

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: MEDICINA MOLECULAR**

FELIPE LIMA MAGALHÃES

**ESPECTROSCOPIA RAMAN DA GLÂNDULA PROSTÁTICA:
AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES MOLECULARES
PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

BELO HORIZONTE

2016

FELIPE LIMA MAGALHÃES

**ESPECTROSCOPIA RAMAN DA GLÂNDULA PROSTÁTICA:
AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES MOLECULARES
PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada no curso de pós graduação em Ciências da Saúde: medicina molecular, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Mamede Lewer

Co-orientadora: Profa. Dra. Jaqueline dos Santos Soares

BELO HORIZONTE

2016

Magalhães, Felipe Lima.
M188e Espectroscopia Raman da glândula prostática [manuscrito]: avaliação de potenciais marcadores moleculares para o câncer de próstata. / Felipe Lima Magalhães. - - Belo Horizonte: 2016.
80f.: il.
Orientador: Marcelo Henrique Mamede Lewer.
Coorientador: Jaqueline dos Santos Soares.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Próstata. 2. Análise Espectral Raman. 3. Biomarcadores Tumorais. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Lewer, Marcelo Henrique Mamede. II. Soares, Jaqueline dos Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WJ 762

“Não devemos nos sentir desencorajados pela dificuldade de interpretar a vida a partir das leis comuns da física” (Erwin Schrodinger – O que é a vida? O aspecto físico da célula viva, 1943)

À minha família e aos meus amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis. Desculpem-me pela ausência nos últimos meses. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu orientador e co-orientadora pela tranquilidade e leveza na condução do processo de mestrado tornando o processo mais suave. Além disso, pela grande disponibilidade da equipe em acertar horários para discussão conjunta, principalmente num momento de transição de residência médica.

Também agradeço enormemente à minha família, em especial à Dani, por escutar empaticamente às queixas repetidas e devaneios no trajeto. Aos amigos da física e medicina e de outros tempos, sempre presentes e dispostos a esparecimentos.

Agradecimento ao professor Marcos Assunção Pimenta e equipe do laboratório de Espectroscopia Raman do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da UFMG, que indicou a Jaque como co-orientadora e disponibilizou seu laboratório para realização do experimento.

Agradecimento ao professor Ishan Barman, professor da Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland USA que indicou bons caminhos na análise e apresentação dos dados coletados.

Agradecimento à família MFC (Medicina da Família e Comunidade), que representa um divisor de águas na minha carreira médica e presente na minha rotina diária durante boa parte do mestrado.

RESUMO

No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma, e apresenta estimativa de 61.200 novos casos para o ano de 2016, o que corresponde a 22,8% do total de neoplasias diagnosticadas no sexo masculino. Numerosos sistemas de classificação foram propostos para o câncer de próstata. O sistema de Gleason é o mais utilizado e é recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Nos espécimes de prostatectomia radical, ele é um dos fatores de predição de prognóstico mais relevantes para a avaliação pós-operatória. Alterações nesta classificação ainda são necessárias de forma a correlacionar adequadamente o escore de Gleason e o prognóstico do paciente. A espectroscopia Raman é uma forma de espectroscopia molecular amplamente utilizada para investigar a estrutura e propriedade das moléculas a partir de suas transições vibracionais. A espectroscopia Raman pode permitir a realização do diagnóstico de câncer prostático de maneira não destrutiva, rápida, objetiva, permitindo a determinação de uma assinatura molecular, que pode ser escalonada desde níveis micrométricos em regiões de interesse até a análise macroscópica de regiões do tecido analisado. Este estudo experimental teve como objetivo avaliar a capacidade de discriminação diagnóstica da espectroscopia Raman utilizando o comprimento de onda 1064nm e sistema FT-Raman em amostras de próstata tendo como referência a avaliação histopatológica como padrão ouro. Foram avaliadas múltiplas amostras prostáticas provenientes de 8 pacientes submetidos à prostatectomia radical no Hospital das Clínicas da UFMG. Este estudo mostrou que a técnica utilizada permite avaliar o espalhamento proveniente de diferentes compostos moleculares presentes no tecido prostático, entretanto sua capacidade discriminatória entre parênquima prostático diagnosticado por patologistas como benigno de parênquima diagnosticado como neoplásico é insatisfatória, tanto na análise univariada quanto multivariada. Este é o primeiro trabalho encontrado na literatura que investigou o uso deste comprimento de onda excitatório em tecidos prostáticos.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, neoplasia prostática.

ABSTRACT

According to National Cancer Institute of Brazil, prostate cancer is the second most common among men, and has 61.200 estimated new cases for 2016 (22.8% of total cancers diagnosed in males). Numerous classification systems have been proposed for prostate cancer. The Gleason system is the most used and recommended by the World Health Organization. In radical prostatectomy specimens, it is one of the most important prognostic factors for postoperative evaluation. Changes in this classification are still needed in order to properly correlate the Gleason score and the patient's prognosis. Raman spectroscopy is a molecular spectroscopy widely used to investigate the structure and property of the molecules from their vibrational transitions. Raman spectroscopy may allow the diagnosis of prostate cancer because of it is a non-destructive manner, rapid and objective. Thus, allowing the determination of a molecular signature that can be scaled from micrometric level in regions of interest to the macroscopic analysis regions of the analyzed tissue. This experimental study aimed to evaluate the diagnostic discrimination capability of Raman spectroscopy using the 1064nm wavelength and FT-Raman system in prostate samples having as reference the histopathological evaluation as the gold standard. Multiple prostatic samples from 8 patients who underwent radical prostatectomy were evaluated. This study showed that the technique can evaluate the scattering from different molecular compounds present in prostatic tissue, however its discriminatory capacity to distinguish between prostate glandular tissue diagnosed by pathologists as benign and glandular tissue diagnosed as cancer is unsatisfactory in both univariate and multivariate analysis. This is the first study in the literature that investigated the use of this excitatory wavelength in prostatic tissues.

Palavras-chave: Raman spectroscopy, prostatic cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de graduação de Gleason modificado	15
Figura 2: Diagrama Jablonski	21
Figura 3: Diagrama simplificado de um espectrômetro FT-Raman.....	26
Figura 4: Foto do eppendorf com identificação da amostra.....	38
Figura 5: Foto do posicionamento da amostra no FT-Raman	39
Figura 6: Módulo RAMII FT-Raman acoplado ao espectrômetro VERTEX 70 FT-IR	40
Figura 7: Foto da amostra em lâmina após processamento histopatológico	40
Figura 8: Microscopia ótica com aumento 40x de amostras	43
Figura 9: Espectro de espalhamento Raman comparativo entre amostra e solução fisiológica	45
Figura 10: Espalhamento comparativo entre amostra e porta amostras de vidro	46
Figura 11: Espectro de espalhamento Raman comparativo entre amostra e formaldeído.....	47
Figura 12: Espectros de espalhamento Raman das amostras do grupo diagnóstico benigno.....	48
Figura 13: Espectros de espalhamento Raman das amostras do grupo diagnóstico maligno.....	50
Figura 14: Espectros de espalhamento Raman comparativo entre amostras do grupo diagnóstico maligno e benigno.	51
Figura 15: Módulo da diferença entre média dos espectros diagnosticados como benignos e malignos	53
Figura 16: Módulo da diferença entre média dos espectros diagnosticados como benignos e malignos, utilizando escala que permite identificação de máximos locais.....	54
Figura 17: Boxplots dos quatro deslocamentos Raman que apresentaram maior diferença entre os grupos diagnósticos na região analisada.	55
Figura 18: Espectros de espalhamento Raman comparativos entre amostras diagnosticadas como benignas e estroma prostático.	56
Figura 19: Análise por componentes principais dos espectros obtidos de amostras diagnosticadas no grupo benignas ou malignas.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Picos de espalhamento Raman obtidos de tecidos prostáticos na literatura.....	31
Quadro 2: Diagnóstico histopatológico das amostras.....	41

ANEXOS

ANEXO I – Comitê de Ética da UFMG.....	68
ANEXO II - Código de programação da análise dos dados.....	71
ANEXO III - Ata da defesa de dissertação.....	77
ANEXO IV - Folha de aprovação.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

CP	Câncer de próstata
PSA	Prostatic Specific Antigen
ERSPC	European Randomized Study of Screening for prostate cancer
PLCO	Cancer Screening Trial
ISUP	International Society of Urological Pathology
CCD	Charged Coupled Device
NIR	Near Infra Red
UV	Ultra violeta
FT	Fourier Transform
α	Polarizabilidade
λ	Comprimento de onda
h	Constante de Planck
c	Velocidade da luz
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Principal Component Regression
PLS	Partial Least Squares
PET	Positron Emission Tomography
CT	Computadorized Tomography
Nd:YAG	Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada
Ti:Safira	Titânio-Safira
C	Carbono
H	Hidrogênio
O	Oxigênio
P	Fósforo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ACP	American College of Physicians
USPSTF	United States Preventive Services Task Force
ASCO	American Society of Clinical Oncology
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
KNN	K-Nearest Neighbor
CTFPHC	Canadian Task Force on Preventive Healthcare
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE QUADROS	5
ANEXOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	9
1.1 O CÂNCER DE PRÓSTATA	9
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA	9
1.1.2 DIAGNÓSTICO	9
1.1.3 HISTOPATOLOGIA	13
1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN	17
1.2.1 EFEITO RAMAN	18
1.2.2 INSTRUMENTAÇÃO	23
1.2.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS	27
1.2.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN E O TECIDO PROSTÁTICO	29
2 OBJETIVOS	34
3 MÉTODOS	35
3.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	35
3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE ESPALHAMENTO RAMAN	35
3.3 ANÁLISE DOS DADOS	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	59
6 REFERÊNCIAS	60
7 ANEXOS	68
7.1 ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA DA UFMG	68
7.2 ANEXO II - CÓDIGO DE PROGRAMAÇÃO DA ANÁLISE DOS DADOS	71
7.3 ANEXO III – ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO	77
7.4 ANEXO IV – FOLHA DE APROVAÇÃO	78

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O câncer de próstata

1.1.1 Epidemiologia

No Brasil, o câncer de próstata (CP) é a segunda neoplasia mais comum entre os homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma, e apresenta estimativa de 61.200 novos casos para o ano de 2016, o que corresponde a 22,8% do total de neoplasias diagnosticadas no sexo masculino. Em valores absolutos, é o sexto tipo mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de cânceres. Mais do que qualquer outro tipo, é considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento do número de casos ao longo dos anos tem como possíveis explicações o aumento da expectativa de vida, melhoria da qualidade dos sistemas de informação, a maior disponibilidade de métodos de diagnóstico e o rastreamento do CP através da dosagem do PSA (do inglês *Prostatic Specific Antigen*) e toque retal (INCA, 2015).

Estima-se o diagnóstico de 233.000 novos casos e 29.480 mortes devido ao câncer de próstata em 2014 nos Estados Unidos da América. O risco de desenvolver neoplasia de próstata durante a vida de um homem norte-americano é de 15,3%, sendo este risco diretamente proporcional à idade. Desta forma, até os 49 anos o risco é de apenas 0,3%, de 50-59 anos o risco é de 2,3%, de 60-69 anos é de 6,4% e depois dos 70 anos o risco aumenta para 11,4% (SIEGEL, MA, *et al.*, 2014). A etnia também influencia na incidência, sendo mais comum em homens afrodescendentes, e a presença de história familiar de câncer de próstata em parentes de primeiro grau antes dos 65 anos também está relacionada (KHARAZMI E, 2012). A existência de mutação no complexo de genes BRCA também é outro fator que aumenta o risco de desenvolver a doença (KOTE-JARAI Z, 2011).

1.1.2 Diagnóstico

O crescimento do câncer prostático inicialmente está relacionado com a via de sinalização do receptor androgênico, cuja atividade é regulada pela testosterona e di-hidrotestosterona, fato corroborado pela inibição do crescimento tumoral através do uso de terapias de privação androgênica. Entretanto, com cerca de 18-24 meses, o tumor desenvolve resistência a estas

terapias, o que parece estar relacionado com mutações pontuais no gene do receptor androgênico ou por vias de sinalização alternativas (VELCHETI V, 2008).

Muitos casos de câncer de próstata não se tornam clinicamente evidentes, como indicado por séries de autópsias, nas quais é detectado em um terço dos homens com menos de 80 anos e em dois terços dos homens com mais de 80 anos (DORR, WILLIAMSON e STEPHENS , 1993). Esses dados sugerem que o CP geralmente apresenta crescimento lento e muitos pacientes morrem de outras causas antes mesmo que a doença se torne clinicamente avançada (HOFFMAN, 2014). Desta forma, a doença é na maioria das vezes assintomática, mesmo em pacientes com nível de PSA elevado no rastreamento. Existe fraca evidência que relacione sintomas do trato geniturinário baixo como manifestação do câncer de próstata (HAMILTON W, 2004). Nos casos avançados, a sintomatologia pode estar relacionada com a presença de metástases.

A sobrevida no câncer de próstata está relacionada com muitos fatores, especialmente a extensão do tumor no momento do diagnóstico. A sobrevida relativa em homens 5 anos após diagnóstico de câncer de próstata localizado é de 99,5%, comparada com 35,4% entre os pacientes diagnosticados com metástases à distância (RIES, YOUNG, *et al.*, 2007). Desta forma, acreditou-se por muito tempo que o rastreamento, através do PSA e exame do toque retal, poderia identificar homens assintomáticos com tumores localizados agressivos, reduzindo a morbidade e mortalidade. O rastreamento através do exame do toque retal apresenta pior performance diagnóstica quando comparado à dosagem sérica do PSA com o valor de referência 4ng/ml, tanto em sensibilidade quanto em especificidade (MISTRY K, 2003). Entretanto, o rastreamento utilizando o PSA não apresenta um ponto de corte com sensibilidade e especificidade simultaneamente elevados o suficiente como desejado em um teste de rastreio. O valor de 4ng/ml apresenta 92% de especificidade, mas apenas 44% de sensibilidade. Quanto maior a sensibilidade, característica desejável em um teste de rastreamento, menor será a especificidade (HOLMSTRÖM B, 2009). Desta forma, o descobrimento de outros biomarcadores torna-se necessário para a detecção precoce do câncer prostático.

O PSA é uma seroprotease de regulação andrógena, presente no líquido seminal, produzido tanto pela próstata normal, quanto pelo carcinoma prostático. A arquitetura prostática mantém as moléculas de PSA confinadas e apenas uma pequena porção delas tem acesso ao sistema circulatório. A concentração do PSA no líquido seminal é de cerca de 105 vezes maior do que a sua concentração plasmática. As moléculas de PSA circulam no plasma tanto na forma livre quanto ligadas a proteases inibidoras. Elevações plasmáticas de PSA ocorrem como resultado da desestruturação da arquitetura prostática normal, permitindo que moléculas de

PSA se difundam no tecido prostático e ganhem acesso ao sistema circulatório (SALLES, 2010). A produção do PSA é menor nos tecidos prostáticos cancerosos quando comparada à dos tecidos prostáticos normais. A desestruturação da arquitetura prostática, nos casos de câncer, é o que permite que grande quantidade de PSA alcance o sistema circulatório (STAMEY, JOHNSTONE, *et al.*, 2002). Esse fato pode ocorrer em várias afecções prostáticas (câncer da próstata, infarto da próstata, hiperplasia nodular prostática ou prostatite) ou em casos de manipulação local (massagem, biópsia, ressecção transuretral da próstata). Níveis elevados de PSA em pacientes portadores de câncer de próstata não podem ser explicados pelo aumento de sua síntese (STEUBER, O'BRIEN e LILJA, 2008).

O rastreamento com PSA provocou aumento na incidência do câncer de próstata (LU-YAO e GREENBERG, 1994). Tal fato, associado ao impacto causado pela facilidade de realização de biópsias prostáticas transretais ecoguiadas, difundiram o diagnóstico e o tratamento do câncer de próstata em fase inicial, alterando a apresentação dos pacientes (POTOSKY, MILLER, *et al.*, 1995). A maioria destes novos diagnósticos evidenciava câncer clinicamente localizado, o que levou ao aumento da realização de prostatectomias radicais e radioterapia, visando tratar agressivamente o câncer em estágio inicial (LU-YAO, FRIEDMAN e YAO, 1997). Como consequência do rastreamento, a chance de detecção da neoplasia prostática durante a vida subiu para cerca de 16%, enquanto o risco de óbito pelo carcinoma é de apenas 3,4% (SALLES, 2010). Essa discrepância entre incidência e mortalidade é atribuída, em parte, ao aumento na detecção de tumores com crescimento lento e comportamento relativamente benigno em homens assintomáticos, os quais provavelmente não necessitariam de tratamento ao longo da vida. Isso acarreta questionamentos sobre terapias radicais desnecessárias, potencialmente associadas a efeitos adversos significativos (BILL-AXELSON e AL, 2005) (CRAWFORD e THOMPSON, 2007).

Uma coorte finalizada em 2008 acompanhou durante 5 anos 295.645 homens com mais de 65 anos submetidos ao rastreio com PSA (corte de 4ng/ml). Concluiu que 8,5% dos pacientes apresentava PSA maior que 4ng/ml. Dentre esses homens com suspeita de câncer de próstata, 33% foram submetidos a uma ou mais biópsias prostáticas. A taxa de complicações em 7 dias relacionadas ao procedimento foi de 5,6% e o diagnóstico confirmado em apenas 62,8% dos casos. Os casos diagnosticados foram tratados, sendo que 13,6% desenvolveram incontinência urinária e 13,7% disfunção erétil (WALTER LC, 2013).

As potenciais complicações relacionadas à biópsia são infecção do trato geniturinário inferior, sepse, retenção urinária, hematúria ou sangramento retal (LOEB S, 2013). Outro estudo evidenciou que cerca de um terço dos homens submetidos à biópsia apresentam

sintomatologia severa a moderada a ponto de procurarem suporte médico e que a hospitalização por complicações foi necessária em 1,4% do total de procedimentos. A sintomatologia após biópsia fez com que cerca de 20% dos homens não desejassem repetir o procedimento mesmo se necessário (ROSARIO DJ, 2012). Entretanto, a confirmação diagnóstica do câncer de próstata na primeira biópsia só ocorre em 22% dos casos que possuem PSA entre 4ng/ml e 10ng/ml, gerando ansiedade e a necessidade de biópsias subsequentes (DJAVAN B, 2001).

O *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer - ERSPC* (SCHRÖDER FH, 2009), observou apenas um pequeno benefício estatisticamente significativo na sobrevivência após nove anos de seguimento, sendo necessário rastrear 1.410 homens e diagnosticar 48 novos casos para prevenir uma morte por câncer de próstata. Desta forma, os autores alertam sobre o grande risco de sobrediagnóstico no rastreamento deste tipo de câncer (SCHRÖDER FH, 2009). Corroborando com esta informação, o estudo nomeado *Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial* (PLCO) (ANDRIOLE GL, 2009), realizado nos Estados Unidos de 1993 até 2001 evidenciou um aumento na incidência do câncer de próstata no grupo submetido ao rastreamento com PSA ou toque retal, mas nenhum benefício estatisticamente significativo na mortalidade após 7-10 anos de seguimento (ANDRIOLE GL, 2009).

Atualmente, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o *American College of Physicians* (ACP), o *United States Preventive Services Task Force* (USPSTF), o *Canadian Task Force on Preventive Health Care* (CTFPHC) e o *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) não recomendam que os médicos ofereçam o rastreio com PSA para pacientes que não expressam interesse e recomenda que informem aos pacientes interessados sobre o limitado benefício potencial e os substanciais riscos relacionados. O potencial benefício inclui a detecção precoce de doença localizada e os potenciais danos incluem ansiedade desnecessária sobre o diagnóstico, detecção de câncer sem importância clínica, resultado falso positivo e os potenciais danos causados pelo tratamento (MOYER, 2012). Além disso, existem implicações psicológicas do diagnóstico de câncer de próstata, incluindo aumento do risco de morte por doença cardiovascular e suicídio nos primeiros meses após o diagnóstico, mesmo para indivíduos com câncer histologicamente bem diferenciado (FANG, KEATING e MUCCI, 2010). Desta forma, é necessário o desenvolvimento de outro método de rastreamento para câncer de próstata que apresente melhor sensibilidade e especificidade e métodos que sejam capazes de diferenciar tumores que apresentarão evolução clínica benigna permitindo desta forma a realização de profilaxia quaternária.

Com o objetivo de diminuir a morbidade relacionada aos procedimentos cirúrgicos, muitos pesquisadores têm trabalhado no refinamento da prostatectomia com a preocupação de que não se comprometam os princípios oncológicos de cura da neoplasia. Nesse ponto, a avaliação anatomopatológica da peça cirúrgica é fundamental (SALLES, 2010). Os objetivos essenciais do estudo anatomopatológico da próstata são estabelecer o estadiamento e o escore de Gleason, sistema de graduação preconizado para avaliação de adenocarcinomas prostáticos, bem como verificar o comprometimento das margens de ressecção cirúrgica e a presença de doença extraprostática, fornecendo assim informações que orientem a melhor conduta terapêutica complementar (MURPHY, PARKINSON e AL, 1994).

1.1.3 Histopatologia

A histologia da próstata mostra dois componentes fundamentais: as glândulas e o estroma. As glândulas são constituídas de ácinos e ductos excretórios revestidos por células secretoras cúbicas ou cilíndricas. Abaixo dessas células há uma fileira, contínua ou não, de células basais. Há ainda uma terceira população de células epiteliais neuroendócrinas. O estroma prostático é constituído de tecido fibroso e muscular liso com quantidade variável de fibras elásticas. Observa-se principalmente no ápice, na própria espessura do parênquima prostático, fibras musculares estriadas esqueléticas que se estendem para o diafragma urogenital (MCNEAL, 1969), (MCNEAL, 1972), (MCNEAL, 1988).

Os adenocarcinomas constituem a neoplasia mais comum da próstata. Classicamente, localizam-se na periferia da glândula e variam de tumores bem diferenciados, por vezes, difíceis de serem distinguidos da próstata normal, a neoplasias pouco diferenciadas ou mesmo indiferenciadas (AIHARA, WHEELER, *et al.*, 1994), (WHEELER, 1989). Um achado comum no adenocarcinoma é a presença única de camadas de células epiteliais secretoras, formando o epitélio ductal e acinar; as glândulas prostáticas não neoplásicas, por sua vez, apresentam camada de células basais abaixo da camada de células secretoras. O reconhecimento das células basais, entretanto, não é evidente em todos os casos, sendo necessário utilizar métodos especiais como a imuno-histoquímica para caracterizar a sua presença (MOSTOFI, SESTERHENN e DAVIS JR, 1993).

Numerosos sistemas de classificação foram propostos para o câncer de próstata. O sistema de Gleason é o mais utilizado e é recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Nos espécimes de prostatectomia radical, ele é um dos fatores de predição de prognóstico mais relevantes para a avaliação pós-operatória. Fundamenta-se em padrões arquiteturais, não

avaliando atipia nuclear. A atipia nuclear é adotada em alguns sistemas, correlaciona-se com o prognóstico, mas não há evidência de que adicione informação prognóstica independente daquela obtida pela avaliação arquitetural (EGEVAD, GRANFORS, *et al.*, 2002).

O sistema de Gleason define cinco padrões histológicos de graduação, com diferenciação decrescente. Nos padrões 1 a 3, de maneira geral, há manutenção da morfologia glandular fundamental, com diferenciação luminal em praticamente todas as glândulas. No padrão 4, há perda parcial dessa morfologia e fusão glandular e, no padrão 5, a perda é quase total (MELLINGER, GLEASON e BAILAR, 1967). O adenocarcinoma da próstata apresenta heterogeneidade morfológica acentuada e, frequentemente, mais de um padrão está presente. O padrão prevalente, denominado padrão primário, e o segundo, denominado padrão secundário, são somados para obter-se o chamado escore de Gleason, recomendando-se que todos os elementos dessa soma sejam mencionados (por exemplo, escore de Gleason 3 + 4 = 7). Se o tumor apresentar apenas um padrão, o escore de Gleason é obtido duplicando aquele padrão. O sistema de Gleason inicial não considerava padrões que correspondiam a menos de 5% dos tumores ou padrões terciários. Entretanto, a presença de um componente terciário representado por um padrão mais elevado afeta de maneira adversa o prognóstico dos pacientes (HARNDEN, SHELLEY, *et al.*, 2007).

Em 2005, a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP, do inglês *International Society of Urological Pathology*) propôs uma modificação do sistema de Gleason, em função dos novos conhecimentos anatomopatológicos relacionados ao adenocarcinoma prostático, com o objetivo de aperfeiçoar sua utilização (EPSTEIN, ALLSBROOK, *et al.*, 2005). Uma nova escala de analogia visual foi proposta e foram estabelecidas novas considerações para padrões terciários, graduação quando o padrão secundário apresenta uma representação limitada, graduação separada de nódulos tumorais isolados presentes na peça de prostatectomia radical, graduação separada das biópsias ecoguiadas e graduação para variantes do adenocarcinoma da próstata (SHAH, 2009). Um esquema visual deste sistema de Gleason modificado pode ser observado na Figura 1.

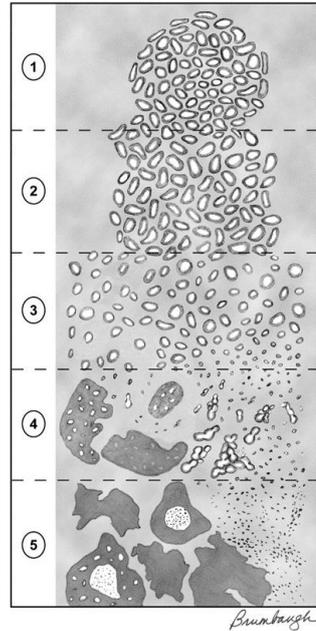


Figura 1: Sistema de graduação de Gleason modificado (Epstein et al, 2006).

Notas: Grau 1- Nódulo circunscrito composto de ácinos de tamanho médio, uniformes, ovais ou arredondados, densamente aglomerados, porém distintos. Grau 2 - Similar ao grau 1, moderadamente circunscrito, podendo haver mínima infiltração na borda do tumor. As glândulas estão dispostas de maneira mais frouxa, e não tão uniforme quanto no grau 1. Grau 3 - Unidades glandulares distintas; tipicamente glândulas menores do que as vistas nos graus 1 ou 2; infiltram entre e ao longo de ácinos não neoplásicos na próstata; marcada variação no tamanho e forma; alguns nódulos de tumor finamente circunscritos e cribiformes. Grau 4 - Glândulas microacinares fundidas; glândulas mal definidas com lúmen glandular malformado; grandes glândulas cribiformes com bordos irregulares; aspecto hipernefrotóide. Grau 5 - Essencialmente nenhuma diferenciação glandular, composto de folhetos sólidos, cordões ou células isoladas; comedocarcinoma com necrose central, circundado por massas papilares, cribiformes ou sólidas.

Na tentativa de obter melhor correlação entre o observado na biópsia prostática ecoguiada e os achados na peça cirúrgica de prostatectomia radical, foi proposta também uma interpretação qualitativa da graduação do adenocarcinoma: adenocarcinoma de baixo risco (correspondente aos escores de Gleason < 7), adenocarcinoma de risco intermediário (correspondente aos escores de Gleason = 7), adenocarcinoma de alto risco (correspondente ao escore de Gleason > 7). Com as novas modificações, estudos posteriores indicaram melhor correlação entre o escore Gleason de biópsias e prostatectomias radicais, além de melhorar a estimativa do risco de recorrência bioquímica (TSIVIAN, SUN e MOURAVIEV, 2009), (UEMURA, HOSHINO, *et al.*, 2009).

Alterações nesta classificação ainda foram necessárias de forma a correlacionar adequadamente o escore de Gleason e o prognóstico do paciente (PIERORAZIO, WALSH, *et*

al., 2013). Em novembro de 2014, a ISUP realizou uma nova conferência em Chicago (IL, EUA) reunindo patologistas, urologistas, radioncologistas e oncologistas sendo proposto um novo sistema de classificação prognóstica. A nova escala proposta apresenta grupos prognósticos de 1 a 5. Pacientes anteriormente classificados como Gleason 6 passaram a fazer parte do grupo 1. Escores de Gleason $3 + 4 = 7$ e $4 + 3 = 7$ foram divididos em dois grupos prognósticos diferentes, agora denominados 2 e 3, respectivamente. Escore de Gleason 8 tornou-se o grupo 4 e escores 9-10 classificados no grupo 5. Estas novas categorias prognósticas de 1 a 5 estão correlacionadas com uma taxa de ausência de recidiva bioquímica em 5 anos de 94,6%, 82,7%, 65,1%, 63,1% e 34,5%, respectivamente, considerando biópsias prostáticas. Quando se consideram resultados de prostatectomias, as taxas de ausência de recidiva bioquímica em 5 anos são respectivamente 96,6%, 88,1%, 69,7%, 63,7% e 34,5% (LOEB, MONTORSI e CATTO, 2015).

Como não existe um padrão que distinga claramente os diversos padrões histológicos no escore de Gleason, a sua determinação é muitas vezes subjetiva e depende do treinamento e experiência do patologista. Por estas razões, diversos estudos foram realizados para quantificar a concordância diagnóstica inter-observador entre patologistas, obtendo-se índices kappa que variam muito entre os estudos, mas em geral há um grau de concordância de moderado a bom (ALLSBROOK, MANGOLD, *et al.*, 2001), (MELIA, MOSELEY, *et al.*, 2006). Goodman *et al.* obteve em 2012, uma concordância total de 54% no escore de biópsias e 63% no escore de prostatectomia radical. A maioria das discordâncias, cerca de 90%, ocorreu por apenas um ponto no escore de Gleason (GOODMAN, WARD, *et al.*, 2012). Em 2007, um estudo realizado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG obteve um grau de concordância inter-observador mediano a moderado no escore de biópsias e prostatectomias radicais (VELOSO, LIMA, *et al.*, 2007).

No que diz respeito à concordância entre o escore obtido através de biópsia ou prostatectomia radical, estudos indicam apenas um fraco a moderado grau de concordância. Há evidência de que escores obtidos de biópsias tendem a subestimar a classificação do câncer de próstata (DIVRIK, EROGLU, *et al.*, 2007) (STAV, JUDITH, *et al.*, 2007). Goodman *et al.* obteve em 2012, uma concordância total de 66% entre os escores de biópsia e prostatectomia radicais, kappa de 0,35 a 0,53, sendo o escore subestimado em 19% dos casos e superestimado em 15% (GOODMAN, WARD, *et al.*, 2012). Fatores que podem contribuir para esta discrepância são heterogeneidade do tumor, erro de amostragem, intervariabilidade e intravariabilidade entre observadores.

Para melhor estratificar e prever o risco de progressão do câncer de próstata, múltiplos parâmetros clínicos e patológicos foram investigados permitindo o desenvolvimento de nomogramas. Avanços na última década aumentaram o conhecimento sobre os processos biológicos deste tipo de câncer, permitindo o surgimento de marcadores moleculares que possam contribuir com mais informações para auxiliar a determinar o prognóstico e nortear as decisões terapêuticas (ROSS, D'AMICO e FREEDLAND, 2014).

Dentre os novos marcadores de prognóstico pode-se citar a reação estromal. É sabido que as células do estroma modulam o desenvolvimento, crescimento e diferenciação do tecido prostático normal. Na próstata normal, células musculares lisas do estroma sob influência da via de sinalização androgênica controlam a diferenciação e proliferação epitelial. Por outro lado, o epitélio prostático modula a diferenciação destas células musculares lisas prostáticas. Miofibroblastos presentes no estroma podem dificultar a migração local de células do sistema imunológico modulando a resposta inflamatória intra-tumoral, protegendo desta forma as células tumorais do sistema imunológico (AYALA, TUXHORN, *et al.*, 2003). O tempo livre de doença é reduzido quanto mais intensa for a alteração estromal, correlação quantificada imunohistoquimicamente pela expressão da vimentina. Estes resultados indicam que a intensidade de alteração estromal no tumor pode servir como um marcador confiável da progressão do câncer prostático, podendo ser utilizado para prever prognóstico. Pacientes que apresentam o mesmo padrão histopatológico e score Gleason, mas alterações mais intensas do estroma tumoral, possuem maior risco de recorrência da doença (YANAGISAWA, LI, *et al.*, 2007). Estudos mostraram que a quantidade de reação estromal pode prever o tempo livre de recidiva bioquímica a partir da análise de prostatectomias e biopsias prostáticas. Tumores que apresentam os extremos, ou seja, abundância ou ausência de estroma reativo, possuem pior prognóstico que os tumores com quantidade moderada de reação estromal (AYALA, TUXHORN, *et al.*, 2003), (YANAGISAWA, LI, *et al.*, 2007).

1.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma forma de espectroscopia óptica com aplicações na identificação molecular amplamente utilizada para investigar a estrutura e propriedade das moléculas a partir de suas transições vibracionais (GARDINER e GRAVES, 1989). A técnica espectroscópica é baseada no fenômeno de espalhamento Raman, um tipo de espalhamento inelástico observado na interação da luz com a matéria, postulado por Smekal em 1923 e observado experimentalmente pela primeira vez por Raman e Krishnan em 1928. A melhoria

da instrumentação voltada para espectroscopia Raman, principalmente nas últimas duas décadas, permitiu a sua aplicação na monitoração de processos químicos e na pesquisa biomédica. Especificamente, os pesquisadores têm explorado a capacidade da técnica em detectar alterações moleculares em tecidos biológicos visando auxiliar o diagnóstico de doenças (OZAKI, 1988), (HANLON , MANOHARAN, *et al.*, 2000), (MAHADEVAN-JANSEN e RICHARDS-KORTUM, 1996), (FRANK, MCCREERY e REDD, 1995).

1.2.1 Efeito Raman

Cada átomo possui três graus de liberdade, ou seja, ele pode mover-se independentemente na direção de cada um dos 3 eixos cartesianos. Se N átomos constituem uma molécula, existem $3N$ graus de liberdade de movimento. Três destes $3N$ graus de liberdade correspondem ao movimento translacional com todos os átomos da molécula deslocando-se simultaneamente na mesma direção paralela a cada um dos eixos cartesianos. Outros 3 graus de liberdade também não estão relacionados com alteração da distância interatômica, correspondendo à rotação da molécula em torno dos três principais eixos do elipsoide inercial que a representa. Desta forma, os outros $3N - 6$ graus de liberdade de movimento restantes correspondem a estados que alteram a distância interatômica, ou seja, existem $3N - 6$ modos de vibração normais em uma molécula não linear com N átomos (SCHRADER, 1995).

O modelo mais simples que descreve as ligações entre os átomos é o de uma mola elástica, o que implicaria em movimentos periódicos dos átomos em torno de pontos de equilíbrio, como em um oscilador harmônico. Neste modelo, a frequência vibracional pode ser relacionada com a massa dos átomos e a força da ligação covalente através da lei de Hooke (SMITH e DENT, 2005). Quanto mais forte a ligação interatômica ou quanto menor a massa dos átomos envolvidos, maior a frequência vibracional deste oscilador. Desta forma, a constante de força da ligação interatômica, a massa dos átomos e a geometria molecular determinam a frequência de oscilação e o movimento relativo entre os átomos. Todas as vibrações moleculares caracterizáveis por este modelo resultam da superposição destes $3N - 6$ modos vibracionais normais (SCHRADER, 1995).

Existem dois principais tipos de vibração. O primeiro padrão conhecido como *stretching*, ou “alongamento” na língua portuguesa, ocorre quando há alteração do comprimento da ligação interatômica. Outro padrão conhecido como *bending*, ou “flexão” na língua portuguesa, ocorre quando há alteração do ângulo entre as ligações interatômicas.

De acordo com a mecânica clássica, um oscilador harmônico pode vibrar com qualquer amplitude, o que significa que ele pode possuir qualquer quantidade de energia. A mecânica quântica, entretanto, mostra que as moléculas podem existir apenas em estados energéticos definidos, não contínuos. Uma molécula precisa absorver uma específica quantidade de energia $h\nu_s$ para chegar a um estado vibracional mais excitado.

Durante a interação da luz com a matéria, os fótons incidentes podem ser absorvidos ou espalhados. Uma parcela dos fótons pode ser transmitida sem interagir com o material. A absorção e espalhamento são os tipos de interação mais frequentes em uma amostra biológica turbida. Na absorção, a energia do fóton incidente precisa ser igual à diferença de energia entre os possíveis estados vibracionais da molécula, levando-a a um estado vibracional mais energético. Este princípio é utilizado na espectroscopia de absorção, tendo como exemplo a espectroscopia NIR (do inglês *Near InfraRed*) (BARMAN, 2011).

O fenômeno de espalhamento não requer que a energia do fóton incidente seja igual à diferença de energia entre os possíveis estados vibracionais das moléculas. Neste caso, o campo elétrico do feixe de luz e a nuvem eletrônica da molécula interagem, alterando o estado vibracional da molécula. Esta interação promove a formação de um complexo efêmero entre a onda eletromagnética e os elétrons na molécula, pois o núcleo não teve tempo suficiente para se mover apreciavelmente (SMITH e DENT, 2005). Este complexo entre a luz e a molécula não é estável, sendo a luz imediatamente espalhada. A distorção da nuvem eletrônica molecular depende da quantidade de energia transferida pela luz para a molécula, sendo desta forma dependente da frequência do laser utilizado.

É importante ressaltar que o espalhamento ocorre através de um estado quântico intermediário que não representa um real estado quântico da molécula. Este nível quântico “virtual” gerado pela distorção da nuvem eletrônica da molécula pela interação com o campo elétrico oscilante do feixe de luz, dura 10^{-14} segundos ou menos (BARMAN, 2011). Desta forma, o espectro Raman detectado contém picos específicos característicos da estrutura molecular, apesar de não serem os picos relacionados com as transições dos níveis quânticos.

A maioria dos fótons espalhados deixa o material com o mesmo comprimento de onda dos fótons incidentes, no chamado espalhamento Rayleigh (MOREIRA, SILVEIRA e SANTOS, 2008). Neste tipo de espalhamento elástico, a nuvem eletrônica da molécula retorna ao estado anterior à formação do complexo onda eletromagnética e molécula sem nenhuma movimentação nuclear (SMITH e DENT, 2005). Não existe desta forma, mudança na energia do fóton incidente.

Uma pequena porcentagem dos fótons deixa o material com um comprimento de onda diferente dos fótons incidentes, o chamado espalhamento Raman. Esse fenômeno ocorre quando a luz e a nuvem eletrônica molecular interagem, mas há ao mesmo tempo movimentação nuclear. Como o núcleo do átomo possui mais massa que a nuvem eletrônica, ocorre uma mudança na energia da molécula, seja para um estado de maior ou menor energia, dependendo se a interação ocorre com uma molécula no estado fundamental (espalhamento Stokes) ou num estado vibracional excitado (espalhamento anti-Stokes) (SMITH e DENT, 2005). Desta forma, o fóton incidente transfere parte de sua energia para as moléculas (resultando em redução da energia dos fótons – espalhamento Raman Stokes) ou recebe energia das moléculas (resultando em aumento da energia dos fótons – espalhamento Raman anti-Stokes).

A maioria dos fótons é espalhada elasticamente e apenas um a cada 10^6 - 10^8 fótons espalham inelasticamente (espalhamento Raman). Além disso, de acordo com a distribuição de Maxwell-Boltzmann, o espalhamento Stokes na temperatura ambiente é muito mais forte que o espalhamento anti-Stokes, pois o número de moléculas em um estado vibracional excitado é significativamente menor que o de moléculas no estado menos energético. Moléculas irradiadas com fótons de energia suficientemente alta para promover a transição dos elétrons de valência para estados eletrônicos excitados podem retornar ao estado fundamental através da emissão de fótons de menor energia no processo chamado fluorescência. O espectro de fótons emitidos por fluorescência pode apresentar pequenas diferenças originadas da transição do estado eletrônico excitado para diferentes estados vibracionais do estado fundamental (SCHRADER, 1995).

O diagrama de Jablonski, mostrado na Figura 2, é um esquema útil para ilustrar os estados vibracionais e eletrônicos e as possíveis transições entre eles. As setas retas representam as transições radiativas e a seta não linear representa uma possível transição não radiativa. A espessura das setas representando o espalhamento Rayleigh, Stokes e anti-Stokes está relacionada com a probabilidade de ocorrência destes espalhamentos.

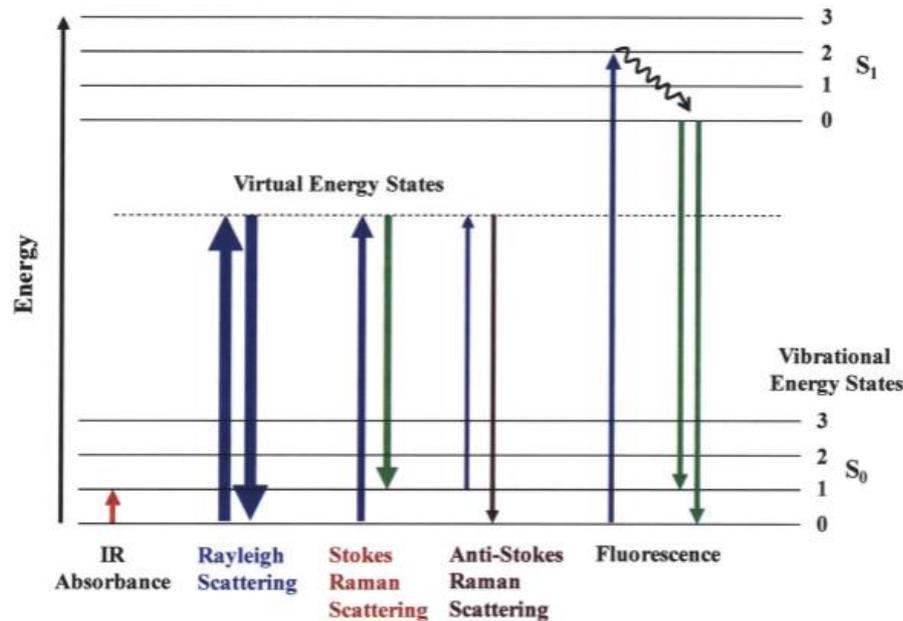


Figura 2: Diagrama Jablonski mostrando as transições entre os diferentes estados vibracionais como consequência da interação entre fótons e matéria (BARMAN, 2011).

Nota: S₁ representa o primeiro estado excitado e S₀ o estado fundamental. Cada estado excitado apresenta quatro possíveis estados vibracionais numerados de 0 - 3 na figura. As setas retas representam as transições radiativas e a seta não linear representa uma possível transição não radiativa. A espessura das setas representando o espalhamento Rayleigh, Stokes e anti-Stokes está relacionada com a probabilidade de ocorrência destes espalhamentos.

A partir destes conceitos físicos, pode-se determinar um modelo matemático que descreva a interação entre a luz e as moléculas. Quando uma onda eletromagnética com frequência ν_0 (luz), interage com as moléculas de uma amostra, ocorre uma perturbação periódica dos elétrons nas órbitas fazendo-os oscilar com a mesma frequência do feixe incidente. Essa distorção periódica da nuvem eletrônica e a sua relação com a carga do núcleo promove uma periódica separação de cargas na molécula, ou seja, forma-se periodicamente um momento de dipolo induzido.

A tendência de uma distribuição de cargas ser distorcida da sua configuração original por um campo elétrico externo incidente (E_i) e formar um momento de dipolo induzido (P) é proporcional à polarizabilidade (α):

$$P = \alpha E_i \quad (\text{Equação 1})$$

A polarizabilidade de um material é uma propriedade que depende da estrutura molecular e natureza das ligações interatômicas presentes na molécula. Quanto menor a

distância entre núcleo atômico e elétrons, menor será a influência do campo elétrico externo nessas partículas. Desta forma, a polarizabilidade de uma molécula pode ser modulada pelo padrão vibracional dos átomos na molécula. A intensidade do campo elétrico incidente (E_i) em um instante t qualquer pode ser expressa pela equação:

$$E_i = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde E_0 é a amplitude do campo elétrico e ν_0 é a frequência de oscilação da onda eletromagnética incidente. Combinando as equações (1) e (2), obtemos:

$$P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (\text{Equação 3})$$

No âmbito molecular, quando se assume um padrão sinusoidal de vibração molecular, é possível descrever um pequeno deslocamento (dx) do núcleo em torno do ponto de equilíbrio através da seguinte equação:

$$dx = x_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde x_0 é a amplitude de vibração e ν_{vib} é a frequência de vibração intrínseca da molécula. Como a polarizabilidade α depende da posição instantânea dos átomos na molécula e considerando pequenos deslocamentos nucleares, pode-se descrever a polarizabilidade em um instante t através da série de Taylor de primeira ordem (BARMAN, 2011):

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial x} dx \quad (\text{Equação 5})$$

Onde α_0 é a polarizabilidade no ponto de equilíbrio e dx é o deslocamento do núcleo em relação ao ponto de equilíbrio. Combinando as equações (4) e (5), obtém-se:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial x} x_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (\text{Equação 6})$$

Por fim, combinando as equações (3) e (6), obtém-se:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{\partial \alpha}{\partial x} \frac{x_0 E_0}{2} [\cos(2\pi t(\nu_0 + \nu_{vib})) + \cos(2\pi t(\nu_0 - \nu_{vib}))] \quad (\text{Equação 7})$$

A equação 7 mostra que o dipolo induzido originado pela interação do campo elétrico do feixe de luz incidente com a nuvem eletrônica das moléculas ocorre em três diferentes frequências: (ν_0) ou ($\nu_0 + \nu_{vib}$) ou ($\nu_0 - \nu_{vib}$). Estas frequências correspondem às frequências de espalhamento Rayleigh, espalhamento Raman anti-Stokes e espalhamento Raman Stokes, respectivamente. Outra conclusão derivada desta equação é que não existe espalhamento Raman se a primeira derivada da polarizabilidade em relação ao deslocamento x do núcleo em relação ao ponto de equilíbrio for igual de zero. Desta forma, a condição necessária para o espalhamento Raman é que a polarizabilidade da molécula varie com o deslocamento vibracional em torno do ponto de equilíbrio.

Por fim, pode ser demonstrado que a intensidade do espalhamento Raman é proporcional à intensidade do feixe incidente com a segunda potência da polarizabilidade e com a quarta potência da frequência ($\nu_0 \pm \nu_{\text{vib}}$) (MCCREERY, 2000). Isto implica o espalhamento Raman ser mais intenso quanto maior for a frequência do feixe incidente, o que precisa ser balanceado com o tipo de amostra, pois o aumento da frequência da onda eletromagnética incidente aumenta a probabilidade de fluorescência ou absorção dos fótons pela amostra.

A polarizabilidade influencia a intensidade do espalhamento Raman através de um fator com potência dois. Desta forma, moléculas que apresentam ligações interatômicas mais polarizáveis, como por exemplo duplas ligações, apresentarão espalhamento Raman mais intenso. Esta abordagem utilizando a teoria clássica permite a compreensão de algumas propriedades do espalhamento Raman, entretanto, uma abordagem pela teoria quântica é necessária para explicar a diferença de intensidade entre o espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes, por exemplo (GARDINER e GRAVES, 1989).

1.2.2 Instrumentação

A primeira consideração ao se realizar espectroscopia Raman é a escolha do comprimento de onda apropriado. Tradicionalmente, quando aplicado em análises químicas, escolhem-se comprimentos de onda menores, como o ultravioleta (UV). Esta escolha decorre da presença do fator com quarta potência que relaciona a frequência do feixe incidente com a intensidade do espalhamento Raman. Além disso, a eficiência dos detectores disponíveis é muito melhor na faixa UV visível que na faixa NIR. Especificamente, os detectores de silício apresentam rápida redução na eficiência quando se detecta comprimentos de onda maiores que 1000nm. Por outro lado, o surgimento de detectores InGaAs CCD (do inglês *Charged Coupled Device*) nos últimos anos, agora permitem um maior uso de sistemas com fótons de 1064nm, apesar do ruído intrínseco gerado na detecção (CHAD, HUAWEN e YANG, 2013).

Favorecendo a utilização da faixa NIR pode-se citar a significativa redução da fluorescência emitida pela amostra. Alterações térmicas ou fotoquímicas também são reduzidas quando se utiliza fótons com menor energia. Além disso, fótons na faixa NIR não são mutagênicos como os fótons na faixa UV que induzem a formação de dímeros de timina no DNA. Por fim, utilizar a faixa 700-1000 nm permite uma maior penetração dos fótons na amostra biológica devido à menor concentração de substâncias absorvedoras para esta faixa de comprimento de onda (BARMAN, 2011).

Os lasers mais usados pela Espectroscopia Raman na faixa NIR são: Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada (Nd: YAG) e Titânio-Safira (Ti: Safira) (SALA, 1995). Quando uma luz monocromática no comprimento de onda visível, ou até mesmo em 780 nm, é utilizada como fonte de excitação para o efeito Raman, os picos de espalhamento Raman geralmente são encobertos pela radiação de fluorescência emitida por constituintes celulares, como enzimas, que estão sempre presentes, mesmo em concentrações muito baixas. Para driblar este obstáculo, diminui-se a energia da fonte de excitação para um grau tal que somente os níveis vibracionais são excitados, não os níveis eletrônicos. Com excitação a 1064nm a partir de um laser de Nd: YAG, por exemplo, essa fluorescência é virtualmente eliminada (SCHRADER, 1995).

A autofluorescência é um dos maiores desafios na análise de material orgânico e biológico por espectroscopia Raman. Young-Kun Min et al (2005) obtiveram uma melhor razão sinal/ruído utilizando o comprimento de onda 1064 nm ao invés do 785 nm, tradicionalmente utilizado em amostras biológicas. Neste caso específico, a fluorescência da amostra mascarava os picos de espalhamento Raman ao se utilizar o comprimento de onda 785 nm (MIN, TATSUYA, *et al.*, 2005). Apesar de haver técnicas de lidar com a fluorescência, como a utilização da configuração confocal ou FT-Raman (do inglês *Fourier Transform Raman*), a maneira mais eficiente é a escolha de um maior comprimento de onda dos fótons emitidos pelo laser. Como dito anteriormente, esta escolha reduz a intensidade do espalhamento Raman, podendo reduzir a sensibilidade da análise. Este efeito poderia ser parcialmente contornado pelo aumento da potência do laser ou pelo maior tempo de integração da coleta. Além disso, devido à eficiência estendida do receptor InGaAs, picos observados em maiores comprimentos de onda (C-H, O-H, N-H stretching modes) podem ser detectados utilizando-se o mesmo laser. No caso da utilização do laser em 785nm, sistemas que usualmente usam CCD, esses picos encontram-se em uma região na qual a eficiência do silício em detecção não é tão alta (CHAD, HUAWEN e YANG, 2013), (NIJSSEN, 2007).

O uso de sistemas dispersivos em 1064nm também reduz as rigorosas condições de acomodação da amostra observadas em sistemas que utilizam menores comprimentos de onda. Por exemplo, a utilização do comprimento de onda em 785nm requer frascos, *cuvettes* e outros suportes feitos de sílica, quartzo ou fluoreto de cálcio para reduzir a fluorescência emitida por eles, entretanto, o custo destes materiais é muito superior em relação ao vidro. O sinal de fundo produzido pelo vidro em 785nm permeia os picos de espalhamento Raman, dificultando a sua remoção. Já em 1064nm, este sinal é bem menor e pode ser muitas vezes simplesmente subtraído do espectro obtido, evidenciando os picos de espalhamento Raman da amostra (CHAD, HUAWEN e YANG, 2013).

Em geral, quando se trata de amostras biológicas, utiliza-se um sistema experimental dispersivo de espectroscopia Raman. Também pode ser utilizado um sistema FT-Raman que apresenta maior precisão de frequência e maior redução da fluorescência em comprimentos de onda maiores (NIR). Entretanto, possuem a desvantagem de maior ruído gerado no detector quando comparados com os detectores de CCD utilizados nos sistemas dispersivos.

Os sistemas dispersivos apresentam como principais componentes uma fonte excitatória, geralmente um laser de onda contínua que emite uma onda eletromagnética com amplitude e frequência constantes. Um sistema que conduz os fótons para a amostra e coleta os fótons espalhados por esta que pode ser composto de lentes, fibra ótica ou uma combinação dos dois. A fibra ótica é preferível para aplicações clínicas pelo fato de ser flexível e compacta. Tradicionalmente, a maioria dos sistemas biológicos utiliza a configuração retro-espalhamento (*back-scattering* – 180°), pois desta maneira há redução no número de fótons perdidos pela turbidez da amostra (BARMAN, 2011). O elemento dispersivo acoplado ao detector, chamado rede de difração, difrata simultaneamente diferentes comprimentos de onda do feixe espalhado pela amostra para um detector com multicanais. Fótons com diferentes energias serão espacialmente separados de maneira linear atingindo desta forma diferentes detectores no sistema de multicanais.

Apesar do sistema FT-Raman ter sido criado por volta de 1964, sua utilização iniciou por volta de 1986 para melhorar a capacidade de detecção e superar algumas limitações do detector CCD, principalmente na utilização de fontes excitatórias NIR, geralmente 1064 nm. O sistema utiliza um interferômetro Michelson e uma fonte de laser contínua Nd:YAG que emite fótons com comprimento de onda em 1064 nm. O sinal medido consiste de um interferograma, ou seja, um gráfico em que tem a potência da radiação que atinge o detector num dado instante em função da distância percorrida pelo espelho móvel do interferômetro. O espectro Raman da amostra é coletado pelo detector simultaneamente. O espectro Raman pode ser obtido através da transformada de Fourier deste interferograma. O detector composto de InGaAs e Germanium (Ge) são operados em temperaturas criogênicas para reduzir o ruído e melhorar a relação sinal-ruído (SINGH e MOHAN, 2015).

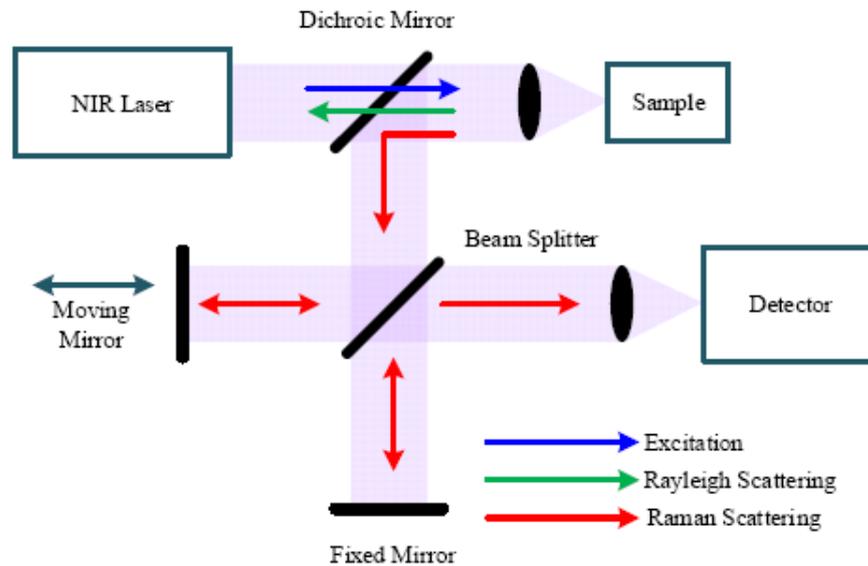


Figura 3: Diagrama simplificado de um FT-Raman (LI, JAMAL , et al., 2014).

Nota: A fonte excitatória (NIR laser) emite uma onda eletromagnética que é transmitida pelo espelho dicróico para a amostra. O feixe espalhado retorna ao espelho dicróico que transmite o comprimento de onda proveniente do espalhamento Rayleigh e reflete aqueles provenientes do espalhamento Raman para o beam splitter. Este, por sua vez, transmite metade do sinal para um espelho fixo (fixed mirror) e reflete a outra metade para um espelho móvel (Moving mirror). A diferença de distância percorrida por estas ondas gera um padrão de interferência construtiva e destrutiva. Este interferograma incide no detector e o sinal será posteriormente processado utilizando a transformada de Fourier para obter o espectrograma

A Figura 3 mostra um diagrama simplificado de espectrômetro FT-Raman. A fonte excitatória (NIR laser) emite uma onda eletromagnética que é transmitida pelo espelho dicróico para a amostra. O feixe espalhado retorna ao espelho dicróico (Dichroic Mirror) que transmite o comprimento de onda proveniente do espalhamento Rayleigh e reflete aqueles provenientes do espalhamento Raman para o *beam splitter*. Este, por sua vez, transmite metade do sinal para um espelho fixo (*fixed mirror*) e reflete a outra metade para um espelho móvel (*Moving mirror*). A diferença de distância percorrida por estas ondas gera um padrão de interferência construtiva e destrutiva. Este interferograma incide no detector e o sinal será posteriormente processado utilizando a transformada de Fourier para obter o espectrograma (LI, JAMAL , *et al.*, 2014).

O espectro Raman é geralmente apresentado em um gráfico relacionando a intensidade da luz espalhada (contagens de fótons medidas pelo detector) no eixo-y pela respectiva energia do fóton detectado no eixo-x. A energia dos fótons (E) no eixo-x é tradicionalmente expressa na forma de Raman shift (cm^{-1}). Considerando que o valor do comprimento de onda (λ), associado à frequência (ν) é inversamente proporcional a esta, isto é, $\nu = c/\lambda$ e,

consequentemente, à energia ($E = h\nu = hc/\lambda$), adota-se o cm^{-1} como unidade de energia, independentemente da velocidade da luz (c) ou da constante de Planck (h).

O espalhamento Rayleigh (0 cm^{-1} de Raman *shift*) é muito mais intenso que o espalhamento Raman, como já explicado anteriormente. Sua intensidade continua sendo superior, mesmo após a passagem do feixe espalhado pelo “*notch filter*” que reduz a transmissão de fótons em determinado intervalo de energia na ordem de 10^6 vezes (BARMAN, 2011). Como consequência deste aspecto, raramente a análise do espalhamento Raman pode ser realizada no intervalo $0\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$ de Raman *shift*.

1.2.3 Processamento dos dados

Dependendo da aplicação, pode ser necessária a realização de suavização do sinal e supressão de ruído, sendo a análise por *wavelets* umas das principais ferramentas utilizadas. Esta análise consiste na decomposição de um sinal em versões “deslocadas” e “escaloadas” da *wavelet* original (ou “*wavelet* mãe”). O resultado de qualquer decomposição *wavelet* é um conjunto de coeficientes que apresenta boa correlação entre o sinal e as funções-base da transformação. Essa propriedade permite a reconstituição de sinais desprezando parte dos coeficientes de menor correlação, já que a forma geral do sinal seria preservada. De fato, esse é o princípio básico de duas das aplicações mais significativas da análise por *wavelets*: a compressão de sinais, muito utilizada com imagens, e a supressão de ruído (*denoising*). A ideia básica por trás da supressão de ruído é escolher os coeficientes a serem mantidos para preservar a informação do sinal, removendo consequentemente os coeficientes associados à contribuição do ruído (EHRENTREICH e SUMMCHEN, 2001). Entretanto, é necessário avaliar se haverá real melhoria na capacidade preditiva do método espectroscópico, pois artefatos podem ser incluídos no sinal detectado.

Outro aspecto que vem sendo extensivamente perseguido em espectroscopia Raman é a correção da linha de base do espectro de espalhamento obtido. O mais promissor algoritmo de subtração utiliza a regressão polinomial, que aproxima o perfil de fluorescência na linha de base através do método de mínimos quadrados, não levando em conta os picos de espalhamento Raman. Não existe consenso na melhor ordem de regressão polinomial a ser utilizada, sendo escolhidos frequentemente polinômios de terceira ou quarta ordem, mas a decisão muitas vezes é baseada na observação do espectro coletado. Em geral, quanto maior a relação fluorescência/sinal (F/S), maior será ordem do polinômio (CAO, PANDYA, *et al.*, 2007).

Novamente, é necessário avaliar se a aplicação destas técnicas realmente gera alguma melhoria na aplicação posterior das técnicas estatísticas de classificação das amostras (BARMAN, 2011).

Após este processamento inicial dos espectros de espalhamento, a utilização de ferramentas estatísticas e matemáticas permite a extração de informação bioquímica relevante das medidas realizadas. Pode-se citar, por exemplo, a ferramenta KNN (do inglês *K-Nearest Neighbor*), a PCA (do inglês *Principal Component Analysis*), a PCR (do inglês *Principal Component Regression*), o PLS (do inglês *Partial Least Squares*), dentre outros. Existem duas principais finalidades desta aplicação na análise dos dados de espectroscopia Raman com aplicações biomédicas: a regressão e a classificação. A regressão é utilizada quando se deseja inferir o valor de um parâmetro molecular relacionado com o espectro de espalhamento obtido, como por exemplo, quando se deseja inferir a concentração de algum composto químico na amostra analisada. A classificação, por outro lado, é utilizada quando se deseja separar as amostras em categorias de interesse clínico, como no caso de classes histopatológicas na avaliação de neoplasias.

A PCA é uma ferramenta estatística utilizada para reduzir a dimensão de uma matriz $n \times p$, onde n representa o total de amostras e p representa todas as variáveis medidas em cada amostra. No caso do espectro de espalhamento Raman em questão, n representa o total de amostras de tecido prostático avaliado e p representa cada medida de intensidade de espalhamento fornecida pelos canais do detector. A direção do primeiro componente principal (PC1) é a mesma daquela que representa a maior variância do conjunto de dados. Desta forma, o vetor que representa o primeiro componente define a linha que mais se aproxima da distribuição do conjunto de dados, ou seja, que minimiza a soma do quadrado das distâncias dos pontos (cada medida) até esta linha (PC1). O segundo componente principal é perpendicular ao primeiro componente, ou seja, é uma combinação linear das variáveis não correlacionadas com o PC1 e que explica a maior variância dos dados que não foi explicada pelo PC1 (GARETH, WITTEN, *et al.*, 2013). A regressão por componentes principais (PCR) envolve a obtenção dos m principais componentes, (PC1, PC2, ..., PC m) e a sua utilização como variáveis no modelo de regressão linear. A obtenção do melhor modelo de regressão linear é realizada através do uso da técnica de mínimos quadrados, como explicado anteriormente. A ideia chave é a obtenção do menor número de componentes principais suficientes para explicar a maior variabilidade possível dos dados e a sua relação com a resposta, ou seja, com a classificação final das amostras.

Ao realizar o PCR, é recomendado a normalização das variáveis antes da obtenção dos componentes principais, garantindo assim que as variáveis possuam todas a mesma escala. Na

ausência de normalização, as variáveis que apresentam maior variância, o que pode ser um efeito de escala, exercerão maior influência na obtenção dos componentes principais. Entretanto, se todas as variáveis apresentarem a mesma unidade de medida, a normalização pode não ser necessária (GARETH, WITTEN, *et al.*, 2013).

1.2.4 Espectroscopia Raman e o tecido prostático

Por décadas, a espectroscopia Raman foi utilizada na física e na ciência dos materiais, e seu uso biomédico ainda é restrito devido à baixa intensidade do espalhamento Raman. Com a melhoria dos lasers, sistema de fibra ótica, rede de difração e detectores tornou-se possível detectar com mais acurácia o número de fótons espalhados em cada comprimento de onda. (KAST, TUCKER, *et al.*, 2014). O espectro de espalhamento Raman obtido em amostras biológicas é a soma do espalhamento gerado por cada modo de vibração molecular dos constituintes da amostra, podendo haver sobreposição e interferência.

Diversos estudos vêm sendo realizados usando espectroscopia Raman para identificar, detectar e classificar diversos tipos de câncer, dentre eles:

- ✓ câncer de mama (KAST, SERHATKULU , *et al.*, 2008), (HAKA, VOLYNSKAYA e GARDECKI, 2006), (BARMAN, DINGARI, *et al.*, 2013), (BROZEK-PLUSKA , MUSIAL, *et al.*, 2012).
- ✓ cancer cerebral (BELJEBBAR , DUKIC, *et al.*, 2010), (KIRSCH , SCHACKERT , *et al.*, 2010).
- ✓ tumores pediátricos (AUNER , KAST , *et al.*, 2013), (KAST , RABAH , *et al.*, 2010).
- ✓ câncer de esôfago (BERGHOLT , ZHENG , *et al.*, 2011), (BERGHOLT, ZHENG, *et al.*, 2013).
- ✓ câncer de cólon (A MOLCKOVKSY, 2003), pele (GNIADOCKA , PHILIPSEN , *et al.*, 2004), (P. J. CASPERS, 2003), (H.G.M. EDWARDS, 1995).
- ✓ câncer de próstata (STONE N., 2007), (DEVPURA, THAKUR, *et al.*, 2010), dentre outros.

Estudos foram realizados comparando em amostras biológicas a intensidade da fluorescência e capacidade discriminatória da espectroscopia Raman utilizando diferentes metodologias, como sistemas dispersivos ou interferômetros, e diferentes frequências excitatórias. Chad et al. (2013) demonstraram que o uso de sistemas dispersivos e frequência excitatória 1064 nm em amostras de fígado e rins permite a obtenção de espectros de espalhamento com redução significativa de fluorescência quando comparados com sistemas dispersivos e frequência excitatória de 785nm. Bandeira et al. (2007) obteve boa capacidade

discriminatória entre nevos e melanoma em amostras de pele. Synytsya et al. (2014) obtiveram boa discriminação diagnóstica em amostras de cólon ao comparar o espalhamento Raman detectado utilizando um sistema FT-Raman com frequência excitatória 1064 nm e sistemas dispersivos com frequência excitatória de 785 nm e 532 nm.

Existe a necessidade clínica da realização do diagnóstico de câncer prostático por um método não destrutivo, rápido, objetivo. A espectroscopia Raman preenche estes critérios e permite a determinação de uma assinatura molecular que pode escalonada desde níveis micrométricos em regiões de interesse até a análise macroscópica de regiões do tecido analisado, podendo ser utilizada para auxiliar o diagnóstico histopatológico *in vivo* e *in vitro* (KAST, TUCKER, *et al.*, 2014).

Patel e Martin (2010) utilizaram a espectroscopia Raman para caracterizar as zonas de transição, central e periférica de próstatas normais; e encontraram maior concentração de DNA/RNA na zona periférica, e diferenças na concentração relativa de lípidos e proteínas entre as três zonas (PATEL e MARTIN, 2010). Paul Crow, Nicholas Stone et al realizaram uma série de estudos utilizando tecido prostático e espectroscopia Raman. A primeira publicação dos espectros de próstata normal ocorreu em 2002 (STONE e CROW, 2002). Em 2003, foram capazes de diferenciar o câncer de próstata subdividido em 3 categorias (Gleason < 7, Gleason = 7 e Gleason > 7) de hiperplasia prostática benigna com 89% de acurácia a partir de análise *in vitro* de biópsias congeladas (CROW, STONE, *et al.*, 2003). Em 2005, demonstraram a possibilidade do uso da fibra ótica para realizar a diferenciação de tecidos urogenitais *in vitro*, abrindo a perspectiva de uso da técnica *in vivo* durante procedimentos endoscópicos e biópsias (CROW, MOLCKOVSKY, *et al.*, 2005). Em 2007, utilizaram métodos de regressão estatística para correlacionar os espectros de espalhamento obtidos das amostras histológicas com a combinação dos espectros de diversos compostos bioquímicos puros. Concluíram que há um aumento na concentração relativa de DNA, colina e colesterol de acordo com a crescente malignidade. Este resultado pode estar relacionado com aumento da taxa de mitose e da relação núcleo/citoplasma nos processos malignos (STONE, HARTPIETRO, *et al.*, 2007). O aumento na quantidade de colesterol pode estar relacionado com efeito de fatores de crescimento na homeostase do colesterol nas células malignas prostáticas (KRYCER e BROWN, 2013). A colina também é outro biomarcador que se acumula em tecido prostático maligno (ZAKIAN, SHUKLA-DAVE, *et al.*, 2008). A colina marcada com ^{18}F se concentra em tumores prostáticos (JADVAR, GURBUZ, *et al.*, 2008). A base biológica para a captação de colina nos tumores é a alta regulação induzida da enzima colina-quinase, o que leva à incorporação e aprisionamento de fosfatidilcolina (lecitina) na membrana da célula tumoral. A captação de colina nos tumores

de próstata não parece estar correlacionada com a proliferação celular, mas pode ser afetada pela hipóxia (BREEUWSMA, PRUIM, *et al.*, 2005).

Devpura et al. classificaram epitélio benigno, neoplasia intraepitelial e adenocarcinoma subdividido nos escores de Gleason 6, 7 e 8 a partir de amostras de próstata desparafinizadas. O adenocarcinoma foi identificado com 94% de sensibilidade e 82% de especificidade e os escores de Gleason foram distinguidos com 81% de acurácia quando comparados a análise do patologista, considerado atualmente o padrão ouro (DEVPURA, THAKUR, *et al.*, 2010). Entretanto, estudos adicionais precisam ser realizados com um número maior de amostras proveniente de um número maior de pacientes. O Quadro 1 evidencia os principais picos de espalhamento avaliados em uma revisão da literatura realizada por Kast et al. (2014).

Quadro 1: Picos de espalhamento Raman obtidos de tecidos prostáticos em diferentes estudos revisados na literatura

Sumário dos picos Raman observados na literatura de próstata						
Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	Vibração	Biomolécula	Células		Tecidos	
			Taleb (2006)	Crow (2005)	Patel (2010)	Devpura (2010)
719-729	C - S Stretch/ CH ₂ Rocking	DNA/RNA/Fosfolípides/Proteínas	X	X	X	X
781-786	O - P - O Symmetric stretch	DNA/RNA (C,T,U)	X	X	X	X
1000-1003	Symmetric ring breathing	Proteínas (fenilalanina)	X	X	X	
1090-1100	O - P - O	Lípides/Fosfolípides/DNA	X	X		
1125-1132	(C - N) backbone C - C stretch	Proteínas/Lípides/Fosfolípides	X	X	X	
1269	C - N stretch CH ₂ wagging	Amida III			X	
1317-1318		Lípides/Fosfolípides/DNA/RNA	X	X		
1338		DNA/RNA	X			
1447-1450	CH ₂ deformation	DNA/RNA/Proteínas/Lípides	X	X		
1576-1577		DNA/RNA	X	X		
1584-1585	C = C stretch	Lípides			X	
1657-1667	C = O stretch	Proteínas (amida I)/DNA/RNA	X	X	X	

Nota: Adaptada de (KAST, TUCKER, et al., 2014).

Usualmente, o tecido estudado é removido do organismo através de biópsia ou exérese cirúrgica. Em seguida, é fixado visando a interrupção do metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, preservando e conservando os elementos teciduais, além de permitir a penetração de outras substâncias subsequentes. A escolha de um fixador depende da natureza do processo patológico presente no tecido, da estrutura celular e/ou tecidual, ou, então, da natureza bioquímica do elemento que se deseja preservar (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). O fixador aldeído comumente utilizado é o formaldeído, que forma ligações cruzadas com as proteínas tissulares, tornando-as insolúveis em água. O formaldeído comercial é uma solução na concentração de 37% ou 40%. Ao se preparar uma solução a base de formaldeído comercial a 10%, de fato, a solução estará a 3,7% ou 4%; apesar disso, convencionou-se chamar essa solução de formalina, ou formaldeído a 10% (CAPUTO, BITIRANA e MANSO, 2009). O formaldeído reage com o NH₂ terminal dos resíduos dos radicais dos aminoácidos das proteínas, predominantemente da lisina, formando pontes de metileno entre proteínas adjacentes. Isso gera uma redução volumétrica e perda da conformação quaternária, terciária e possivelmente secundária das proteínas. Além disso, provoca redução na solubilidade do DNA, possivelmente pela clivagem do esqueleto de fosfato-desoxirribose do DNA/RNA através de uma reação lenta de hidrólise. Também existe evidências de que o formaldeído lava os lípides de amostras biológicas (FAOLAIN, HUNTER, *et al.*, 2005). Esta técnica de fixação altera o padrão de ligações moleculares da amostra, modificando o espalhamento Raman obtido delas quando comparado com o tecido preservado através de outras técnicas que preservam a bioquímica do tecido. O espectro Raman obtido de amostras fixadas com formaldeído, quando comparadas com amostras frescas, apresenta redução na intensidade das bandas de amida e desloca a frequência vibracional dos resíduos amino das proteínas. Estes efeitos, principalmente as alterações decorrentes da formação de pontes de metileno entre as proteínas, podem ser reduzidos através da lavagem da amostra com água (MEADE, CLARKE, *et al.*, 2010).

O espectro Raman de amostras congeladas comparado com o de amostras frescas apresenta redução na intensidade dos picos em 1002 cm⁻¹ (C-C anel aromático *stretching*), 1447 cm⁻¹ (CH₂ *bending* em proteínas e lípidos) e 1637 cm⁻¹ (Amida I). Além disso, um novo pico foi observado em 1493cm⁻¹. Estas alterações são provocadas possivelmente pela redução da temperatura que provoca a despolimerização do citoesqueleto celular (FAOLAIN, HUNTER, *et al.*, 2005). As amostras analisadas por Crow *et al.* (2005) foram fixadas utilizando nitrogênio líquido e descongeladas para detecção do espalhamento Raman.

As amostras prostáticas analisadas por Devpura et al (2010) passaram pelo processamento histopatológico padrão e foram desparafinizadas por 5 minutos com xilol e etanol para posteriormente serem analisadas pela espectroscopia Raman utilizando uma fonte excitatória de 785 nm. O processamento tecidual padrão torna os fragmentos rígidos, capazes de proporcionar o seccionamento de fatias finas e delicadas para a observação ao microscópio ótico. O processamento para inclusão de material em parafina passa por três etapas: desidratação, clarificação e impregnação. A desidratação consiste na remoção da água dos tecidos, sendo utilizado o álcool etílico, por produzir bons resultados e apresentar baixo custo. A clarificação visa remover completamente o álcool do interior dos tecidos, preparando-os para as etapas subsequentes, utilizando-se comumente o xilol. Conforme o xilol penetra o tecido, em substituição ao álcool, o material se torna mais claro, transparente. No fim do processamento, ocorre a infiltração dos elementos teciduais em parafina. Para permitir a análise dos tecidos ao microscópio de luz, a amostra é seccionada em fatias bem finas e uniformes, com espessura comumente de 4 a 6 micrômetros. A utilização de corantes possibilita a visualização do tecido ao microscópio de luz. Após a microtomia, as células e o material extracelular são transparentes e os corantes, dentre eles a hematoxilina e eosina, melhoram a visualização das estruturas teciduais (CAPUTO, BITIRANA e MANSO, 2009). Este processo de parafinização da amostra contamina o espectro obtido com parafina, mas seu resíduo pode ser significativamente reduzido após repetidos ciclos de desparafinização, o que pode ser avaliado pela intensidade dos picos em 1063 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} , 1296 cm^{-1} e 1436 cm^{-1} (FAOLÁIN, HUNTER, *et al.*, 2005).

Em suma, todos fixadores afetam os modos vibracionais de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos. Entretanto, existem diferenças na intensidade das mudanças e nas espécies moleculares mais afetadas. Levando em consideração a diferença no espectro detectado, pode-se concluir que a fixação com formaldeído produz um espectro globalmente mais similar ao obtido de tecidos frescos, preservando a integridade celular simultaneamente (MEADE, CLARKE, *et al.*, 2010).

2 OBJETIVO

Avaliar a capacidade de discriminação diagnóstica da espectroscopia Raman utilizando um laser de comprimento de onda 1064 nm em amostras de parênquima prostático tendo como referência a avaliação histopatológica como padrão ouro.

3 MÉTODOS

3.1 Aprovação do comitê de ética e pesquisa

Esta pesquisa foi realizada segundo princípios éticos e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, de acordo com a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo COEP - UFMG no dia 20 de fevereiro de 2013 coordenado pelo Prof. Marcelo Henrique Mamede Lewer e intitulado ‘Papel do PET/CT com ^{18}F -FDG e ^{18}F -colina nos pacientes com câncer de próstata’. Os pacientes foram informados sobre a pesquisa e assinaram termo de permissão para o uso das amostras. CAAE – 09288112.0.0000.5149 (ANEXO I).

3.2 Obtenção de amostras e obtenção dos espectros de espalhamento Raman

Todas amostras de parênquima prostático foram provenientes de pacientes do Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Pacientes com suspeita de envolvimento neoplásico da glândula prostática (após biópsia negativa) ou com diagnóstico histopatológico de câncer prostático que foram encaminhados ao tratamento cirúrgico ou com sinais de recidiva bioquímica do câncer (elevação do PSA) foram avaliados clínica, laboratorial e imaginologicamente; utilizando as técnicas convencionalmente disponíveis no SUS. Os pacientes selecionados e que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Este trabalho utilizou apenas amostras da glândula prostática de pacientes de um braço do estudo, ou seja, apenas amostras provenientes de pacientes submetidos a prostatectomia radical. Após inclusão no protocolo de pesquisa, os pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de próstata, foram encaminhados ao serviço de radiologia e medicina nuclear para realizarem o estadiamento inicial com estudos de imagem convencional. Posteriormente, foram encaminhados ao Centro de Tecnologia em Medicina Molecular da FM-UFMG para a realização dos estudos de ^{18}F -FDG e ^{18}F -colina PET/CT, entretanto as informações provenientes destas imagens não foram utilizadas neste trabalho. Finalizada a fase de estadiamento, os pacientes eram reencaminhados ao setor de Urologia do HC-UFMG para ressecção cirúrgica da lesão. A glândula prostática retirada foi analisada de acordo com o procedimento padrão da instituição. Fragmentos prostáticos foram coletados da glândula prostática remanescente por um patologista visando a análise utilizando a espectroscopia Raman. Estes fragmentos foram conservados em formaldeído até o momento

da medida. A coleta do material foi realizada quando a peça cirúrgica já estava fora do paciente, portanto, não houve intervenção direta no paciente. A peça cirúrgica principal foi, então, enviada para exame anatomopatológico de rotina. Não houve prejuízo ao diagnóstico, pois a casuística foi constituída de fragmentos da próstata remanescente.

Neste estudo, foram utilizados fragmentos da glândula prostática provenientes de 8 pacientes atendidos no serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte. Considerando que a próstata retirada de um paciente apresenta múltiplos diagnósticos, como por exemplo, parênquima prostático normal, hiperplasia prostática benigna, neoplasia intra-epitelial, e diversas gradações de malignidade dependendo da região analisada, cerca de 30 fragmentos foram coletados de cada próstata remanescente utilizando um *punch* de 1 mm de diâmetro. Fragmentos foram coletados à direita e à esquerda do ápice, base e terço médio da próstata. Esse grande número de fragmentos por paciente foi necessário, pois a maior parte das amostras iniciais era excluída pelo critério de haver mais de um tipo diagnóstico histopatológico por fragmento, o que só era definido posteriormente às medidas de espalhamento Raman. Além disso, considerando as observações realizadas pelos estudos prévios utilizando Raman para determinação diagnóstica em parênquima prostático, o espectro espalhado de regiões de parênquima normal deveria apresentar maior quantidade de glândulas que de estroma para ser utilizado no processamento dos dados. Cada fragmento foi conservado em *eppendorf*, como mostrado na Figura 4, independente contendo solução de formaldeído e imediatamente antes das medidas a solução de formaldeído era substituída por solução fisiológica 0,9%. Após as medidas, os fragmentos eram novamente armazenados em solução de formaldeído para processamento histopatológico posterior.

As medidas de espectroscopia Raman das amostras foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Raman de responsabilidade do Professor Marcos Assunção Pimenta do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da UFMG. Inicialmente esperava-se realizar as medidas utilizando o sistema dispersivo 785nm existente no laboratório, mas como a fonte excitatória não apresentava estabilidade neste comprimento de onda, optou-se pela utilização do sistema FT-Raman 1064 nm também existente no laboratório. Até o final deste trabalho, a estabilidade do laser 785 nm ainda não havia sido obtida, impedindo a realização de medidas que pudessem comparar as duas faixas excitatórias. Como não haviam estudos em parênquima prostático utilizando esta frequência excitatória, foi necessário inicialmente realizar um estudo piloto para padronização metodológica, utilizando como referência básica a metodologia adotada por Chad et al. (2013) e Synytsya et al. (2014) que obtiveram boa discriminação diagnóstica em amostras biológicas.

Nos estudos com parênquima prostático utilizando a fonte excitatória 785 nm, dois métodos de preparação das amostras principais podem ser observados. Crow et al. (2005) foram capazes de diferenciar o câncer de próstata subdividido em 3 categorias (Gleason < 7, Gleason = 7 e Gleason > 7) de hiperplasia prostática benigna a partir de análise in vitro de biópsias congeladas. Devpura et al. (2010) classificaram epitélio benigno, neoplasia intraepitelial e adenocarcinoma subdividido nos escores de Gleason 6, 7 e 8 a partir de amostras de próstata desparafinizadas. Utilizando a fonte excitatória 1064nm, Chad et al. (2013) e Synytsya et al. (2014) realizaram medidas em fragmentos de tecido fresco. Bandeira et al. (2007) utilizou o sistema FT-Raman 1064 nm em fragmentos congelados de biópsias de pele, obtendo boa capacidade discriminatória entre nevos pigmentados e melanomas.

Inicialmente, tentou-se manter a metodologia utilizada por Devpura et al. (2010) realizando medidas em cortes histopatológicos de fragmentos de próstata desparafinizados, objetivando realizar o posicionamento do fragmento por microscopia óptica. Devido à possível contaminação do espectro da amostra por resíduos de parafina, como demonstrado por Faolain et al. (2005), realizou-se testes com amostras após um, dois e três ciclos de desparafinização. Entretanto, a espessura de 4 micrômetros não produziu sinal detectável mesmo com potências elevadas do laser. Desta forma, tentou-se aumentar a espessura do fragmento para dez e vinte micrômetros, o que não foi suficiente para gerar espalhamento Raman detectável pelo sistema FT-Raman 1064nm existente no laboratório. Como a realização de cortes histopatológicos mais espessos de fragmentos parafinizados pelo micrótomo é tecnicamente difícil, optou-se então, pelo uso de fragmentos fixados em formaldeído com espessura de cerca de 1 milímetro, pois estes geravam espalhamento Raman detectável pelo sistema disponível.

Como as amostras provenientes do bloco cirúrgico estavam fixadas em formaldeído, avaliou-se inicialmente a presença de picos provenientes do formaldeído nos fragmentos de amostra. Concluiu-se que o processo de imersão da amostra em solução fisiológica 0,9% por alguns minutos era suficiente para remover este possível contaminante. De acordo com os estudos de Meade et al. (2010), o espectro Raman obtido de fragmentos fixados com formaldeído, quando comparados com fragmentos frescos, apresenta redução na intensidade das bandas de amida e desloca a frequência vibracional dos resíduos amino das proteínas, decorrentes da formação de pontes de metileno entre as proteínas, efeitos que podem ser reduzidos através da lavagem da amostra com água. Após a obtenção de espectros de espalhamento Raman compatíveis com os observados na literatura, foi necessário padronizar o tamanho da amostra para garantir que o fragmento analisado apresentasse apenas um diagnóstico histopatológico, pois não era mais possível posicionar o fragmento utilizando a

microscopia óptica. Padronizou-se o tamanho de 1 milímetro, após tentativas com 2 mm e 5 mm, pois a chance de haver apenas um diagnóstico por fragmento era maior. Mesmo assim, mais de metade dos fragmentos não foi utilizada na análise final por este motivo.

Para a realização das medidas de espalhamento, os fragmentos eram posicionados na região central entre duas lamínulas que apresentavam proteção nas bordas de espuma de E.V.A. (etil-vinil-acetato) contra o esmagamento da amostra, o que prejudicaria o diagnóstico histopatológico posterior. A espuma de E.V.A. não era atingida pelo laser incidente. O conjunto lamínulas-fragmento era posicionado no aparelho, como mostrado na Figura 5, utilizando um laser visível vermelho com cerca de 1 mm de diâmetro como referência. Este posicionamento garantia que o laser excitatório 1064 nm com cerca de 6 micrômetros de diâmetro atingisse a amostra, mesmo que o local incidido fosse desconhecido. Este é o motivo pelo qual considerou-se apenas fragmentos que contivessem apenas um tipo de diagnóstico histopatológico, pois independentemente da região incidida, poder-se-ia inferir que os compostos biológicos pertencentes àquele diagnóstico haviam sido analisados. Foram realizadas duas medidas em cada fragmento, número abaixo das 5 medidas desejadas para melhorar a relação sinal ruído. Entretanto, um número maior de medidas aquecia e danificava bioquimicamente o fragmento, o que podia ser observado pela liberação de vapor de água e formação de um ponto enegrecido na região onde incidia o laser. A utilização do laser 1064 nm reduz a intensidade do espalhamento Raman o que precisou ser balanceado pelo uso de uma potência de 300 mW relativamente maior à potência utilizada nos experimentos com laser na faixa de 785 nm. A medida de dois espectros permitiu melhorar a elaboração da análise estatística sem destruir as amostras pela liberação de calor. Toda a coleta de dados de espalhamento foi realizada de maneira cega, sem que houvesse conhecimento do diagnóstico contido na amostra.



Figura 4: Foto do eppendorf com identificação do fragmento e duas lamínulas contendo fragmento pronto para medida.

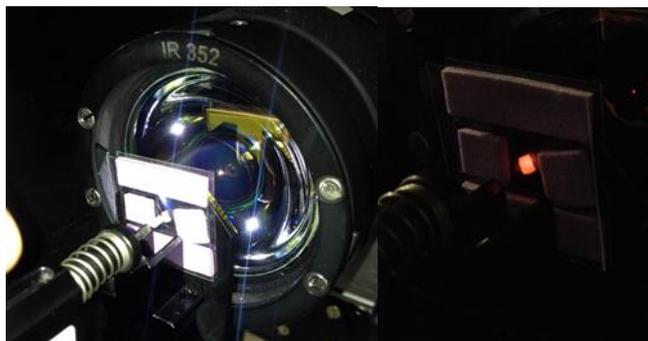


Figura 5: Foto do posicionamento do fragmento no FT-Raman e laser de posicionamento incidindo no fragmento.

Utilizaram-se 64 varreduras para todos os fragmentos com potência de 300 mW, resolução espectral de $0,4 \text{ cm}^{-1}$ e aproximadamente 6 micrômetros de diâmetro no foco do feixe do laser. A potência utilizada para a realização do estudo foi investigada e está de acordo com a literatura publicada utilizando o comprimento de onda 1064 nm em amostras biológicas, pois, com cerca de 200 mW de potência do laser, consegue-se boa razão sinal/ruído nos espectros o que facilita a interpretação dos dados. Não há estudos publicados utilizando o comprimento de onda 1064 nm em amostras de próstata, sendo todos os estudos anteriormente citados realizados com o comprimento de onda 785 nm. Essa energia permite a utilização de potências menores, de cerca de 3 mW, devido a maior intensidade do espalhamento Raman.

O espectrômetro FT-Raman VERTEX 70 da Bruker®, mostrado na Figura 6, foi utilizado com o *laser* Nd:YAG de 1064nm como fonte de excitação. O laser HeNe utilizado para posicionamento, emite fótons com comprimento de onda 632,8 nm e potência 5 mW. O sinal Raman foi coletado por um detector de germânio resfriado por nitrogênio líquido. O sistema utiliza um interferômetro ROCKSOLID. Padrões de aquisição: Geometria de Espalhamento (180°); amostra colocada entre duas lamínulas de vidro; número de pontos na amostra: (1 ponto); 2 medidas por fragmento; potência de saída do laser de excitação: (300 mW); 64scans/amostra; tempo aproximado de coleta por amostra (60 segundos).



Figura 6: Módulo RAMII FT-Raman acoplado ao espectrômetro VERTEX 70 FT-IR (Bruker ® Corporation)¹.

Após a realização das medidas dos espectros de espalhamento Raman, os fragmentos retornavam para o formol e seguiam para processamento histopatológico tradicional da glândula prostática. Este processo foi realizado pela técnica em patologia do laboratório de patologia da Faculdade de Medicina – UFMG. Após desidratação, clarificação e impregnação com parafina, os fragmentos eram cortados por micrótomo em fatias de 4 micrômetros, obtendo-se amostras de toda a extensão do fragmento, como mostrado na Figura 7. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. A coleta de cortes de toda a extensão dos fragmentos foi etapa fundamental, pois o principal critério de exclusão era a existência de mais de um tipo de diagnóstico histopatológico por fragmento. Desta forma, estaria garantido que o espectro coletado era proveniente do espalhamento dos compostos biológicos presentes naquele fragmento com diagnóstico histopatológico único. As lâminas foram analisadas pelo patologista da Faculdade de Medicina da UFMG Prof. Ms. Eduardo Paulino Junior e por outro patologista externo à faculdade de medicina, como pode ser observado no Quadro 2.



Figura 7: Foto do fragmento em lâmina após processamento histopatológico contendo cortes amostrais de toda sua extensão para avaliar diagnóstico e critérios de exclusão.

1 - Disponível em: <<https://www.bruker.com/pt/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/raman/ram-ii/overview.html>> Acesso em abril 2016.

Quadro 2: Diagnósticos histopatológicos fornecidos por 2 diferentes patologistas e diagnóstico consensual para cada fragmento considerado apto à análise estatística.

Nº Amostra	Paciente/região/amostra	Diagnostico patologista 1	Diagnostico patologista 2	Diagnostico final
09	1AE5	Gleason 3 + 3	Gleason 3 + 3	Gleason 3 + 3
55	1AE7	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
56	1TE3	NIP baixo grau	NIP	Glândula Normal
74	2AE1	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
57	2BE1	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
04	2BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
34	2TD2	Gleason 3 + 4	Gleason 4 + 3	Gleason 3 + 4
32	2TD3	Gleason 3 + 3	Gleason 4 + 3	Gleason 3 + 4
12	3TD3	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 4
23	3TD5	Gleason 3 + 3	Gleason 4 + 3	Gleason 3 + 4
43	3TE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
37	4AD1	Gleason 3 + 3	Gleason 4 + 3	Gleason 3 + 4
14	4AD6	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4
27	4AE4	Gleason 3 + 3	Gleason 4 + 3	Gleason 3 + 4
02	4BE3	Gleason 3 + 3	Estroma	Gleason 3 + 3
07	4TD1	Gleason 3 + 3	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 3
03	4TD2	Glândula Normal	Microócinos	Glândula Normal
35	4TD6	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 4
24	4TD8	Gleason 5 + 4	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 3
31	4TD9	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 4
05	4TD10	Gleason 3 + 3	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 3
21	4TE1	Gleason 3 + 4	Gleason 4 + 4	Gleason 3 + 4
10	4TE7	Gleason 3 + 3	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 3
18	4TE10	Gleason 3 + 3	Gleason 4 + 4	Gleason 3 + 4
19	5AD1	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4
13	5AD3	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4
08	5AD5	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4	Gleason 3 + 4
73	5BD7	Glândula Normal	Microócinos	Glândula Normal
42	5BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
47	6BD1	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
60	6BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
65	6BE4	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
48	6TE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
63	6TE3	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
30	7AD1	Gleason 3 + 4	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 3
64	7BE2	Glândula Normal	Glândula Normal	Glândula Normal
62	7TD1	Glândula 3 + 3	Gleason 3 + 3	Gleason 3 + 3
11	7TD5	Gleason 4 + 3	Gleason 4 + 4	Gleason 4 + 3

Quando houve discordância quanto ao diagnóstico do fragmento, foi realizado um consenso entre os dois patologistas sendo definido desta forma o diagnóstico final. Vale ressaltar que o índice de concordância geral entre os patologistas foi de 0,51 IC95% (0,37-0,65) $p < 0,001$, considerado um grau de concordância moderado. Observou-se para o diagnóstico de glândulas normais um Kappa 0,83 IC 95% (1,00 – 0,51) $p < 0,001$, considerado excelente. Para o diagnóstico Gleason 6 (3+3), observou-se Kappa 0,24 IC95% (0,03 – 0,45) $p = 0,023$, considerado uma concordância considerável. Para o diagnóstico Gleason 7 (3 + 4), kappa 0,47 IC95% (0,16 – 0,79) $p = 0,003$, considerado concordância moderada. Já para o diagnóstico Gleason 7 (4 + 3), kappa – 0,046 IC95% (-0,27 – 0,18), considerado pobre, ou seja, concordância pode ter ocorrido ao acaso. Para o diagnóstico Gleason 8 (4 + 4), observou-se kappa 0,55 IC95% (0,27 – 0,83) $p < 0,001$, considerado um grau de concordância moderado. Desta forma, observa-se que a principal disparidade entre os patologistas envolvidos neste estudo foi na determinação do padrão histopatológico Gleason 3 ou 4, o que pode ter sido provocado pelas alterações relativamente recentes na classificação histopatológica pela ISUP em novembro de 2014. Outra possível explicação para esta disparidade é o tamanho reduzido do fragmento analisado pelo patologista, o que não permite o diagnóstico panorâmico da glândula prostática e avaliação das regiões vizinhas ao fragmento que permaneceram no remanescente da glândula.

A taxa de aproveitamento de amostras para o processamento estatístico final foi de cerca de 25% devido aos critérios de exclusão e perdas durante o processamento. Desta forma, 3 em cada 4 espectros de amostras foram eliminados da análise estatística devido às perdas no processamento histopatológico, à presença de mais de um diagnóstico histopatológico por fragmento ou pela presença de pequena quantidade de parênquima no mesmo. Foram incluídos apenas fragmentos que possuíam grande quantidade de glândulas espalhadas pelos cortes histopatológicos, preenchendo acima de 80% da amostra e homoganeamente distribuídos em toda sua extensão, aumentando assim as chances de que o espectro medido apresentava maior componente de espalhamento do parênquima prostático. Este critério de exclusão está exemplificado através da Figura 8 que compara duas amostras analisadas, sendo a primeira considerada adequada para o processamento estatístico, enquanto a segunda foi descartada do mesmo.

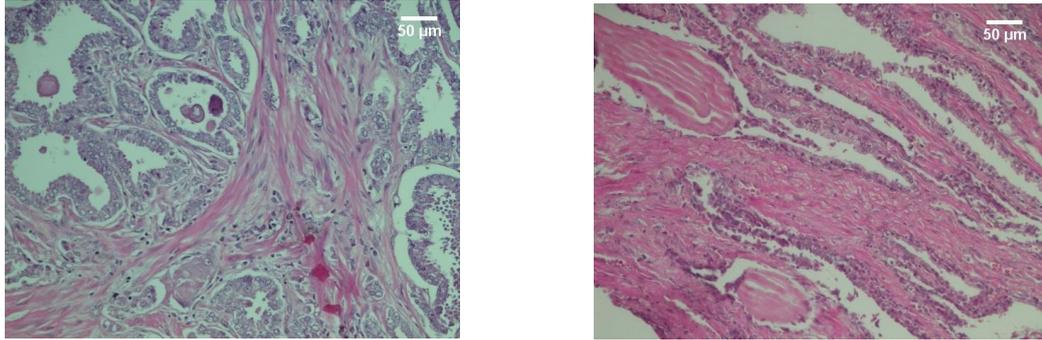


Figura 8: Microscopia ótica com aumento 40x do fragmento 4AD1 (imagem da esquerda) comparada com fragmento 3TME2 (imagem da direita).

Nota: Fragmento 4AD1 classificado como câncer de próstata Gleason 3 foi utilizado no processamento estatístico pela grande proporção de glândulas. Entretanto, o fragmento 3TME2 foi descartado da análise estatística final pela presença de maior proporção de estroma que glândulas.

3.3 Análise dos dados

Toda a análise estatística e gráfica foi realizada por meio do programa estatístico R (versão 3,1,3) (R Core Team, 2015). Para o processamento e criação dos gráficos, foi necessário o uso dos pacotes ‘ggplot2’, ‘reshape’, ‘ggbiplot’. Vide programação em anexo (Anexo II).

Inicialmente, realizou-se pela média dos dois espectros coletados para cada fragmento. Nenhuma correção da linha de base foi realizada. Nenhuma técnica estatística para remoção de ruído foi utilizada na análise dos dados. Os espectros foram normalizados utilizando, como referência, o pico referente à amida I na região de 1658 cm^{-1} para eliminar as influências de possíveis oscilações na intensidade do laser incidente na análise. Posteriormente foram avaliadas as possíveis influências nos espectros detectados das lamínulas, da solução de hidratação e solução de fixação às quais os fragmentos foram submetidos. Em seguida, os espectros foram avaliados por grupos diagnósticos para determinar a capacidade discriminatória do método, utilizando uma abordagem univariada e multivariada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, é importante apresentar o espectro de alguns materiais presentes na detecção do espalhamento dos fragmentos da glândula prostática que poderiam influenciar no espectro detectado. Os fragmentos foram acondicionados entre duas lamínulas de vidro e o feixe de fótons incidente atravessa tanto a amostra quanto as duas lâminas de vidro. Observa-se na região $0 - 200 \text{ cm}^{-1}$ a região de espalhamento elástico Rayleigh, região usualmente não utilizada para processamento de dados, pois não contém informação sobre os componentes moleculares da amostra. O pico na região 2940 cm^{-1} corresponde à sobreposição do espalhamento Raman produzido pelo estiramento assimétrico do grupo $(-\text{CH}_3)$ e estiramento simétrico do grupo $(-\text{CH}_2)$ presentes em grande quantidade em tecidos biológicos. Já o pico mais largo na região 3200 cm^{-1} corresponde à sobreposição do espalhamento Raman produzido pelo estiramento simétrico e assimétrico do grupo $(-\text{OH})$ presente na água. Esta afirmação foi corroborada pela presença do mesmo pico intenso no espalhamento produzido pela solução fisiológica 0,9% isolada, que pode ser observada na Figura 9. Estes dois picos de espalhamento foram também observados no trabalho de Bandeira et al. (2007) que utilizou um FT-Raman 1064nm para discriminar nevos pigmentados de melanoma. Entretanto, estes picos são ausentes nos trabalhos utilizando sistemas dispersivos 785nm devido à redução da sensibilidade dos detectores CCD de silício nesta região.

Também foi avaliado o efeito do soro fisiológico no espalhamento produzido pelos fragmentos, pois cerca de 10 minutos antes da detecção todo fragmento era retirado do formaldeído e colocado numa solução de soro fisiológico 0,9% para mantê-lo hidratado e remover o formaldeído o máximo possível. O fragmento apresentava cerca de 1 mm^3 de volume e era imerso em cerca de 1 mL (1.000 mm^3) de soro fisiológico, o que representa uma diluição de 1/1000 partes, fazendo a concentração de formaldeído sair de cerca de 4% para 0,004% aproximadamente, de acordo com a lei de conservação da massa. Imediatamente antes da medida, o fragmento era retirado do soro fisiológico e, após removido o excesso de água, era acondicionado entre as lamínulas. Desta forma, o soro fisiológico é um dos componentes moleculares que poderia influenciar o espectro final detectado. Pode-se observar através da Figura 9 que o soro fisiológico produz dois largos picos de espalhamento na região de interesse, o primeiro na região próximo de 800 cm^{-1} e outro em 1650 cm^{-1} . O pico em 800 cm^{-1} praticamente inexistente no espectro de espalhamento dos fragmentos, entretanto o de 1650 cm^{-1} coincide com um pico no espalhamento do fragmentos exposto ao soro fisiológico. Desta forma, se o pico em 1650 cm^{-1} fosse exclusivamente produzido pelo espalhamento do soro fisiológico,

também seria esperado a observação do outro pico em 800 cm^{-1} , o que indica que o pico na região de 1650 cm^{-1} dos espectros das amostras é originado pelos próprios compostos biológicos do fragmento, especificamente o pico amida I ($\text{C}=\text{O stretch}$) presente em grande quantidade nas proteínas, DNA e RNA.

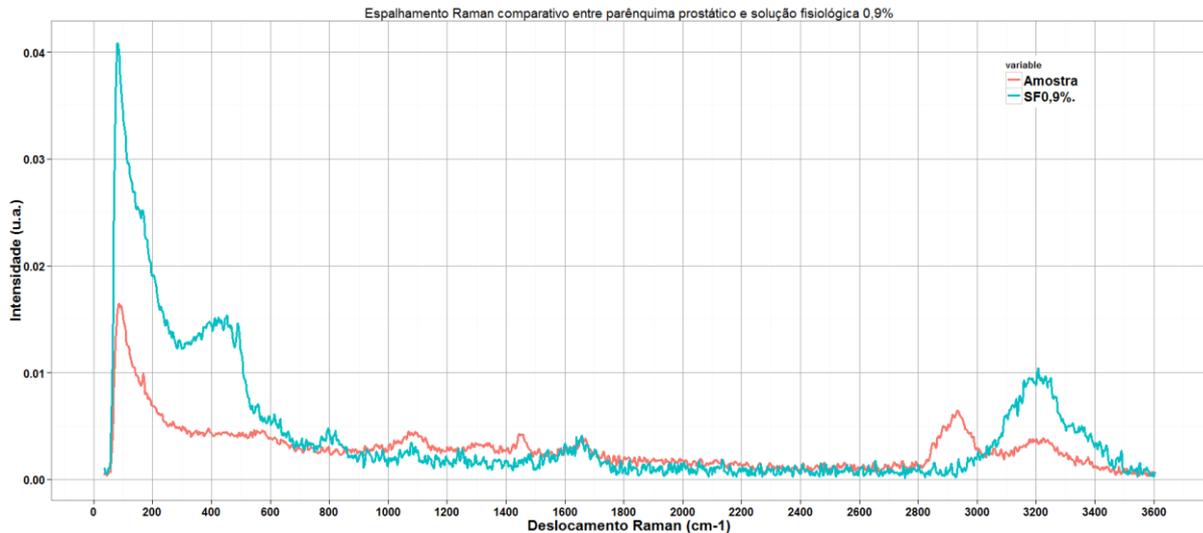


Figura 9: Espectro de espalhamento Raman comparativo entre fragmento e solução fisiológica utilizada para hidratar fragmentos.

Nota: O pico mais largo na região 3200 cm^{-1} corresponde à sobreposição do espalhamento Raman produzido pelo estiramento simétrico e assimétrico do grupo ($-\text{OH}$) presente na água. Na região de interesse, um pico na região próximo de 800 cm^{-1} e outro em 1650 cm^{-1} . O pico em 800 cm^{-1} praticamente inexistente no espectro de espalhamento dos fragmentos, entretanto o de 1650 cm^{-1} coincide com um pico no espalhamento do fragmento exposto ao soro fisiológico. Desta forma, se o pico em 1650 cm^{-1} fosse exclusivamente produzido pelo espalhamento do soro fisiológico, também seria esperado a observação do outro pico em 800 cm^{-1} , o que indica que o pico na região de 1650 cm^{-1} dos espectros dos fragmentos é originado pelos próprios compostos biológicos.

Percebe-se claramente através da Figura 10 que as lamínulas produzem dois largos picos também observados no espalhamento do conjunto fragmento e porta amostras. O primeiro pico na região entre $550 - 600\text{ cm}^{-1}$ e outro na região de 1100 cm^{-1} . O primeiro pico não prejudica a detecção do sinal biológico, pois a região utilizada do espalhamento com informações sobre os compostos bioquímicos do fragmento encontra-se principalmente entre 600 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} . Entretanto, o pico de espalhamento Raman produzido pelos compostos da lamínula na região 1100 cm^{-1} pode prejudicar a identificação de picos gerados pelos fragmentos nesta região. A Figura 10 mostra o espectro produzido pelo fragmento acondicionado entre as lamínulas e comparativamente o espalhamento das duas lamínulas isoladamente.

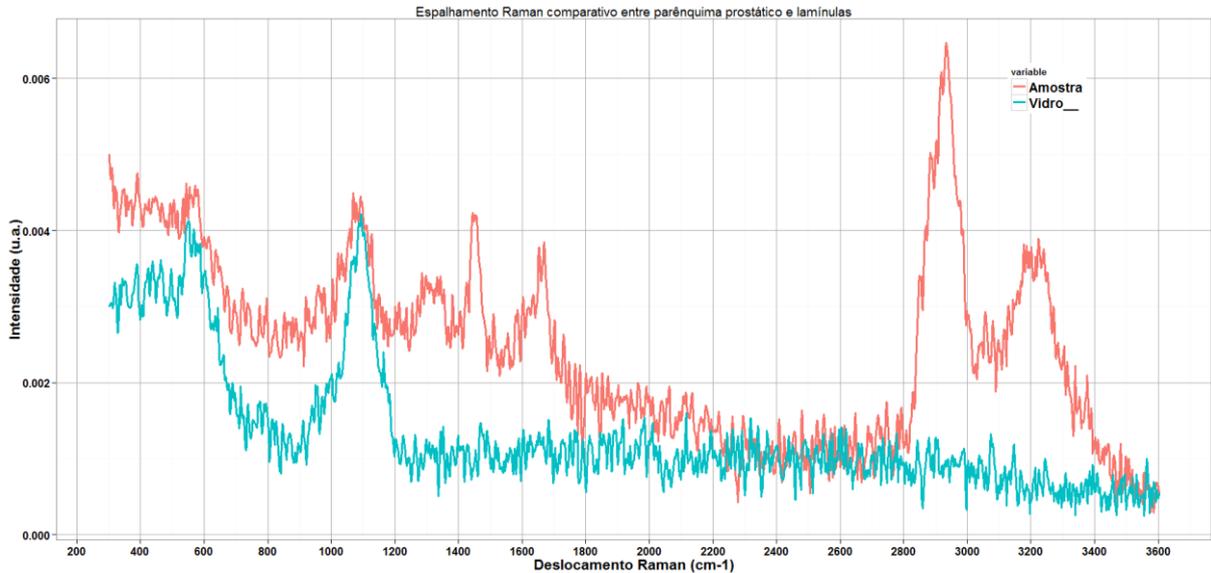


Figura 10: Espalhamento comparativo entre fragmento e porta amostras de vidro.

Nota: Espectro produzido pelo fragmento acondicionado entre as lamínulas e comparativamente o espalhamento das duas lamínulas isoladamente. Percebe-se claramente que as lamínulas produzem dois largos picos também observados no espalhamento do conjunto fragmento e porta amostras. O primeiro pico na região entre 550 – 600 cm^{-1} e outro na região de 1100 cm^{-1} , que pode prejudicar a identificação de picos gerados pelo fragmento nesta região.

Observa-se que os espectros obtidos apresentam grande quantidade de ruído, notado pela oscilação de alta frequência e baixa amplitude da curva espectral. Esse fato acaba prejudicando a obtenção de informação biológica útil dos espectros, pois torna difícil a distinção do que representa sinal de espalhamento Raman dos compostos biológicos do sinal proveniente do ruído que não contém informações úteis. Essa relação sinal/ruído pode ser explicada pelo pequeno número de detecções realizadas em cada amostra de apenas duas medidas. Como já explicado anteriormente, um número maior de medidas aquecia e danificava bioquimicamente o fragmento o que podia ser observado pela liberação de vapor de água e formação de um ponto enegrecido na região onde incidia o laser. A utilização do comprimento de onda 1064 nm reduz a intensidade do espalhamento Raman, o que precisou ser balanceado pelo uso de uma potência de 300 mW, cerca de 100 vezes maior que a potência utilizada nos experimentos com o laser incidente na faixa de 785 nm. A medida de dois espectros permitiu melhorar a elaboração da análise estatística sem destruir as amostras pela liberação de calor. Mesmo assim, optou-se pela não remoção do ruído utilizando ferramentas como *wavelets*, pois estes processos de suavização de curvas também podem retirar informações úteis dos dados obtidos. Não foram observados picos estreitos de intensidade variada, conhecidos como *spikes*, gerados por raios cósmicos nos espectros analisados.

Para se certificar que o processo de diluição removeu o máximo possível do formaldeído do fragmento, realizou-se a detecção do espalhamento Raman do formaldeído 4% para avaliar a existência de contaminação residual. Pode-se observar na Figura 11 que os picos de espalhamento Raman na região de 800 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} coincidem com o do soro fisiológico isoladamente, pois formol é diluído em água. Entretanto, os picos nas regiões 900 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} existem apenas no espalhamento do formol isoladamente. Esses picos não foram observados no espectro de espalhamento dos fragmentos indicando que o processo de diluição foi suficiente para reduzir significativamente a presença do formol no fragmento.

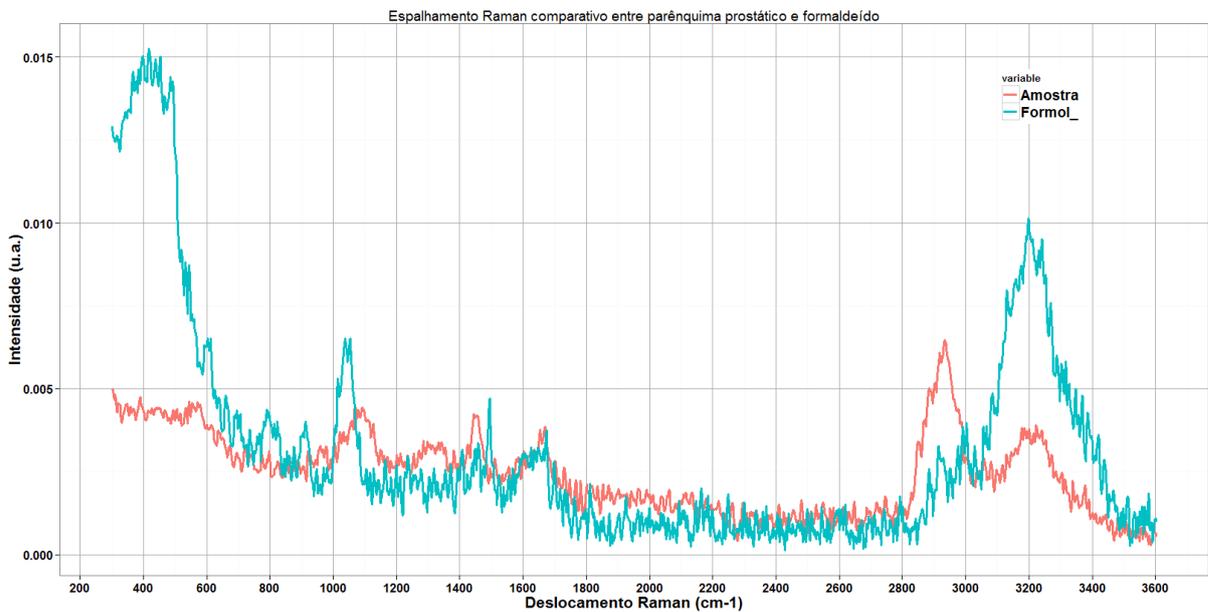


Figura 11: Espectro de espalhamento Raman comparativo entre fragmento e formaldeído 4% usado para fixar o material.

Nota: Os picos de espalhamento Raman na região de 800 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} coincidem com o do soro fisiológico isoladamente, pois o formol é diluído em água. Entretanto, os picos nas regiões 900 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} existem apenas no espalhamento do formol isoladamente. Esses picos não foram observados no espectro de espalhamento das amostras indicando que o processo de diluição foi suficiente para reduzir significativamente a presença do formol nas amostras.

Inicialmente, foram construídos gráficos a partir dos espectros de cada grupo estudado. O grupo “parênquima prostático benigno” inclui espectros obtidos de parênquima normal e hiperplasia prostática benigna. O grupo “parênquima prostático neoplásico” inclui espectros obtidos de parênquima diagnosticados como NIP e Gleason 3 a 5. Fragmentos que possuíam diagnóstico duplo maligno, simultaneamente Gleason 3 e 4, por exemplo, foram incluídos neste grupo. Para o gráfico das amostras benignas, foram incluídos 15 espectros e, para as amostras malignas, 23 espectros, como pode ser observado no Quadro 2. Para que esta construção pudesse ser tomada como base de reconhecimento do padrão de modos vibracionais Raman dos

grupos relacionados, todos os espectros foram normalizados utilizando como referência o pico amida I na região de Raman *shift* 1660 cm^{-1} . Desta forma, possíveis diferenças na intensidade do espalhamento Raman devido às variações na potência do laser ou na geometria da superfície da amostra que poderiam alterar a sua intensidade foram minimizadas pela normalização da intensidade de espalhamento em todos canais em relação ao espalhamento em uma região específica do espectro, o que permite a comparação dos espectros obtidos de diferentes amostras.

As Figuras 12 e 13 evidenciam a média e a mediana de cada grupo diagnóstico e a região entre os percentis 10 e 90 das variáveis espectrais foi evidenciado para observação da existência de algum padrão espectral específico e variabilidade entre as amostras do grupo. Os percentis são divisões da amostra ordenada por ordem crescente em 100 partes, cada uma com uma percentagem de dados aproximadamente igual. A opção pelo uso de percentis ocorreu para demonstrar a variabilidade dos dados, pois a distribuição em torno da média não segue necessariamente o tipo gaussiano. A média e a mediana foram evidenciadas para mostrar a possível influência de *outliers*, que acabam influenciando mais a média que a mediana. Além disso, seria possível avaliar a proximidade dos dados para cada canal detectado a uma distribuição normal.

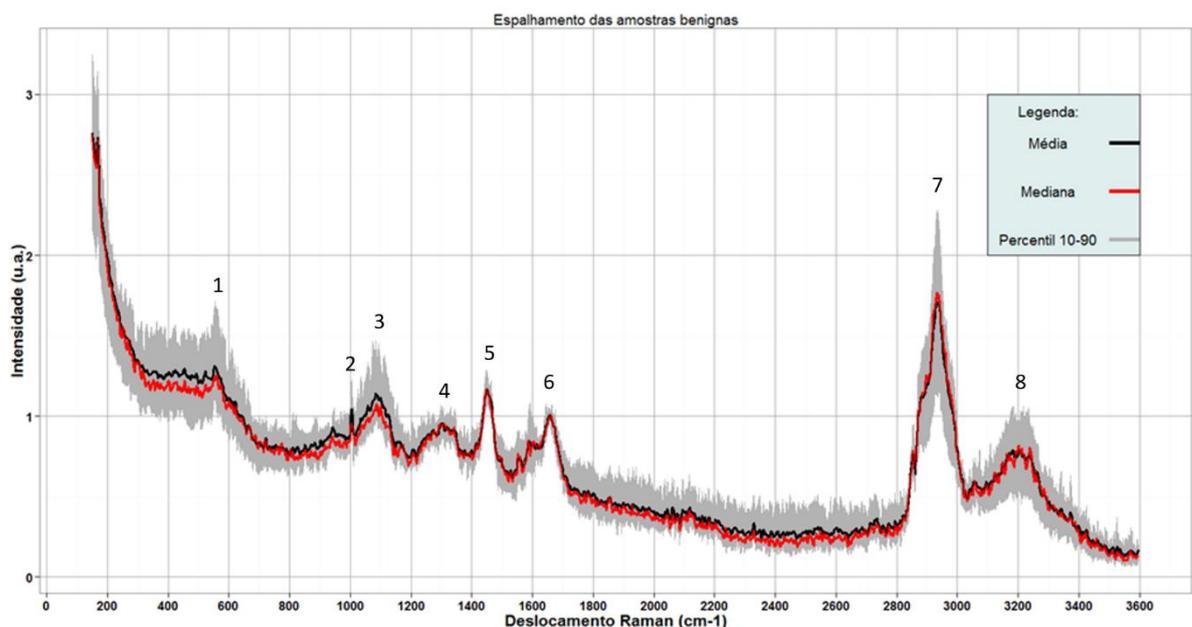


Figura 12: Espectros de espalhamento Raman das amostras do grupo diagnóstico benigno.

Nota1: Pode-se observar que a média e a mediana encontram-se muito próximas, apesar da mediana ser inferior à média em algumas regiões do espectro. A região de $700 - 1800\text{ cm}^{-1}$ é a região dos espectros utilizada por todos os artigos publicados de aplicação da espectroscopia Raman para discriminação de amostras prostáticas. Os

espectros obtidos do grupo benigno apresentam grande variabilidade o que pode ser evidenciado pela região hachurada em cinza que contém 80% dos dados medidos para cada variável espectral.

Nota2: Correspondência molecular dos picos mais evidentes. Picos 1 e 3 são provenientes das lamínulas. Pico 2 resulta do espalhamento do “symmetric ring breathing” do aminoácido fenilalanina presente em proteínas. O pico 4 resulta da sobreposição dos espalhamento (C - N) “backbone” e C - C “stretch” presente em proteínas, lípides e fosfolípides, (amida III) e C - N “stretch”/CH₂ “wagging” presente em lípides, fosfolípides, DNA e RNA. O pico 5 resulta do espalhamento CH₂ “deformation” presente no DNA, RNA, proteínas e lípides. O pico 6 resulta do espalhamento C = O “stretch” presente em proteínas (amida I), DNA e RNA. O pico 7 produzido pelo estiramento assimétrico do grupo (-CH₃) e estiramento simétrico do grupo (-CH₂) presentes em grande quantidade em tecidos biológicos. O pico 8 resulta da sobreposição do espalhamento Raman produzido pelo estiramento simétrico e assimétrico do grupo (-OH) presente na água.

Por meio da Figura 12 que condensa todos os espectros medidos de amostras diagnosticadas como benignas, pode-se observar que a média e a mediana encontram-se muito próximas, apesar da mediana ser inferior à média em algumas regiões do espectro. Apesar desta pequena diferença, se houve *outliers* neste grupo de amostras, estes apresentavam intensidade normalizada entre os percentis 50 e 100, pois *outliers* tendem a deslocar para sua proximidade mais a média que a mediana. Apesar disso, como a média e a mediana apresentaram pequena diferença entre si, optou-se pela não remoção destes espectros da análise estatística.

Observa-se, na média dos espectros benignos, a presença do espalhamento Rayleigh na região de 0 - 200 cm⁻¹, os picos na região de 550 cm⁻¹ e 1050 – 1150 cm⁻¹ que correspondem ao espalhamento do vidro das lamínulas como explicado anteriormente. Também se observa o pico mais intenso na região 2900 – 2950 cm⁻¹ que corresponde ao espalhamento produzido pelo estiramento dos grupos (-CH₂) e (-CH₃) presentes em grande quantidade nos tecidos biológicos. O pico mais largo na região 3100 – 3300 cm⁻¹ corresponde ao espalhamento Raman produzido pelo estiramento simétrico e assimétrico do grupo (-OH) presente na água. Estas regiões descritas não foram utilizadas para discriminação entre amostras benignas e malignas.

A região de 700 – 1800 cm⁻¹ é a região dos espectros utilizada por todos os artigos publicados de aplicação da espectroscopia Raman para discriminação de amostras prostáticas citados anteriormente. A presença do pico produzido pelas lamínulas na região 1050 - 1150 cm⁻¹ prejudica a obtenção de dados provenientes da amostra nesta região. Desta forma, as regiões úteis para análise estatística do espectro encontram-se na região 700 – 1050 cm⁻¹ e 1150 – 1800 cm⁻¹. O Quadro 1 mostra os picos de espalhamento Raman observados nesta região na literatura revista. Os picos mais evidentes se encontram em 1000 cm⁻¹ do “ring breathing” da fenilalanina, região 1200 – 1350 cm⁻¹ da sobreposição dos picos amida III, -CH₂- “wagging” e -CN- “stretch” presentes principalmente em lípides e ácidos nucleicos, 1450 cm⁻¹ do

espalhamento produzido pela vibração $\text{-CH}_2\text{-}$ “*deformation*” presente nos ácidos nucleicos, proteínas e lípides e finalmente na região $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ do espalhamento da vibração C=O “*stretch*” (amida I) presente em ácidos nucleicos e proteínas. Estes picos detectados estão de acordo com a literatura revisada que utilizou sistemas dispersivos 785nm em parênquima prostático como revisado por Kast et al. (2014).

A região $700 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ não apresenta os picos bem definidos de espalhamento Raman registrados na literatura que utiliza sistemas dispersivos 785nm em parênquima prostático como revisado por Kast et al. (2014) e sumarizados no quadro 1. Os picos encontrados nesta região são os mais utilizados pela literatura para discriminar amostras benignas de amostras malignas. A detecção destes picos de espalhamento Raman pode ter sido prejudicada pela relação sinal-ruído observada neste experimento que torna difícil a apropriada distinção nesta região do que representa sinal de espalhamento Raman dos compostos biológicos, do sinal proveniente do ruído que não contém informações úteis. Outra possibilidade explanatória é a menor intensidade do espalhamento Raman quando se utiliza o laser 1064nm como fonte excitatória.

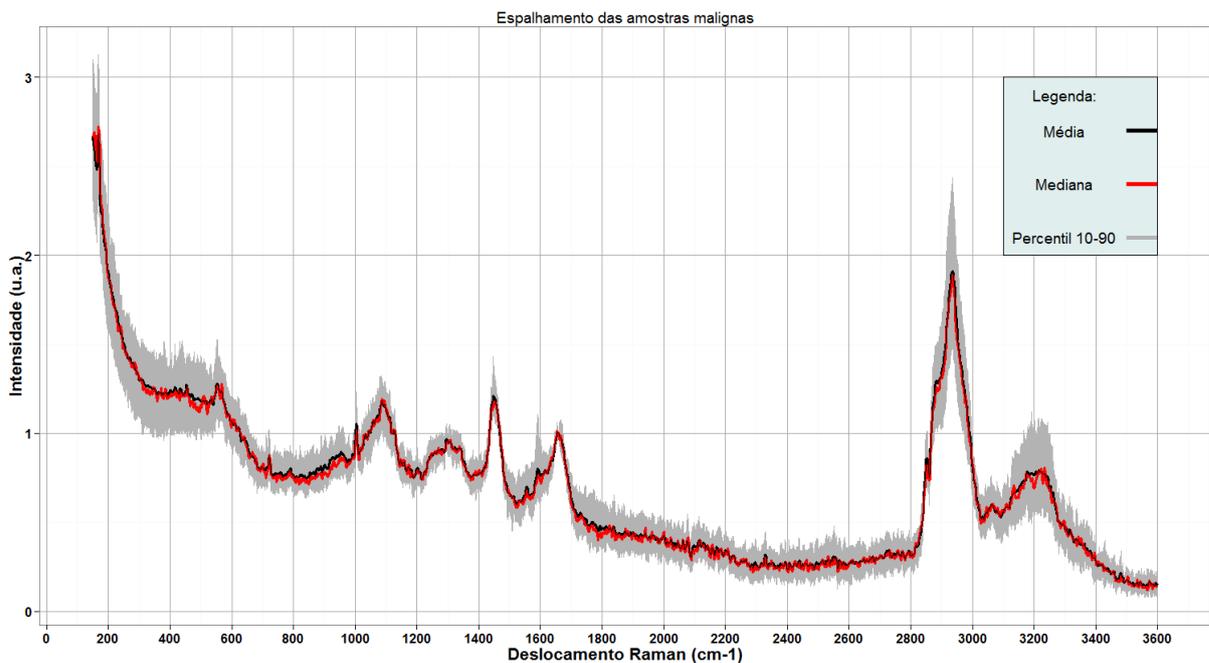


Figura 13: Espectros de espalhamento Raman das amostras do grupo diagnóstico maligno.

Nota: Os espectros obtidos do grupo diagnóstico maligno apresentam grande variabilidade o que pode ser evidenciado pela região hachurada em cinza que contém 80% dos dados medidos para cada variável espectral. Os mesmos picos de espalhamento Raman observados nas amostras do grupo benigno também foram observados no grupo maligno. Os picos mais evidentes se encontram em 1000 cm^{-1} do “ring breathing” da fenilalanina, região $1200 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ da sobreposição dos picos amida III, $\text{-CH}_2\text{-}$ “wagging” e -CN- “stretch” presentes principalmente em lípides e ácidos nucleicos, 1450 cm^{-1} do espalhamento produzido pela vibração $\text{-CH}_2\text{-}$ “deformation” presente nos ácidos nucleicos, proteínas e lípides e finalmente na região $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ do espalhamento da vibração C=O “stretch” (amida I) presente em ácidos nucleicos e proteínas.

Por meio da Figura 13 que condensa todos os espectros medidos de amostras diagnosticadas como malignas, pode-se observar que a média e a mediana encontram-se muito próximas em todas regiões do espectro. Testes de normalidade da distribuição não foram realizados. A variabilidade dos espectros seguiu aproximadamente o mesmo padrão do observado nas amostras classificadas como benignas. Os mesmos picos de espalhamento Raman já descritos anteriormente também foram observados.

Para comparar inicialmente os dois grupos de diagnóstico detectados, confeccionou-se a Figura 14 comparando a média dos espectros obtidos para cada grupo e a respectiva variabilidade deles em percentis.

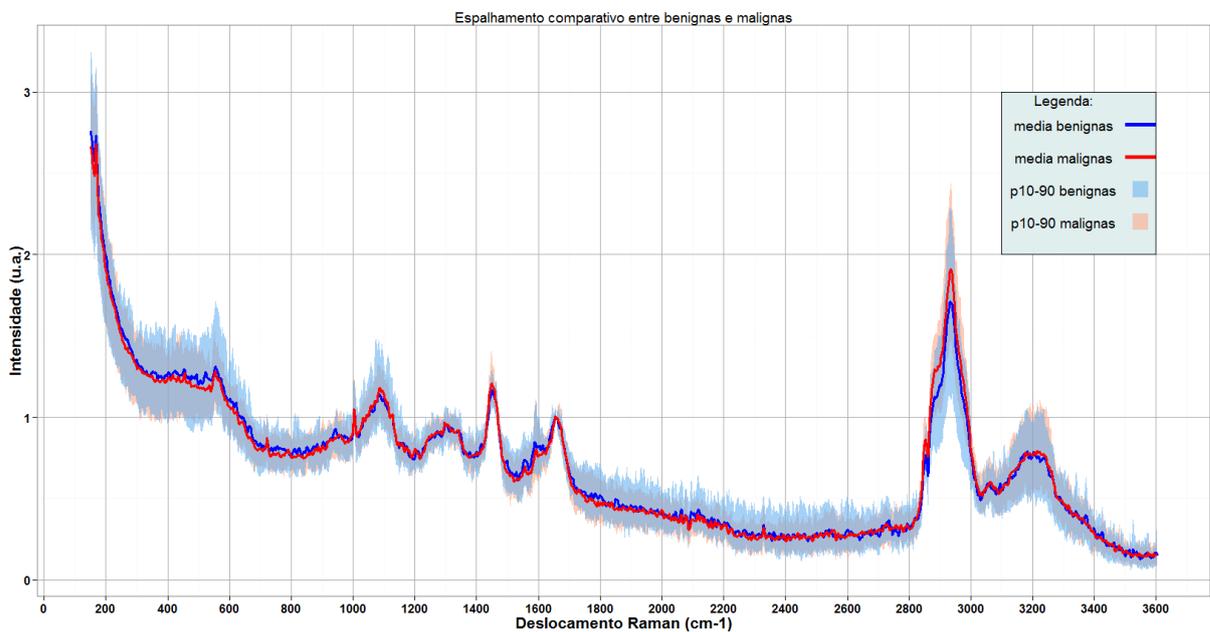


Figura 14: Espectros de espalhamento Raman comparativo entre amostras do grupo diagnóstico maligno e benigno.

Nota: Existe sobreposição da intensidade média das amostras benignas e malignas em toda a extensão do espectro de espalhamento Raman. Uma outra característica que indica a baixa eficiência do método na discriminação das amostras prostáticas é a sobreposição das regiões hachuradas que compreendem 80% dos dados medidos para cada grupo. Percebe-se que, utilizando esta metodologia, não foi possível obter qualquer pico de espalhamento Raman específico dos compostos moleculares dos tecidos prostáticos benignos ou malignos.

A Figura 14 apresenta duas regiões hachuradas em azul e salmão que representam respectivamente o intervalo p10-p90 das amostras benignas e malignas, respectivamente. Na região em que ocorre a sobreposição das regiões hachuradas, ou seja, em praticamente toda a extensão do espectro, uma terceira cor surge. É evidente a sobreposição do espectro médio das amostras benignas e malignas, havendo apenas uma discreta diferença na região $700 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ e $1500 - 1650 \text{ cm}^{-1}$. Entretanto, essa pequena diferença ocorre em regiões do espectro que não apresentam picos bem definidos, na qual a distinção entre sinal biológico e ruído pode

ser duvidosa. Uma outra característica que indica a baixa eficiência do método na discriminação do parênquima prostático é a sobreposição das regiões hachuradas que compreendem 80% dos dados medidos para cada grupo. Percebe-se que, utilizando esta metodologia, não foi possível obter qualquer pico de espalhamento Raman específico dos compostos moleculares dos tecidos prostáticos benignos ou malignos. Esta observação é corroborada pela literatura revisada que, mesmo utilizando um laser de comprimento de onda 785 nm, obtiveram discretas diferenças entre os espectros dos grupos diagnósticos.

A Figura 15 confirma a grande semelhança entre a média dos espectros dos dois grupos diagnósticos através da relação entre o deslocamento Raman (cm^{-1}) e o módulo da diferença entre a média dos espectros provenientes de amostras diagnosticadas como benignas e malignas. A região destacada representa a região utilizada do espectro para discriminação diagnóstica tanto pela literatura revisada quanto por este trabalho. A região próxima do deslocamento 1100 cm^{-1} não foi destacada, como explicado anteriormente, pois as lamínulas de vidro produzem um pico de espalhamento intenso nesta região. A escala utilizada no eixo y foi propositalmente a mesma da Figuras 14, para evidenciar a grande semelhança dos espectros detectados em cada grupo diagnóstico. Observa-se claramente que não existe diferença característica entre os espectros dos dois grupos diagnósticos definidos, exceto na região de 2900 cm^{-1} que corresponde à sobreposição do espalhamento produzido pelo estiramento assimétrico do grupo ($-\text{CH}_3$) e estiramento simétrico do grupo ($-\text{CH}_2$) presentes em grande quantidade em tecidos biológicos. Entretanto, esse pico não é utilizado para discriminação diagnóstica devido à sua inespecificidade. Além disso, a sua intensidade era fortemente influenciada pela temperatura da amostra. Observou-se, durante a realização das medidas, aumento significativo da sua intensidade quando o posicionamento das amostras era mais difícil, exigindo um maior tempo de exposição ao laser. Quando isso ocorria, a observação macroscópica posterior da amostra, evidenciava condensação de vapor de água nas lamínulas e um ponto enegrecido na amostra indicando o início da sua carbonização.

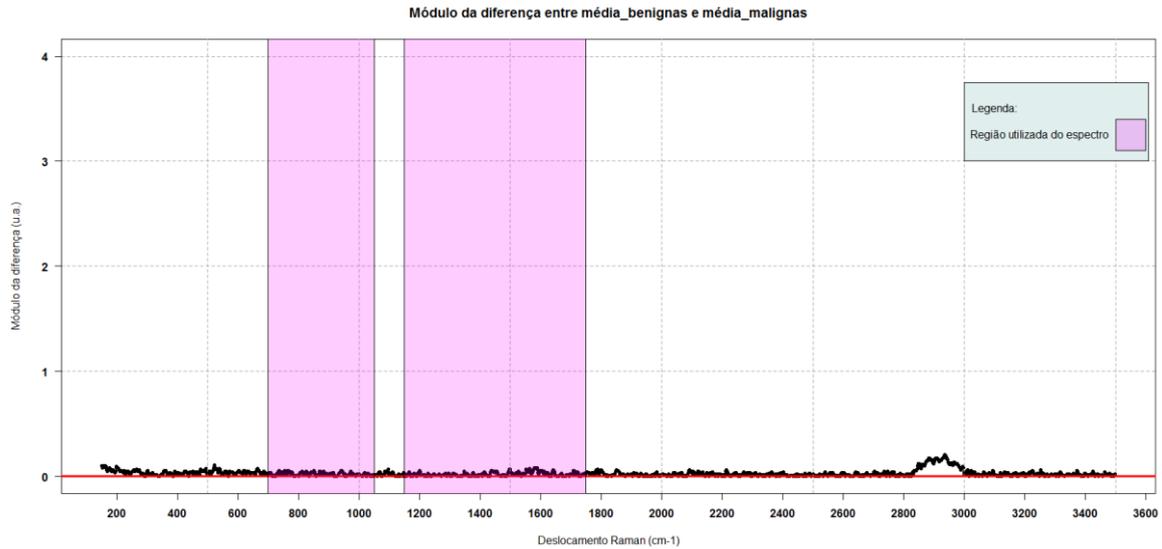


Figura 15: Módulo da diferença entre média dos espectros diagnosticados como benignos e malignos, utilizando mesma escala da Figura 14.

Nota: A região destacada representa a região utilizada do espectro para discriminação diagnóstica tanto pela literatura revisada quanto por este trabalho. A região próxima do deslocamento 1100 cm^{-1} não foi destacada, pois as lamínulas de vidro produzem um pico de espalhamento intenso nesta região. A escala utilizada no eixo y foi propositalmente a mesma da Figuras 14, para evidenciar a grande semelhança dos espectros detectados em cada grupo diagnóstico. Observa-se claramente que não existe diferença característica entre os espectros dos dois grupos diagnósticos definidos, exceto na região de 2900 cm^{-1} que corresponde à sobreposição do espalhamento produzido pelo estiramento assimétrico do grupo ($-\text{CH}_3$) e estiramento simétrico do grupo ($-\text{CH}_2$) presentes em grande quantidade em tecidos biológicos, entretanto, inespecífico para discriminação diagnóstica.

Optou-se pela discriminação das regiões com maior diferença entre a média dos espectros provenientes de amostras diagnosticadas como benignas e malignas dentro das áreas destacadas. Essa opção decorre da observação na literatura revisada para a mesma discreta diferença entre os espectros dos grupos com diferentes diagnósticos. Além disso, mesmo levando em conta a relação sinal-ruído neste experimento, poder-se-ia descartar pequenas diferenças úteis na discriminação diagnóstica. Através da Figura 16, determinaram-se quatro deslocamentos Raman distintos do espectro dentro da área destacada que apresentavam os maiores módulos da diferença de intensidade média dos espectros dos grupos diagnósticos, sendo eles localizados em 764 cm^{-1} , 851 cm^{-1} , 943 cm^{-1} e 1587 cm^{-1} .

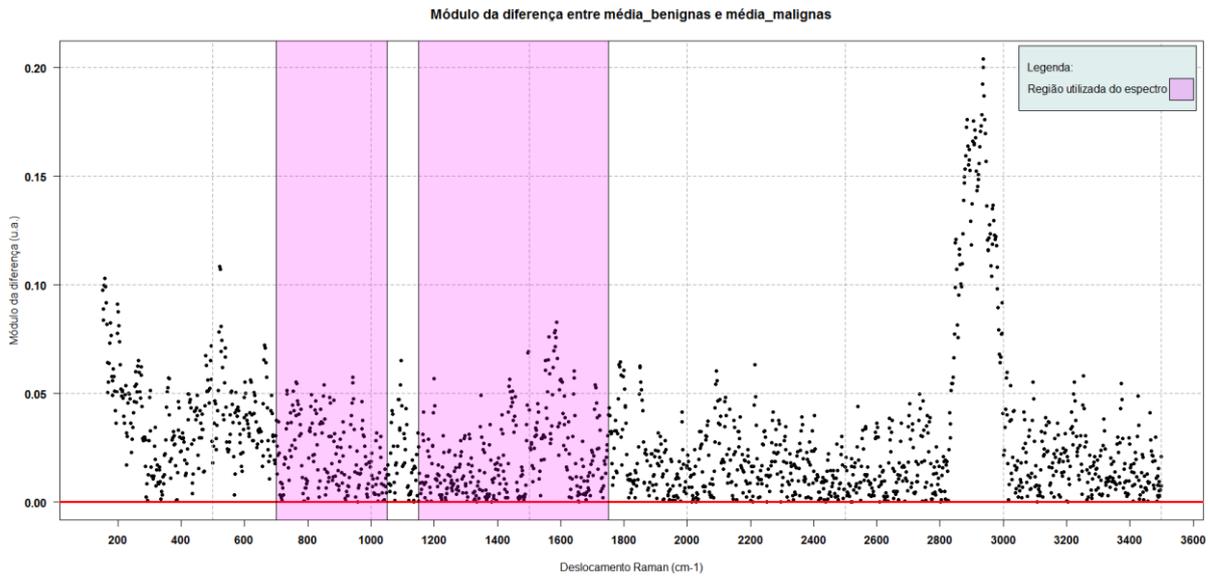


Figura 16: Módulo da diferença entre média dos espectros diagnosticados como benignos e malignos, utilizando escala que permite identificação de máximos locais

Nota: Determinação de quatro regiões distintas do espectro dentro da área destacada que apresentam os maiores módulos da diferença de intensidade média dos espectros dos grupos diagnósticos para análise subsequente por boxplots, sendo a localização em 764 cm^{-1} , 851 cm^{-1} , 943 cm^{-1} e 1587 cm^{-1} .

A Figura 17 é um conjunto de *boxplots* dos espectros detectados nos quatro deslocamentos Raman definidos através da Figura 16, como explicado anteriormente. Os *boxplots* vermelho correspondem aos valores de intensidade detectados no deslocamento Raman especificado de todas as amostras diagnosticadas como malignas. Já os *boxplots* azul correspondem aos valores de intensidade detectados no deslocamento Raman especificado de todas as amostras diagnosticadas como benignas. A comparação deve ser realizada entre o *boxplot* vermelho e azul de cada deslocamento Raman especificado. Observa-se que a localização da mediana varia nos grupos amostrais, evidenciando não necessariamente uma simetria na distribuição dos dados em cada região do espectro. Também se observa a existência de *outliers*, geralmente superiores à mediana, o que já era esperado nas Figuras 12 e 13 que mostravam valores da média superiores à mediana. É importante ressaltar que estes *outliers* não foram provenientes de amostras específicas de cada grupo diagnóstico. Por exemplo, se uma mesma amostra do grupo benigno tivesse gerado todos os *outliers* observados nas diferentes regiões do espectro do grupo, isso poderia indicar uma amostra cujo posicionamento do laser não tenha atingido glândulas prostáticas, havendo mais espalhamento de estroma prostático. Entretanto, os *outliers* observados em cada região do espectro eram provenientes de diferentes amostras dentro do mesmo grupo diagnóstico, o que pode ser explicado pela influência do ruído nos espectros observados. Torna-se evidente, através dos *boxplots*, que não existe diferença

estatisticamente significativa entre os espectros obtidos das amostras diagnosticadas como benignas ou malignas nas quatro regiões onde havia maior diferença entre as médias. Pode-se inferir que nas outras regiões de interesse do espectro, nas quais a diferença era ainda menor, esse mesmo padrão se repetiu, como evidenciado na Figura 14 pela superposição dos percentis p10-90 dos dois grupos diagnósticos.

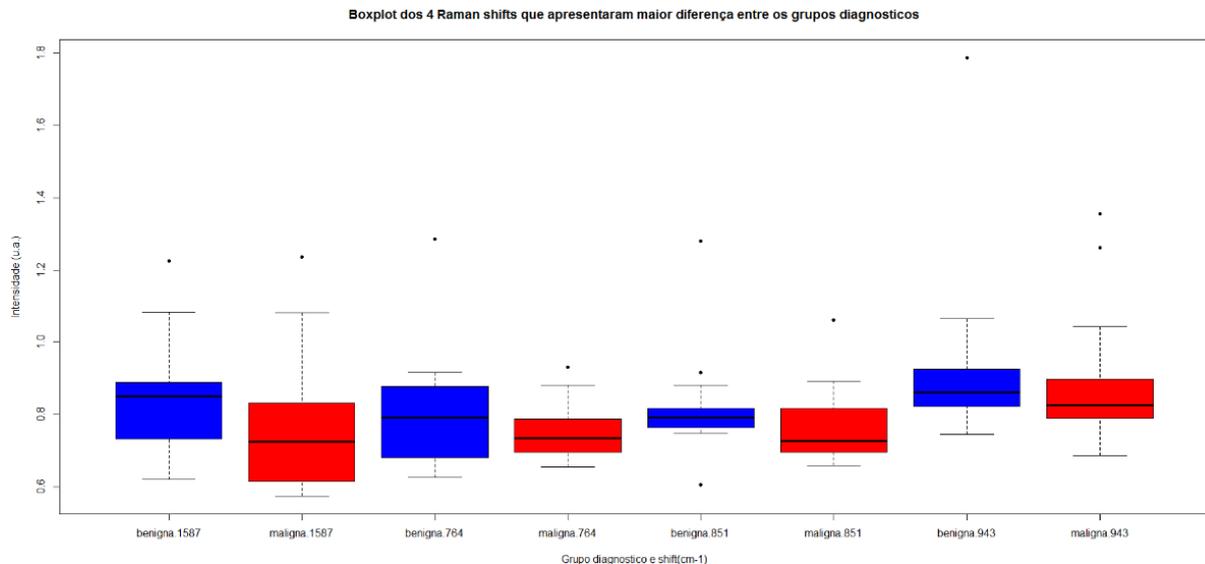


Figura 17: Boxplots dos quatro deslocamentos Raman que apresentaram maior diferença entre os grupos diagnósticos na região analisada.

Nota: Os boxplots vermelho correspondem aos valores de intensidade detectados no deslocamento Raman especificado de todas as amostras diagnosticadas como malignas. Já os boxplots azul correspondem aos valores de intensidade detectados no deslocamento Raman especificado de todas as amostras diagnosticadas como benignas. A comparação deve ser realizada entre o boxplot vermelho e azul de cada deslocamento Raman especificado. A posição da mediana em relação ao p25 e p75 é diferente entre as variáveis espectrais, evidenciando não necessariamente uma simetria na distribuição em torno da média dos dados em cada região do espectro. Também se observa a existência de outliers, geralmente superiores à mediana. Não existe diferença estatisticamente significativa entre os espectros obtidos das amostras diagnosticadas como benignas ou malignas nas quatro regiões onde havia maior diferença entre as médias.

Para avaliar um possível viés de metodologia, confeccionou-se Figura 18. A possibilidade deste viés motivou a determinação do critério de exclusão mais rigoroso que promoveu a exclusão de cerca de metade das amostras avaliadas, pelo menos durante a fase de validação da metodologia. Amostras que, na observação microscópica após processamento histopatológico tradicional, apresentavam uma porcentagem de glândulas menor que 80% ou distribuição não homogênea em toda amostra eram descartadas da análise. Esta foi a maneira encontrada de garantir que os espectros provenientes dos grupos diagnosticados apresentavam informações sobre os componentes glandulares principalmente. Esta decisão foi baseada nos trabalhos de

Devpura et al. (2012) que indicava não haver boa capacidade discriminatória entre estroma e parênquima prostático benigno ou maligno utilizando a espectroscopia Raman com fonte excitatória de 785nm. Entretanto, observa-se pela Figura 18, que as diferenças espectrais entre estroma e tecido prostático benigno são muito sutis. É importante salientar que para a determinação do espectro médio proveniente de amostras diagnosticadas como estroma, considerou-se apenas amostras que apresentavam diagnóstico único de estroma, não sendo observadas glândulas prostáticas. Desta forma, não existe pico de espalhamento específico produzido pelos compostos biológicos do estroma que pudesse auxiliar na avaliação se os espectros provenientes do grupo benigno consistiam de espalhamento proveniente do estroma prostático. Foi, portanto, necessário manter o critério de exclusão mais rigoroso.

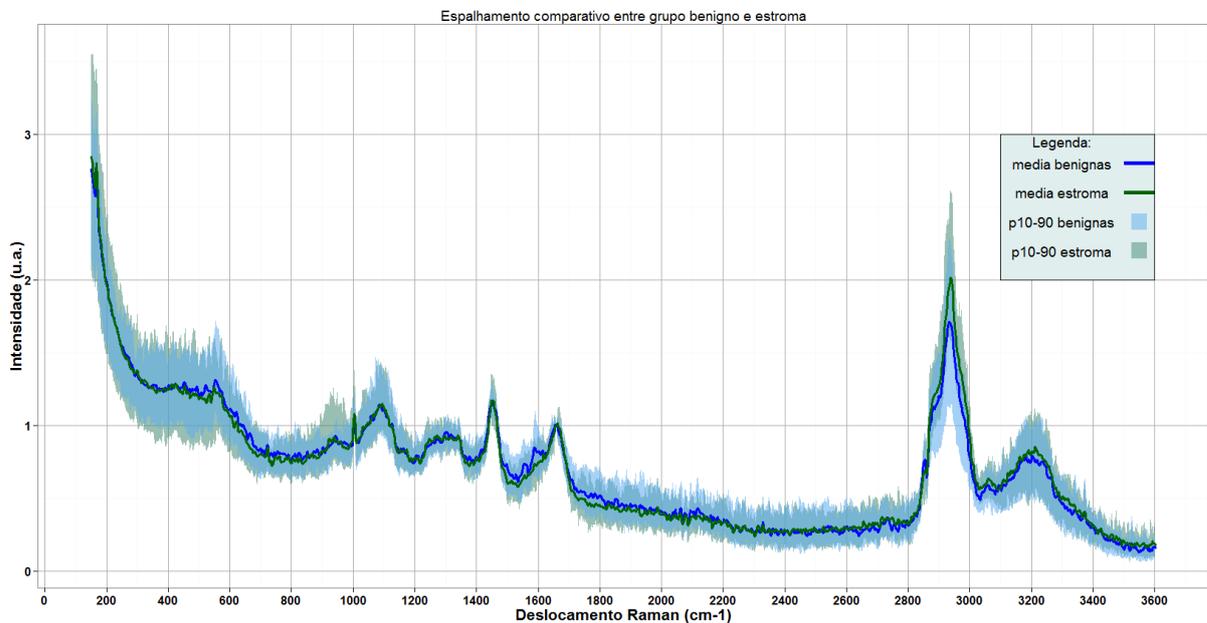


Figura 18: Espectros de espalhamento Raman comparativos entre parênquima diagnosticado como benigno e estroma prostático.

Nota: As diferenças espectrais entre estroma e parênquima prostático benigno são muito sutis utilizando esta metodologia. Para a determinação do espectro médio proveniente de amostras diagnosticadas como estroma, considerou-se apenas amostras que apresentavam diagnóstico único de estroma, não sendo observadas glândulas prostáticas.

Por fim, para avaliar através de uma análise multivariada a capacidade discriminatória do método utilizado, realizou-se a análise por componentes principais (PCA) de todos os dados contidos na região $700 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ e $1150 - 1650 \text{ cm}^{-1}$. No total, foram 467 pontos analisados de cada um dos 38 espectros detectados considerados aptos à análise estatística após critérios de exclusão. As elipses presentes no gráfico delimitam a região na qual 95% dos dados estão inclusos. Estão evidenciados na Figura 19 apenas o primeiro e segundo componentes principais

que explicam cerca de 72% da variabilidade total do conjunto de dados. Novamente, não há qualquer tipo de distinção estatisticamente significativa entre os espectros obtidos de amostras diagnosticadas como benignas e malignas. O centro das elipses é praticamente o mesmo e nenhum padrão ou tendência a distinção pode ser observado.

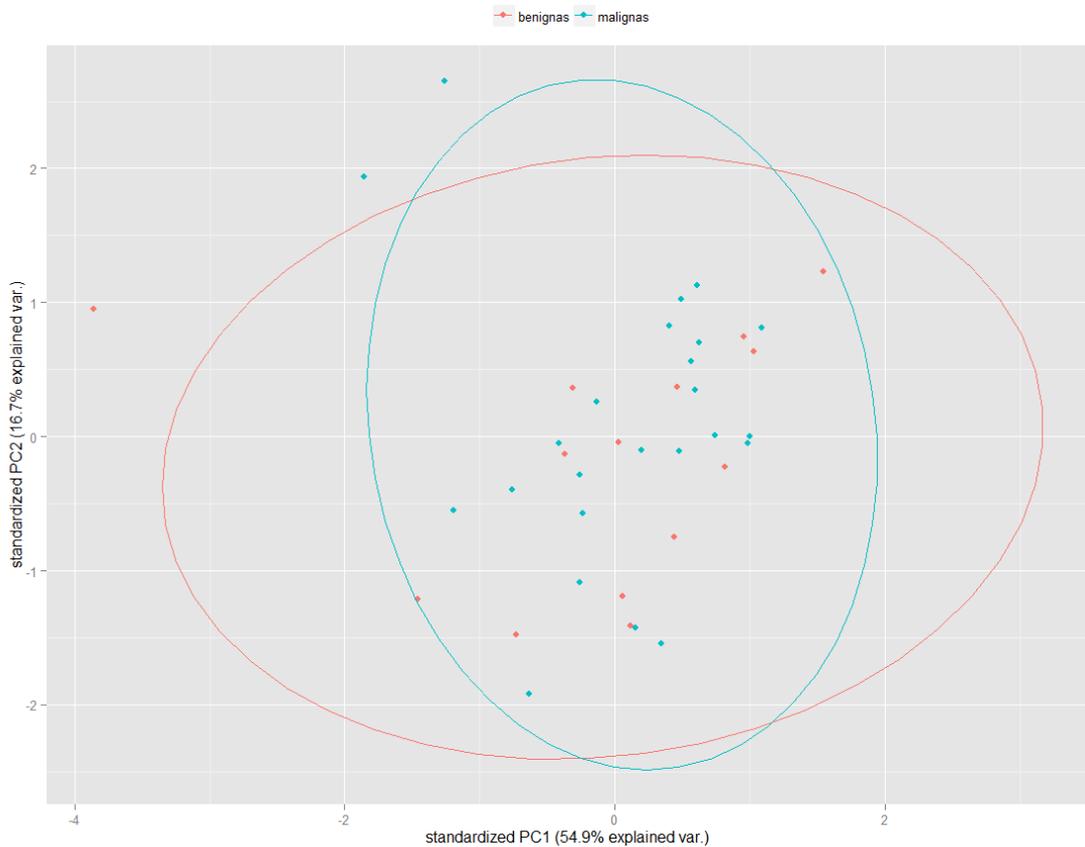


Figura 19: Análise por componentes principais dos espectros obtidos de amostras diagnosticadas no grupo benignas ou malignas.

Nota: Foram 467 pontos analisados de cada um dos 38 espectros detectados considerados aptos à análise estatística após critérios de exclusão. As elipses presentes no gráfico delimitam a região na qual 95% dos dados estão incluídos. Estão evidenciados apenas o primeiro e segundo componentes principais que explicam cerca de 72% da variabilidade total do conjunto de dados. Não há qualquer tipo de distinção estatisticamente significativa entre os espectros obtidos de amostras diagnosticadas como benignas e malignas.

Em resumo, a espectroscopia Raman já havia sido utilizada com sucesso para diferenciar tecidos cutâneos benignos de nevos pigmentados e melanomas. Tradicionalmente, quando aplicado em análises biológicas, escolhe-se comprimentos de onda menores, como 785 nm. Esta escolha decorre da presença do fator com quarta potência que relaciona a frequência do feixe incidente com a intensidade do espalhamento Raman. A redução da sensibilidade da técnica com a utilização de uma fonte excitatória NIR pode ser parcialmente contornada pelo aumento da potência do laser ou pelo maior tempo de integração da coleta. Entretanto, esse aumento na potência, cerca de 100X, exigiu a redução do número de medidas realizadas em

cada amostra para evitar a destruição das mesmas por aquecimento ao longo das medidas, o que piorou a relação sinal/ruído na média dos espectros obtidos de cada amostra.

A expectativa inicial era que favorecendo a utilização da faixa NIR, pode-se citar a significativa redução da fluorescência emitida pela amostra, além da redução de alterações térmicas ou fotoquímicas. De fato, obteve-se significativa redução na intensidade da fluorescência quando comparado com os trabalhos publicados que discriminam diagnósticos em tecidos prostáticos utilizando a fonte excitatória 785nm, não sendo necessário qualquer tipo de processamento do sinal detectado.

Vale ressaltar também que os trabalhos realizados com a fonte excitatória em 785nm obtiveram espectros muito semelhantes entre os grupos diagnósticos, assim como observado neste trabalho, entretanto obtiveram boa capacidade discriminatória através da análise multivariada destas pequenas diferenças. Acredita-se que a informação que permite essa discriminação utilizando a fonte excitatória 1064nm esteja contaminada pelo ruído presente no sinal. Mesmo assim, optou-se pela não remoção do ruído utilizando ferramentas como *wavelets*, pois estes processos de suavização de curvas também podem retirar informações úteis dos dados obtidos e tornaria mais trabalhoso o processamento do sinal, sendo que um dos objetivos principais do estudo é avaliar a aplicação de novas técnicas de simples uso na prática que permitiriam auxiliar na determinação histopatológica e prognóstica do câncer de próstata.

Entretanto, para se obter os espectros de espalhamento Raman, o posicionamento e processamento inicial das amostras se mostrou trabalhoso, o que torna inviável sua aplicação prática nos laboratórios de anatomia patológica. Além disso, a técnica utilizando 1064 nm também se mostrou ineficaz, não fornecendo qualquer espectro típico de amostras biológicas quando se tentou realizar medidas em cortes de 4 micrômetros das amostras submetidas ao processamento histopatológico padrão, o que viabilizaria a sua aplicação dentro da rotina padrão de análise de tecidos prostáticos.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A espectroscopia Raman utilizando o laser excitatório 1064 nm permite avaliar o espalhamento proveniente de diferentes compostos moleculares presentes no tecido prostático, entretanto sua capacidade discriminatória entre parênquima prostático diagnosticado por patologistas como benigno de parênquima diagnosticado como neoplásico é insatisfatória. Este é o primeiro trabalho encontrado na literatura que investigou o uso deste comprimento de onda excitatório em tecidos prostáticos.

A técnica de espectroscopia Raman apresenta grande potencial de uso na prática clínica como evidenciado pelos diversos estudos já publicados na literatura utilizando diversas variantes da técnica. Um objetivo futuro é a estabilização do laser 785 nm disponível no laboratório o que permitiria a utilização de cortes histopatológicos padrão e focar o laser na amostra utilizando a microscopia óptica. Desta forma, será possível obter uma maior sensibilidade da técnica, além de estudar diferentes regiões do corte com maior precisão, diferenciando o espalhamento de parênquima, reação estromal e estroma perinódulos. Outro benefício seria uma melhor taxa de aproveitamento das amostras o que aumentaria o espaço amostral de detecções para cada diagnóstico, permitindo uma análise por subgrupos das regiões com diferentes escores de Gleason. Atualmente, o padrão ouro diagnóstico de neoplasias prostáticas é o escore de Gleason, mas a sua determinação é muitas vezes subjetiva e depende do treinamento e experiência do patologista. Torna-se desta forma, necessário comparar a capacidade discriminatória da técnica de espectroscopia Raman diretamente com o prognóstico do paciente, o que poderia ser feito através de um estudo retrospectivo das amostras de parênquima prostático já disponíveis no departamento de patologia.

Uma perspectiva futura de aplicação em tecidos prostáticos seria a utilização da técnica CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy*) que exige um menor tempo de integração do sinal e poderia aumentar a sensibilidade da técnica. A expectativa é realizar um mapeamento 2D de cortes histopatológicos, auxiliando o patologista a determinar de maneira mais precisa os grupos prognósticos dos pacientes a partir de informações quantitativas da composição bioquímica do tecido prostático.

Um outro desdobramento deste projeto de integração entre a Física e a Medicina é a colaboração com o laboratório de Biofotônica do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da UFMG, que utiliza processos ópticos não lineares, como exemplo a microscopia por Segundo Harmônico, como ferramenta diagnóstica de doenças.

6 REFERÊNCIAS

- A MOLCKOVKSY, et al. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 57, p. 396-402, 2003.
- AIHARA, M. et al. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. **Urology**, v. 43, p. 60-66, 1994.
- ALLSBROOK, W. C. et al. Interobserver reproducibility of gleason grading of prostatic carcinoma: general pathologist. **Hum Pathol**, p.81-88. 2001
- ANDRIOLE GL, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. **N Engl J Med.**, v. 13, n. 360, p. 1310-1319, 2009.
- AUNER , A. W. et al. Conclusions and data analysis: a 6-year study of Raman spectroscopy of solid tumors at a major pediatric institute. **Pediatr Surg Int**, v. 29, p. 129-40, 2013.
- AYALA, G. et al. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 4792-4801, 2003.
- BAISDEN, B. L.; KAHANE, H.; EPSTEIN, J. I. Perineural invasion, mucinous fibroplasia, and glomerulations: Diagnostic features of limited cancer on prostate needle biopsy.. **Am. J. Surg. Pathol.** , v. 23, p. 918-924, 1999.
- BANDEIRA, C.S.; **Espectroscopia FT-Raman na diferenciação entre melanoma cutâneo e nevo pigmentado**: Universidade Federal de São Paulo, p.116, 2007.
- BARMAN, I. **Unraveling the puzzles of spectroscopy-based non-invasive blood glucose detection**. [S.l.]: Massachusetts Institute of Technology, p.252, 2011.
- BARMAN, I. et al. Application of Raman spectroscopy to identify microcalcifications and underlying breast lesions at stereotactic core needle biopsy. **Cancer Research**, v. 73, p. 3206–3215, 2013.
- BELJEBBAR , A. et al. Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, p. 477-87, 2010.
- BERGHOLT , M. S. et al. Characterizing variability in in vivo Raman spectra of different anatomical locations in the upper gastrointestinal tract toward cancer detection. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, p. 037003–037010, 2011.
- BERGHOLT, M. S. et al. Fiber-optic Raman spectroscopy probes gastric carcinogenesis in vivo at endoscopy. **J Biophotonics**, v. 6, p. 49-59, 2013.

- BILL-AXELSON, A.; AL, E. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. **N. Eng. J. Med.** , v. 100, p. 1977-1984, 2005.
- BREEUWSMA, A. J. et al. In vivo uptake of [11C]choline does not correlate with cell proliferation in human prostate cancer. **European Journal of Nuclear Medicine Molecular Imaging**, v. 32, p. 668-673, 2005.
- BROZEK-PLUSKA , B. et al. Raman spectroscopy and imaging: applications in human breast cancer diagnosis. **Analyst**, v. 137, p. 3773-3780, 2012.
- CAO, A. et al. A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence. **J. Raman Spectrosc.**, v. 38, p. 1199–1205, 2007.
- CAPUTO , L. G.; BITIRANA, L. D. B.; MANSO, P. P. D. A. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratrios de Saúde. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, p. 93-188, 2009.
- CARSTENS, P. H. Perineural glands in normal and hyperplastic prostates. **J. Urol.** , v. 123, p. 686-688, 1980.
- CHAD , A. L.; HUAWEN, W.; YANG, W. Tissue measurement using 1064 nm dispersive Raman spectroscopy. **Proc. of SPIE**, v. 8572 , p. 857212-4, 2013.
- CRAWFORD, E. D.; THOMPSON , I. M. Controversies regarding screening for prostate cancer. **BJU Int.** , v. 100, p. 5-7, 2007.
- CROW, P. et al. The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 106-108, 2003.
- CROW, P. et al. Assessment of fiberoptic near-infrared raman spectroscopy for diagnosis of bladder and prostate cancer. **Urology**, v. 65, n. 6, p. 1126-1130, jun 2005.
- DEVPURA, S. et al. Detection of benign epithelia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer regions in radical prostatectomy tissues using Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 53, p. 227-232, 2010.
- DIVRIK, R. T. et al. Increasing the number of biopsies increases the concordance of Gleason scores of needle biopsies and prostatectomy specimens. **Urol Oncol**, v. 25, n. 5, p. 376-382, 2007.
- DJAVAN B, et al. Prospective evaluation of prostate cancer detected on biopsies 1, 2, 3 and 4: when should we stop? **J Urol**, v. 5, n. 166, p. 1679-1683, 2001.
- DORR, V. J.; WILLIAMSON, S. K.; STEPHENS , R. L. An evaluation of prostate-specific antigen as a screening test for prostate cancer. **Arch Intern Med**, n. 153, p. 2529, 1993.
- EGEVAD, L. et al. Prognostic value of the Gleason score in prostate cancer. **British Journal of Urology** , Edinburgh, 538-542, 2002.

- EHRENTREICH, F.; SUMMCHEN, L. Spike Removal and Denoising of Raman Spectra by Wavelet Transform Methods. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 4364-4373, 2001.
- EPSTEIN, J. I. et al. The 2005 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma. **Am J Surg Pathol.**, p.1228-12242, 2005.
- FANG, F.; KEATING, N. L.; MUCCI, L. A. Immediate risk of suicide and cardiovascular death after a prostate cancer diagnosis: cohort study in the United States. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, p. 307-314, 2010.
- FAOLÁIN, E. Ó. et al. Raman Spectroscopic Evaluation of Efficacy of Current Paraffin Wax Section Dewaxing Agents. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 121-129, 2005.
- FAOLAIN, O. et al. A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 38, p. 121–127, March 2005.
- FRANK, C. J.; MCCREERY, R. L.; REDD, D. C. Raman Spectroscopy of Normal and Diseased Human Breast Tissues. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 777-783, 1995.
- GARDINER, D. J.; GRAVES, P. R. **Practical Raman Spectroscopy**. [S.l.]: Springer, 1989.
- GARETH, J. et al. **An Introduction to Statistical Learning with applications in R**. New York: Springer, 2013.
- GNIADOCKA, M. et al. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. **J Invest Dermatol**, v. 122, p. 443-449, 2004.
- GOODMAN, M. et al. Frequency and determinants of disagreement and error in Gleason scores: a population-based study of prostate cancer. **Prostate**, v. 72, n. 13, p. 1389-1398, 2012.
- GOODMAN, M. et al. Frequency and determinants of disagreements and error in gleason scores: a population -based study of prostate cancer. **Prostate**, v. 72, n. 12, p. 1389-1398, 2012.
- H.G.M. EDWARDS, et al. Potential Applications of FT-Raman Spectroscopy for Dermatological Diagnostics. **Journal of Molecular Structure**, v. 347, p. 379-388, 1995.
- HAKA, A. S.; VOLYNSKAYA, Z.; GARDECKI, J. A. In vivo Margin Assessment During Partial Mastectomy Breast Surgery Using Raman Spectroscopy. **Cancer Research**, v. 66, p. 3317–3322, 2006.
- HAMILTON W, S. D. Symptomatic diagnosis of prostate cancer in primary care: a structured review. **Br J Gen Pract.**, n. 54, p. 617-621, 2004.
- HANLON, E. B. et al. Prospects for in vivo Raman Spectroscopy. **Phys. Med. Biol.**, v. 45, p. R1-59, 2000.

- HARNDEN, P. et al. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. **Lancet oncology**, London, 2007. 411-419.
- HAYES, J. H.; BARRY, M. J. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. **JAMA**, v. 311, n. 11, p. 1143-1149, 2014.
- HOFFMAN, R. W. Screening for prostate cancer , 2014. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/screening-for-prostate-cancer>>. Acesso em: 19 setembro 2014.
- HOLMSTRÖM B, et al. Prostate specific antigen for early detection of prostate cancer: longitudinal study. **BMJ**, n. 339, p. 3537, 2009.
- INCA , 2015. Disponível em: <<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>>. Acesso em: 22 Dezembro 2015.
- JADVAR, H. et al. Choline autoradiography of human prostate cancer xenograft: effect os castration. **Molecular Imaging**, v. 7, p. 147-152, 2008.
- JUNQUEIRA, C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.
- KAST , R. et al. Differentiation of small round blue cell tumors using Raman spectroscopy. **J Pediatr Surg**, v. 45, p. 1110-1114., 2010.
- KAST, E. et al. Emerging technology: applications of Raman spectroscopy for prostate cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 33, p. 673–693, 2014.
- KAST, R. E. et al. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model. **Biopolymers**, v. 66, p. 235-41, 2008.
- KAST, R. E. et al. Emerging technology: applications of Raman spectroscopy for prostate cancer. **Cancer Metastasis Review**, p. 673–693, 2014.
- KHARAZMI E, F. M. S. K. H. K. Familial risk of early and late onset cancer: nationwide prospective cohort study. **BMJ**, n. 345, p. e8076, 2012.
- KIRSCH , M. et al. Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1707–1713, 2010.
- KOTE-JARAI Z, et al. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. **Br J Cancer**, v. 8, n. 105, p. 1230-1234, 2011.

- KRYCER, J. R.; BROWN, A. J. Cholesterol accumulation in prostate cancer: A classic observation from a modern perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on cancer**, v. 1835, p. 219-229, 2013.
- LI, et al. Raman Spectroscopy for In-Line Water Quality Monitoring — Instrumentation and Potential. **Sensors**, v. 14, n. 9, p. 17275-17303, 2014.
- LOEB S, et al. Systematic review of complications of prostate biopsy. **Eur Urol**, v. 6, n. 64, p. 876-892, 2013.
- LOEB, ; MONTORSI, F.; CATTO, J. W. Future-proofing Gleason grading: What to call Gleason 6 prostate cancer?. **European Urology** , v. 68, p. 1-2, 2015.
- LU-YAO, G. L.; FRIEDMAN, M.; YAO, S. L. Use of radical prostatectomy among Medicare beneficiaries before and after the introduction of prostate specific antigen testing. **J. Urol.** , n. 157, p. 2219, 1997.
- LU-YAO, G. L.; GREENBERG, E. R. Changes in prostate cancer incidence and treatment in USA. **Lancet**, v. 343, p. 251, 1994.
- MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. Raman Spectroscopy for the Detection of Cancers and Precancers. **Journal of Biomedical Optics**, v. 1, p. 31-70, 1996.
- MCCREERY, R. L. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. New York: John Wiley & Sons, 2000.
- MCINTIRE, T. L.; FRANZINI, D. A. The presence of benign prostatic glands in perineural spaces. **J. Urol.** , v. 135, p. 507-509, 1986.
- MCNEAL, J. E. Origin and development of carcinoma in the prostate. **Cancer**, v. 23, p. 24-34, 1969.
- MCNEAL, J. E. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. **J. Urol.** , v. 107, p. 1008-1016, 1972.
- MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **Am. J. Surg. Pathol.** , v. 12, p. 619-633, 1988.
- MEADE, D. et al. Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, p. 1781–1791, 2010.
- MELIA, J. et al. A UK-based investigation of inter- and intra-observer reproducibility of gleason grading of prostatic biopsies. **Histopathology**, v. 48, n. 6, p. 644-654, 2006.
- MELLINGER , G. T.; GLEASON , D.; BAILAR, J. The histology and prognosis of prostatic cancer. **Journal of Urology**, p.331-367, 1967.
- MIN, Y.-K. et al. 1064nm near-infrared multichannel Raman spectroscopy of fresh lung tissues. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, p. 73-76, 2005.

- MISTRY K, C. G. Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. **J Am Board Fam Pract**, v. 2, n. 16, p. 95-101, 2003.
- MOREIRA, L. M.; SILVEIRA, L. J.; SANTOS, F. V. Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis. **Spectroscopy**, v. 22, p. 1-19, 2008.
- MOSTOFI, F. K.; SESTERHENN, I. A.; DAVIS JR, C. J. A pathologist's view of prostatic carcinoma. **Cancer**, v. 50, p. 906-932, 1993.
- MOYER, V. Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, p.120-134, 2012.
- MURPHY, G. P.; PARKINSON, C.; AL, E. Histopathology of localized prostate cancer. Consensus conference on diagnosis and prognostic parameters in localized prostate cancer. **Scand. J. Uro. Nephrol. Suppl.**, v. 162, p. 7-42, 1994.
- NIJSSEN, A. et al. Discriminating basal cell carcinoma from perilesional skin using high wave-number Raman spectroscopy. **J. Biomed. Opt.**, v. 12, p. 034004, 2007.
- OZAKI, Y. Medical application of Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 24, n. 3, p. 259-312, 1988.
- P. J. CASPERS, et al. Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 572-580, 2003.
- PATEL, I. I.; MARTIN, F. L. Discrimination of zone-specific spectral signatures in normal human prostate using Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3060-3069, 2010.
- PIERORAZIO, P. M. et al. Prognostic gleason grade grouping: data based on the modified gleason scoring system. **British Journal of Urology int**, p.753-760, 2013.
- POTOSKY , A. L. et al. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. **JAMA**, n. 273, p. 548, 1995.
- RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new type of secondary radiation. **Nature**, v. 121, p. 501-502, 1928.
- RIES, L. A. et al. **Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001 Patient and Tumor Characteristics**. [S.l.]. 2007.
- ROSARIO DJ, et al. Short term outcomes of prostate biopsy in men tested for cancer by prostate specific antigen: prospective evaluation within ProtecT study. **BMJ**, n. 344, p. 7894, 2012.
- ROSS, A.; D'AMICO, A. V.; FREEDLAND, S. Molecular prognostic tests for prostate cancer. **UpToDate**, 2014. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/molecular-prognostic-tests-for-prostate-cancer>>. Acesso em: 25 Novembro 2014.
- SALA, O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho. São Paulo: Unesp, 1995.

- SALLES, P. G. Estudo anatomopatológico de biopsias ecoguiadas e peças cirúrgicas de prostatectomia radical e correlação com o PSA. Tese (Doutorado em Medicina). ed. Belo Horizonte: UFMG, p.166, 2010.
- SCHRADER, B. Infrared and Raman Spectroscopy - Methods and applications. Weinheim: VHC, 1995.
- SCHRÖDER FH, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. **N Engl J Med.**, v. 13, n. 360, p. 1320-1328, 2009.
- SHAH, R. B. Current perspectives on the gleason grading of prostate cancer. **Arch. Pathol. Lab. Med.** , Chicago, p.1810-1816, 2009.
- SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin.**, v. 1, n. 64, p. 9-29, 2014.
- SINGH, B.; MOHAN, S. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, June 2015.
- SMEKAL, A. **Naturwiss P873**. [S.l.]: Academic Press, 1923.
- SMITH, E.; DENT, G. Modern Raman Spectroscopy - A practical approach. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.
- STAMEY, T. A. et al. Preoperative serum prostate specific antigen levels between 2 and 22ng/ml correlate poorly with post-radical prostatectomy cancer morphology: prostate specific antigen cure rates appear constant between 2 and 9 ng/ml. **J. Urol.** , v. 167, p. 103-111, 2002.
- STAV, K. et al. Does prostate biopsy Gleason score accurately express the biologic features of prostate cancer?. **Urol Oncol**, v. 25, n. 5, p. 383-386, 2007.
- STEUBER, T.; O'BRIEN , M. F.; LILJA, H. Serum markers for prostate cancer: a rational approach to the literature. **Eur. Urol.** , v. 54, p. 31-40, 2008.
- STONE N., et al. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** , v. 387, p. 1657-1668, 2007.
- STONE, N. et al. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies. **Analytical and bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1657-1668, 2007.
- STONE, N. et al. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies. **Anal Bioanal Chem**, v. 387, n. 5, p. 1657-1668, Mar 2007.
- STONE, N.; CROW, P. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers, v. 33, n. 7, p. 564-573, 2002.

- SZYMANSKI, H. A. Raman Spectroscopy, theory and practice. New York: Plenum, 1967.
- SYNYTSYA, A. et al. Raman spectroscopy at different excitation wavelengths (1064, 785 and 532 nm) as a tool for diagnosis of colon cancer. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.45, p. 903–911, 2014.
- TSIVIAN, M.; SUN, L.; MOURAVIEV, V. . E. A. Changes in gleason score grading and their effect in predicting outcome after radical prostatectomy. **Urology**, p.1090-1093, 2009.
- UEMURA, H. et al. Usefulness of the 2005 international society of urologic pathology gleason grading system in prostate biopsy and radical prostatectomy specimens. **British Journal of Urology int.** , p.1190-1194, 2009.
- VELCHETI V, et al. Pathogenesis of prostate cancer: lessons from basic research. **Ochsner J.**, v. 4, n. 8, p. 213-218, 2008.
- VELOSO, S. G. et al. Interobserver agreement of gleason score and modified gleason score in needle biopsy and in surgical specimen of prostate cancer. **Int Braz J Urol**, v. 33, n. 5, p. 639-646, 2007.
- WALTER LC, et al. Five-year downstream outcomes following prostate-specific antigen screening in older men. **JAMA Intern Med**, v. 10, n. 173, p. 866-873, 2013.
- WHEELER, T. M. Anatomic considerations in carcinoma of the prostate. **Urol. Clin.** , v. 16, p. 623-634, 1989.
- YANAGISAWA , N. et al. Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after prostatectomy. **Hum Pathol** , v. 38, p. 1611-1620, 2007.
- ZAKIAN, K. L. et al. 1H magnetic ressonance spectroscopy of prostate cancer: biomarkers of tumor characterization. **Cancer biomarkers**, v. 4, p. 263-276, 2008.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I – Comitê de Ética da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel do PET/CT com 18F-FDG e 18F-colina nos pacientes com câncer de próstata

Pesquisador: Marcelo Henrique Mamede Lewer

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 09288112.0.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA ((UFMG))

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 200.406

Data da Relatoria: 31/01/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental a ser desenvolvido no Hospital das Clínicas da UFMG e na Faculdade de Medicina da UFMG. A amostra engloba 300 participantes adultos, atendidos pelo grupo de Urologia do HC-UFMG, divididos em três grupos de 100 pacientes cada: (1) pacientes com suspeita de câncer de próstata; (2) pacientes candidatos ao tratamento cirúrgico curativo para câncer próstata de alto risco e não metastático; e (3) pacientes com câncer de próstata submetidos à ressecção cirúrgica da próstata, que apresentarem aumento progressivo dos níveis séricos de PSA. Todos os pacientes serão avaliados quanto à extensão da doença através de exames clínico, laboratoriais e de imagem convencionais, rotineiramente solicitados no estadiamento pré-operatório ou no reestadiamento. Após assinatura de TCLE, os participantes serão encaminhados ao Centro de Imagem Molecular da FM-UFMG para a realização do estudo com tomografia por emissão de pósitrons (PET) utilizando os radiotraçadores 18F-FDG e 18F-colina. Amostras tumorais serão coletadas e armazenadas durante o a ressecção cirúrgica do tumor. Estas amostras serão utilizadas para: (1) estudos moleculares de possíveis preditores de prognóstico oncológico, PTEN e PCA-3; (2) estudos genéticos; e (3) pesquisa de fatores patológicos com valor prognóstico, incluindo: tipo histológico da neoplasia, grau de diferenciação, extensão extraprostática, invasão da vesícula seminal, invasão perineural, invasão vascular e margens cirúrgicas, tamanho, localização, grau de invasão tumoral, número de tumores e metástases regionais linfonodais. Pelo exposto a metodologia é clara.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Objetivo da Pesquisa:

Objetivos Primários:

- Verificar os achados do 18F-FDG e do 18F-colina PET/CT na determinação do foco neoplásico em pacientes com biópsia transretal guiada por US negativa para câncer, mas com suspeita de malignidade;
- Verificar os achados do 18F-FDG e do 18F-colina PET/CT em pacientes com câncer de próstata confirmado histopatologicamente em 2 cenários: no estadiamento de pacientes de alto risco e no reestadiamento de pacientes com recidiva bioquímica mínima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto é claro quanto aos riscos e benefícios para os sujeitos. O compromisso do pesquisador quanto à publicação dos resultados, ao uso/destino do material e/ou dados coletados está bem explicitado. Os critérios para a interrupção/suspensão da pesquisa são claros. O projeto tem um orçamento de R\$ 10.000,00 e será custeado com financiamento próprio.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto visa basicamente investigar o potencial de novos métodos de imagem, em especial o PET/CT, no manejo de pacientes com Câncer de Próstata. O projeto está bem descrito, tem grande relevância para o avanço científico na área de Ciências da Saúde e será desenvolvido por pesquisador com grande experiência na área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIA:

DOCUMENTAÇÃO APRESENTADA CORRETAMENTE: Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do CONEP; Protocolo de Pesquisa da Plataforma Brasil; Projeto de Pesquisa detalhado; Protocolo de Submissão do projeto ao DEPE do HC-UFMG; Parecer consubstanciado do Departamento de Anatomia e Imagem da Faculdade de Medicina da UFMG, Carta de Anuência do Centro de Imagem Molecular da FM-UFMG; Carta de Anuência do Serviço de Urologia do HC-UFMG; Carta de Anuência do Hospital Luxemburgo.

TCLE: Foram apresentados três TCLE, sendo um para cada grupo de participantes. Os TCLE estão adequados à resolução 196 do CNS.

Recomendações:

SMJ, somos pela aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Após atendimento das diligências, não há mais pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 20 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

7.2 ANEXO II - Código de programação da análise dos dados

```

##Preparando data frame##
#Listando arquivos contendo dados e iniciando dataframe#
files = list.files()
data = read.table(files[1],header=FALSE,sep='      ')
colnames(data) =c('shift',files[1])
#gravando restante dos arquivos em 'data'#
for (i in seq(2,length(files),1)){
    new = read.table(files[i],header=FALSE,sep='      ')
    data[,i+1]= new[,2]
    colnames(data)[i+1] = files[i]
}
###Preparando a matriz que receberá a media ###
#numero de amostras + 1 (shift)#
final = matrix(0,length(files)/2+1,nrow=1851)
final = data.frame(final)
final[,1]=data[,1]
#5 primeiras letras do nome do arquivo#
sample_name = substr(files,1,5)
s_name = vector('character',length=38)
for (i in seq (2,76,2)){s_name[i/2] = sample_name[i]}
colnames(final)=c("shift",s_name)
##Calculando a média das medidas >> 2 medidas para cada amostra##
p = 2
for (i in seq(2,length(files),2)){
    x = mapply(sum,data[,i],data[,i+1])
    x = x/2
    final[,p]=x
    p = p+1
}
## Normalizando pelo pico amida I proximo de 1658cm-1 / corrigir numero de amostras ##
N = final[1009,]
final_N = matrix(0,ncol=39,nrow=1851)
final_N = data.frame(final_N)
colnames(final_N) = colnames(final)
final_N[,1] = final[,1]
for(i in seq (2,39,1)){
final_N[,i] = final[,i]/N[1,i]
}

```

```

## Criando matriz por categoria malignas e benignas##
benignas = matrix(0,ncol=15,nrow=1851)
benignas = data.frame(benignas)
benignas = final_N[,which(names(final_N) %in% c("shift","1AE7_",
"2AE1_","2BE1_","2BE2_","3TE2_","4TD2_","5BD7_","5BE2_","6BD1_",
"6BE2_","6BE4_","6TE2_","6TE3_","7BE2_"))]
malignas = matrix(0,ncol=25,nrow=1851)
malignas = data.frame(malignas)
malignas = final_N[,-which(names(final_N) %in% c("1AE7_",
"2AE1_","2BE1_","2BE2_","3TE2_","4TD2_","5BD7_","5BE2_","6BD1_",
"6BE2_","6BE4_","6TE2_","6TE3_","7BE2_"))]

##Calculando a média e SD para benignas##
Mean_b = rowMeans(benignas[,c(2:15)])
sum_sq = vector(mode='numeric',length=1851)
for(i in seq(2,15,1)){
sum_sq = sum_sq + (benignas[,i] - Mean_b)^2
}
SD_b = sqrt(sum_sq/14)
SE_b = SD_b/sqrt(14)
benignas_perc = matrix(0,ncol=5,nrow=1851)
benignas_perc = data.frame(benignas_perc)
colnames(benignas_perc) = c('shift','p50%','p95%','p5%','media')
benignas_perc[,1] = benignas[,1]
benignas_perc[,5] = Mean_b
for (i in seq(1,1851,1)){
h = quantile(benignas[i,2:15],probs=c(0.5,0.90,0.1))
benignas_perc[i,2] = h[1]
benignas_perc[i,4] = h[3]
benignas_perc[i,3] = h[2]
}
g1 = benignas_perc
ggplot(g1, aes(x = shift, y = media)) +
ylab('intensidade (u.a.)'+ xlab('Shift (cm-1)')+
scale_x_continuous(breaks = scale)+
scale_y_continuous(breaks = c(0,1,2,3,4,5,6))+
ggtitle('Espalhamento das amostras benignas')+
annotate("text", x = 2500, y = 6, label = "Legenda")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.7, label = "Média")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.4, label = "Mediana")+

```

```

annotate("text", x = 2500, y = 5.1, label = "p10% - p90%")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.7, yend = 5.7, size= 2, colour = "black")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.4, yend = 5.4, size= 2, colour = "red")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.1, yend = 5.1, size= 2, colour = "grey70")+
geom_ribbon(aes(x = shift, ymax= g1[,4] , ymin= g1[,3] ), fill="grey70")+
geom_line(size=1.0)+
geom_line(aes(x=shift,y = g1[,2]), colour = 'red')+
geom_line()

```

##Calculando a média e SD para malignas##

```

Mean_m = rowMeans(malignas[,c(2:25)])
sum_sq = vector(mode='numeric',length=1851)
for(i in seq(2,25,1)){
sum_sq = sum_sq + (malignas[,i] - Mean_m)^2
}
SD_m = sqrt(sum_sq/24)
SE_m = SD_m/sqrt(24)
malignas_perc = matrix(0,ncol=5,nrow=1851)
malignas_perc = data.frame(malignas_perc)
colnames(malignas_perc) = c('shift','p50%','p90%','p10%','media')
malignas_perc[,1] = malignas[,1]
malignas_perc[,5] = Mean_m
for (i in seq(1,1851,1)){
h = quantile(malignas[i,2:25],probs=c(0.5,0.90,0.1))
malignas_perc[i,2] = h[1]
malignas_perc[i,4] = h[3]
malignas_perc[i,3] = h[2]
}
g1 = malignas_perc
ggplot(g1, aes(x = shift, y = media)) +
ylab("intensidade (u.a.)")+ xlab("Shift (cm-1)")+
scale_x_continuous(breaks = scale)+
scale_y_continuous(breaks = c(0,1,2,3,4,5,6))+
ggtitle("Espalhamento das amostras malignas")+
annotate("text", x = 2500, y = 6, label = "Legenda")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.7, label = "Média")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.4, label = "Mediana")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.1, label = "p10% - p90%")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.7, yend = 5.7, size= 2, colour = "black")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.4, yend = 5.4, size= 2, colour = "red")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.1, yend = 5.1, size= 2, colour = "grey70")+

```

```
geom_ribbon(aes(x = shift, ymax= g1[,4] , ymin= g1[,3] ), fill="grey70")+
geom_line(size=1.0)+
geom_line(aes(x=shift,y = g1[,2]), colour = 'red')+
geom_line()
```

```
##Grafico comparando benignas e malignas simultaneamente##
```

```
benignas_malignas = cbind(benignas_perc,malignas_perc)
colnames(benignas_malignas) = c('shift','b_p50%','b_p90%','b_p10%',
'b_media','shift','m_p50%','m_p90%','m_p10%','m_media')
g1 = benignas_malignas
ggplot(data = g1) +
geom_ribbon(aes(x = shift, ymax= g1[,3] , ymin= g1[,4],alpha=0.1), fill="royalblue1")+
geom_ribbon(aes(x = shift, ymax= g1[,8] , ymin= g1[,9],alpha=0.1), fill="tomato1")+
geom_line(aes(x=shift, y = b_media), colour = 'blue', size = 1.0)+
geom_line(aes(x=shift, y = m_media), colour = 'red', size = 1.0)+
annotate("text", x = 2500, y = 6, label = "Legenda")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.7, label = "media benignas")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.4, label = "media malignas")+
annotate("text", x = 2500, y = 5.1, label = "p10%-90% benignas")+
annotate("text", x = 2500, y = 4.8, label = "p10%-90% malignas")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.7, yend = 5.7, size= 2, colour = "blue")+
annotate("segment", x = 2700, xend = 2800, y = 5.4, yend = 5.4, size= 2, colour = "red")+
      annotate("segment", x = 2725, xend = 2775, y = 5.1, yend = 5.1, size= 8, colour =
"steelblue2")+
annotate("segment", x = 2725, xend = 2775, y = 4.8, yend = 4.8, size= 8, colour = "lightsalmon1")+
ggtitle('Espalhamento comparativo entre benignas e malignas')+
ylab('intensidade (u.a.)'+ xlab('shift (cm-1)')+
scale_x_continuous(breaks = scale)+
scale_y_continuous(breaks = c(0,1,2,3,4,5,6))
```

```
## Determinando o modulo da difereça entre espectros malignos e benignos##
```

```
diff = abs(g1[,5] - g1[,10])
D = cbind(g1[,1],diff)
plot(D, pch = 20, main = "Módulo da diferença entre média_benignas e média_malignas",
xlab = "shift (cm-1)", ylab = "Modulo da diferença (u.a.)", xaxt = 'n')
axis (1, at = seq(0,3600,200))
abline(h = 0, lwd = 3, col = 'red')
rect(700, -0.1, 1050, 0.22, col = rgb(1,0,1, alpha=0.2))
rect(1150, -0.1, 1750, 0.22, col = rgb(1,0,1, alpha=0.2))
text(x = 3200, y = 0.2, label = "Legenda")
text(x = 3350, y = 0.19, label = "Região utilizada do espectro")
```

```

rect(3600, 0.185, 3675, 0.195, col = rgb(1,0,1, alpha = 0.2))
plot(D, pch = 20, main = "Módulo da diferença entre média_benignas e média_malignas utilizando
mesma escala dos graficos espectrais",
xlab = "shift (cm-1)", ylab = "Modulo da diferença (u.a.)", xaxt = 'n',
ylim = c(0,6))
axis (1, at = seq(0,3600,200))
abline(h = 0, lwd = 3, col = 'red')
rect(700, -0.1, 1050, 0.22, col = rgb(1,0,1, alpha=0.2))
rect(1150, -0.1, 1750, 0.22, col = rgb(1,0,1, alpha=0.2))
text(x = 3200, y = 5, label = "Legenda")
text(x = 3350, y = 4.75, label = "Região utilizada do espectro")
rect(3600, 4.6, 3675, 4.9, col = rgb(1,0,1, alpha = 0.2))

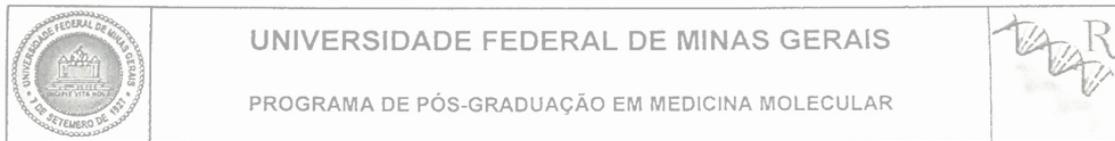
## Construindo boxplot##
Uni = cbind(benignas,malignas[,2:25])
Uni1 = Uni[c(1473,1428,1380,1046),]
c764 = as.numeric(Uni1[1,c(2:39)])
c851 = as.numeric(Uni1[2,c(2:39)])
c943 = as.numeric(Uni1[3,c(2:39)])
c1587 = as.numeric(Uni1[4,c(2:39)])
shift = c(replicate(38,'764'),replicate(38,'851'),replicate(38,'943'),replicate(38,'1587'))
intensidade = c(c764,c851,c943,c1587)
ddx = c(replicate(14,'benigna'),replicate(24,'maligna'))
diagnostico = c(ddx,ddx,ddx,ddx)
BP = cbind(shift,intensidade,diagnostico)
BP = data.frame(BP)
BP$intensidade = as.numeric(as.character(BP$intensidade))
boxplot(intensidade ~ diagnostico*shift, data=BP, pch =20,
col=(c("blue","red")),font.lab = 3,
main="Boxplot dos 4 Raman shifts que apresentaram maior diferença entre os grupos diagnosticos",
xlab="Grupo diagnostico e shift(cm-1)",
ylab="Intensidade (u.a.)")

##Analise PCA##
x = cbind(benignas,malignas[,2:25])
x1 = x[x[,1] > 700,]
x1 = x1[x1[,1] < 1050,]
x2 = x[x[,1] > 1150,]
x2 = x2[x2[,1] < 1700,]
analise = rbind(x1,x2)
analise[,1] = round(analise[,1])
names = analise[,1]

```

```
analise_t = t(analise)
colnames(analise_t) = names
analise_t = analise_t[-c(1),]
ddx = c(replicate(14,'benignas'),replicate(24,'malignas'))
library(devtools)
library(ggbiplot)
bm.ddx = ddx
bm = analise_t
bm.pca = prcomp(bm,center=TRUE,scale=FALSE)
print(bm.pca)
plot(bm.pca)
summary(bm.pca)
g <- ggbiplot(bm.pca, obs.scale = 0, var.scale = 0,
groups = bm.ddx, ellipse = TRUE,
circle = FALSE, ellipse.prob = 0.95,varname.size=0, var.axes=FALSE)
g <- g + scale_color_discrete(name = "")
g <- g + theme(legend.direction = 'horizontal',
legend.position = 'top')
print(g)
```

7.3 ANEXO III – Ata da defesa da dissertação



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO FELIPE LIMA MAGALHÃES

Realizou-se, no dia 24 de maio de 2016, às 09:00 horas, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *ESPECTROSCOPIA RAMAN DA GLÂNDULA PROSTÁTICA: AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES MOLECULARES PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA*, apresentada por FELIPE LIMA MAGALHÃES, número de registro 2014718924, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Marcelo Henrique Mamede Lewer - Orientador (UFMG), Prof(a). Jaqueline dos Santos Soares (UFOP), Prof(a). Paula Vieira Teixeira Vidigal (UFMG), Ana Maria de Paula (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 24 de maio de 2016.

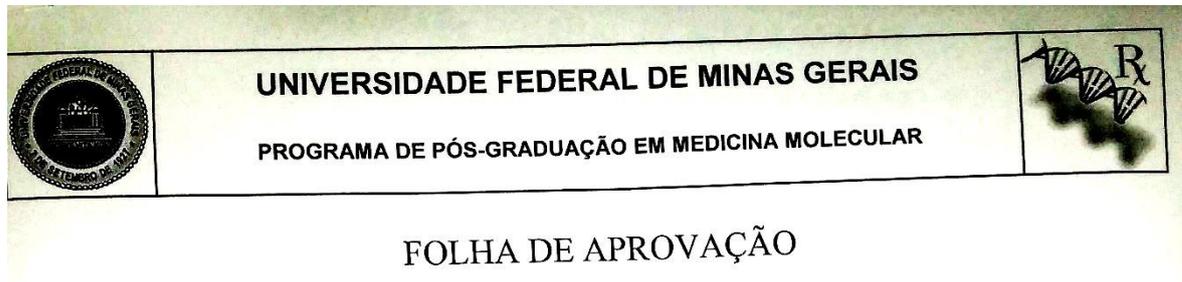

Prof(a). Marcelo Henrique Mamede Lewer (Doutor)


Prof(a). Jaqueline dos Santos Soares (Doutora)


Prof (a) Paula Vieira Teixeira Vidigal


Prof(a). Ana Maria de Paula (Doutora)

7.4 ANEXO IV – Folha de aprovação



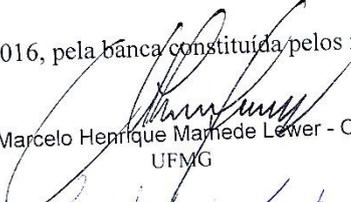
FOLHA DE APROVAÇÃO

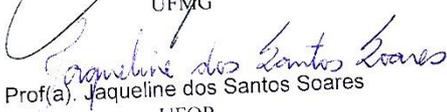
ESPECTROSCOPIA RAMAN DA GLÂNDULA PROSTÁTICA: AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES MOLECULARES PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA

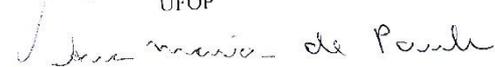
FELIPE LIMA MAGALHÃES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 24 de maio de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Marcelo Henrique Marinho Leber - Orientador
UFMG


Prof(a). Jaqueline dos Santos Soares
UFOP


Prof(a). Ana Maria de Paula
UFMG


Profª Paula Vieira Teixeira Vidigal
UFMG

Belo Horizonte, 24 de maio de 2016.