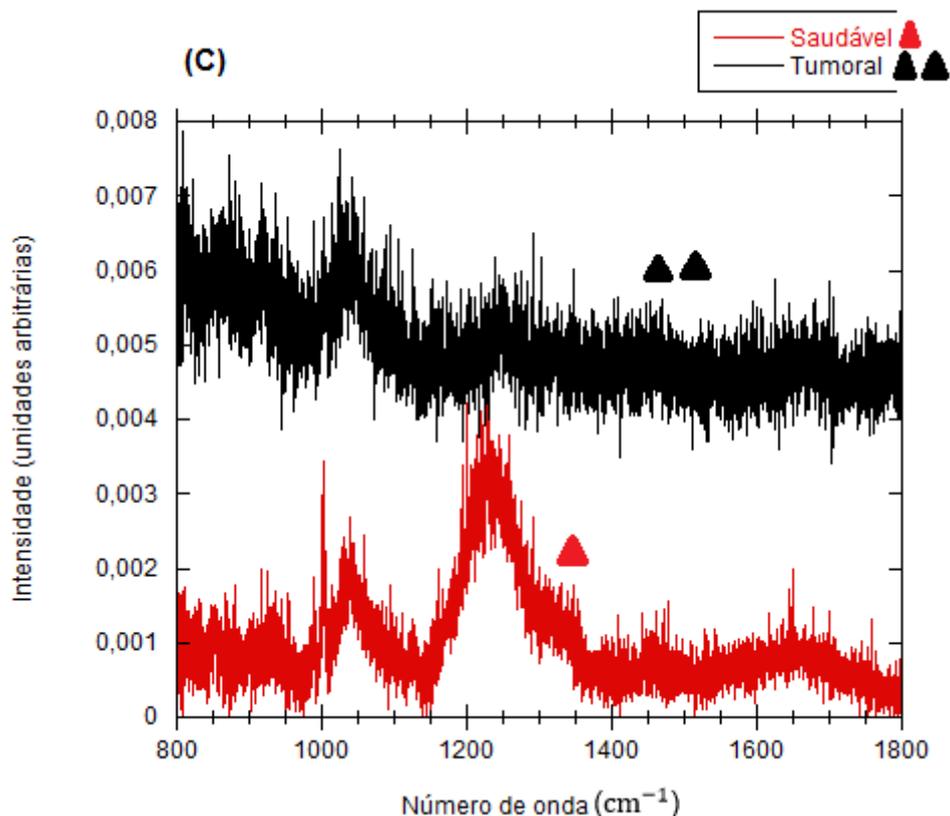


Figura 38: Espectros Raman registados com excitação 785 nm, em regiões de tecido saudável (A) e tumoral (B) do estômago; Amostra 9 (Adenocarcinoma de células pouco coesas, estadiamento IV) com os locais das aquisições espectrais. (C) Comparação dos espectros saudável (vermelho) e tumoral (preto) da Amostra 9. Os espectros foram seleccionados a partir de (A) e (B) mantendo o mesmo código de cores.

A Figura 38 (A) mostra os espectros Raman registados em duas localizações diferentes da região muscular saudável da amostra 9. Verifica-se que não há diferenças significativas no número e perfil das bandas entre os espectros registados, excetuando na região espectral entre 800 e 1000 cm^{-1} . Esta situação já se verificou no caso da amostra 3 e não se trata de um artefacto do ajuste da linha do polinómio à linha de fundo. O espectro Raman registado na localização assinalada a vermelho ($\blacktriangle \blacktriangle$) apresenta maiores intensidades e as bandas estão melhor definidas e, conseqüentemente, tornam-se mais fáceis de identificar. No que diz respeito à região tumoral (Figura 38 (B)), as bandas observadas nos espectros Raman são menos definidas, apresentando a sua maior variação, em relação ao espectro registado no tecido saudável, entre 800 e 1000 cm^{-1} , zona correspondente a proteínas e lípidos. Das bandas Raman observadas nos dois espectros apresentados na Figure 38 (C), três delas são coincidentes na sua posição espectral: 1040, 1230 e 1655 cm^{-1} . As bandas localizadas a 930, 1004 e 1455 cm^{-1} no espectro Raman registado no tecido saudável, não são claramente observadas no espectro registado no tecido canceroso. Verifica-se,

para o tecido tumoral, uma diminuição na intensidade das bandas localizadas a 1004 e 1230 cm^{-1} que se pode observar pelo espectro diferença da Figura 39. Estas bandas com origem na fenilalanina e triptofano revelam uma diminuição na percentagem destes componentes para o tecido tumoral [26]. No caso destas bandas Raman, o resultado obtido encontra-se em concordância com os estudos publicados [19]. A banda situada a 930 cm^{-1} apresenta uma intensidade superior no caso do tecido tumoral concordado com o estudo de Huang *et al* (rever a Figura 17). Esta banda é atribuída a modos de extensão C – C na conformação α das proteínas [24], o que se pode justificar com a hipótese do tecido canceroso possuir uma maior concentração de proteínas com essa estrutura. As restantes bandas situadas a 1040, 1455 e 1655 cm^{-1} , relativas a proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, não revelam alterações significativas entre os dois tipos de tecidos.

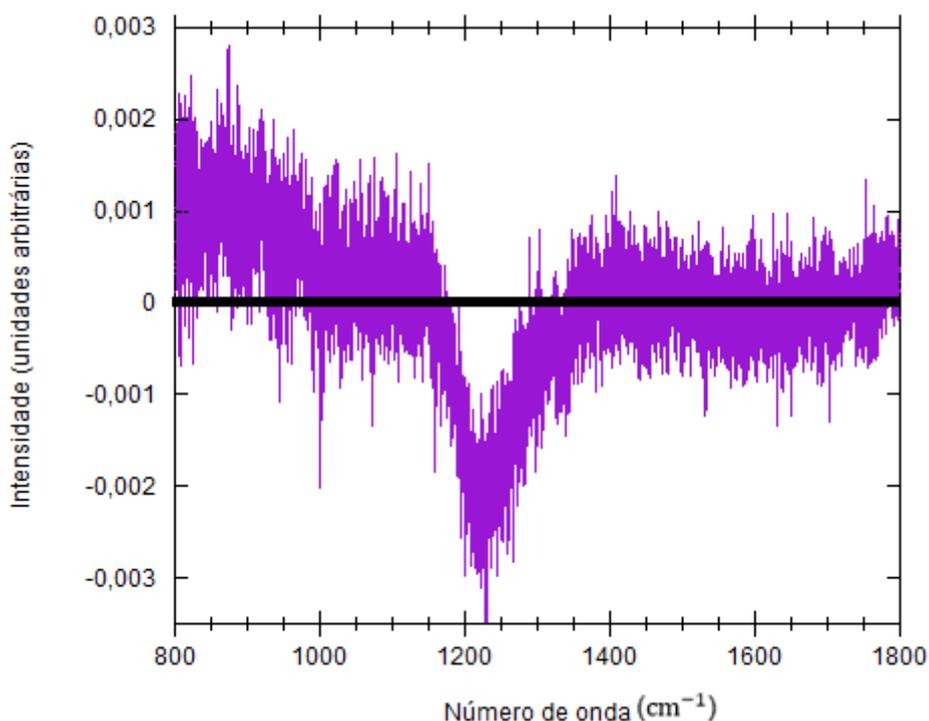


Figura 39: Espectro diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável da amostra 9: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).

A Tabela 6 resume a posição das bandas discutidas e a respetiva identificação dos modos de vibração. A última coluna da tabela indica se a banda pode ou não ser um fator discriminatório entre tecido saudável e tumoral. O critério de seleção baseou-se se a banda Raman apresenta diferenças significativas entre os dois tipos de tecido.

Tabela 6: Identificações prováveis dos principais modos vibracionais dos espectros Raman apresentados [1, 3, 4, 5, 13, 16, 19, 24, 25, 27]

Número de onda (cm ⁻¹)	Movimento atómico	Biomolécula associada	Discriminante para cancro
875	Modos de extensão C – C da hidroxiprolina do colagénio	Proteínas	Sim
890	Modos de vibração do Triptofano	Proteínas	Sim
915	Flexão CH	Lípidos	Não
930	Extensão C – C na conformação α	Proteínas	Sim
1004	Extensão C – C do anel de fenilalanina	Proteínas	Sim
1040	Pico de formalina – extensão assimétrica OCO	Proteínas	Não
1061	Extensão C – C	Lípidos	Não
1230	Modo de extensão C – C ₆ H ₅ do triptofano e fenilalanina	Proteínas	Não
1260	Modos de Extensão C – N e torção N – H da amida III	Proteínas	Sim
1300	Flexão do CH ₂ e CH ₃ CH ₂ wagging	Lípidos; Proteínas; Ácidos nucleicos	Sim
1440/1450	Flexão do CH ₂	Lípidos; Proteínas	Sim
1455	Extensão/Flexão CH ₂	Proteínas; Lípidos	Não
1586	Fenilalanina e Hidroxiprolina	Proteínas	Sim
1650/1655	Extensão C = O da amida I (α -helix); Modos de ácidos nucleicos e Extensão C = C	Proteínas; Ácidos nucleicos; Lípidos	Sim
1750	Extensão C = O dos fosfolípidos	Lípidos	Sim

A Figura 40 apresenta, a título de sumário, o conjunto dos espectros diferença da amostra 2, 3, 4 e 9, alguns deles já apresentados anteriormente. Assim, as bandas apresentadas acima ou abaixo de zero revelam as diferenças significativas, a nível de intensidade, entre os espectros registados nos dois tipos de tecido (canceroso e saudável). Essas diferenças predominam na região espectral entre 1200 e 1800 cm^{-1} , sendo esta a zona espectral mais promissora para a discriminação entre tecido tumoral e tecido saudável. Esta região espectral possui modos de vibração de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (rever Tabela 6). De acordo com os resultados experimentais obtidos neste trabalho, estudos detalhados futuros deverão ser aplicados nesta gama espectral no sentido de avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica Raman na discriminação do adenocarcinoma do estômago.

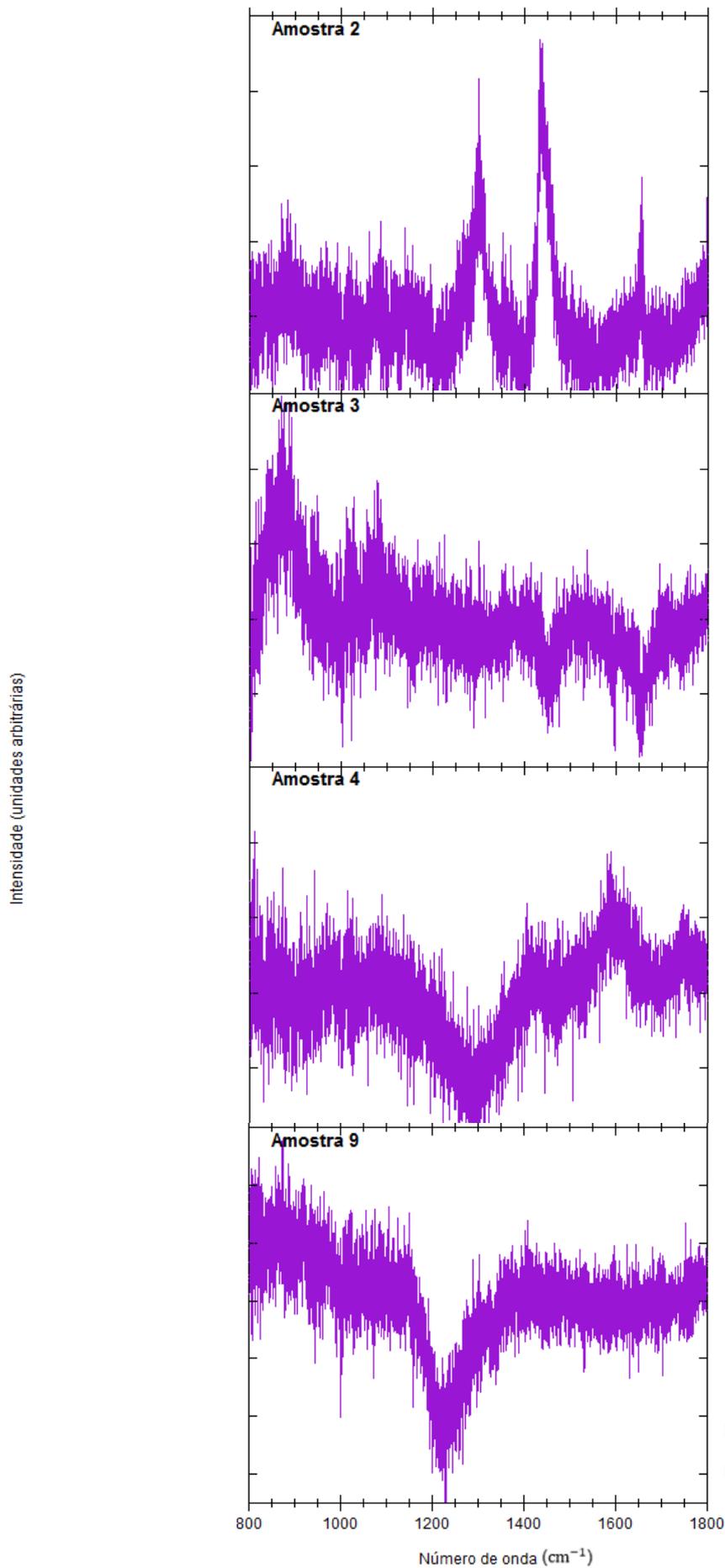


Figura 40: Espectros diferença dos espectros Raman registados nas regiões tumoral e saudável das amostras 2, 3, 4 e 9: Espectro (tumoral) - Espectro (saudável).

4.3.3 Discriminação do estadiamento

Como já fora anteriormente referido, de um modo muito simplificado, pode considerar-se que existem cinco grupos de estadiamento do cancro do estômago: 0, I, II, III e IV. No que se segue, serão apresentados os resultados do tratamento espectral realizado e a discussão dos mesmos, no sentido de avaliar a adequação da técnica para a discriminação dos diferentes estádios da doença.

4.3.3.1 Grupo de estadiamento 0

Não foi facultada qualquer amostra neste grupo de estadiamento.

4.3.3.2 Grupo de estadiamento I

As amostras que se encontram neste grupo de estadiamento são as amostras 3 e 6. A Figura 41 apresenta uma comparação entre os espectros de difusão Raman adquiridos na região tumoral das duas amostras.

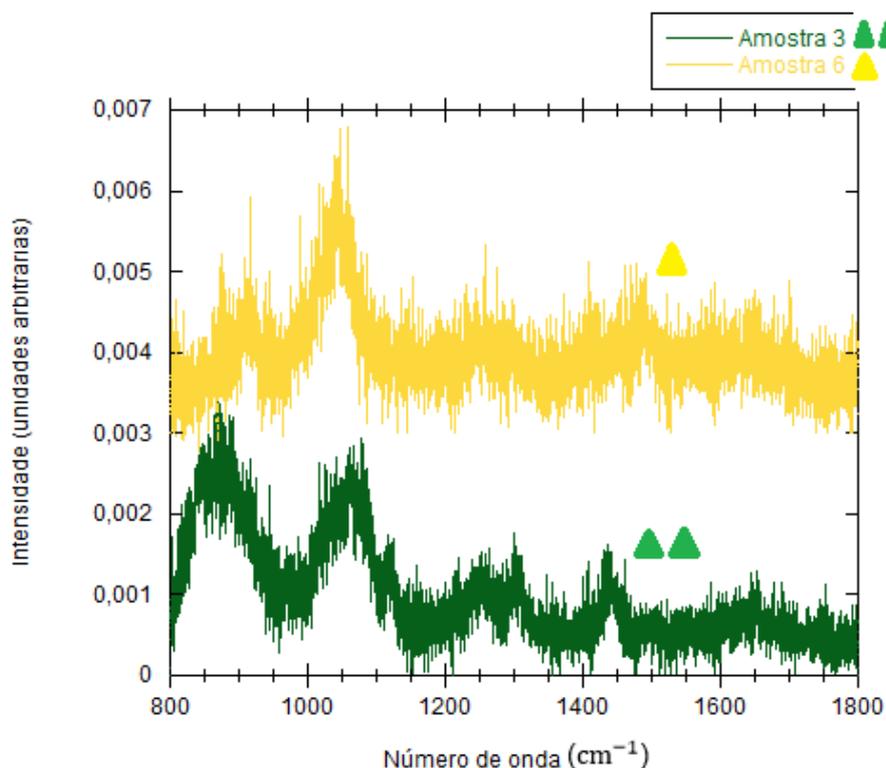


Figura 41: Comparação entre os espectros tumorais da amostra 3 (verde) e amostra 6 (amarelo).

As bandas Raman destas duas amostras são coincidentes a 875, 1061, 1300 e 1655 cm^{-1} . É na região 1400 – 1500 cm^{-1} que se observa a maior discrepância, nomeadamente na amostra 3 existe uma banda que se situa a 1440 cm^{-1} enquanto que na amostra 6 existe uma outra a 1490 cm^{-1} . Esta gama espectral possui bandas Raman associadas a proteínas (actina, albumina, histonas, pepsinogénio, colagénio), lípidos (fosfolípidos e trioleína) e ADN [24].

4.3.3.3 Grupo de estadiamento II

Não foi facultada qualquer amostra neste grupo de estadiamento.

4.3.3.4 Grupo de estadiamento III

As amostras que se encontram neste grupo de estadiamento são as amostras 1, 2, 5, 7 e 8. A Figura 42 apresenta uma comparação entre os espectros de difusão Raman adquiridos na região tumoral das amostras 7 e 8.

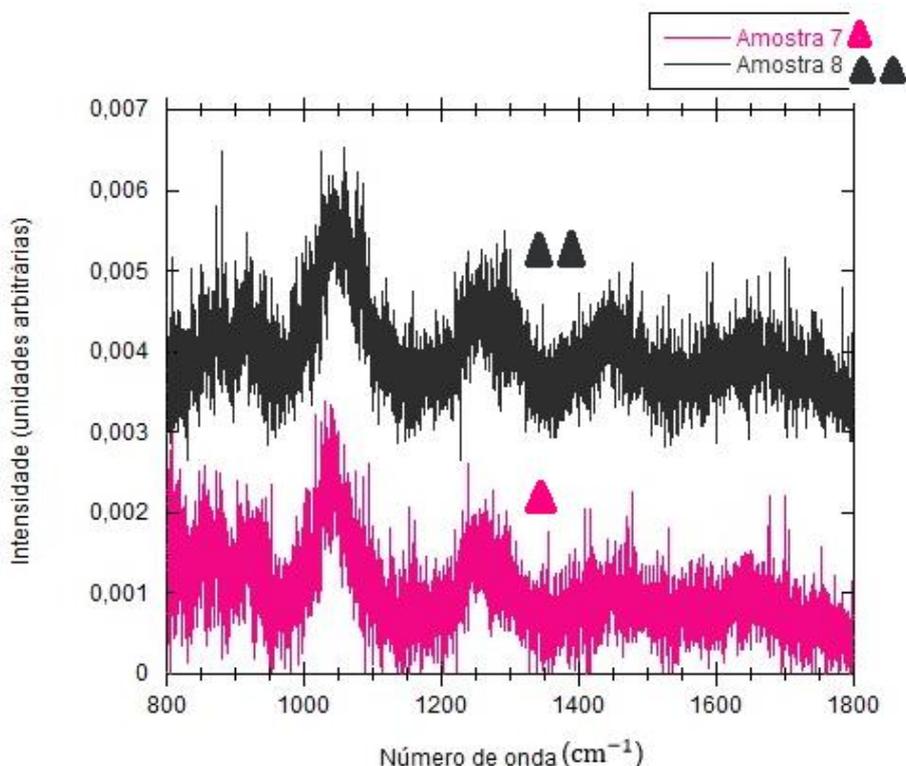


Figura 42: Comparação entre os espectros tumorais da amostra 7 (rosa) e 8 (cinza).

Pela observação da Figura 42, verifica-se que não há diferenças significativas no número e perfil das bandas entre os espectros registados. Os espectros Raman da região tumoral da amostra 2, anteriormente apresentados na Figura 32 (B), revelam o mesmo resultado, no entanto as bandas são mais proeminentes a nível de intensidade.

4.3.3.5 Grupo de estadiamento IV

As amostras que se encontram neste grupo de estadiamento são a 4 e a 9. A Figura 43 apresenta uma comparação entre os espectros adquiridos na região tumoral das duas amostras referidas.

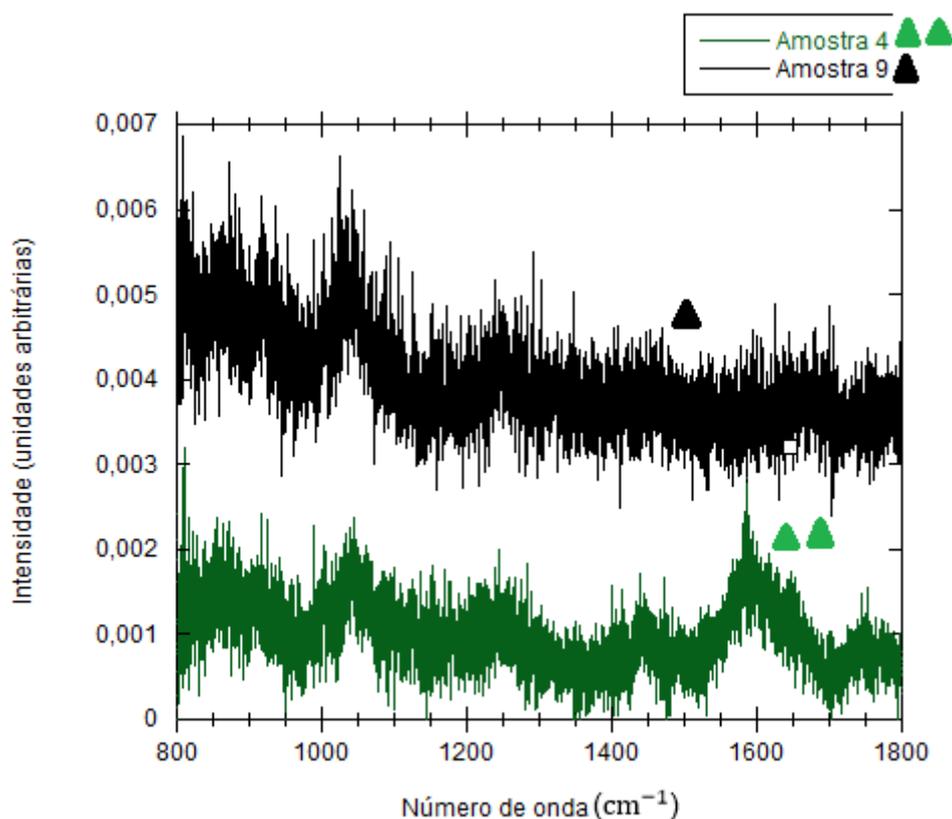


Figura 43: Comparação entre os espectros tumorais da amostra 4 (verde) e amostra 9 (preto).

No geral, os dois espectros são coincidentes entre si, isto é, as bandas Raman presentes nos dois espectros localizam-se no mesmo número de onda. No entanto, a banda situada a 1586 cm^{-1} revela-se apenas para a região tumoral da amostra 4. Esta

banda está associada aos aminoácidos fenilalanina e hidroxiprolina, pelo que esta discrepância entre as duas amostras pode ser justificada afirmando que o local de retirada do espectro na amostra 4 será mais rico em proteínas constituídas por estes aminoácidos.

4.3.3.6 Comparação dos espectros Raman dos grupos de estadiamento

A partir das Figuras 41, 42 e 43, selecionaram-se três espectros Raman, cada um deles relativo a um grupo de estadiamento específico. Esses espectros são apresentados na Figura 44.

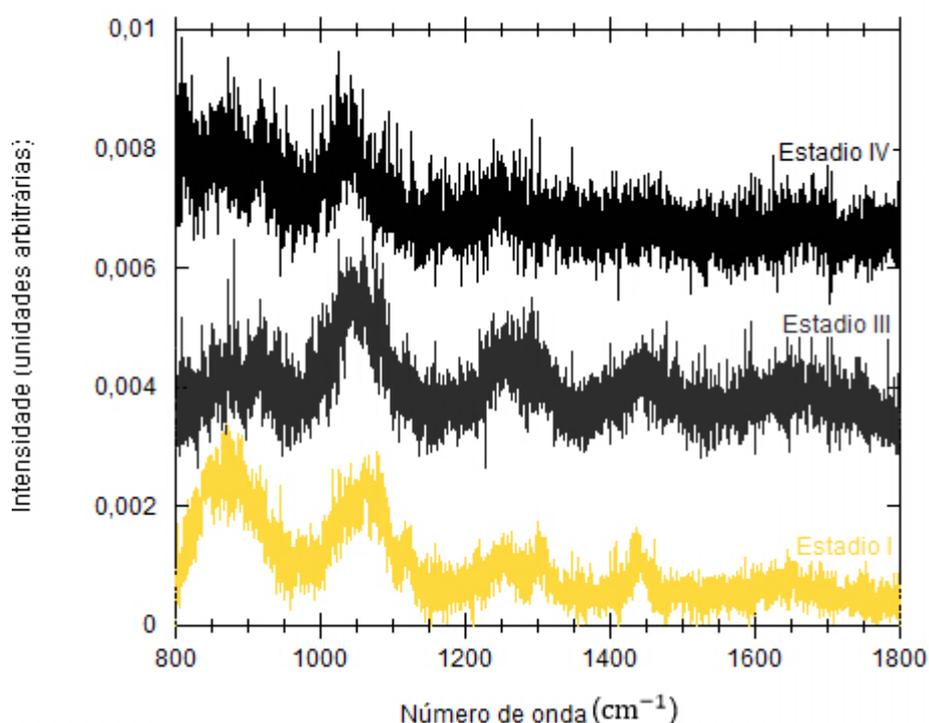


Figura 44: Comparação dos espectros Raman dos grupos de estadiamento I, III e IV. Espectros selecionados das Figuras 41, 42 e 43 mantendo o mesmo código de cores.

Pela análise da Figura 44, é possível verificar diferenças significativas entre os espectros de cada grupo, em particular nas gamas espectrais $800-1000\text{ cm}^{-1}$ e $1400-1800\text{ cm}^{-1}$. Para além disso, observa-se um aumento na indefinição das bandas Raman à medida que a doença evolui. Do estadio I para o estadio IV, as bandas vão-se tornando mais largas e conseqüentemente menos evidentes. Uma hipótese justificativa deste acontecimento, que carece de posterior confirmação, é o aumento da desordem

estrutural nas amostras com estadio mais avançado. Os resultados obtidos permitem afirmar que a técnica de espectroscopia Raman é uma técnica apropriada para discriminar os diversos grupos de estadiamento do cancro do estômago.

5. Considerações finais, conclusões e perspectivas futuras

A presente dissertação teve como objetivos: (1) o estudo das condições ótimas de aquisição de espectros de difusão Raman em amostras excisadas cirurgicamente do estômago e conservadas em formol; e (2) a comparação dos espectros de difusão Raman registados na gama espectral entre 800 e 1800 cm^{-1} , em locais de zona saudável e tumoral das amostras no sentido de avaliar a aplicabilidade da técnica na discriminação de lesões cancerosas do estômago e o grupo de estadiamento.

A primeira fase deste trabalho consistiu no estudo das condições ótimas de aquisição do espectro Raman. Para isso, analisou-se o efeito da largura da fenda de entrada do espectrómetro, os filtros de intensidade, o comprimento de onda de excitação e sua potência, o tempo de aquisição e o número de varrimentos para maximização da razão sinal/ruído. Neste trabalho, o tempo de aquisição dos espectros foi de 120s, por 2 varrimentos e foi utilizada uma objetiva de 50x de distância focal 10,6 mm. O *background* causado pela fluorescência do tecido biológico é um sério problema da espectroscopia Raman, e uma das soluções passou por utilizar radiação de excitação na região espectral do vermelho, de comprimento de onda 785 nm. Mostrou-se que a utilização da radiação de 785 nm para além de diminuir o efeito da fluorescência, aumentando consequentemente a facilidade de deteção de componentes espectrais revelantes para a discriminação entre tecido saudável e canceroso, tem maior capacidade de penetração, permitindo um estudo da difusão em maior profundidade na amostra.

As amostras estudadas foram obtidas de nove indivíduos após excisão cirúrgica e posteriormente conservadas em formol. As amostras foram previamente caracterizadas do ponto de vista histológico por um especialista, que delimitou a região saudável e tumoral de cada amostra. Foram registados espectros de difusão Raman em quatro locais distintos em cada amostra, na gama espectral 800 – 1800 cm^{-1} , e procedeu-se à atribuição de modos de vibração moleculares característicos de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, de acordo com a literatura. O facto da conservação das amostras em formol não afetar significativamente o número e perfil das bandas observadas é vantajoso, pois possibilita a realização de estudos em laboratórios afastados da zona de colheita, e a repetição das experiências em diferentes momentos, evitando ao

mesmo tempo a utilização de métodos de preservação mais complicados e dispendiosos, como a conservação a baixas temperaturas.

O estudo da difusão Raman na gama espectral $800 - 1800 \text{ cm}^{-1}$, relativamente à região normal, permitiu identificar diferenças significativas entre a zona muscular e a zona da mucosa, principalmente nas gamas $800 - 1000$ e $1400 - 1800 \text{ cm}^{-1}$. Relativamente aos resultados intrínsecos a cada zona, as diferenças revelam-se apenas a nível de um fator de intensidade, justificáveis pela heterogeneidade da amostra.

Relativamente à discriminação entre tecido saudável e tecido tumoral, foi possível identificar bandas espectrais cujas intensidades apresentam diferenças significativas. Para evidenciar as diferenças e com o objetivo de verificar se são sistemáticas, procedeu-se à análise dos espectros diferença entre os espectros Raman registados em regiões tumoral e saudável de cada amostra. Apesar das diferenças não serem no mesmo sentido em todas as amostras, o que pode ter origem na heterogeneidade das amostras e estadiamento da doença, pode concluir-se que a região espectral de interesse, que apresenta sistematicamente diferenças entre os sinais Raman de ambos os tipos de tecidos, permitindo a discriminação do adenocarcinoma do estômago, é limitada entre 1200 e 1800 cm^{-1} . Nesta zona espectral são esperadas, de acordo com a literatura, bandas de difusão Raman com origem em modos vibracionais característicos de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Estudos futuros deverão focar-se nesta gama espectral, reduzindo assim o número de dados adquiridos e facilitando a interpretação dos resultados. Os resultados obtidos permitem ainda concluir que a técnica de difusão Raman poderá ser utilizada para imagiologia tirando partido das diferenças de intensidade nesta gama espectral.

A comparação de espectros de difusão Raman de três grupos de estadiamento (I, III e IV) permitiu concluir que esta técnica de espectroscopia permite distinguir entre os diferentes grupos. É possível verificar diferenças significativas entre os espectros de cada grupo, em particular nas gamas espectrais $800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ e $1400 - 1800 \text{ cm}^{-1}$. Para além disso, observa-se um aumento na indefinição das bandas Raman à medida que o estadio aumenta. Do estadio I para o estadio IV as bandas vão-se tornando mais largas e conseqüentemente menos evidentes, tendo sido interpretado como o resultado do aumento da desordem estrutural com o aumento do estadio.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a difusão Raman é uma técnica promissora para a discriminação entre tecidos saudável e tumoral e para determinar o estadio da doença no tecido tumoral. Contudo o reduzido número de amostras estudadas e de espectros experimentais obtidos não permite uma análise

estatística detalhada dos dados e, conseqüentemente, determinar a especificidade e sensibilidade da técnica. Por outro lado, a heterogeneidade das amostras biológicas faz com que alguns espectros apresentem variações de intensidade dentro do mesmo tipo de tecido biológico, o que levanta problemas na identificação inequívoca das regiões espectrais significativas para efeitos de discriminação. Assim, propõe-se como trabalho futuro nesta linha de investigação:

- i) o estudo sistemático dos espectros Raman recolhidos de um elevado número de amostras conservadas em condições idênticas e de diversos indivíduos (sexo, idade, estadio da doença);
- ii) a análise estatística dos resultados obtidos por amostra e tipo de tecido, com o objetivo de determinar o espectro médio e desvio padrão;
- iii) a análise dos espectros experimentais através de técnicas de desconvolução espectral e de simulação por sobreposição linear de espectros de biomoléculas, avaliando qual dos métodos é o mais adequado para a identificação correta das bandas observadas;
- iv) a determinação da sensibilidade e especificidade da técnica e definição da gama espectral revelante para a discriminação entre tecidos saudável e tumoral, e entre tecidos tumorais em diferentes estadios de evolução da doença;
- v) a verificação dos resultados obtidos através de estudos “cegos”, com o objetivo da determinação de falsos positivos e falsos negativos;
- vi) o mapeamento da região cancerosa utilizando imagiologia Raman, com base no conhecimento das regiões espectrais estatisticamente significativas para a discriminação.

Referências Bibliográficas

- [1] Kim H. (2015). Endoscopic Raman spectroscopy for molecular fingerprinting of gastric cancer: principle to implementation. *BioMed Research International*, 2015: 9 pp.
- [2] Miranda N. *et al.* (2016). Doenças oncológicas em números – 2015. Programa Nacional para doenças oncológicas. Direção Geral da Saúde, Lisboa.
- [3] Silva P. (2010). *Estudo do adenocarcinoma colo-rectal com a espectroscopia de Raman*. Tese de Mestrado em Física Médica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 107 pp.
- [4] Xu M. *et al.* (2009). Recognition of gastric cancer by Raman spectroscopy. Em: *Proceedings of spie – the international society for optical engineering*, China, 8 de Agosto de 2009, SPIE. 75191H-1 - 75191H-8.
- [5] Bergholt M. *et al.* (2011). Characterizing variability in in vivo Raman spectra of different anatomical locations in the upper gastrointestinal tract toward cancer detection. *Journal of Biomedical Optics*, 16(3): 037003-1 – 037003-9.
- [6] Tate, S. (2008). *Anatomia & Fisiologia*. 8ª Edição, Lusociência. Loures.
- [7] Waddell T. *et al.* (2013). Gastric cancer: esmo-esso-estro clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24: 57-63.
- [8] Fontelonga A. (2001). Cancro do estômago. Acedido a 3 de Março de 2016 em <http://www.alert-online.com/pt/medical-guide/cancro-do-estomago#toc-target-1>.
- [9] Dinis-Ribeiro M, Areia M *et al.* (2012). Management of precancerous conditions and lesions in the stomach (maps): guideline from the european society of gastrointestinal endoscopy (esge), european helicobacter study group (ehsg), european society of pathology (esp), and the sociedade portuguesa de endoscopia digestiva (sped). *Endoscopy*, 44: 74-94.
- [10] Acedido a 25 de Outubro em <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-estomago/subtipos>.
- [11] Rodrigues A. *et al.* (2012). Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 34: 4309-1 – 4309-9.

- [12] Cartaxo S. (2008). *Espetroscopia ft-Raman na diferenciação entre melanoma cutâneo e nevo pigmentado*. Tese de Mestrado em Ciências. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 116 pp.
- [13] Rygula A. *et al.* (2013). Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44: 1061- 1076.
- [14] Shin N. (1996). *Analysis of biological tissue with ex vivo and in vivo Raman spectroscopy*. Tese de Mestrado em Ciências. Universidade de Toronto, Toronto. 115 pp.
- [15] David C. (2012). Raman spectroscopy for proteins. Acedido a 30 de Setembro de 2016 em http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/HORIBA_webinar_proteins.pdf.
- [16] Czamara K. *et al.* (2015). Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46: 4-20.
- [17] Benevides J. *et al.* (2005). Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36: 279-299.
- [18] Eckstein F. e Lilley D. (1988). *Nucleic acids and molecular biology*. Volume 2. 1ª Edição, Springer-Verlag, Berlin.
- [19] Teh S.K. (2010). Near-infrared Raman spectroscopy for early diagnosis and typing of adenocarcinoma in the stomach. *British Journal of Surgery*, 97: 550-557.
- [20] Barroso E.M. *et al.* (2015). Discrimination between oral cancer and healthy tissue based on water content determined by Raman spectroscopy. *Analytical chemistry*, 87: 2419-2426.
- [21] Abramczyk H. *et al.* (2014). The cellular environment of cancerous human tissue. Interfacial and dangling water as a “hydration fingerprint”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*.
- [22] Fenn M. *et al.* (2011). Raman spectroscopy for clinical oncology. *Advances in Optical Technologies*, 2011: 20 pp.
- [23] Bergholt M. *et al.* (2010). Raman endoscopy for in vivo differentiation between benign and malignant ulcers in the stomach. *The analyst*, 135: 3162-3168.

- [24] Huang Z. *et al.* (2010). In vivo detection of epithelial neoplasia in the stomach using imaged-guided Raman endoscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 383-389.
- [25] Bergholt M.S. *et al.* (2010). In vivo diagnosis of gastric cancer using Raman endoscopy and ant colony optimization techniques. *International Journal of Cancer*, 128: 2673-2680.
- [26] Teh S. *et al.* (2008). Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue. *British Journal of Cancer*, 98: 457-465.
- [27] Teh S. *et al.* (2009). Near-infrared Raman spectroscopy for gastric precancer diagnosis. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40: 908-914.
- [28] Ribeiro A. (2011). *New insights into mutable collagenous tissues: an inspiring model for tissue regeneration*. Tese de Doutoramento em Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto. 167 pp.
- [29] Li R. *et al.* (2014). Effects of laser excitation wavelength and optical mode on Raman spectra of human fresh colon, pancreas, and prostate tissues. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45: 773-780.
- [30] Esteves A. (2009). *Estudo de lesões cancerosas com a espectroscopia de Raman*. Tese de Mestrado em Física Médica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 100 pp.