

Sidney Bandeira Cartaxo

**ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN NA DIFERENCIAÇÃO
ENTRE MELANOMA CUTÂNEO E NEVO PIGMENTADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2008

Sidney Bandeira Cartaxo

**ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN NA DIFERENCIAÇÃO
ENTRE MELANOMA CUTÂNEO E NEVO PIGMENTADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin
Co-orientador: Prof. Dr. Elvio Bueno Garcia

São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Cartaxo, S.B.

Espectroscopia FT-Raman na Diferenciação entre melanoma cutâneo e nevo pigmentado. /Sidney Bandeira Cartaxo. São Paulo, 2007.

xiv, 100 f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. UNIFESP. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

FT-Raman spectroscopy in the differentiation between cutaneous melanoma and pigmented nevus.

1. Melanoma Cutâneo. 2. Espectroscopia FT-Raman. 3. Diagnóstico Comparativo. 4. Saúde Pública.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA PLÁSTICA

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof^a. Dr^a. Lydia Masako Ferreira

Dedico:

Ao meu pai, José Bandeira de Melo, embaixador da paz e da concórdia.

À Laura Cartaxo Bandeira de Melo, sinônimo de dignidade, determinação e fortaleza.

Aos meus filhos: Rodrigo Cartaxo Bandeira de Melo e Paloma Cartaxo Bandeira de Melo, motivação para esta pesquisa.

À companheira, Márcia, pelo apoio.

Agradecimentos

Ciente de que para se desenvolver um estudo, naturalmente, ocorrerá o envolvimento e a contribuição de várias pessoas, nesta oportunidade externo minha gratidão a todos que me deram suporte.

Entretanto, não posso deixar de agradecer, em especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos* e co-orientadores Prof. Dr. *Airton Abrahão Martin* e Prof. Dr. *Elvio Bueno Garcia*;

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação Profa. Dra. *Lydia Masako Ferreira*;

À Profa. *Mílvia Maria Simões e Silva Enokihara*

À Equipe da UNIVAP:

Ao Prof. Dr. *Herculano Martinho*;

M.Sc. Renata Bitar;

Profa. Ana Maria do Espírito Santo;

Carolina Carvalho;

Sheila Moraes;

Carolina Marzullo;

Talita Greco e

Marcella Irigarai

À Equipe da UNIFESP:

Silvana Assis

Marta Silva

Sandra Silva

Joaquim Soares de Almeida – Laboratório de Anatomia Patológica

À minha Equipe Pessoal:

Tieko Neide Higa –secretária

Lucimara Geraldo –secretária

Tânia Morgado – Instrumentadora Cirúrgica

Marcelo Pena – Enfermeiro do Ambulatório de Cirurgia Plástica –
coleta das amostras

Ao Laboratório CIPAX e Corpo Médico

Aos Doutores:

Paulo Guimarães de Castro Júnior e Carlos Alberto Queiroz
Carvalho, que me introduziram na pesquisa.

Ao Físico:

Auzélio Nascimento, pela paciência, desprendimento e apoio durante
as aulas ministradas.

*Ao meu Mestre,
Prof. Dr. Pedro Aníbal Rolon*

Homenagem Póstuma

Ao Prof. Dr. Dino Bandiera.

Ao Dr. Gustavo Riart

À Hilda Ortellado de Riart

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. LITERATURA	5
3.1 PROGRESSÃO TUMORAL EM MELANOMAS	5
3.2 EPIDEMIOLOGIA	6
3.3 FATORES DE RISCO	9
3.4 LESÕES PRECURSORAS	9
3.5 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	13
3.6. ESPECTROSCOPIA RAMAN E O CÂNCER	17
4. MÉTODOS	20
4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	20
4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO PARA AQUISIÇÃO DE AMOSTRAS	20
4.3 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS FT-RAMAN DE MELANOMA, NEVOS E PELE NORMAL	22
4.4 ANÁLISE DOS DADOS	27
4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	28
5. RESULTADOS	29
5.1 <i>BOXPLOT</i>	29
5.2 ANÁLISE UNIVARIADA	33
5.3 ANÁLISE MULTIVARIADA	38
6. DISCUSSÃO	41
6.1 ESTUDOS FUTUROS	50
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS	52
RESUMO	58

<i>SUMMARY</i>	59
APÊNDICES	60
APÊNDICE A – ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN	60
APÊNDICE B - GRÁFICO <i>BOX PLOT</i> RELACIONADO AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PELE NORMAL, MELANOMA PRIMÁRIO E NEVO PIGMENTADO, RESPECTIVAMENTE	72
APÊNDICE C – ESPECTROS DAS UNIDADES AMOSTRAIS	74
ANEXOS	
ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	91
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	93
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - INFORMAÇÕES AO PACIENTE -	98

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(A)	Adenina
(G)	Guanina
(T)	Timina
(U)	Uracila
(C)	Citosina
C	Carbono
Ca	Cálcio
CCD	<i>Charge Couple Device Detector</i>
Cloro	Cl
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Fé	Ferro
FT	Transformada de Fourier
H	Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IR	Infravermelho
K	Potássio
LEVB	Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
MC	Melanoma Cutâneo
Mg	Magnésio
N	Nitrogênio
Na	Sódio
Nd:YAG	Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada
P	Fósforo
Q3	Quartil
RNA	Ribonucléico
S	Enxofre
Ti:Safira	Titânio-Safira
UVA	Ultravioleta – maior parte do espectro – intensidade constante durante o ano
UVB	Ultravioleta – incidência maior durante o verão – são responsáveis pelas queimaduras solares

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	Nevos pigmentados comuns	11
Figura 2	Classificação do melanoma primário de acordo com o grau de invasão Milvia Enokihara	14
Figura 3	Espectro FT-Raman característico de tecido de pele humana normal	19
Figura 4	Peça anatômica apresentando lesão nodular primária de melanoma cutâneo, retirada do fragmento do meio da lesão e tubo identificado para armazenamento da amostra	22
Figura 5	Porta-amostra com amostra sendo ajustada no seu interior	23
Figura 6	Porta-amostra em detalhe	23
Figura 7	Posicionamento dos pontos na amostra	24
Figura 8	Materiais utilizados para preparo das amostras: tubo criogênico, bisturi e lâmina #15; tesoura de Íris, Pinça de Addison com dente, Porta-amostra de alumínio e lâminula de vidro	24
Figura 9	Espectrômetro FT-Raman (Bruker Optics, Alemanha)	25
Figura 10	Gráfico das medidas e percentis 25 e 75 do grupo Pele Normal	30
Figura 11	Gráfico das medidas e percentis 25 e 75 do grupo Nevo Pigmentado	31
Figura 12	Gráfico das medidas e percentis 25 e 75 do grupo Melanoma Primário	32
Figura 13	Distribuição da variável Polissacarídeos em cada grupo estudado	37
Figura 14	Distribuição da variável Tirosina em cada grupo estudado	37
Figura 15	Distribuição da variável Amida I em cada grupo estudado	38
Figura 16	Diferenciação dos grupos por meio das duas funções discriminantes obtidas	40
Figura 17	Formas de Espalhamento	62
Figura 18	Espectro Raman esquemático mostrando os processos Stokes (ν_V); Rayleigh (ν_L) e Anti-stokes (ν_{AS})	63
Figura 19	Modos esquemáticos dos modos de vibração dos átomos	64
Figura 20	Tetracloroeto de carbono (CCl_4)	65
Figura 21	Espectroscopia Raman do CCl_4	66
Figura 22	Esquema do sistema de coleta FT-Raman (Bruker, 1994)	67
Figura 23	Esquema geral do sistema de espectroscopia FT-Raman	68
Figura 24	Gráfico <i>Box Plot</i> relacionado aos grupos experimentais Pele Normal, Melanoma Primário e Nevo Pigmentado, respectivamente, as variações	

	dos modos vibracionais	72
Figura 25	Espectro observado para a primeira unidade amostral do grupo Pele Normal	75
Figura 26	Espectro observado para a segunda unidade amostral do grupo Pele Normal	75
Figura 27	Espectro observado para a terceira unidade amostral do grupo Pele Normal	76
Figura 28	Espectro observado para a quarta unidade amostral do grupo Pele Normal	76
Figura 29	Espectro observado para a quinta unidade amostral do grupo Pele Normal	77
Figura 30	Espectro observado para a sexta unidade amostral do grupo Pele Normal	77
Figura 31	Espectro observado para a sétima unidade amostral do grupo Pele Normal	78
Figura 32	Espectro observado para a oitava unidade amostral do grupo Pele Normal	78
Figura 33	Espectro observado para a nona unidade amostral do grupo Pele Normal	79
Figura 34	Espectro observado para a décima unidade amostral do grupo Pele Normal	79
Figura 35	Espectro observado para a primeira unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	80
Figura 36	Espectro observado para a segunda unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	80
Figura 37	Espectro observado para a terceira unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	81
Figura 38	Espectro observado para a quarta unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	81
Figura 39	Espectro observado para a quinta unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	82
Figura 40	Espectro observado para a sexta unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	82
Figura 41	Espectro observado para a sétima unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	83
Figura 42	Espectro observado para a oitava unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	83
Figura 43	Espectro observado para a nova unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	84

Figura 44	Espectro observado para a décima unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	84
Figura 45	Espectro observado para a décima primeira unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	85
Figura 46	Espectro observado para a décima segunda unidade amostral do grupo Nevo Pigmentado	85
Figura 47	Espectro observado para a primeira unidade amostral do grupo Melanoma Primário	86
Figura 48	Espectro observado para a segunda unidade amostral do grupo Melanoma Primário	86
Figura 49	Espectro observado para a terceira unidade amostral do grupo Melanoma Primário	87
Figura 50	Espectro observado para a quarta unidade amostral do grupo Melanoma Primário	87
Figura 51	Espectro observado para a quinta unidade amostral do grupo Melanoma Primário	88
Figura 52	Espectro observado para a sexta unidade amostral do grupo Melanoma Primário	88
Figura 53	Espectro observado para a sétima unidade amostral do grupo Melanoma Primário	89
Figura 54	Espectro observado para a oitava unidade amostral do grupo Melanoma Primário	89
Figura 55	Espectro observado para a nona unidade amostral do grupo Melanoma Primário	90
Figura 56	Espectro observado para a décima unidade amostral do grupo Melanoma Primário	90

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Frequência, identificação e tipo de estrutura vibracional da pele humana (δ modo de dobramento), (ν modo de estiramento)	19
Tabela 2	Modos vibracionais e biomoléculas relacionadas aos espectros de Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário (modificado de Gniadecka, 2004)	34
Tabela 3	Medidas descritivas das variáveis estudadas, em cada grupo, de 10 modos vibracionais principais relacionados por Gniadecka, 2004	35
Tabela 4	Resultados da comparação entre os grupos (Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário) com relação a cada uma das variáveis que compõem o estudo	36
Tabela 5	Coeficientes das funções discriminantes	39
Tabela 6	Coeficientes das funções de classificação	39

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia que se desenvolve a partir da transformação dos melanócitos expostos ao longo da camada basal da epiderme. No início, a maioria dos melanomas prolifera no sentido lateral à epiderme, sendo o seu potencial metastático reduzido. No entanto, quando as células do melanoma invadem a membrana basal da epiderme e, conseqüentemente, os planos mais profundos da pele, esse potencial cresce, podendo provocar metástase generalizada.

O nevo atípico representa grupo clinicamente heterogêneo de nevo melanocítico, que tende a ser maior (geralmente > 5 mm) do que o nevo comum e tem margens mais mal-definidas.

O melanoma cutâneo, quando removido em seu estágio inicial tem perto de 100 % de chance de cura, por isso, o acerto no diagnóstico é indispensável, podendo variar entre 40 e 80 %, dependendo da especialização do médico. A dificuldade em se diagnosticar o melanoma cutâneo ocorre em virtude da sua semelhança com algumas lesões benignas de pele, como o nevo pigmentado, ceratose seboréica e, mesmo, com o carcinoma basocelular pigmentado.

CORREA NETO (1998), comenta que, hoje, para se confirmar diagnóstico de lesão suspeita, é preciso fazer biópsia, um exame invasivo. Contudo, a biópsia convencional tem algumas limitações, entre elas, a necessidade de remover o tecido a ser analisado; o resultado não é conseguido em tempo real; o armazenamento pode levar a alterações

bioquímicas no tecido biopsiado e, por último, os resultados não fornecem informações sobre as alterações em nível bioquímico que ocorreram com o tecido analisado.

Nos estudos desenvolvidos por HARLAND et al., (2000); KITTLER et al, (2002), ficam evidentes que a criação de técnicas de diagnóstico não-invasivas são relevantes para a detecção precisa do melanoma cutâneo, entre elas: dermatoscopia, ultra-sonografia de alta frequência da pele, espectroscopia de fluorescência, porém, uma metodologia não-invasiva confiável para detecção de melanoma cutâneo ainda não foi definida.

Porém, neste trabalho utilizou-se uma técnica inovadora para o estudo de lesões oncológicas, a biópsia óptica (Espectroscopia FT-Raman), um método que possibilita a informação sobre a estrutura molecular da amostra investigada (RAMAN, KRINHANAN, 1928; EDWARDS et al., 1995; HANLON et al., 2000). BITAR et al., 2006 afirmam, que esta técnica há pouco tempo, destacou-se como um instrumento para investigação não-destrutível de tecidos biológicos. PEREIRA et al., (2004) explica que é uma tecnologia que usa a luz *laser* que pode ser conduzida por fibras ópticas, que possibilitam uma análise não-invasiva da lesão, não sendo necessário remover tecidos ou células, nem fazer preparatório prévio e, o mais importante, o resultado é conseguido em tempo real.

Vários pesquisadores, entre eles, LIU et al., (1992); MIZUNO et al., (1994), HANLON et al., (2000); STONE et al., (2000) têm usado a espectroscopia FT-Raman no aprimoramento da técnica para detecção precisa e minimamente invasiva de vários tumores, como os genitais, cerebrais, mamários e da laringe, mostrando que a transição do tecido

normal para o câncer está associada às diferenças nas estruturas bioquímicas, que são refletidas no espectro de Raman.

Como no melanoma o diagnóstico precoce influencia no tratamento, a Espectroscopia FT-Raman surge como uma possibilidade de prevenção diagnóstica por meio de procedimentos não-invasivos.

2. OBJETIVO

Qualificar os dados espectrais FT-Raman de modo a diferenciar melanoma cutâneo de nevo pigmentado.

3. LITERATURA

3.1 PROGRESSÃO TUMORAL EM MELANOMAS

CHAMAS et al (2003), comentam que os melanomas são as neoplasias malignas de melanócitos que figuram entre os cânceres humanos mais indiferentes a diversos tratamentos. Diferentemente do que vem sendo observado com outros tumores, a incidência de melanomas tem crescido nas últimas décadas.

CLARK Jr., ELDER, GUERRY et al. (1984); CLARK (1991) *apud* OLIVEIRA FILHO (2003), afirmam que a alta mortalidade por melanomas, quando diagnosticados tardiamente, tem estimulado a busca de marcadores de progresso desses tumores, para que se possa diagnosticar a lesão o mais precocemente possível, quando os tratamentos cirúrgicos ainda podem ser curativos.

CLARK JR., REIMER, GREENE et al., (1978); LYNCH, FRICHOT e LYNCH (1978) *apud* Oliveira Filho (2003), informam que, como constatado nos diversos tipos de cânceres, cerca de 10% dos melanomas não oferecem dúvidas quanto ao componente familiar. O fato de ocorrerem síndromes hereditárias que se caracterizam pela maior incidência de melanomas foi primeiramente descrito por Clark e Lynch, em 1978, simultaneamente. Essas famílias apresentavam membros com grande número de nevos comuns e atípicos.

De WIT, van MUIJEN, de WAAL e RUITTER (1996); HENDERSON, FINN (1996) *apud* OLIVEIRA FILHO (2003), publicaram estudos onde afirmam que os nevos podem representar tanto lesões precursoras quanto marcadoras para o desenvolvimento de melanomas. Estima-se que um em cada cinco nevos atípicos progrida para melanoma de crescimento vertical. Sendo assim, a existência de lesão pré-maligna que se transforma em maligna, em cerca de 20% dos casos, justifica a busca de elementos fenotípicos e genotípicos com potencial valor preditivo para o fenômeno da progressão.

3.2 EPIDEMIOLOGIA

FESTA NETO (2004), comenta que o estudo da epidemiologia do melanoma cutâneo (MC) não se limita ao conhecimento de suas taxas de incidência e mortalidade, mas também ao conhecimento de fatores importantes para o seu desenvolvimento.

FESTA NETO (2004), refere que o melanoma é o tumor maligno da pele mais agressivo que existe. Origina-se a partir dos melanócitos que se situam na junção dermoepidérmica; são células dendríticas especializadas na síntese de melanina, que dá a característica marcante desse tumor, a cor escura, na grande maioria das vezes. Pode dar metástase em qualquer parte do corpo (linfonodos, cérebro, pulmões, fígado, osso, tecido gorduroso, etc), colocando em risco a vida do paciente.

Devido ao aumento de sua incidência, atualmente ao redor de 4% ao ano, sua importância epidemiológica tem se acentuado de maneira significativa. Enquanto a maioria dos tumores apresentou aumento na incidência de 48%, no período de 1973 a 1988, o melanoma cresceu 314% nesse mesmo período, no mundo (FESTA NETO, 2004).

A incidência do melanoma cresce em todo o mundo, sendo estimado que um em cada 57 norte-americanos terá diagnóstico de melanoma no futuro. A taxa de mortalidade também tem-se elevado, mas em contrapartida, a sobrevivência está melhorando. Uma das explicações para esta aparente contradição é que o diagnóstico tem sido realizado mais precocemente.

3.2.1 Incidência

No Brasil, segundo o INCA (2002), a incidência do melanoma é variável, indo de 1,9 a 4,4/100.000 habitantes nos homens e de 1 a 4/100.000 habitantes nas mulheres, dependendo da região. As taxas menores são as das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste e as maiores são das regiões Sudeste e Sul.

Sua letalidade é elevada, porém, sua incidência é baixa (2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres).

BAKOS (1991); LUCAS, DEPS, LIMA et al. (1994); FERNANDES, CARDOSO, MACEIRA e PEREZ (1996); CRIADO, VASCONCELLOS, SITTART et al. (1999); MAIA (2002), constataram

que o MC é mais freqüente em adultos jovens, dos 20 aos 50 anos de idade. Acima dos 50 anos, é mais comum nos homens e abaixo dos 40, nas mulheres. Estudos nacionais sobre o assunto apontam a idade média em torno de 58 anos.

Quanto ao gênero, é variável. É maior nas mulheres que nos homens em áreas geográficas de menor insolação e menor incidência tumoral, entretanto, na Austrália onde a incidência é alta, a proporção é praticamente igual.

Dados isolados demonstraram a predominância é no gênero feminino. A composição racial e étnica do país apresentaram algumas peculiaridades aos indivíduos com MC. Observou-se, com certa freqüência, a manifestação em idades mais avançadas, quantidade maior de não-brancos e porcentagem elevada de melanomas do tipo acrolentiginoso, se comparada com literatura internacional (MAIA, 2002).

MOLIFE, LORIGAN, MACNEIL (2001), encontraram em sua pesquisa que, no que se refere à mortalidade, evidências epidemiológicas sustentam o fato de que a sobrevida de portadores de melanoma é maior para o gênero feminino do que para o masculino.

No Brasil, estima-se que o melanoma cutâneo foi responsável, no ano de 2006, por 5.760 novos casos (INCA, 2006).

3.3 FATORES DE RISCO

Quanto aos fatores de risco, observa-se que desenvolvimento do melanoma cutâneo se deve à combinação dos fatores endógenos, constitucionais e hereditários (genotípicos e fenotípicos) do ser humano, com os fatores exógenos ou ambientais.

Para GREENE, CLARK, TUCKER et al. (1985), a epidemiologia demonstra que um dos maiores riscos para o desenvolvimento do MC é a presença de grande número de nevos atípicos ou nevos melanocíticos benignos.

3.4 LESÕES PRECURSORAS

PASCHOAL, ENOKIHARA (2003), lembram que o melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna derivada do melanócito, sendo assim, é inevitável supor que qualquer célula de linhagem melanocítica guarde dentro de si potencial de se transformar em célula maligna. Logo, todas as lesões de pele constituídas por células melanocíticas apresentam, em tese, risco de originar melanoma, sendo por isso, consideradas lesões precursoras.

CLARK et al. (1984), em estudo precursor, postularam, de maneira genérica, cinco estágios de progressão tumoral do sistema melanocítico,

baseados na clínica, na histopatologia, na imunopatologia, na citogenética e em estudos *in vitro*, sendo eles:

- 1 – nevo melanocítico benigno;
- 2 – nevo melanocítico com alterações arquiteturais e atipia celular;
- 3 – melanoma primário em fase de crescimento radial;
- 4 – melanoma primário em fase de crescimento vertical;
- 5 – melanoma metastático.

É de fundamental importância esclarecer que não é obrigatório que um melanoma se desenvolva via lesão precursora.

3.4.1 Nevo pigmentado adquirido

PASCHOAL, ENOKIHARA (2003), comentaram que o nevo pigmentado adquirido aparece a partir dos seis aos 12 meses de vida. Fatores ambientais, genéticos e imunológicos participam em conjunto na determinação do número de nevos que se desenvolvem em uma pessoa (Figura 1).



Figura 1 – Nevos pigmentados comuns
FONTE: PASCHOAL, ENOKIHARA, 2003, p. 34

KANZLER, MRAZ-GERNHARD (2001), publicaram estudos histopatológicos onde confirmam que, de 20 a 30% dos melanomas apresentam associação e contigüidade com nevos pigmentados adquiridos e nevos atípicos.

3.4.2 Nevo atípico

É considerado o precursor potencial do melanoma cutâneo. De uma maneira geral, sua dimensão é igual ou superior a 5 mm, exhibe componente maculoso e/ou papuloso com margens irregulares e mal definidas, policromia (tons castanhos claros, escuros e róseos) e localiza-se, preferencialmente, no tórax.

KANZLER, MRAZ-GERNHARD (2001), mostraram que o risco de desenvolvimento do melanoma relacionado com o nevo atípico será

diferente se ele ocorrer de forma esporádica ou se manifestar por meio da síndrome familiar do nevo atípico. Esta última, descrita por Clark et al. (1978), é definida como: ocorrência de melanoma em um ou mais parentes de primeiro e segundo graus, presença de grande número de nevos melanocíticos, 50 ou mais: alguns nevos com aspecto clínico atípico e, geralmente de tamanhos diferentes; presença de nevos com características histológicas de nevo atípico. Com essas características, o risco estimado de desenvolvimento de melanoma é 184 vezes maior quando comparado com o da população em geral.

Os mesmos autores informaram que é impossível prever se uma determinada lesão irá ou não progredir para melanoma, por isso não se recomenda a retirada de todos os nevos de aspecto anormal. A retirada profilática dos nevos atípicos não elimina o risco de desenvolvimento de um melanoma, assim como não existe estudo, até agora, que tenha avaliado o efeito, se é que existe, de tal remoção na diminuição do risco de desenvolvimento de futuros melanomas.

3.4.3 Nevo congênito

PASCHOAL, ENOKIHARA (2003), informam que nevo melanocítico congênito pode ser classificado, de forma arbitrária, de acordo com a medida do seu tamanho na infância: pequeno (<1,5cm de diâmetro), médio (1,5 a 20cm no maior diâmetro) e gigante (>20cm de diâmetro).

3.5 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

THOMAS, TRANCHAND, BERARD et al. (1998); Paschoal, Almeida (2004), afirmaram que a suspeita diagnóstica clínica do melanoma baseia-se em suas características morfológicas. Na avaliação morfológica, leva-se em conta a assimetria da forma, a irregularidade das margens, a variedade de cores, o tamanho e a evolução da lesão pigmentada.

THOMAS et al. (1998), propuseram de forma mais enfática o critério ABCD, já publicado em 1995, como uma forma simples para memorizar os sinais clínicos mais comuns presentes no melanoma, a saber:

- A) Assimetria (lesões com crescimento assimétrico);
- B) Bordas irregulares (lesões com bordas geográficas ligeiramente elevadas, arciformes, cujas margens são denteadas e irregulares e a superfície discretamente elevada);
- C) Cor variada - (duas ou mais cores - lesões de coloração variável desde marrom, negra, acastanhada, rósea, cinza e branca (sinal de regressão));
- D) Diâmetro (lesões com diâmetro maior que 6mm);
- E) *Enlargement* crescimento em inglês.

Considerando-se clínica e histologicamente, o melanoma cutâneo pode ser classificado em quatro tipos mais frequentes:

- a) melanoma disseminativo superficial;
- b) melanoma nodular;

- c) melanoma acral lentiginoso,
- d) lentigo maligno melanoma.

CONRADO (2000), publicou pesquisa sobre a necessidade de identificar alterações pré-malignas ou detectar precocemente os cânceres, que tem provocado corrida científica e tecnológica na área de oncologia, como propósito de analisar as mudanças bioquímica ou farmacológica na arquitetura dos tecidos normais e pré-neoplásicos.

A confirmação histológica baseada na classificação de Clark e Breslow e o microestadiamento são essenciais antes do tratamento definitivo, pois as opções variam desde conservadoras até procedimentos mais amplos para lesões biologicamente mais agressivas (Fig. 2).

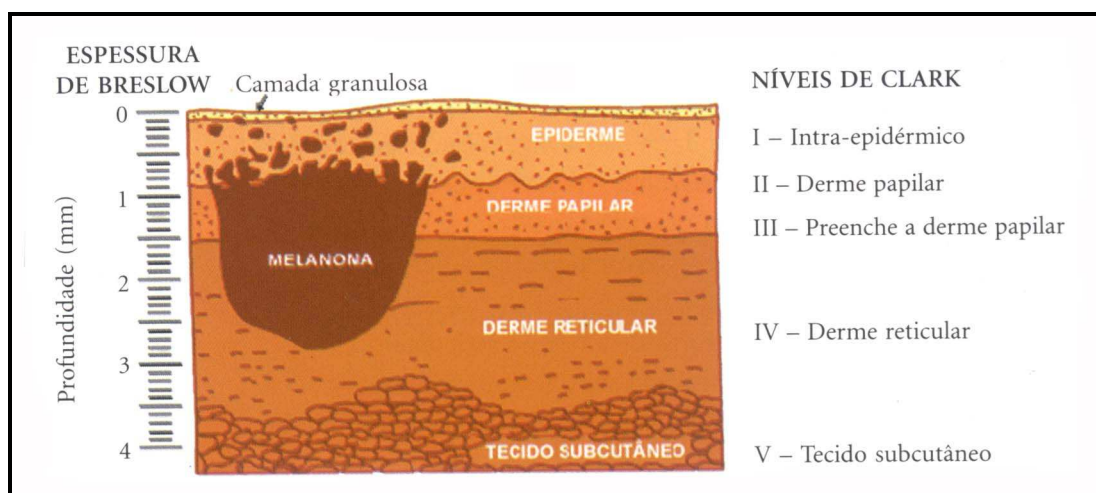


Figura 2 - Classificação do melanoma primário de acordo com o grau de invasão
 Fonte: Mílvia ENOKIHARA, 2003

GNIADOCKA et al. (1997a) e WALLACE et al. (2000), publicaram estudos que afirmam que os resultados dos exames histopatológicos

dependem da interpretação dos patologistas, os quais, nem sempre chegam ao mesmo diagnóstico, levando a uma dificuldade nas decisões terapêuticas. Além destes fatores, o diagnóstico histopatológico, baseia-se nas anormalidades morfológicas e não nas mudanças estruturais bioquímicas do tecido.

3.5.1 Biópsia óptica

Segundo pesquisas de SHIM, WILSON (1997), o mundo todo busca pelo desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas que sejam menos invasivas e forneçam resultados em tempo real, eliminando, assim, as principais desvantagens encontradas na técnica da biópsia convencional. Dentre as técnicas estudadas, destaca-se, a biópsia óptica, a qual é a utilização da espectroscopia óptica (espectroscopia Raman, espectroscopia de Fluorescência e espectroscopia no Infravermelho) no diagnóstico e estudos de doenças.

ZONIOS et al. (1998); SCHUT (2000), informam que, dentre estas técnicas, a espectroscopia Raman é das mais promissoras, por apresentar várias aplicabilidades e possuir grandes perspectivas para o diagnóstico de todos os tipos de cânceres. Por meio desta técnica, as informações podem ser obtidas *in situ*, porque a espectroscopia Raman investiga os constituintes moleculares e estruturais das amostras e, esta técnica, permite detectar modificações bioquímicas na morfologia e arquitetura celular que ocorrem na presença de doenças. Essas alterações podem auxiliar na

detecção precoce de lesões pré-cancerígenas, na realização de diagnósticos de múltiplas lesões, no rastreamento de lesões incipientes não manifestadas clinicamente e, ainda, auxiliar na seleção do tratamento, no prognóstico do paciente e no margeamento cirúrgico das lesões de confirmação maligna, pois sabe-se que as alterações bioquímicas antecedem as morfológicas.

HATA et al. (2000); HUANG et al. (2001); CRUPI et al. (2002); NUNES et al. (2003), desenvolveram pesquisas nas quais informaram que o emprego da espectroscopia Raman na medicina é amplo, como exemplo, pode-se citar as investigações patológicas no diagnóstico de melanoma cutâneo. SHIM et al. (2000); SONG et al. (2000); UTZINGER et al. (2001) e DACOSTA et al. (2002), desenvolveram estudos empregando a espectroscopia Raman na área gastrointestinal. SHAFER-PELTIER et al. (2002), usaram a espectroscopia Raman na mama; KAMINAKA (2002), estudou seu uso no pulmão; MARSHALL (2001), na próstata; STONE (2002), na laringe; PAPAS (2000), e CHOO-SMITH et al. (2002), identificaram placas de arteriosclerose empregando a espectroscopia Raman. PAPAS (2000), publicou estudo sobre células, ácidos nucleicos, cromossomos, DNA, vírus e bactérias.

GNIADHECKA et al. (1998); SCHRADER (1999), informaram que a biópsia óptica realizada por meio do método da espectroscopia Raman é método de análise não-destrutiva, não decompõe a amostra de forma mecânica, química, fotoquímica e ou térmica, determina a estrutura e a conformação de componentes moleculares, não requerendo preparação prévia da amostra e o resultado é obtido em tempo real.

3.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN E O CÂNCER

KRAFFT (2003), publicou estudo em que afirma que o aparecimento do câncer ocorre devido a alterações na composição química da célula (a composição celular é dada principalmente por água 90%). O restante das moléculas presentes são compostas, aproximadamente, por: 50% proteína, 15% carboidrato, 15% ácido nucléico, 10% lipídio, 10% outros. Os elementos químicos na composição aproximada são: 58% hidrogênio, 25% oxigênio, 12% carbono, 5% nitrogênio. Outros elementos significantes que constituem estruturas moleculares da célula são: o fósforo (P) e o enxofre (S). Em adição, existem traços de sódio (Na), magnésio (Mg), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca) e ferro (Fe) e, em menor frequência, outros metais.

A Espectroscopia Raman é largamente usada em estudos biológicos, desde estudos sobre compostos biológicos purificados até investigações em nível celular, por isso é técnica com potencial para ser utilizada no diagnóstico de lesões malignas e pré-malignas.

Esta técnica possui características particulares, apropriadas para estudos em pele, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A Espectroscopia Raman gera informações detalhadas sobre a composição e estruturas moleculares da pele. Porém, devido às vibrações moleculares serem, diretamente, influenciadas pelo micro-ambiente dos grupos funcionais, os aspectos vibracionais fornecem informações sobre as interações moleculares. Outrossim, este tipo de informação pode ser conseguido de forma inteiramente não-invasiva, sendo o espectro Raman recolhido diretamente sobre a pele. Particularmente, quando acontecem mudanças na pele, esta

metodologia tem a vantagem sobre as técnicas de análise existentes que precisam de biópsia. Outra qualidade da Espectroscopia Raman é a possibilidade de monitoramento, não somente da camada superficial da pele, mas também das camadas mais profundas.

A possibilidade de utilização da Espectroscopia FT-Raman em pesquisas dermatológicas vem sendo estudada por EDWARDS *et al.* (1995) e GNIADCKA *et al.* (1997(a, b)).

O primeiro trabalho desenvolvido por EDWARDS (1995), efetuou medidas nos espectros FT-Raman do estrato córneo normal, do tecido caloso e das placas de psoríase hiperqueratótica. Mudanças no deslocamento Raman nos comprimentos de onda de 1000-1500 e 2800-3100 cm^{-1} foram relacionadas à perda de lipídios nos tecidos alterados, no entanto, os componentes da queratina persistiram estruturalmente iguais.

Em seus estudos, GNIADCKA *et al.* (1997a, b)) obtiveram espectros FT-Raman de biópsia de diversas lesões de pele e perceberam que as lesões examinadas produziam variações espectrais únicas, que as distinguíam do controle de pele normal. Diante destes resultados foi sugerido que a Espectroscopia FT-Raman poderia ser um diferencial como ferramenta diagnóstica em dermatologia.

HATA *et al.* (2000), fizeram levantamento dos níveis de carotenos em diversos locais da pele humana, com o auxílio da Espectroscopia FT-Raman. Os autores deduziram que, na pele sã, a presença de caroteno é bem maior do que nos locais com lesões pré-cancerígenas.

Tabela 1 - Frequência, identificação e tipo de estrutura vibracional da pele humana (δ modo de dobramento, ν modo de estiramento)

BANDAS	Identificação dos picos vibracionais ($\pm 4\text{cm}^{-1}$)	Tipo de estrutura que promove a vibração	Identificação dos compostos moleculares	Referências bibliográficas
1	813	ν (OPO)	Ácido Fosfórico (DNA e RNA)	b, c, d
2	860	(C ₁ -H)	Polissacarídeos	c, d
3	939	ν (C-C)	Prolina e Valina	a, c
4	1004	δ anel aromático	Fenilalanina	a, b, c, d, e
5	1030	ν (CH ₂)	Fosfolípido	b
6	1100	ν (PO)	Ácido nucléico	a, c
7	1244	ν (=C-H)	Fosfolípido	a, b, c, e
8	1272	ν (C-N) e δ (NH)	Amida III	a, b, c, d, e
9	1321	ν CH ₂	Lipídios	a, e
10	1452	δ (CH ₂) δ (CH ₃)	Lipídios e Proteínas	a, c, e
11	1556		DNA (Adenina)	d, c
12	1660	ν C=O	Amida I	a, b, c, d, e

(a) GNIADÉCKA et al., (1997)

(b) MANHADEVAN-JANSEN; RICARDS-KORTUM, (1996)

(c) NUNES et., (2003)

(d) TWARDOWSKI, ANZENBACHER (1994)

(e) VENKATAKRISHNA et a., (2001)

A Figura 3, apresenta espectro FT-Raman característico de pele normal, bem como, o tipo de estrutura que ocasiona a vibração. Por meio da frequência, identificação e tipo de estrutura vibracional da pele humana (Tabela 1), é possível fazer as devidas identificações.

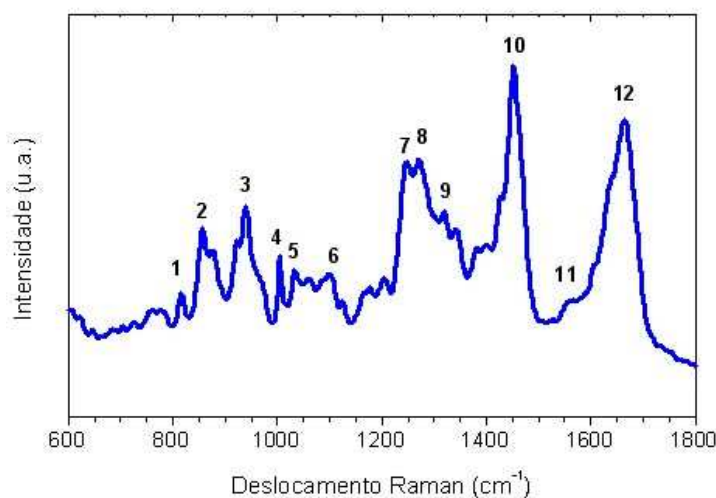


Figura 3 – Espectro FT-Raman característico de tecido de pele humana normal

4. MÉTODOS

4.1 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 pela UNIFESP/EPM (Nº 1228/05) (vide o Anexo A). Os pacientes foram informados sobre a pesquisa e assinaram termo de permissão para o uso das amostras (vide os Anexos B e C).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

Neste estudo foram utilizadas amostras de Melanoma Cutâneo de 10 pacientes atendidos no Hospital São Paulo UNIFESP/EPM, São Paulo; 9 amostras de nevo pigmentado e 10 de pele normal obtidas no Ambulatório de Cirurgia Plástica da Secretaria Municipal de Saúde de São José dos Campos, São Paulo.

Foram obtidas de lesões de Melanoma Cutâneo de grandes demarcações, sem que houvesse prejuízo para o diagnóstico

histomorfológico. Este procedimento não comprometeu qualquer pesquisa diagnóstica. As amostras de nevo pigmentado também foram oriundas da parte central de lesões, para não haver comprometimento das análises histopatológicas de rotina. As peles normais, retiradas destes mesmos pacientes, foram obtidas de pequena extensão das margens cirúrgicas, sem prejuízo para cicatrização das feridas. Estas amostras foram provenientes do Banco de Dados de Amostras do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), na UNIVAP.

As amostras de melanoma cutâneo foram coletadas apenas de lesões com dimensões acima de 2 cm de diâmetro, nodulares ou ulceradas, correspondendo à fase de crescimento vertical com elevados índices de Breslow. Lesões consideradas suspeitas, pequenas (menores que 2 cm), e/ou com componente de crescimento na fase radial ou horizontal não foram utilizadas para não interferir no diagnóstico histopatológico final. No momento operatório, pequeno fragmento medindo de 0,1 a 0,3 cm foi obtido da porção caudal da peça, por meio de incisão no sentido longitudinal, como observado na Figura 4. A coleta do material foi realizada quando a peça cirúrgica já estava fora do paciente, portanto, não houve intervenção direta no paciente, evitando manipulação do sítio da lesão e, conseqüentemente, evitando propagação hematogênica. A peça cirúrgica principal foi, então, enviada para exame anatomopatológico de rotina. Não houve prejuízo ao diagnóstico, pois a casuística foi constituída de casos com lesões metastáticas ou lesões primárias com biópsia prévia.

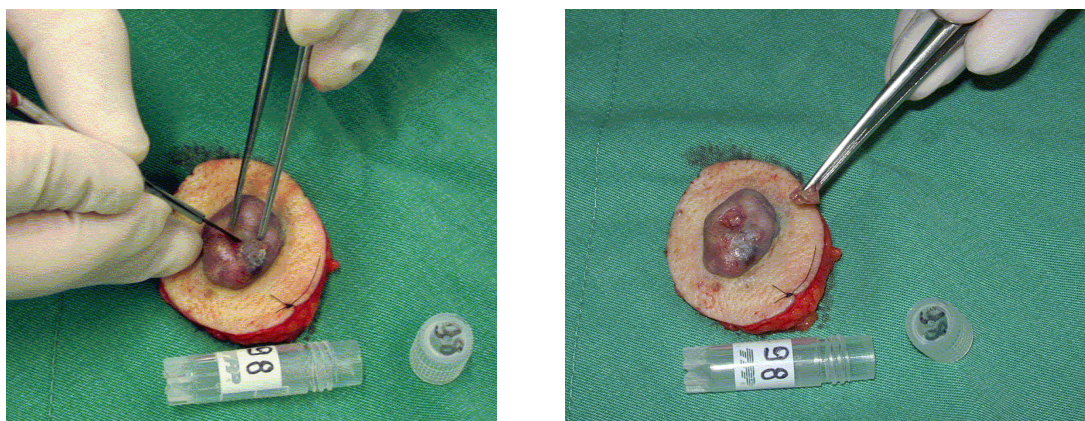


Figura 4 - Peça anatômica apresentando lesão nodular primária de melanoma cutâneo, retirada de fragmento do meio da lesão e tubo identificado para armazenamento da amostra

4.3 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS FT-RAMAN DE MELANOMA, NEVOS E PELE NORMAL

O levantamento das medidas espectroscópicas e a análise dos dados espectrais foram produzidos no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB).

Para a obtenção dos espectros FT-Raman, as amostras de melanoma cutâneo, nevo pigmentado e pele normal foram descongeladas em solução fisiológica a 0,9 %. Cada amostra foi dividida em três, quatro ou cinco frações de 2 mm³, número este variando de acordo com a amostra original. O número de espectros coletados por fração de amostra foi de cinco pontos, para melhor elaboração da análise estatística. O tamanho padronizado para a segmentação das amostras é específico para acomodação das mesmas no porta-amostra de alumínio, desenvolvido para o ajuste dos tecidos biológicos na espectroscopia FT-Raman. Este conjunto, de amostra e porta-

amostra, foi posicionado na caixa de amostras do equipamento e, automaticamente, centralizado pelo sistema operacional do espectrômetro (Figuras 5 e 6).

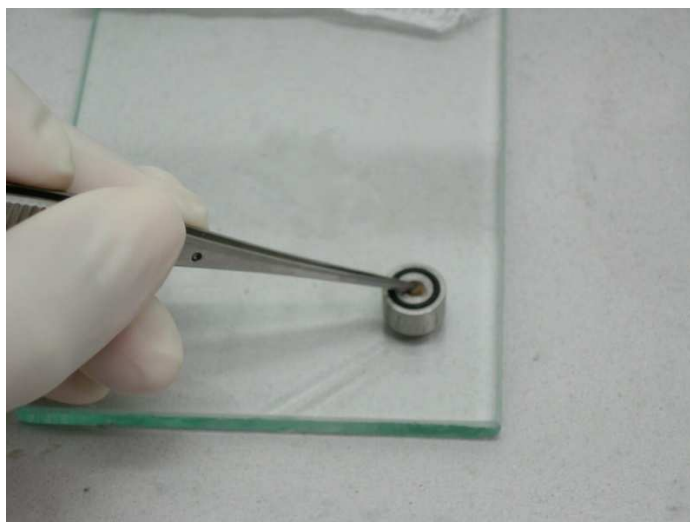


Figura 5 - Porta-amostra com amostra sendo ajustada no seu interior

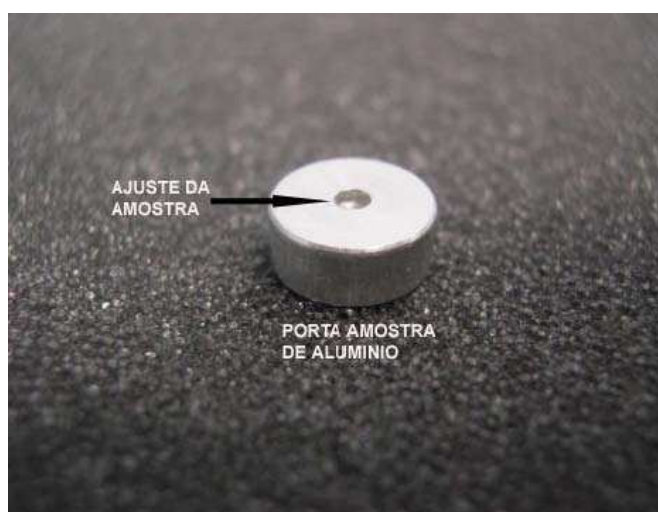


Figura 6 - Porta-amostra em detalhe

Eletronicamente, com auxílio do OPUS®, foram variados os cinco pontos de coleta por amostra FT-Raman, em distância de 250 μm de acordo com a ilustração (Figura 7).

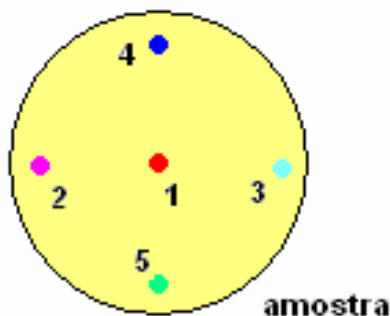


Figura 7 - Posicionamento dos pontos na amostra

Os materiais utilizados para a realização do experimento foram: cabo de bisturi, lâmina de bisturi nº 15, pinça clínica, tesoura clínica, placa de vidro, gaze estéril, soro fisiológico, luvas descartáveis, formol, tubo criogênico e porta-amostra (Figura 8).



Figura 8 - Materiais utilizados para preparo das amostras: tubo criogênico, bisturi e lâmina #15, tesoura de Íris, Pinça de Addison com dente, Porta-Amostra de alumínio e lamínula de vidro

Antes de dar início à coleta dos espectros do melanoma cutâneo e do nevo pigmentado, utilizou-se amostra de pele normal, para alinhar o sistema de acordo com os parâmetros que são referenciados na literatura. Utilizou-se 250 varreduras para todas as amostras, com potência de 300 mW, resolução espectral de 4 cm^{-1} e 7 mm de abertura do feixe do *laser*. A potência utilizada para a realização do estudo foi investigada e está

de acordo com a literatura, porque com 200 mW de potência do laser consegue-se boa razão sinal/ruído nos espectros, o que facilita a interpretação dos dados. Uma vez que o laser de Nd:YAG possui menor energia, esta potência não gera aquecimento na amostra e, portanto, não interfere na estrutura bioquímica da mesma. Depois da incidência do laser, a luz espalhada é captada por óptica composta de interferômetro de Michelson e detector de germânio refrigerado por nitrogênio líquido.



Figura 9 - Espectrômetro FT-Raman (Bruker Optics, Alemanha)

Antes da análise espectroscópica, as amostras a serem estudadas foram descongeladas, individualmente. Para isto utilizou-se solução de soro fisiológico a 0,9 %, para que o tecido alcançasse rapidamente a temperatura ambiente e se mantivesse úmido, evitando degradação e desidratação das amostras. O fragmento de melanoma cutâneo primário foi colocado em porta-amostra para posicionar o tecido para a incidência do *laser*. O porta-amostra foi colocado em suporte específico dentro do compartimento de amostras no equipamento FT-Raman. Após o posicionamento da amostra,

fechou-se o compartimento e obteve-se o espectro, fazendo-se a luz monocromática do laser de Nd:YAG incidir sobre a amostra. O tempo total para a coleta dos espectros foi de 30 minutos.

Os espectros das amostras foram coletados alternadamente, isto é, uma amostra de melanoma cutâneo primário, uma de nevo pigmentado e uma de pele normal. Foram coletados espectros em cinco pontos diferentes de cada amostra, totalizando 105 espectros de tecido normal, 140 de tecido neoplásico e 126 de nevo pigmentado.

4.3.1 *Laser* Nd:YAG (Neodímio: Ítrio Alumínio Granada)

O espectrômetro FT-Raman RFS 100 da Bruker[®], foi utilizado com o *laser* Nd:YAG de 1064 nm como fonte de excitação. Os sinais Raman foram coletados por detector de germânio resfriado por nitrogênio líquido, observando os seguintes padrões de aquisição: Geometria de Espalhamento: 180°; Amostra colocada no porta-amostras de alumínio; número de pontos na amostra: 5 pontos; Potência de saída do laser de excitação: para Melanoma: 100 - 300mW, para Nevo e pele normal: 300 mW.

A potência de saída do laser precisou ser ajustada para o melanoma em virtude da intensidade de luminescência emitida por esse tecido. As amostras pigmentadas emitiram energia que saturou o sistema de detecção do equipamento: Laser de excitação: modo Focado; N° de Varreduras: Melanoma: 500; Nevo e pele normal: 300 varreduras (o número estipulado

de varreduras é de 300-500, porque deve-se obter espectros com melhor relação sinal/ruído); abertura do feixe de luz espalhada: 7 mm; resolução espectral: 4 cm^{-1} .

A partir do *software* instalado no FT-Raman Spectrometer RFS 100, o OPUS versão 4.2, Copyright © Bruker Optik GmHb 1997-2002, pôde-se ajustar todos os parâmetros do equipamento, como potência do laser, abertura de feixe, ajuste na transformada de Fourier, auxílio durante a aquisição dos espectros, armazenamento e manipulação dos dados espectrais.

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

Primeiramente, todos os dados foram pré-processados, corrigindo a linha de base e realizando a normalização vetorial com auxílio do *software* Minitab (Minitab[®] 15.1.1.0). Os espectros foram montados em tabela do *software* Excel (Microsoft[®] Excel 2002), sendo criada uma tabela para cada paciente. Para cada um dos pacientes, foi estabelecido que o conjunto de dados seria tratado como UNIDADE AMOSTRAL. Foram construídos os gráficos com o espectro observado para cada unidade amostral pesquisada (gráficos das médias e percentis 25 e 75).

Em seguida, foram investigadas as variáveis obtidas a partir da unidade amostral em questão e sua possibilidade de diferenciar os grupos do ponto de vista estatístico. Em um primeiro momento, empregou-se o modelo de análise de variância com um fator fixo e verificou-se que todas

as variáveis apresentavam associação com o próprio grupo. Deste modo, todas as 10 informações fizeram parte do processo de análise univariada.

O passo derradeiro do estudo estatístico desses dados foi o emprego da Análise Discriminante (Análise Multivariada) aos dados, cujos resultados mostraram importante diferenciação entre os três grupos estudados, sobretudo se tratando das variáveis: Polissacarídeos, Tirosina e Amida I.

4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Logo em seguida às medidas das amostras por espectroscopia Raman, todas essas foram fixadas em solução formol 10 % e, posteriormente, encaminhadas para o Departamento de Anatomia Patológica da UNIFESP/EPM. Nessa etapa, as amostras foram regularmente processadas para confecção de lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Essas lâminas foram lidas e suas características estruturais analisadas, de acordo com padrões estabelecidos por CLARK et al. (1984). Dessa forma, cada espectro obtido pôde ser relacionado a um achado histológico, possibilitando a formação dos grupos espectrais para desenvolvimento das análises univariadas e multivariadas.

5. RESULTADOS

5.1 BOXPLOT

Inicialmente, foram construídos os gráficos de *Boxplot*, a partir dos espectros de cada grupo estudado, Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário. Para que esta construção pudesse ser tomada como base de reconhecimento do padrão de modos vibracionais Raman dos grupos relacionados, todos os espectros tiveram previamente a linha de base corrigida na região espectral de 800 a 1800 cm^{-1} e foram, posteriormente, normalizados vetorialmente. Os gráficos das médias e percentis 25 e 75 das variáveis espectrais foram construídos para observação da existência de padrão espectral para cada grupo. Por meio dessas figuras, observa-se uma grande variação intrínseca em cada grupo estudado.

O gráfico das médias e percentis 25 e 75 das variáveis espectrais forneceram algumas informações importantes sobre o grupo espectral formado. A linha contínua em cor preta, que passa pelo meio dos dados, se refere à média dos espectros analisados. Cerca de metade dos espectros deste grupo são iguais a esta média. As sombras coloridas que envolvem esta média espectral, foram referidas ao Terceiro quartil (Q3), representando cerca de 75 % dos valores dos dados, e aos *Outliers*, representados pelos *whiskers* superiores e inferiores, que definiram os

limites mais altos e mais baixos dos valores encontrados para cada deslocamento Raman.

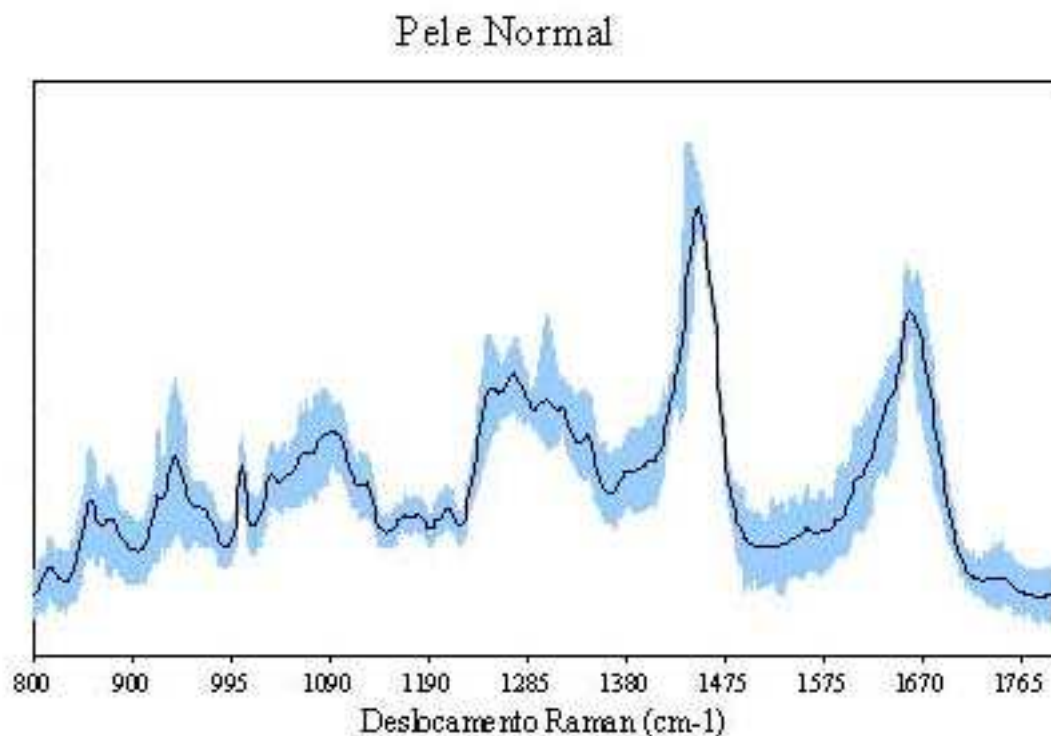


Figura 10 - Gráfico das médias e percentis 25 e 75 do grupo Pele Normal

O gráfico das médias e percentis 25 e 75 dos espectros observados nesta figura refere-se ao Grupo de Pele Normal. Para a construção deste gráfico foram utilizados 105 espectros, de 10 pacientes. Todas as amostras foram diagnosticadas histologicamente como peles normais. Relacionando a média dos espectros aos espectros pertencentes ao *quartil* e *outliers*, pôde-se notar que não existe grande variação entre os espectros deste grupo (Figura 10).

O mesmo procedimento foi repetido para o grupo Nevo Pigmentado. Nesse grupo, foram contabilizados 126 espectros, de 9 pacientes. Diferentemente do grupo anterior, o Grupo Nevo Pigmentado acolheu

alguns tipos tissulares, sendo estes: Nevo Melânico Composto (1 paciente, 15 espectros), Nevo Melânico Intradérmico (5 pacientes, 75 espectros), Nevo Celular Intradérmico (2 pacientes, 30 espectros) e Pólipo Fibroepitelial pigmentado (1 paciente, 7 espectros). Para a construção do gráfico das médias e percentis 25 e 75 dessas variáveis, objetivando a caracterização espectral do grupo Nevo Pigmentado, foi proposto que todos os dados fossem utilizados, independentemente da variedade histológica (Figura 11).

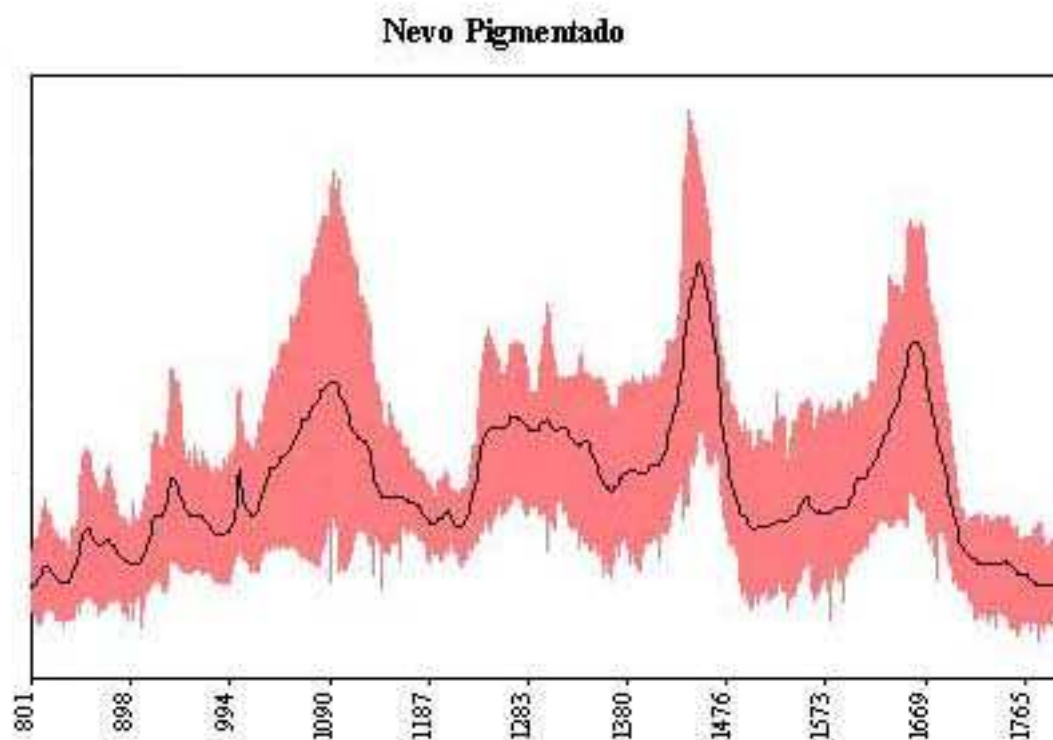


Figura 11 - Gráfico das médias e percentis 25 e 75 do grupo Nevo Pigmentado

Observando a figura 11 do gráfico das médias e percentis 25 e 75 do Nevo Pigmentado, relacionando a média dos espectros aos espectros pertencentes ao *quartil* e *outliers*, pôde-se notar que existe variação espectral notável neste grupo, devido à grande variedade histológica. As

diferenças visualmente identificadas por meio desta figura, foram discutidas adiante com a exposição dos novos gráficos e tabelas que favorecerão a compreensão das informações espectrais encontradas.

O terceiro grupo deste estudo, Melanoma Primário, foi composto, exclusivamente, por espectros obtidos de amostras histologicamente avaliadas como melanoma cutâneo primário. Estas amostras foram colhidas de 10 pacientes, resultando em 140 espectros Raman.

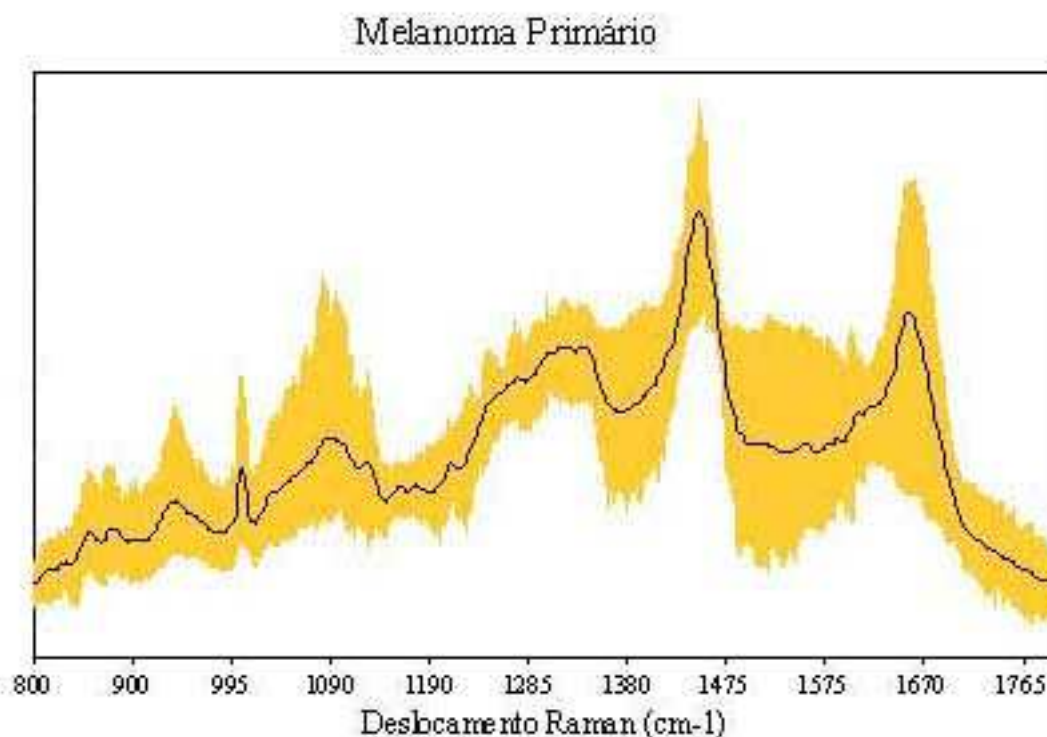


Figura 12 - Gráfico das médias e percentis 25 e 75 do grupo Melanoma Primário

Observando a figura 12 do gráfico das médias e percentis 25 e 75 do grupo Melanoma Primário, relacionando a média dos espectros aos espectros pertencentes ao *quartil* e *outliers*, pôde-se notar que existe variação espectral que, semelhantemente ao grupo Nevo Pigmentado, é insofismável. A variedade desta patologia entre os pacientes escolhidos

para compor este grupo pode ser um dos fatores que contribuíram para essa variação. Assim como o grupo Nevo Pigmentado, essas diferenças serão discutidas adiante com a exposição dos novos gráficos e tabelas.

5.2 ANÁLISE UNIVARIADA

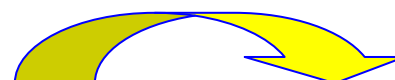
Para a realização da análise estatística dos dados espectrais, os espectros foram divididos de acordo com o grupo histológico pertencente, formando os grupos: Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário. Dentro de cada um destes grupos, os espectros foram agrupados em UNIDADES AMOSTRAIS. Estas unidades foram construídas por meio do cálculo da média entre os espectros originais, da forma como foram coletados pelo sistema Raman, pertencentes ao mesmo paciente de cada grupo histológico.

Em seguida, foram investigadas algumas variáveis dentro dos espectros, essas factíveis para classificação dos grupos do ponto de vista estatístico. Para encontrar essas, este estudo se baseou nas informações sobre os compostos bioquímicos presentes nos tecidos biológicos por meio da identificação dos mesmos nos espectros Raman.

Por meio da análise dos gráficos das médias e percentis 25 e 75 de cada grupo diagnóstico (Figuras 10, 11 e 12), puderam ser identificadas as bandas específicas a cada modo vibracional conhecido. Esta identificação foi baseada no trabalho de GNIADÉCKA et al. (2004), modificado neste

estudo pela inclusão de novas bandas. Estes resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Modos Vibracionais e Biomoléculas relacionadas aos espectros de Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário (Gniadecka et al., 2004).



Bandas*	Estudo Atual			Gniadecka et al., 2004	
	P. Normal (cm ⁻¹)	Nevo (cm ⁻¹)	Melanoma (cm ⁻¹)	Modos Vibracionais	Biomoléculas
1	813, 855, 876	832, 857, 867	807, 822, 955, 882	810 - 860	Polissacarídeos
2	921, 940, 957	923, 936, 961	934, 955, 984	900 - 985	Aminoácidos, Valina e Prolina.
3	1004	1004	1004	1003 - 1005	Fenilalanina (anel)
4	1033, 1047, 1067, 1096, 1125	1033, 1067, 1102, 1125	1032, 1046, 1079, 1096, 1121	1021 - 1144	PO ₂ ⁻ , Ácidos Nucleicos.
5	1160, 1168, 1206	1162, 1173, 1200	1158, 1173, 1221	1144 - 1222	Tirosina
6	1247, 1270, 1312, 1335, 1343	1247, 1264, 1305, 1322, 1343	1235, 1248, 1316, 1328, 1341	1222 - 1362	Lipídios, Proteínas, Amido-III.
7	1312, 135, 1343, 1384	1322, 1343, 1380	1316, 1328, 1341	1300 - 1400	Adenina e Fenilalanina (Melanina)
8	1451, 1544	1397, 1451, 1555	1407, 1451, 1526	1400 - 1560	Proteínas e Lipídios
9	1619	1613	1582, 1598, 1621	1560 - 1620	DNA (adenina, guanina, fenilalanina, Melanina)
10	1663, 1748	1657, 1750	1663	1640 - 1800	Lipídios e Amida I (Proteínas)

Após a identificação das bandas bioquímicas relevantes para análises estatísticas, o primeiro passo foi o emprego do modelo de análise de variância com um fator fixo, onde se verificou que todas as variáveis, ou modos vibracionais Raman, apresentavam relevante associação com cada grupo diagnóstico. Estes resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Medidas descritivas das variáveis estudadas, em cada grupo, dos 10 modos vibracionais principais relacionados por GNIADÉCKA (2004)

Grupo	Bandas*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Descrição										
Pele Normal	Média	0,0150	0,0161	0,0172	0,0169	0,0152	0,0180	0,0160	0,0186	0,0144	0,0192
	Desvio-padrão	0,0069	0,0071	0,0073	0,0075	0,0081	0,0082	0,0089	0,0085	0,0093	0,0081
	Mínimo	0,0085	0,0092	0,0103	0,0103	0,0076	0,0104	0,0076	0,0103	0,0059	0,0117
	Máximo	0,0318	0,0334	0,0351	0,0353	0,0352	0,0384	0,0383	0,0401	0,0377	0,0395
Melanoma Primário	Média	0,0482	0,0489	0,0499	0,0499	0,0504	0,0535	0,0533	0,0548	0,0513	0,0519
	Desvio-padrão	0,0315	0,0314	0,0312	0,0318	0,0327	0,0335	0,0344	0,0342	0,0334	0,0312
	Mínimo	0,0148	0,0153	0,0164	0,0160	0,0150	0,0163	0,0153	0,0165	0,0143	0,0162
	Máximo	0,0877	0,0886	0,0900	0,0906	0,0924	0,0972	0,0984	0,1005	0,0976	0,0966
Nevo melanocítico	Média	0,0124	0,0132	0,0139	0,0144	0,0138	0,0151	0,0149	0,0160	0,0147	0,0160
	Desvio-padrão	0,0092	0,0097	0,0098	0,0104	0,0112	0,0120	0,0128	0,0129	0,0135	0,0125
	Mínimo	0,0042	0,0045	0,0050	0,0053	0,0043	0,0049	0,0043	0,0051	0,0040	0,0056
	Máximo	0,0349	0,0375	0,0393	0,0417	0,0438	0,0478	0,0502	0,0516	0,0529	0,0513
Total	Média	0,0244	0,0252	0,0262	0,0263	0,0257	0,0280	0,0273	0,0289	0,0260	0,0282
	Desvio-padrão	0,0245	0,0244	0,0245	0,0247	0,0257	0,0265	0,0273	0,0271	0,0267	0,0249
	Mínimo	0,0042	0,0045	0,0050	0,0053	0,0043	0,0049	0,0043	0,0051	0,0040	0,0056
	Máximo	0,0877	0,0886	0,0900	0,0906	0,0924	0,0972	0,0984	0,1005	0,0976	0,0966

*Bandas: (1) Polissacarídeos; (2) Aminoácidos Valina e Prolina; (3) Fenilalanina; (4) Ácidos Nucléicos; (5) Tirosina; (6) Lipídeos, Proteínas e Amida III; (7) Adenina, Fenilalanina e Melanina; (8) Proteínas e Lipídeos; (9) DNA (Adenina, Guanina, Fenilalanina e Melanina); (10) Lipídeos e Amida I (Proteínas)

Na Tabela 3, pode ser observada a descrição qualitativa dos espectros de pele normal, nevo pigmentado e melanoma primário, em relação à média, desvio-padrão, valor mínimo e valor máximo de cada um dos modos vibracionais.

Para que estes resultados fossem mais bem compreendidos, para cada modo vibracional (Bandas 1 a 10, descritas na Tabela 2) analisado, foram construídos gráficos de *Boxplot*, que mostraram, claramente, a distribuição destas biomoléculas dentro de cada grupo estudado (veja APÊNDICE B).

Neste conjunto de figuras, onde a descrição qualitativa de todos os modos vibracionais foi resumida, pode ser notado que os espectros do grupo Melanoma foram aqueles que obtiveram a maior diferença intra-grupo em todos os quesitos analisados, seguido do grupo nevo pigmentado

e pele normal, seqüencialmente. É provável que este fato se refira à grande fluorescência gerada pelo tecido, devida ao alto grau de pigmentação.

Finalmente, para cada modo vibracional descrito até o momento, foi calculado o nível descritivo que favoreceu a segunda fase desta análise, a análise multivariada dos espectros. Estes resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da comparação entre os grupos (Pele Normal, Nevo Pigmentado e Melanoma Primário) com relação a cada uma das variáveis que compõem o estudo

Bandas	Variável	Nível descritivo
1	POLISSACARÍDEOS	0,000294
2	Aminoácidos, Valina e Prolina	0,000366
3	Fenilalanina	0,000327
4	PO ₂ , Ácidos nucleicos	0,000477
5	TIROSINA	0,000441
6	Lipídios, Proteínas, Amida-III	0,000467
7	Adenina e Fenilalanina	0,000576
8	Proteínas e Lipídios	0,000592
9	DNA	0,000611
10	AMIDA I	0,000639

Na Análise Discriminante, cujos resultados apresentaram importantes diferenciações entre os três grupos estudados, merecem destaque as variáveis: Polissacarídeos (Figura 13), Tirosina (Figura 14) e Amida-I (Figura 15).

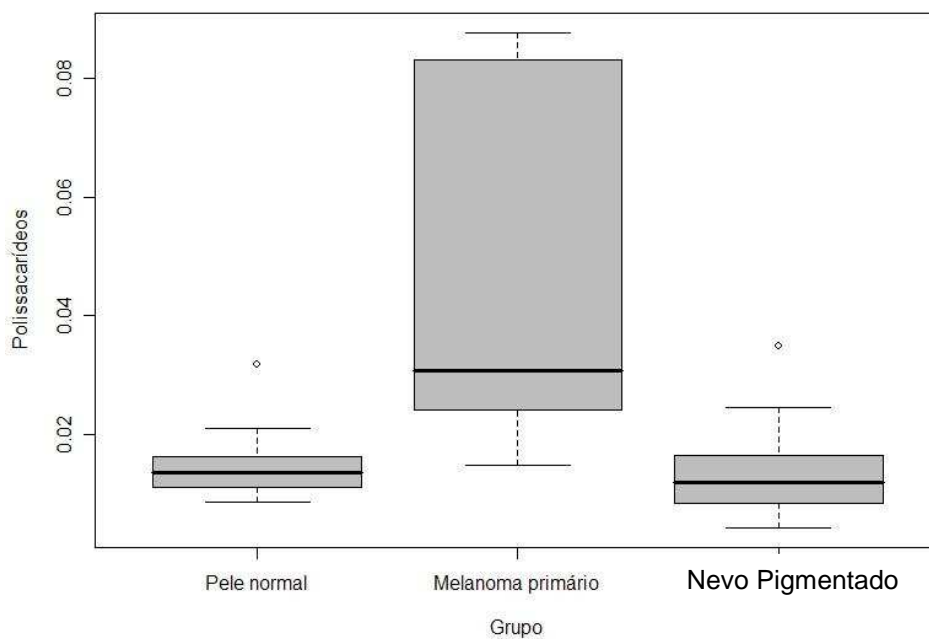


Figura 13 - Distribuição da variável Polissacarídeos em cada grupo estudado

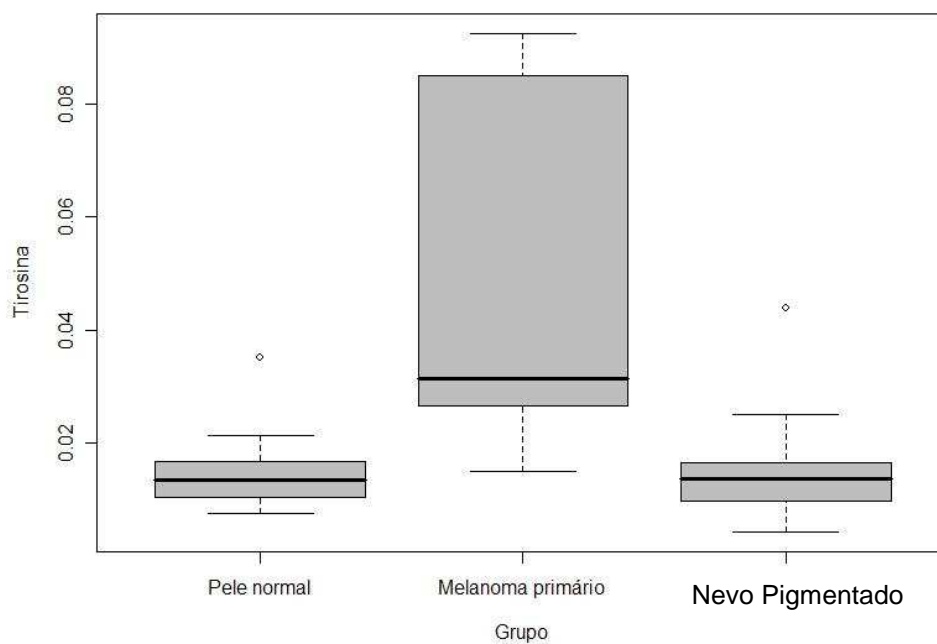


Figura 14 - Distribuição da variável Tirosina em cada grupo estudado

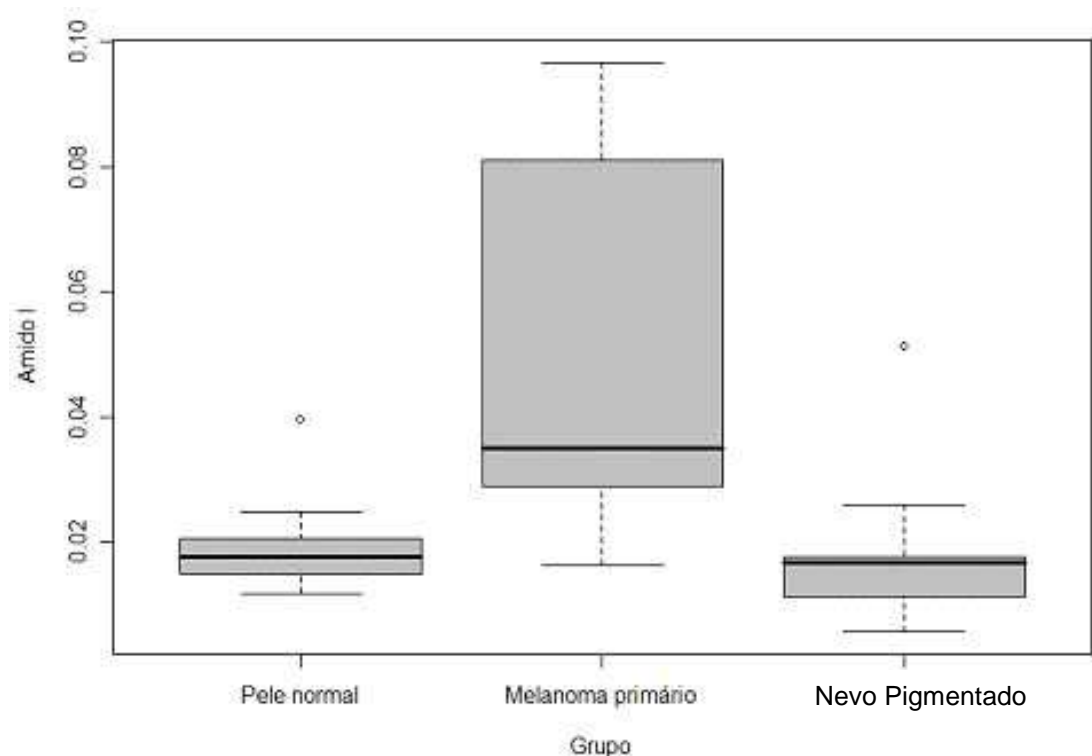


Figura 15 - Distribuição da variável Amida I em cada grupo estudado

5.3 ANÁLISE MULTIVARIADA

O passo derradeiro do estudo estatístico desses dados foi o emprego da Análise Discriminante aos dados, cujos resultados mostraram importante diferenciação entre os três grupos estudados, sobretudo, tratando-se das variáveis (modos vibracionais) Polissacarídeos (Banda 1), Tirosina (Banda 6) e Amida I (Banda 10).

Com a finalidade de diferenciar os três grupos formados na amostra, de acordo com as características extraídas dos espectros, realizou-se Análise Discriminante dos dados. As variáveis Polissacarídeos, Tirosina e Amida I destacaram-se na diferenciação dos três grupos, de acordo com as

funções de classificação apresentadas a seguir (Tabelas 5 e 6). A porcentagem de indivíduos corretamente classificados com este critério foi de 75,3%; o que mostra a eficiência da análise realizada. O gráfico apresentado na Figura 16 permite visualizar os resultados obtidos.

Tabela 5 - Coeficientes das funções discriminantes

Variáveis	Função 1	Função 2
Polissacarídeos	9,096	-0,418
Tirosina	-13,321	5,828
Amida I	4,651	-4,607

Tabela 6 - Coeficientes das funções de classificação

Variáveis	GRUPO		
	Pele Normal	Melanoma Primário	Nevo pigmentado
Polissacarídeos	-67,430	-72,372	-104,267
Tirosina	101,130	126,423	160,732
Amida I	-53,732	-73,782	-81,343
Constante	-36,402	-31,979	-52,565

Utilizando-se os resultados das funções discriminantes dos dados, foi construído o gráfico de dispersão destas funções, com o objetivo de visualizar estes valores. Na Figura 16 pode ser observado o gráfico construído por meio da correlação dos modos vibracionais de Polissacarídeos, Tirosina e Amida I.

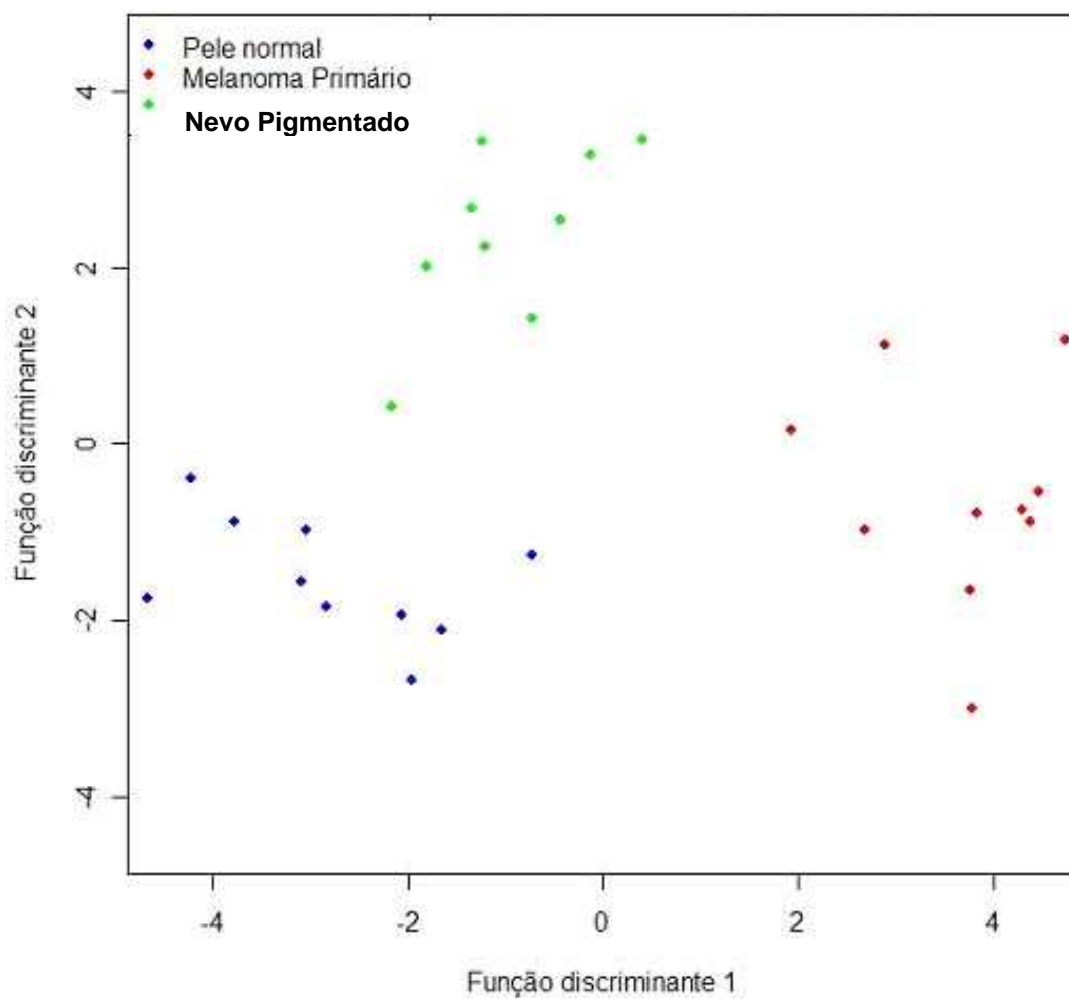


Figura 16 - Diferenciação dos grupos por meio das duas funções discriminantes obtidas

Na Figura 16 pode-se notar que as unidades amostrais foram separadas com 75,3% de eficiência, sendo as variáveis de pele normal representadas em azul, de nevo pigmentado, em verde e de melanoma primário, em vermelho.

6. DISCUSSÃO

Ficou comprovado o aumento da sobrevida nos pacientes com melanoma cutâneo nas últimas décadas, no entanto, não ocorreu nenhum avanço diferencial no tratamento do melanoma que explique esse cenário. A maioria, se não toda a melhora na mortalidade parece ser ocasionada pelo diagnóstico precoce do melanoma na população geral. Essa afirmativa foi encontrada em diversos estudos epidemiológicos revisados, mostrando essa tendência nos países onde existe acompanhamento histórico desses dados, entre eles: Estados Unidos, Austrália e países da Europa como Alemanha e Itália (URIST, KARNELL, 1994; CHANG et al., 1998; WEINSTOCK et al., 2006).

O diagnóstico precoce do melanoma vem se estabelecendo por procura de metodologias de análise que sejam menos invasivas e possibilitem a aquisição de informações que não comprometam a viabilidade das lesões, para que essas possam ser continuamente monitoradas. Inúmeros trabalhos que investem na elaboração de imagens e análise automática das mesmas vêm sendo implementados e incorporados à clínica médica. Entretanto, essas técnicas não analisam bioquimicamente as lesões, diminuindo enormemente o poder de classificação das mesmas sem o auxílio de patologista experiente.

Nesta busca, foram envolvidas técnicas experimentais muito utilizadas nas áreas de Física e Química que vêm se ajustando para estudos dos padrões biológicos. A espectroscopia óptica, dominada apenas por

físicos e químicos, agora vem sendo utilizada por não-espectroscopistas, na análise de diversos tecidos em inúmeras doenças, especialmente o câncer. Dentre as técnicas de Biópsia Óptica, destacou-se a espectroscopia Raman, por fornecer informações detalhadas sobre os modos vibracionais presentes na amostra, sem influência da água, sendo desta forma factível seu desenvolvimento para uso clínico (BITAR et al., 2006)

Existem inúmeros estudos sobre espectroscopia Raman aplicados aos tecidos tumorais, entretanto, são escassos aqueles que se referem a lesões pigmentadas. Deste modo, estudar o nevo pigmentado, como uma das lesões que clinicamente mimetizam o melanoma cutâneo, dificultando o diagnóstico diferencial, foi favorável.

Sob o ponto de vista de obtenção das amostras de Melanoma Cutâneo, as lesões invariavelmente deveriam ter grandes dimensões, para que não houvesse prejuízo ao diagnóstico histomorfológico, ou ao comprometimento de qualquer pesquisa diagnóstica. As amostras de nevo pigmentado também foram oriundas da parte central de lesões, para não haver comprometimento das análises histopatológicas de rotina. As peles normais, retiradas desses mesmos pacientes, foram obtidas de pequena extensão das margens cirúrgicas, sem prejuízo para a cicatrização das feridas. Todas as amostras foram congeladas em Nitrogênio líquido, este método é estabelecido e seguido pelos pesquisadores em espectroscopia em tecido biológico.

Para a obtenção dos espectros FT-Raman, as amostras de melanoma cutâneo, nevo pigmentado e pele normal foram descongeladas em solução fisiológica a 0,9 %, para manter a sua integridade estrutural, sem comprometimento dos espectros Raman. A solução fisiológica é conhecida

por não fornecer interferência no sinal Raman das amostras biológicas. O procedimento de fracionamento das amostras em três, quatro ou cinco pedaços e a coleta, por fragmento, de cinco pontos, foram realizados para melhor elaboração da análise estatística (BITAR et al., 2006)

O início das coletas dos espectros Raman se deu com as amostras de pele normal e de nevo pigmentado. De acordo com parâmetros descritos na literatura sobre espectroscopia FT-Raman aplicada à pele normal, o ajuste do equipamento se deu de forma padrão: a potência de saída do *laser* de excitação em 300 mW, sendo aproximadamente 250 mW na amostra, e 250 varreduras por ponto. Desta forma, foram obtidos espectros de pele normal idênticos aos observados na literatura internacional, porque com 200 mW de potência do laser consegue-se boa razão sinal/ruído nos espectros, o que facilita na interpretação dos dados. Uma vez que o laser de Nd:YAG possui menor energia, esta potência não gera aquecimento na amostra e, portanto, não interfere na estrutura bioquímica da mesma.

Entretanto, em relação aos espectros de melanoma, houve algumas controvérsias. Os poucos estudos existentes em análise de tecido pigmentado de pele em Espectroscopia FT-Raman demonstraram que, pelo uso do Nd:YAG como fonte de excitação não haveria fluorescência que comprometesse o sinal. Neste estudo, houve necessidade de ajuste da potência do *laser* para as lesões mais escuras. A potência de saída do *laser* de excitação, para o Melanoma oscilou entre 100 a 300 mW e, para Nevo Pigmentado e Pele normal, 300 mW. Essa variação da potência não comprometeu a intensidade do sinal Raman, entretanto, a relação sinal/ruído foi comprometida. Para minimizar esse viés, para as amostras que eram escuras e que dessa forma necessitaram diminuição da potência

do *laser*, foram aumentados os tempos (varreduras) de aquisição dos espectros, passando para 500 varreduras por ponto.

O trabalho da literatura internacional que pode ser comparado a este estudo, foi desenvolvido por GNIADÉCKA et al. (1997b), onde foram comparados espectros de lesões cutâneas pigmentadas benignas e malignas: queratose seborréica, nevo pigmentado, carcinoma basocelular pigmentado e melanoma. Os autores, por meio da análise visual dos espectros, conseguiram diferenciar as lesões e, com o uso de sistema neural, a sensibilidade do diagnóstico do melanoma foi de 85 % e a especificidade de 99 %. A análise visual é subjetiva e demorada, porém, com o auxílio da rede neural, foi possível análise quantitativa dos espectros. O espectro de nevo pigmentado se assemelha ao de pele normal, mostrando diminuição na banda amida I. Os autores discutiram, baseados nessas observações, que a transformação neoplásica nos tecidos dá a partida nas mudanças celulares, independente do tecido envolvido. Entretanto, GNIADÉCKA et al. (1997b) não discutiram a dificuldade da aquisição dos espectros em relação à fluorescência, nem como foi realizado o pré-processamento dos dados espectrais, tampouco os resultados falso-positivos e falso-negativos. Desta forma, seguindo a experiência prática e conhecimentos adquiridos durante a fase experimental, o tratamento das amostras mais escuras foi realizado. Em contrapartida, existiram alguns espectros Raman destas amostras que foram totalmente obscurecidos pela forte fluorescência, mas mesmo chamados de *outliers*, participaram da análise dos dados. Todas as UNIDADES AMOSTRAIS poderão ser observadas no Apêndice C, deste trabalho.

O pré-processamento dos dados é etapa importantíssima para que se tenha reprodutibilidade e confiabilidade na análise dos dados espectrais.

Devido à extrema irregularidade da superfície dos espécimes obtidos para esse estudo, mesmo melhorando essa irregularidade com o uso da lamínula de vidro, é sempre necessário o ajuste dos sinais. A linha de base serve para eliminar a fluorescência e a normalização vetorial, para adequar as intensidades.

Em trabalho publicado por AFSETH et al. (2006), onde foram estudadas algumas possibilidades de pré-processamento dos espectros Raman de tecidos biológicos, foi discutida, principalmente, a importância da efetividade do método escolhido para obtenção de resultado robusto e com informação quantitativa para ser avaliada. Foi sugerido que os métodos de correção de linha de base fossem aplicados antes dos métodos de normalização. O presente trabalho denomina como normalização da intensidade total (*total intensity normalization*) o método de normalização vetorial. Como conclusão, aplicando o método de normalização da intensidade total, depois da adequada correção de linha de base, os modelos de calibração obtidos se mostraram robustos em todos os espectros analisados. Por meio da experiência prática do presente pesquisador, esta metodologia vem sendo aplicada no pré-processamentos dos espectros obtidos. A linha de base escolhida para correção dos espectros na região estudada (800 a 1800 cm^{-1}) foi uma RETA. O estudo de AFSETH et al. (2006), reforçou os achados de presente experiência prática. Desta forma, seguiu-se, neste estudo, com o método de pré-processamento aqui descrito.

Nas Figuras 10, 11 e 12, foram observadas alterações espectrais, as quais foram utilizadas neste estudo, para diferenciação de peles normais, nevo pigmentado e melanoma primário.

Expressivas diferenças de intensidade também foram encontradas na região entre $800 - 980 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 10). Entretanto, diferentemente das outras regiões, neste intervalo de energia, a intensidade dos modos vibracionais do nevo pigmentado e do melanoma primário foi menor que a dos tecidos normais. O mesmo efeito foi observado anteriormente por GNIADÉCKA et al. (1997).

As bandas em 855 e 937 cm^{-1} são características típicas do espectro do colágeno e são devidas à vibração da prolina e à vibração de estiramento do C—C na estrutura protéica (NELSON et al., 2002).

Encontrou-se, no presente estudo, nas regiões de deslocamento Raman de $1540 - 1620 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 24J – APÊNDICE B) e $1040 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 24E – APÊNDICE B), que correspondem ao modo vibracional do DNA, um aumento de intensidade espectral no melanoma primário. Este ganho de intensidade no espectro do melanoma primário para estas bandas, pode estar relacionado com o aumento da síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas nos tecidos malignos, devido ao elevado número de mitoses e, conseqüentemente, ao aumento na duplicação do material genético, responsável pela proliferação celular maligna. O mesmo efeito foi observado por MAHADEVAN-JANSEN et al. (1997), que realizaram estudos sobre a biologia molecular e a transformação de energia no DNA entre os tecidos cancerosos e pré-cancerosos, utilizando a espectroscopia Raman.

Como pode ser observado nas Figuras 10, 11 e 12, a banda da vibração secundária das proteínas (Amida I) está em $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$, correspondendo ao modo de vibração de estiramento das ligações C=O. O modo vibracional da mesma ligação peptídica (Amida III) está em $1222-$

1362 cm^{-1} , denominado pela vibração no plano das ligações do N—H e estiramento da ligação C—N. MAHADEVAN-JANSEN et al. (1997), observaram bandas intensas na região da Amida I (1640–1680 cm^{-1}), nos tecidos malignos, o que auxilia na identificação desse tipo de tecido. Nos presentes resultados, o ganho de intensidade neste pico pode ser observado na região de menor energia desta banda, ou seja, em torno de 1540 a 1600 cm^{-1} (Figura 24J – APÊNDICE B). MAHADEVAN-JANSEN et al. (1997), no mesmo trabalho, também observou que na região espectral de 1540 a 1570 cm^{-1} corresponde às bandas das bases de nucleotídeos Guanina e Adenina. A maior alteração que ocorre com os tecidos neoplásicos é o aumento do conteúdo de ácidos nucléicos na célula. Isto pode, portanto, ter relação com o aumento de intensidade desses picos nos tecidos malignos nos resultados aqui apresentados. As transformações das bandas amida no espectro Raman foram atribuídas a mudanças na conformação das proteínas (Nelson et al., 2002). No grupo melanoma primário do atual estudo, as alterações examinadas visualmente foram semelhantes e a região da amida I apresentou aumento da sua intensidade.

Em princípio, essas diferenças nas intensidades de algumas bandas podem ser utilizadas para diferenciar entre espectro Raman de tecido normal, de nevo pigmentado e de melanoma cutâneo. É evidente, também, que muitas dessas mudanças refletem alterações na estrutura secundária das proteínas. Uma vez que todos os estados de doença são causados por mudanças fundamentais na bioquímica das células e/ou dos tecidos e que essas alterações podem ser detectadas nos espectros Raman, as mudanças de intensidade das bandas vibracionais estão, assim, diretamente relacionadas com a mudança na bioquímica dos tecidos (MAHADEVAN-

JANSEN et al., 1996; FENDEL et al., 1998 *apud* HANLON et al. (2000); SCHRADER et al., 1999; WALLACE et al., 2000).

A estrutura dos lipídios é representada pela vibração do CH₂ na região entre 1420 – 1500 cm⁻¹. Esses picos são bastante complexos, dependendo de vários fatores como, por exemplo, as ligações de hidrogênio, que podem estar alteradas devido ao crescimento tumoral e suas demandas (TWARDOWSKI et al., 1994; NELSON et al., 2002; SANTOS, et al., 2006).

Em seguida, foram investigadas as variáveis obtidas a partir da unidade amostral em questão e sua possibilidade de diferenciar os grupos do ponto de vista estatístico. Em um primeiro momento, empregou-se o modelo de análise de variância com um fator fixo e verificou-se que todas as variáveis apresentavam associação com o próprio grupo. Deste modo, todas as 10 informações (Bandas 1-10) fizeram parte do processo de análise univariada. Essa ferramenta se mostrou útil para elaboração dos gráficos de *boxplot* para visualização das diferenças espectrais entre os grupos estudados e, principalmente, a variação intrínseca de cada grupo. A análise univariada, utilizada aqui como redutor de variáveis para futura análise multivariada, também se mostrou eficiente.

Por meio da análise univariada, as bandas escolhidas das unidades amostrais destacaram que as unidades amostrais foram mais bem caracterizadas através dos modos vibracionais dos Polissacarídeos, da Tirosina e da Amida I. Essa importante informação, que culminou na classificação dos espectros, foi obtida por análise de elaboração e entendimento mais simples, com 75,3% de eficiência.

HANLON et al., (2000), verificaram que uma análise qualitativa e quantitativa de materiais e substâncias pode ser realizada pela espectroscopia Raman. As aplicações biológicas da espectroscopia são relativamente recentes e diversas pesquisas têm sido realizadas para ampliar esta aplicabilidade. Pode-se citar, dentre várias situações, a caracterização de materiais com grande sensibilidade e alta precisão, com formas e volumes variados e secções extremamente delgadas. Nesse estudo, a descrição qualitativa de todos os modos vibracionais foi compilada no conjunto de figuras (Figura 24), onde se observou que os espectros do grupo Melanoma Primário foram os que obtiveram a maior diferença intra-grupo em todos os quesitos analisados, seguido dos grupos nevo pigmentado e pele normal, seqüencialmente.

O passo derradeiro do estudo estatístico desses dados foi o emprego da Análise Discriminante (Análise Multivariada) aos dados, cujos resultados mostraram importante diferenciação entre os três grupos estudados, sobretudo se tratando das variáveis: Polissacarídeos, Tirosina e Amida I. Este procedimento foi proposto por WINER et al. (1971) e JOHNSON et al. (1998). Não há, na literatura existente, o algoritmo de classificação elaborado para esse estudo, unido à análise univariada seguida de análise discriminante dos dados espectrais.

De acordo com OLIVEIRA (2003), uma das vantagens do uso da técnica da análise estatística multivariada é possibilitar a classificação da amostra com alta definição de categorias, complementando seu uso nos casos nos quais não é conhecida a composição bioquímica da mesma. Isto é importante, porque nem sempre se tem a informação completa da composição de determinado material ou composto, na maioria das vezes, conhece-se apenas parte dos constituintes. Esse tipo de técnica permite a

redução de diferenças entre os pontos representativos das amostras, obtendo padrão de variabilidade característico dos espectros. Nesse estudo, por meio da análise multivariada dos dados, também foi possível demonstrar que a espectroscopia Raman é capaz de diferenciar o melanoma primário, do nevo pigmentado, assim como da pele normal, com 75,3% de eficiência.

6.1 ESTUDOS FUTUROS

É importante a implementação da biblioteca espectral com espectros dos cânceres que acometem a pele em tecidos *ex-vivo*. Ainda, é necessário analisar, individualmente, a célula, para se estabelecer marcadores tumorais na membrana plasmática dos diferentes tipos de tecido. Espera-se, diante dos resultados apresentados, que outros pesquisadores se interessem pelo tema, com o objetivo de desenvolver outros estudos na área da Oncologia, utilizando a Espectroscopia Raman.

7. CONCLUSÕES

Os dados espectrais FT-Raman foram qualificados e as variáveis: Polissacarídeos, Tirosina e Amida-I permitiram a diferenciação entre o melanoma cutâneo e nevo pigmentado.

8. REFERÊNCIAS

- AFSETH, N. K.; SEGTAN, V. H. and WOLD, J. P. "Raman Spectra of Biological Samples: A Study of Preprocessing Methods," **Appl Spectrosc.** 2006; 60:1358-67.
- BAKOS L. Melanomas malignos e etnia. **Anais Bras Dermatol;** 1991; 66:299-302.
- BIGIO, I.J.; BOWN, S.G. Spectroscopy sensing of câncer and câncer therapy. **Landes Bioscience.** 2004; 33: 259-67.
- BITTAR, R.A.; MARTINHO, H.; TIERRA-CRIOLLO, C.J.; MOURÃO NETO, M.; MARTIN, A.A. Biochemical analysis of human breast tissue using FT-Raman spectroscopy. **J Biom Opt;** 2006; 11:1-8.
- CHAMAS R, DUARTE APM, OTAKE AH, COSTA Mda. Genética e Biologia Molecular do Melanoma e de Sua Progressão. In: Oliveira Filho RS de. **Melanoma Cutâneo Localizado e Linfonodo Sentinela.** São Paulo: Lemar, 2004, p. 1-17.
- CHANG, A.E., KARNELL, H.R., MENCK, H.R. The National Cancer Data Base Report on cutaneous e noncutaneous melanoma: summary of 84.836 cases from the past decade. **Cancer** 1998; 83:299-302.
- CHOO-SMITH, L. P. et al. Medical applications of Raman spectroscopy: From proof of principle to clinical implementation. **Biopolymers,** 2002 ; 67:1, p.1-9.
- CLARK Jr WH, ELDER DE, GUERRY D et al. A study of tumour progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol.** 1984; 15:1147-65.
- CLARK, WH. Tumour progression and the nature of cancer. **Br. J Cancer** 1991; 64:631-44.
- CORRÊA NETTO, A. **Clínica Cirúrgica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 169 p.
- CRIADO PR, VASCONCELLOS C, SITTART JAS et al. Melanoma maligno cutâneo primário: estudo retrospectivo de 1963 a 1997 no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. **Rev Ass Med Brail** 1999; 45-157-62.

CRUPI, V. et al. Recent results on biomedical problems: A Fourier transform infrared (FT-IR) study. **Spectroscopy – An International Journal**, 2002; 16:3-4, p.245-50,

DACOSTA, R. S.; WILSON, B. C.; MARCON, N. E. New optical technologies for earlier endoscopic diagnosis of premalignant gastrointestinal lesions. **Journal of Gastroenterol and Hepatol**, 2002; 17:S85-S104.

EDWARDS, H.G.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. – Potencial applications of FT-Raman spectroscopy for dermatological diagnostics. *J Mol Struc* 1995; 347: 379-88.

ENOKIHARA, MMSS. **Estudo morfológico e imuno-histoquímico dos linfonodos sentinelas de pacientes com melanoma cutâneo primário**. Tese (Doutorado) UNIFESP, 2003.

FENTON DA, MAYOU B, ATHERTO D et al – Histopathology of giant congenital melanocytic naevi: implications for treatment [abstract]. **Br J Dermatol** 1987; 117 (suppl 32):40.

FERNANDES NC, CARDOSO ICL, MACEIRA J e PEREZ M. Melanoma: estudo retrospectivo de 47 casos. **Anais Bras Dermatol** 1996; 71:479-84.

FESTA NETO C. Epidemiologia e Prevenção Primária do Melanoma Cutâneo, p. 21-30. In: Oliveira Filho RS de. **Melanoma Cutâneo Localizado e Linfonodo Sentinela**. São Paulo: Lemar, 2004.

GNIADCKA M.; PHILIPSEN, P. A. S. Sigurdsson, S. Wessel, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, J. Hercogova, K. Rossen, H. K. Thomsen, R. Gniadecki, L. K. Hansen, H. C. Wulf. Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks: Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue. **Journal of Investigative Dermatology** 2004, 122.

GNIADCKA, M. et al. Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**. 1997 (a); 28:2-3, p.125-9.

GNIADCKA, M. et al. Distinctive Molecular Abnormalities in benign and Malignant Skin Lesions: Studies by Raman Spectroscopy. **Photochemistry and photobiology**. 1997 (b); 66:4, p.418-21.

GNIADCKA, M. et al. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. **J Invest Dermatol.**, 1998; 110:4.

GREENE MH, CLARK WH, TUCKER MA et al – High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. **An Intern Med** 1985; 102:458-65.

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

HARLAND, M., MISTRY, S., BISHOP, D.T e BISHOP, J.A.N. A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. **Hum Mol Genet**; 2001; (23): 2679–86.

HATA, T. R. et al. Non-invasive Raman spectroscopy detection of carotenoids in human skin. **J Invest Dermatol** 2000; 115:3.

HUANG, Z.W. et al. Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time *in vivo* skin measurements. **Optics letters** 2001; 26:22, p.1783-4.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. **Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil**. Banco de dados. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa/2006/versãofinal.pdf>>. Acesso em: 04 de abril de 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em abril de 2002.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W.. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. Fourth Edition. Prentice Hall, 1998.

KAMINAKA, S. et al, Near-infrared multichannel Raman spectroscopy toward real-time *in vivo* cancer diagnosis. **J Raman spectrosc** 2002; 33:7, p.511-6.

KANZLER MH & MRAZ-GERNHARD S – Primary cutaneous malignant melanoma and its precursors lesions: diagnostic and therapeutic overview. **J Am Acad Dermatol** 2001; 45:260-76.

KITTLER, H, PEHAMBERGER H, WOLFF K, *et al.* - Diagnostic accuracy of dermoscopy. **Lancet Oncol**, 2002, (3):159-65.

KRAFFT, C. Bioanalytical applications of Raman spectroscopy. **Anal Bioanal Chem.** 2003; 378:60-2.

LIU, C.H., SHA, G.W.L., TANG, GC. Et al. Raman, fluorescence, and time-resolved light scattering as optical diagnostic techniques to separate diseased and normal biomedical media. **J Photochem Photobiol B.**, 1992 Oct. 30:16(2):187-209.

LUCAS EA, DEPS PD, LIMA JGB et al. Melanoma maligno: estudo casuístico retrospectivo de 1982 a 1992, no Hospital Universitário da UFES. **Arq Bras Med** 1994; 68:67-70.

MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. Raman Spectroscopy for the Detection of Cancers and Precancers. **Journal of Biomedical Optics** 1996; 1:1, p.31-70.

MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. Raman Spectroscopy for cancer detection: A review. Proceedings - **19th International Conference**, 1997; p.2722-828.

MAIA, M., RUSSO, C., FERRARI, N., RIBEIRO, MCS de A., SANTOS, ABOS. Reflexões em relação à epidemiologia do melanoma cutâneo no Brasil. **An Bras Dermatol**. 2002; 77:163-70.

MARSHALL, F. F. Spectroscopy in prostate cancer: hope or hype? **Oncology – New York**, 2001; 15:11, p.1418.

MIZUNO, A., TSUJI, M. FUJII, K. et al. Near-infrared Fourier Transform Raman spectroscopic study of cornea and sclera. **J Ophthalmol**. 1994; 38(1):44-8.

MOLIFE R, LORIGAN P & MacNEIL S – Gender and survival in malignant melanoma. **Cancer Treat Rev** 2001; 27:201-9.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

NUNES, L. O. et al. FT-Raman Spectroscopy study for skin cancer diagnosis. **Spectroscopy**, 2003; 17:2-3, p.597-602.

OLIVEIRA FILHO, R.S. **Melanoma cutâneo localizado e linfonodo sentinela**. São Paulo: LEMAR, 2003.

PAPAS, D.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D. Raman spectroscopy in bioanalysis. **Talanta**, 200; 51:131.

PASCHOAL FM, ALMEIDA GOO de. Diagnóstico Clínico, Dermatoscopia e Diagnóstico Precoce. In: Oliveira Filho RS de. **Melanoma Cutâneo Localizado e Linfonodo Sentinela**. São Paulo: Lemar, 2004, p. 51-73.

PASCHOAL FM, ENOKIHARA MMS e S – Lesões precursoras do melanoma: nevos melanocíticos, nevos displásicos e nevos congênitos. In: OLIVEIRA FILHO RS de.

Melanoma Cutâneo Localizado e Linfonodo Sentinela. São Paulo: Lemar, 2004, p. 31-49.

PEREIRA, R.M.F. et al. Diagnosis of squamous cell carcinoma of human skin by Raman spectroscopy. **Optical Biopsy V.** 2004; 5326:106.

RAMAN, C.V.; KRISHNAN, K.S. **Indian Journal of Physics**, 1928; 2:399.

RUIZ-MALDONADO R, TAMAYO L, LATERZA AM & DURÁN C – Giant pigmented nevi: clinical, histopathologic, and therapeutic considerations. **J Pediatric** 1992;120:906-11.

RUIZ-MALDONADO R. Conduite à tenir vis-à-vis des anevus géants congénitaux. **Ann Dermatol Venereol** 1999; 126:792-4.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho.** São Paulo: Unesp, 1995.

SCHRADER, B. et al. Raman Spectroscopy in Medicine and Biology: results and aspects. **J Mol Struct** 1999; 480/481:21-32.

SCHUT, T. C. et al. In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. **Anal. Chem.**, 2000; 72:6010-8.

SHAFER-PELTIER, K. E. et al. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. **J Raman spectrosc**, 2002; 33:7, p.552-63.

SHIM, M. G.; WILSON, B. C. Development of an *in vivo* Raman Spectroscopic System for Diagnostic Application. **Journal of Raman Spectroscopy** 1997; 28:131-42.

SONG, L. M. W. K. et al. Spectral diagnosis of colon cancer in an animal model and spectral classification of human colon polyps using Raman spectroscopy. **Gastroenterolo** 2000; 78:1, p.1538.

STONE, N. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. **Journal of Raman Spectroscopy**, 2002; 33:564-73.

THOMAS L, TRANCHAND P, BERARD F, SECCHI T, Colin C & Moulin G – Semiological value of ABCDE criteria in the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. **Dermatology** 1988; 197:11-7.

TWARDOWSKI, J.; ANZENBACHER, P. **Raman and IR Spectroscopy in Biology and Biochemistry**, Ellis Horwood: New York, 1994.

URIST, M.M., KARNELL, L.H. The National Cancer Data Base Report On Melanoma. **Cancer** 1994; 74:782-8.

UTZINGER, U. et al. Near-infrared Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical precancers. **Applied Spectroscopy** 2001; 55:.8, p.955-9.

VENKATAKRISHNA, K. et al. Optical pathology of oral tissue: A Raman spectroscopy diagnostic method. **Curr. Science India** 2001; 80 :5, p. 665-9.

WEINSTOCK, M.A. Cutaneous melanoma: public health approach to early detection. **Dermatol. Ther** 2006; 19:26-31.

WINER, B.J. (1971). **Statistical Principles in Experimental Design**. 2nd ed. Tokyo: McGraw-Hill.

ZONIOS, G. et al. Spectral Pathology. **Ann N. Y. Academy of Science** 1998; 9:838, p. 108-115.

RESUMO

Objetivo: Qualificar os dados espectrais de modo a diferenciar o melanoma cutâneo do nevo pigmentado. **Metodologia.** Foram obtidas lesões de melanoma cutâneo, de nevo pigmentado e de pele normal, de peças que estavam acondicionadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP. A peça cirúrgica principal foi encaminhada para exame anatomopatológico de rotina. As amostras das três variáveis foram descongeladas em solução fisiológica a 0,9%. Cada amostra foi dividida em 3,4 ou 5 frações de 2mm^3 . Antes de iniciar a coleta dos espectros de melanoma e nevo pigmentado utilizou-se amostra de pele normal para alinhar o sistema conforme os parâmetros referendados na literatura. Foram utilizadas 250 varreduras para todas as amostras, com potência de 300mW, resolução espectral de 4cm^{-1} e 7mm de abertura do feixe do laser. No total, foram coletados 105 espectros de tecido normal, 140 de tecido neoplásico e 126 de nevo pigmentado. **Resultados:** Os espectros FT-Raman de cada grupo diagnóstico apresentaram alta correlação entre os elementos do mesmo grupo, favorecendo a realização das médias espectrais. Boxplot foi construído a partir dos espectros de cada grupo estudado: pele normal, nevo pigmentado e melanoma cutâneo – a linha base corrigida na região espectral de 800 a 1800cm^{-1} e, posteriormente, foram normalizados vetorialmente. Os gráficos das médias e percentis 25 e 75 das variáveis espectrais foram feitos para observar a existência de um padrão espectral para cada grupo. No grupo de pele normal pôde-se notar que não houve grande variação entre os espectros; no grupo de nevo pigmentado existe variação notável devido à variedade histológica e, no terceiro grupo, Melanoma Primário, há uma variação espectral que, semelhantemente ao grupo Nevo Pigmentado, é evidente. Na Análise Univariada, usando os gráficos das médias e percentis 25 e 75, foram identificadas bandas específicas para cada modo vibracional conhecido. O último passo do estudo estatístico foi a Análise Discriminante aos Dados cujos resultados mostraram importante diferenciação entre os três grupos estudados, tratando-se das variáveis (modos vibracionais) Polissacarídeos (Banda I), Tirosina (Banda 6) e Amida I (Banda 10). A porcentagem de indivíduos corretamente classificados com esse critério foi de 75,3%, obtida por meio de Análise Discriminante, mostra a eficiência da análise empreendida. **Conclusão:** Os dados espectrais FT-Raman foram qualificados e as variáveis: Polissacarídeos, Tirosina e Amida-I permitiram a diferenciação entre melanoma cutâneo e nevo pigmentado.

Palavras-chaves: Melanoma Cutâneo. Espectroscopia FT-Raman. Diagnóstico Comparativo. Saúde Pública

SUMMARY

Objective: Qualify spectral data in order to differentiate the Pigmented Nevus from cutaneous melanoma. **Method.** Tissue samples were obtained from cutaneous melanoma, from Pigmented Nevus and from normal skin, from parts that were stored in the Laboratory of Vibration Spectroscopy of the Institute for Research and Development of UNIVAP. The main surgical piece was referred for a routine anatomical pathological examination. Samples of the three variables were thawed in a physiological solution at 0.9%. Each sample was divided in 3.4 or 5 fractions of 2mm^3 . Before starting the collection of spectra of melanoma and Pigmented Nevus, a sample of normal skin was used to align the system in agreement with the parameters referred in literature. A 250 scan sequence was used for all samples, with a power of 300mW, spectral resolution of 4cm^{-1} and an opening of 7mm for the laser beam. Altogether, 105 spectra of normal tissue, 140 of neoplastic tissue and 126 of pigmented nevus were collected. **Results:** The FT-Raman spectra of each group diagnosis showed high correlation between the elements of the same group, encouraging the implementation of spectral averages. A boxplot was built from the spectra of each group studied: normal skin, Pigmented Nevus and cutaneous melanoma - the baseline corrected in the spectral region from 800 to 1800cm^{-1} and later were standardized by vectors. The graphics of the averages and percentages of the 25 and 75 of the spectral variables have been made to observe the existence of a spectral pattern for each group. In the group of normal skin it could be observed that there was no great variation between the spectra; in the Pigmented Nevus group, there is a remarkable variation due to the histological variety, and in the third group, Primary Melanoma, a spectral variation, which, similar to the Nevus Pigmented group is very clear. In the Single Variable Analysis, using the graphics of the averages and percentages, 25 and 75, specific bands were identified for each vibrational mode known. The last step of the statistical study was the Discriminatory Analysis of data, the results of which showed significant differentiation between the three groups studied, in the case of the variables (variable forms) Polysaccharides (Band 1), Tyrosine (Band 6) and Amide I (Band 10). The percentage of individuals classified correctly with this criterion was 75.3%, reached through Discriminatory Analysis, which shows the efficiency of the analysis undertaken. **Conclusion:** The FT-Raman spectral data were qualified and the variables: Polysaccharides, Tyrosine and Amide-I, to allow the differentiation between cutaneous melanoma and Pigmented Nevus.

Keywords: Cutaneous Melanoma. Raman Spectral Analysis. Optical Biopsy. Discriminatory Analysis.

APÊNDICE A

ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman é a aplicação prática do efeito Raman para a obtenção de informações sobre a matéria e consiste basicamente na medida da variação da frequência da luz, quando um feixe de luz monocromática interage com moléculas da matéria e é espalhada perdendo energia. A medida dessa variação é que permite obter-se as informações sobre o material em estudo (FARIA; SANTOS, 1997).

Os elementos que compõem essa técnica se apóiam nos conceitos físicos descritos a seguir.

A.1 Efeito Raman

Esse efeito, descoberto, em 1928, pelo físico indiano C.V. Raman, depende dos processos de vibração e rotação das moléculas e consiste, essencialmente no espalhamento inelástico de um feixe de luz monocromático pela molécula, o que causa uma variação entre a energia do fóton espalhado e aquela do fóton incidente. Este espalhamento inelástico depende ainda de outras condições como, massa da molécula, os tipos de ligações que a compõem, a sua polarizabilidade e ocorre sempre que as dimensões da molécula forem menores do que o comprimento de onda (λ) da luz incidente (SALA, 1995).

Desta forma, considerando-se um fóton de energia, $E = h \cdot \nu_i$,

onde:

h = constante de Planck;

ν_i = frequência da energia do fóton incidente,

interagindo com uma molécula que está num estado vibracional de energia E_0 , podem ser gerados os seguintes tipos de espalhamento:

1. Elástico ou Espalhamento Rayleigh – neste caso, a molécula, no estado vibracional E_0 (que é o seu estado normal de energia), absorve a energia total do fóton ($h\nu_i$), passa para um estado excitado, num nível energético maior, E_1 e retorna em seguida para o estado vibracional E_0 , reemitindo integralmente a energia absorvida de forma que, $h\nu_e = h\nu_i$, como está mostrado na figura 17(a);
2. Inelástico, ou espalhamento Raman, ou efeito Raman – esse processo pode ocorrer de duas formas:
 - a. Na primeira, a molécula, ao interagir com o fóton, absorve uma pequena fração de sua energia antes de reemitir-lo, de forma que $h\nu_i - h\nu_e = h\Delta\nu$, que é a variação da energia entre o fóton incidente e a do fóton espalhado. Isso significa que a molécula está agora vibrando em outro patamar de energia, E_{ex} , acima daquele em que estava no seu estado normal, como está mostrado na figura 17(b). Este caso, em que a energia espalhada é menor do que a incidente, é chamado de “Stokes”.
 - b. Na segunda, antes da interação com o fóton, a molécula já está num estado de energia E_{ex} , ou seja, excitada, de forma que ao

absorver a energia $h\nu_i$ do fóton, passa para um patamar de energia ainda maior, E_2 . Nesse estado, a molécula reemite integralmente toda a energia em excesso de forma a voltar ao patamar normal E_0 . Assim, a energia de espalhamento do fóton é $h\nu_e = h\nu_i + h\Delta\nu$, ou seja, a energia espalhada é maior do que a energia incidente. Portanto, o processo Raman pode produzir fóton com a energia maior ou menor que a energia do fóton incidente. Este caso é chamado de ‘Anti-stokes’ e é mostrado na Figura 17(c).

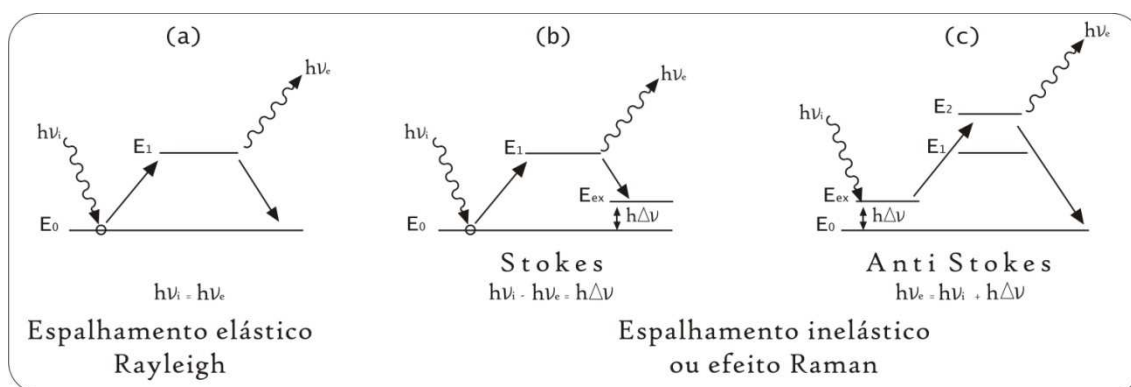


Figura 17 – Formas de Espalhamento

Na técnica da espectroscopia Raman, em função do uso de um feixe de luz monocromática, a aquisição dos dados é feita medindo-se a variação da frequência da luz, que é $\Delta\nu = \nu_e - \nu_i$. Isso, na prática, representa uma pequena variação na cor da luz monocromática, imperceptível ao olhar humano, mas, instrumentalmente, capaz de gerar um espectro mostrando as características do espalhamento, como na figura 18.

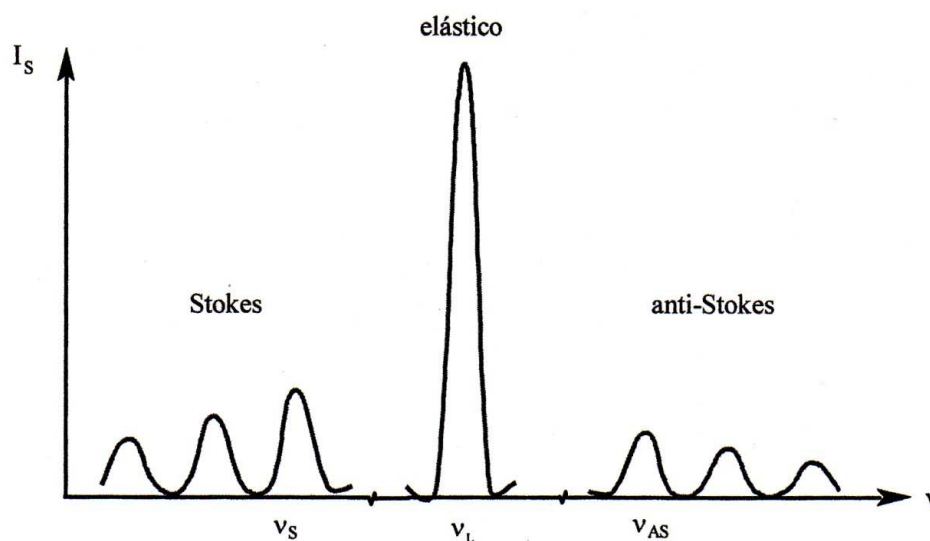


Figura 18 – Espectro Raman esquemático mostrando os processos Stokes (ν_S); Rayleigh (ν_L) e Anti-Stokes (ν_{AS})

Considerando ainda que o valor do comprimento de onda λ , associado à frequência é inversamente proporcional a esta, isto é, $\nu \propto 1/\lambda$ e, conseqüentemente, à energia, adota-se o cm^{-1} como unidade de energia.

A.2 Considerações sobre Espalhamento

A.2.1 A vibração molecular

O estado vibracional das moléculas refere-se ao movimento dos átomos que a compõem e que deixam fixo o seu centro de massa. Nessa condição, quando há deslocamento desse centro de massa, a molécula está em translação. Essas vibrações são fisicamente muito pequenas se comparadas às distâncias interatômicas e isto representa uma condição limitante para que ocorra um efeito Raman, pois a frequência da luz tem de

coincidir com uma dessas frequências de vibração para ser absorvida. Devido à simetria e as propriedades vibracionais das moléculas estas podem apresentar três modos diferentes de vibrações entre seus átomos. Na Figura 19, o primeiro é chamado de modo de estiramento simétrico (a), o segundo o modo de estiramento assimétrico (b) e o terceiro modo de dobramento (c).

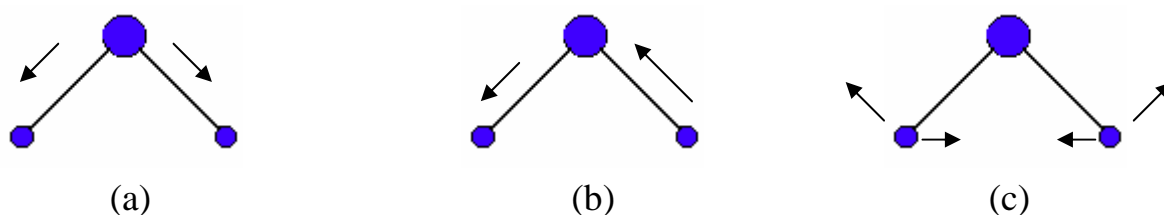


Figura 19 – Modos esquemáticos dos modos de vibração dos átomos

Além dessa condição, para que um modo vibracional seja Raman ativo, o feixe de luz incidente precisa gerar também um momento de dipolo elétrico na molécula para que ela varie ou, no caso da molécula já possuir um, a sua vibração, sob ação do feixe de luz, tem de ser induzida a fazer esse momento de dipolo variar. Para que o espalhamento seja inelástico, é preciso ainda que haja polarizabilidade, que é uma medida da predisposição da molécula em gerar um momento dipolo. Sendo assim, \mathbf{p} torna-se $\mathbf{p} = \alpha\mathbf{E}$, onde α é a polarizabilidade. Portanto, para que haja efeito Raman, é necessário variar a polarizabilidade (SALA, 1995).

A.2.2 A Detecção dos Modos de Vibração na Espectroscopia Raman

A obtenção de dados de uma amostra por espectroscopia Raman, em função dos modos de vibração das moléculas dessa amostra, pode ser exemplificada pela análise do tetracloreto de carbono (CCl_4), que tem a forma de um tetraedro (figura 20).

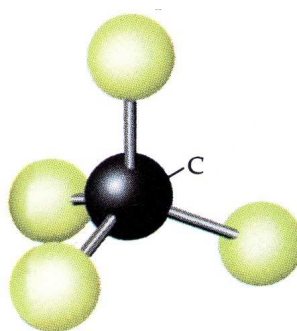


Figura 20 – Tetracloreto de carbono (CCl_4)

Como se vê, a molécula tem cinco átomos e, então, seus modos de vibração devem ser $(5 \times 3) - 6 = 9$. O espectro obtido dessa molécula (Figura 21), mostra quatro desses modos e as linhas Raman associadas a eles. Na verdade, essas quatro linhas correspondem aos nove modos vibracionais do CCl_4 , pois três delas estão em vários modos com energias iguais. São modos ditos ‘degenerados’. Por exemplo, a linha de 770cm^{-1} , corresponde ao modo chamado de ‘estiramento assimétrico, representa o conjunto de três modos de vibração, que só diferem pela orientação espacial dos momentos dos átomos. Logo, devem ter a mesma energia.

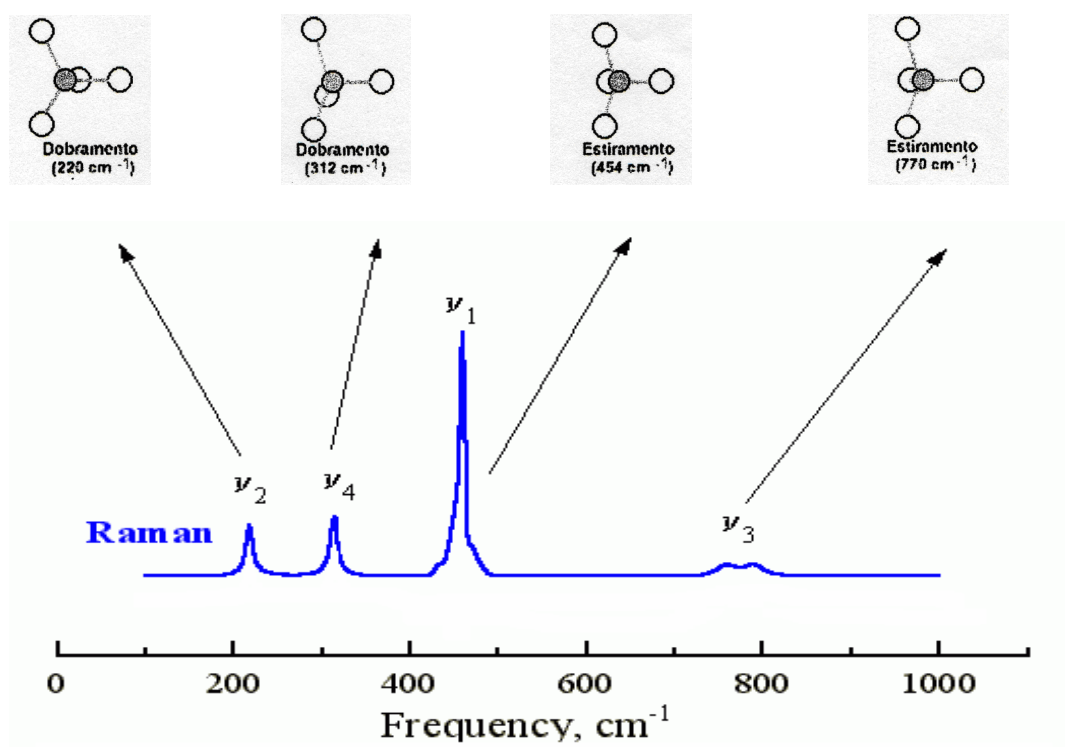


Figura 21 – Espectroscopia Raman do CCl₄

A.2.3 Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman)

O interesse em métodos de processamento digital de imagens vem principalmente de duas áreas de aplicações: para melhoria da informação para interpretação humana e para o processamento de dados em computador. A transformada de Fourier bi-dimensional, desenvolvida por Jean Baptiste Joseph Fourier, um matemático francês, se tornou uma ferramenta matemática de grande aplicabilidade na solução dos problemas de processamento digital de imagens, ou seja, promove a mudança do domínio do tempo ou espaço (x, y) para o domínio da frequência

facilitando, assim, o processamento digital da imagem (FONSECA NETO; ALCOECER, 1998).

O equipamento de espectroscopia Raman pode ser de dois tipos:

- a) Dispersivo ou
- b) com Transformada de Fourier (FT-Raman).

A técnica de espectroscopia Raman dispersiva, diferentemente da espectroscopia FT-Raman, utiliza grades de difração e energia de excitação laser na faixa do visível ou infravermelho próximo (830 nm), provocando, porém, no caso dos tecidos biológicos, forte interferência da fluorescência nos seus resultados. A fluorescência impede a detecção dos sinais Raman, devido sua alta intensidade quando comparada com o sinal Raman (SANTOS, 2001; SOARES, 2002).

Já o sistema FT-Raman usa um interferômetro que agrupa as frequências do espalhamento Raman em um único sinal. É composto de um separador de feixe, que tem a função de dividir o espalhamento Raman em dois feixes ópticos, um transmitido e outro refletido, figura 22.

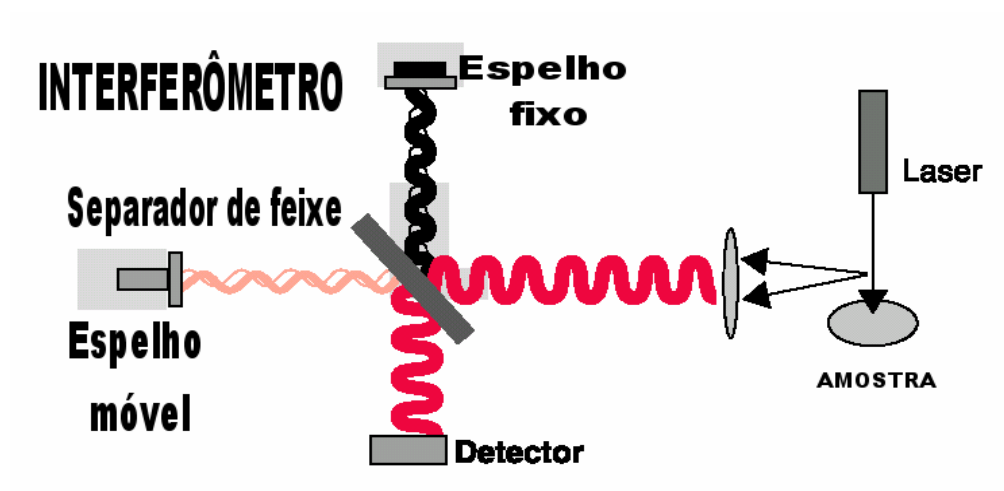


Figura 22 - Esquema do sistema de coleta FT-Raman (BRUKER, 1994)

Possui lentes de coleta, prismas, espelhos e um detector de germânio com alta sensibilidade próximo ao infravermelho, refrigerado por nitrogênio líquido, como ilustra a figura 23. Possui um filtro, que remove o espalhamento elástico, antes que este chegue ao detector, interferindo na captação do espalhamento inelástico que é o efeito Raman. Utiliza ainda, elementos ópticos que se movem, selecionando 90° ou 180° para o posicionamento perfeito da amostra (BRUKER, 1994).

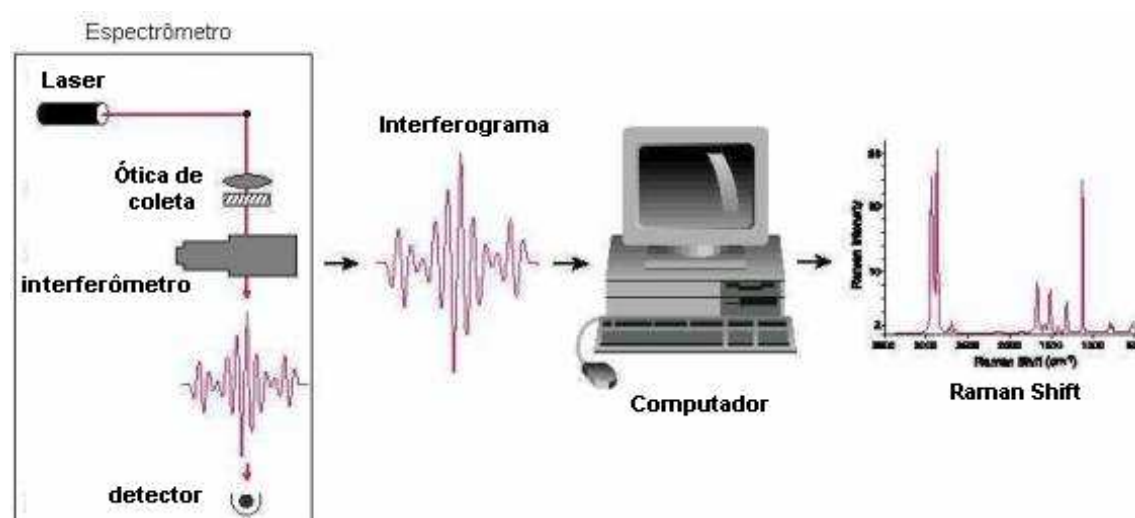


Figura 23 - Esquema geral do sistema de espectroscopia FT-Raman

FONTE: THERMO NICOLET (2002)

Segundo Schrader et al., (1999), na espectroscopia FT-Raman as frequências são decodificadas pelo uso da expressão matemática chamada de Transformada de Fourier, que é realizada por um *software* e a informação espectral é apresentada na forma de picos

A espectroscopia FT-Raman é a melhor escolha para análises de compostos com fluorescência ou compostos associados ao uso de substâncias fluorescentes (FERRARO, 1999), pois utiliza o laser Nd:YAG (1.064 nm), como energia de excitação, obtendo-se espectros mais

próximos do real (BRUKER, 1994). Isso foi possível, pois o Nd:YAG possui um maior comprimento de onda com 1.064 nm e, portanto, menor energia, o que causa uma redução nas transições eletrônicas, diminuindo consideravelmente a fluorescência.

A espectroscopia FT-Raman começou a ser utilizada para aplicações biomédicas em meados dos anos 80 (OZAKI et al., 1987; LAWSON et al., 1997). A partir, notou-se um avanço tecnológico marcado pela sua aplicabilidade em estudos com tecidos biológicos.

Importantes e bem-sucedidas análises com o FT-Raman têm sido desenvolvidas na Medicina Forense, nas indústrias têxtil, petroquímica, alimentícia e farmacêutica para identificações desconhecidas, ou até mesmo, na caracterização de materiais, na prevenção da qualidade de produção e em análises quantitativas (OZAKI et al., 1987; LAWSON et al., 1997).

Outra vantagem da espectroscopia FT-Raman é a utilização de fótons de baixa intensidade, da qual resultará uma degradação fotoquímica menor na amostra se comparado com as espectroscopias convencionais.

Após a radiação com a luz laser e a leitura do espalhamento inelástico Raman, são produzidos espectros característicos para cada amostra em análise. Os espectros são analisados e armazenados em um computador acoplado ao sistema FT-Raman. A figura 16 ilustra o processo completo, desde a incidência da luz laser sobre a amostra, passando pelo interferômetro, a detecção do sinal e a geração dos picos finais característicos da amostra (FERRARO JR., 1999).

A.2.4 Instrumentação em Espectroscopia FT-Raman

A Espectroscopia FT-Raman requer o uso de fontes de luz monocromáticas, ou seja, com um único comprimento de onda, visto que é baseada no deslocamento da frequência a partir da luz incidente, que é muito pequena e pode ser obscurecida por uma fonte de largos comprimentos de onda.

A Espectroscopia FT-Raman pode ser classificada baseada por sua fonte de luz utilizada, como por exemplo: ultravioleta (UV), visível e infravermelho (IR). Para a maioria das aplicações da espectroscopia FT-Raman na área Biológica/ Biomédica, fontes de excitação no infravermelho são mais utilizadas devido à propriedade física de se conseguir diminuir virtualmente a emissão de autofluorescência de, por exemplo, enzimas presentes nos os tecidos biológicos.

Os *lasers* mais comuns usados pela Espectroscopia Raman no infravermelho são: Neodímio Ítrio-Alumínio-Granada (Nd: YAG) e Titânio-Safira (Ti: Safira) (SALA, 1996). Quando uma luz monocromática no comprimento de onda visível, ou até mesmo em 780nm, é utilizada como fonte de excitação para o efeito Raman, estas linhas fracas, geralmente são encobertas 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 quântica da fonte de excitação para um grau tal que somente os níveis vibracionais são excitados, não os níveis eletrônicos. Com excitação a 1064 nm a partir de um *laser* de Nd: YAG, por exemplo, esta

fluorescência é virtualmente eliminada (SCHRADER, 1989; SCHRADER, 1995; SCHRADER; MOORE, 1997; SCHRADER, 1997).

A Espectroscopia Raman, também pode ser classificada de acordo com a tecnologia empregada, por exemplo: Transformada de Fourier (FT-Raman) ou de Sistemas Dispersivos. O Sistema FT-Raman tem inúmeras vantagens sobre o Sistema Dispersivo, incluindo a vantagem “multiplex” o qual lidera a capacidade de coletar vários comprimentos de onda em um curto período de tempo. No entanto, a Espectroscopia Raman Dispersiva tem se tornado muito mais popular desde o advento de um detector *Charge Couple Device Detector* (CCD), devido ao alto ganho de eficiência quântica. A partir desta tecnologia, provavelmente serão desenvolvidos os equipamentos para coleta de espectros Raman *in vivo*, a atual dificuldade é a baixa sensibilidade do detector CCD nos comprimentos de onda de excitação, acima de 830 nm (SCHRADER, 1989; SCHRADER, 1995; SCHRADER; MOORE, 1997; SCHRADER, 1997).

APÊNDICE B

Gráfico *Box Plot* relacionado aos grupos experimentais Pele Normal, Melanoma Primário e Nevo Pigmentado, respectivamente

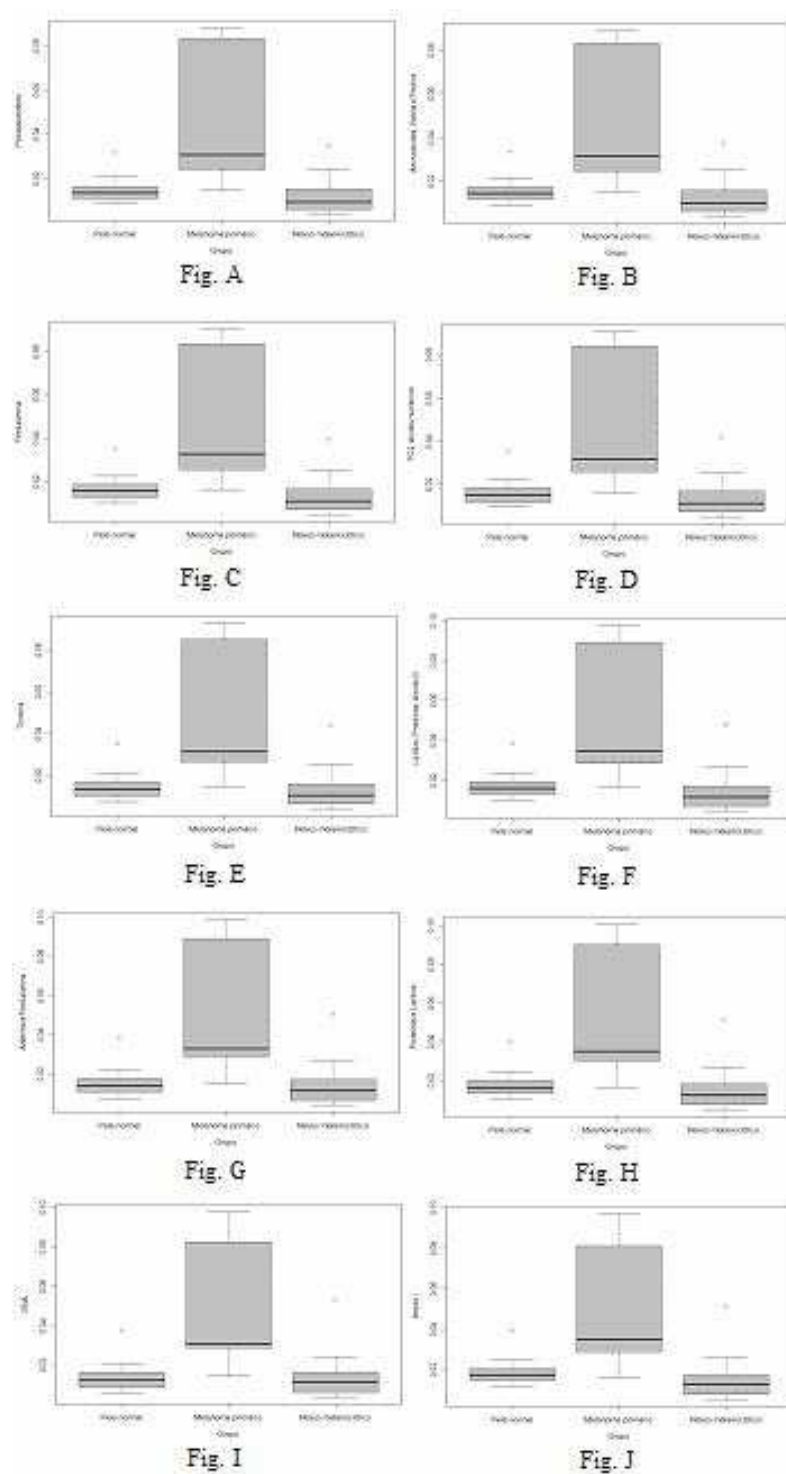


Figura 24 - Gráfico *Box Plot* relacionado aos grupos experimentais Pele Normal, Melanoma Primário e Nevo Pigmentado, respectivamente, as variações dos modos vibracionais: 1A – Polissacarídeos; 2B - Aminoácidos, Valina e Prolina; 3C - Fenilalanina (anel); 4D - PO₂, Ácidos Nucléicos; 5E – Tirosina; 6F - Lipídios, Proteínas, Amida-III; 7G - Adenina e Fenilalanina (Melanina); 8H - Proteínas e Lipídios; 9I - DNA (Adenina, Guanina, Fenilalanina, Melanina); 10J - Lipídios e Amida I (Proteínas).

APÊNDICE C

ESPECTROS DAS UNIDADES AMOSTRAIS

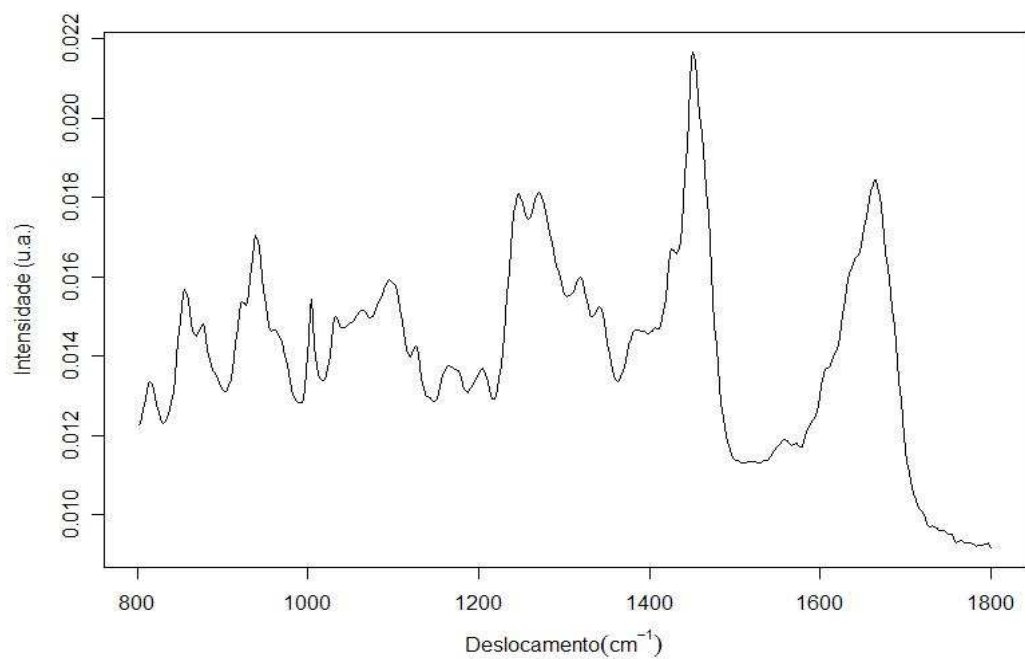


Figura 25 - Espectro observado para a primeira unidade amostral do grupo Pele normal

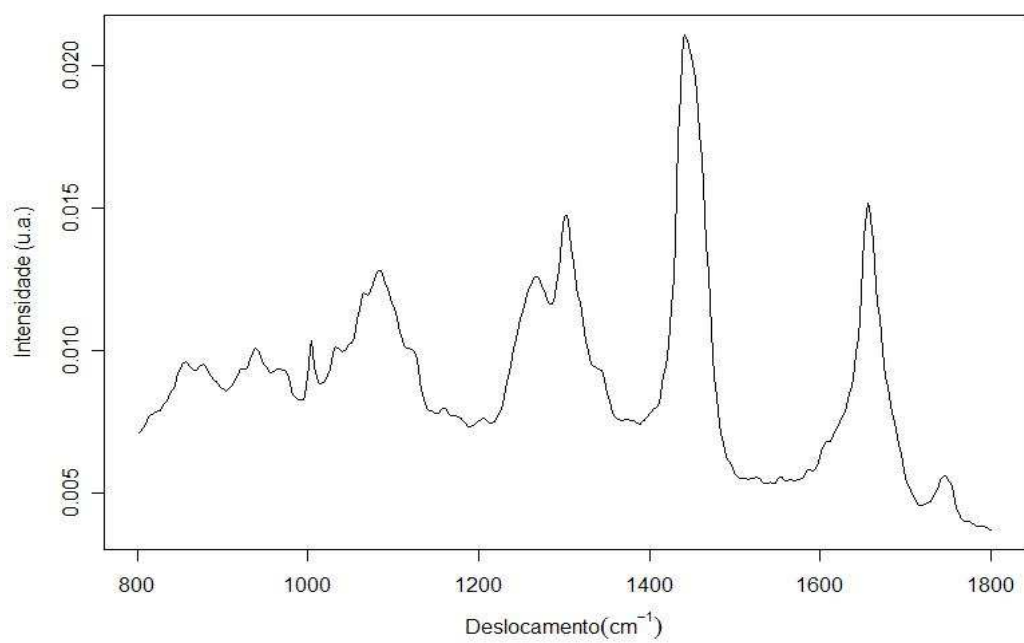


Figura 26 - Espectro observado para a segunda unidade amostral do grupo Pele normal

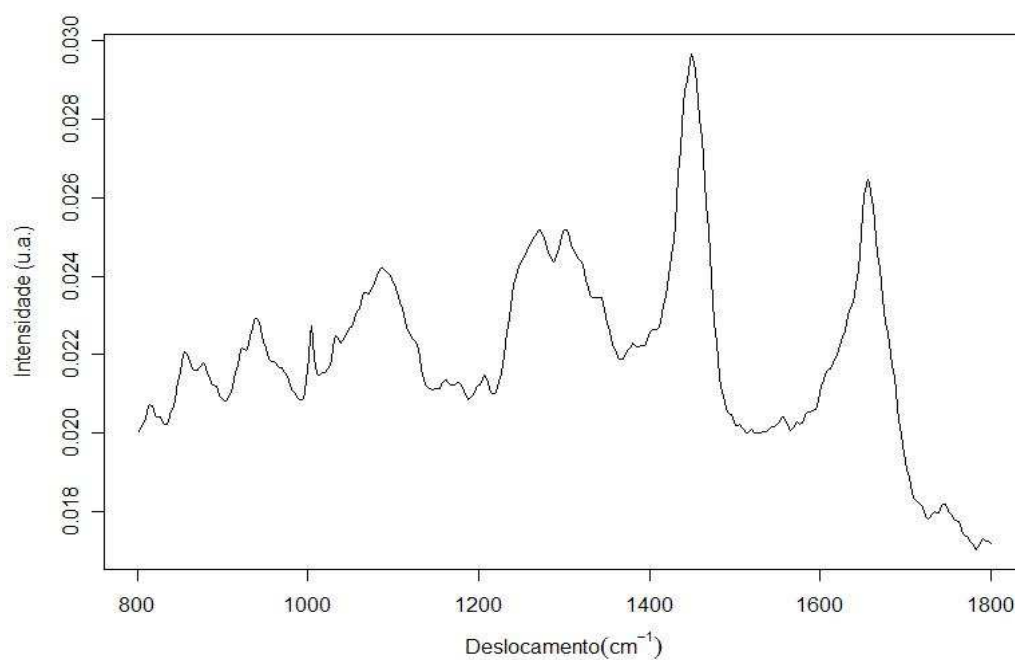


Figura 27 - Espectro observado para a terceira unidade amostral do grupo Pele normal

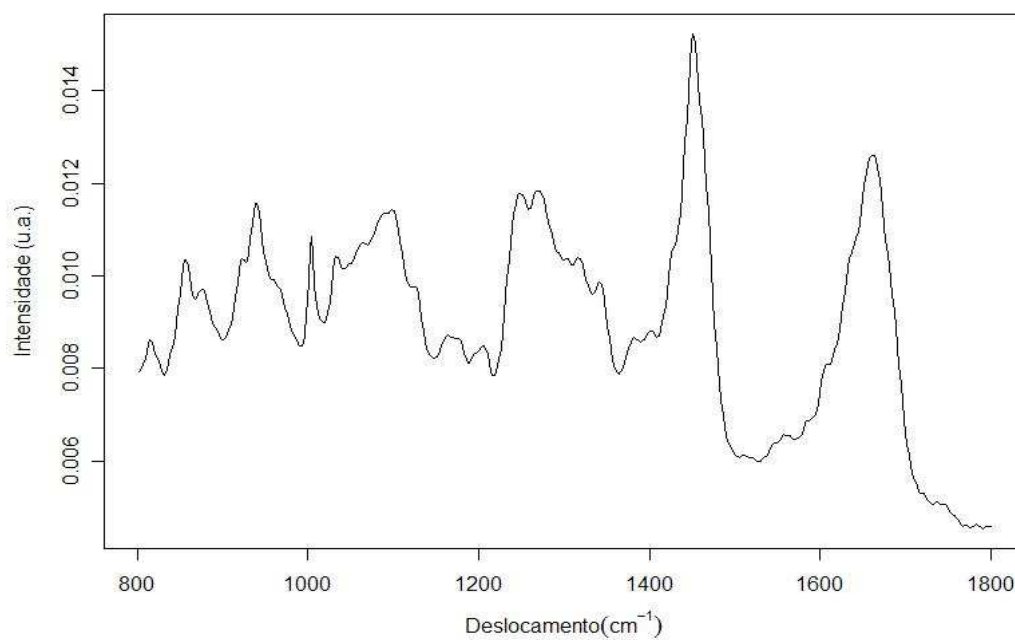


Figura 28 - Espectro observado para a quarta unidade amostral do grupo Pele normal

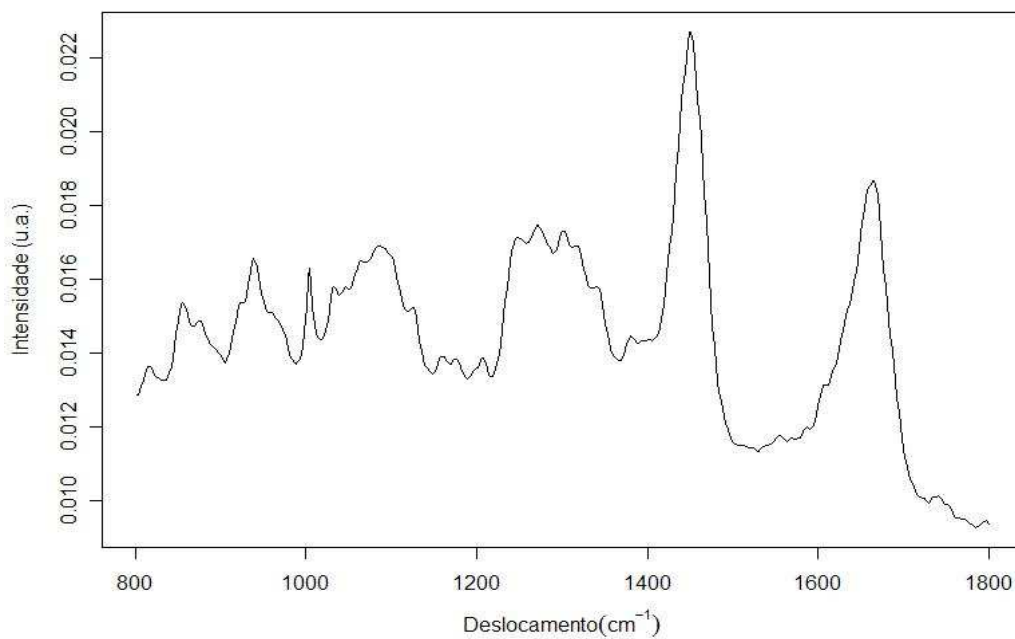


Figura 29 - Espectro observado para a quinta unidade amostral do grupo Pele normal

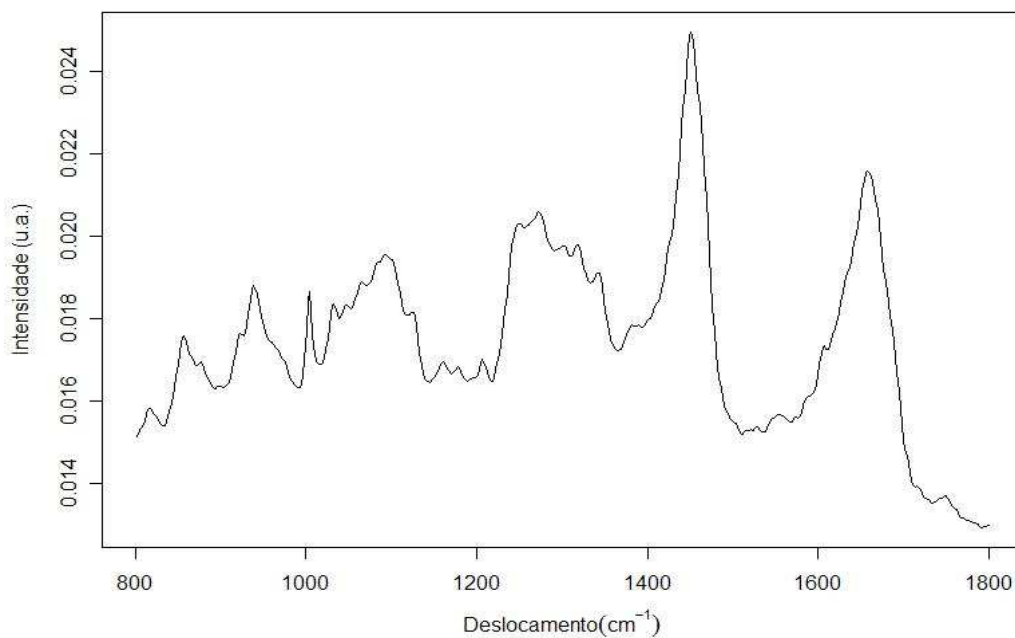


Figura 30 - Espectro observado para a sexta unidade amostral do grupo Pele normal

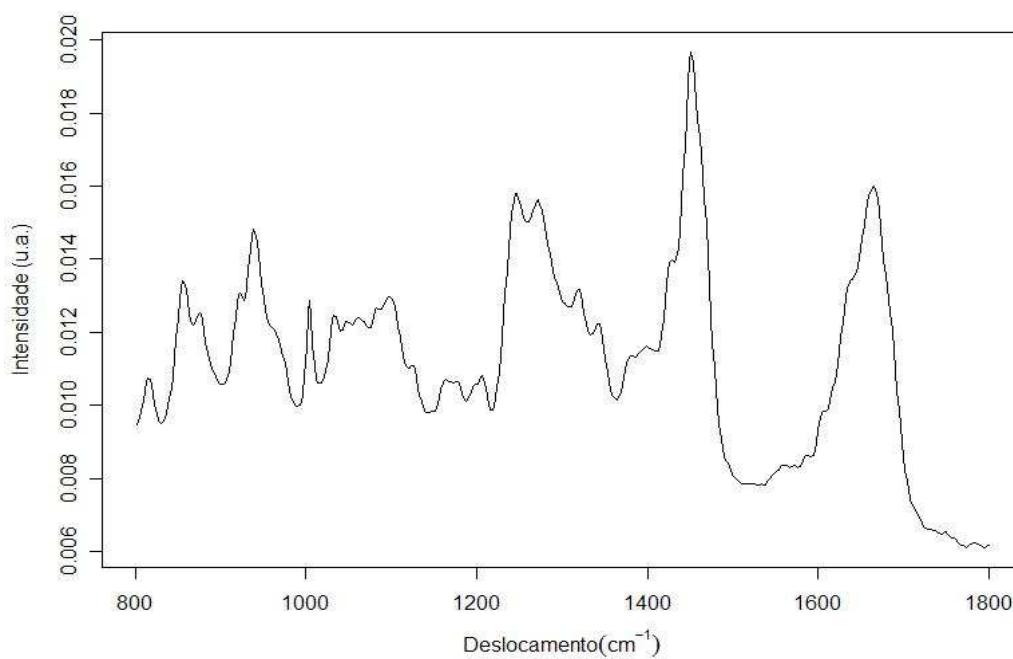


Figura 31- Espectro observado para a sétima unidade amostral do grupo Pele normal

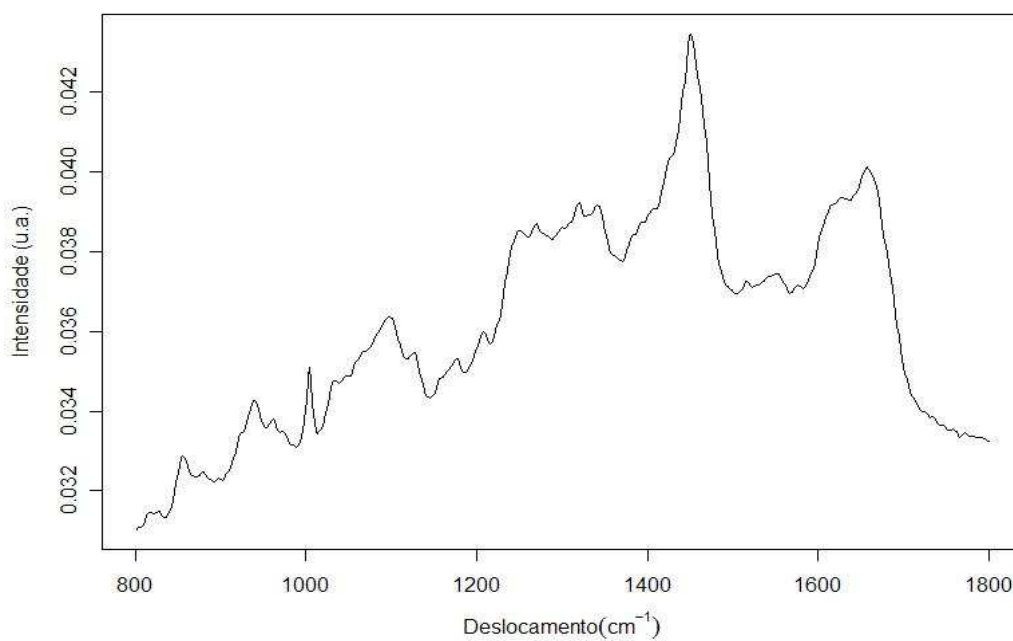


Figura 32 - Espectro observado para a oitava unidade amostral do grupo Pele normal

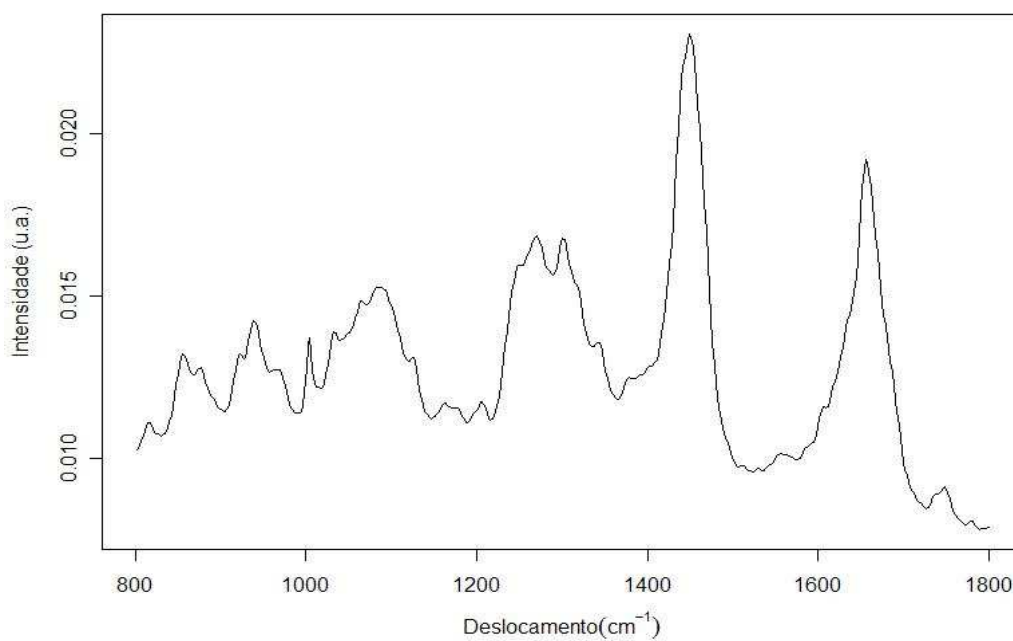


Figura 33 - Espectro observado para a nona unidade amostral do grupo Pele normal

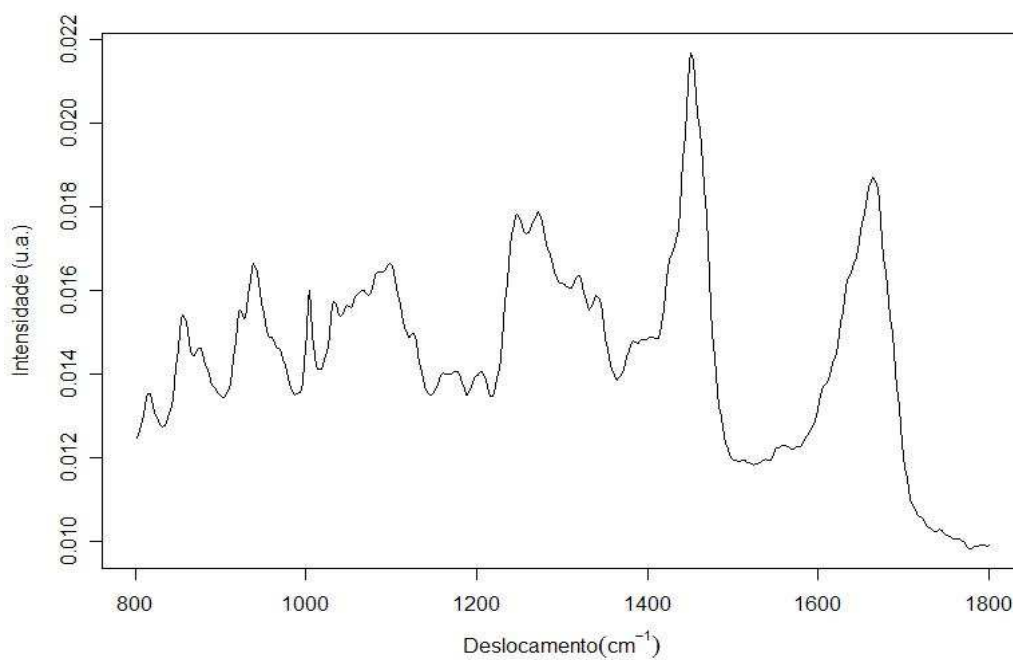


Figura 34 - Espectro observado para a décima unidade amostral do grupo Pele normal

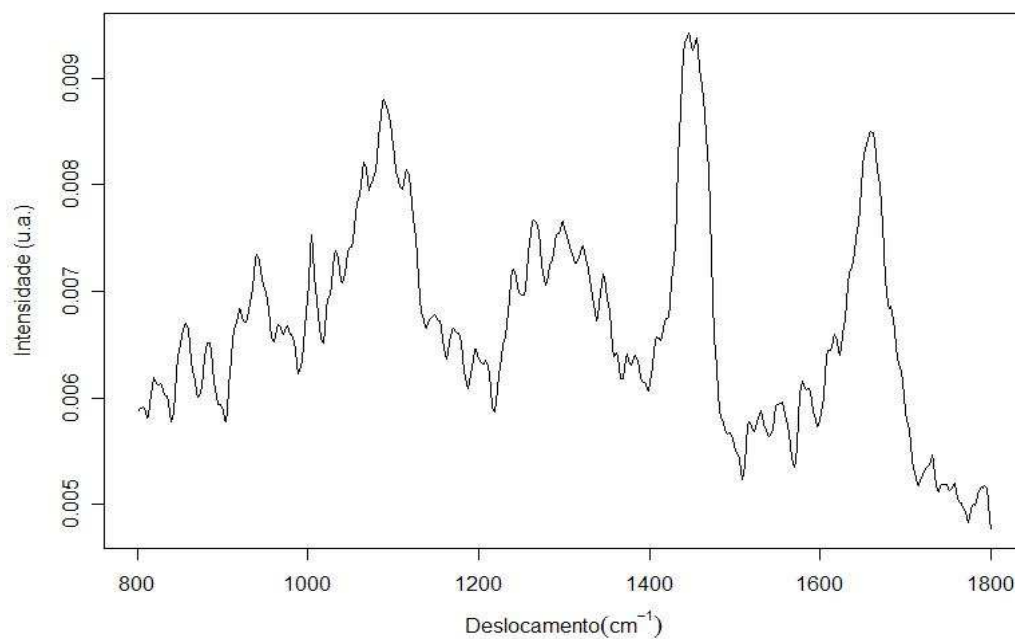


Figura 35 - Espectro observado para a primeira unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

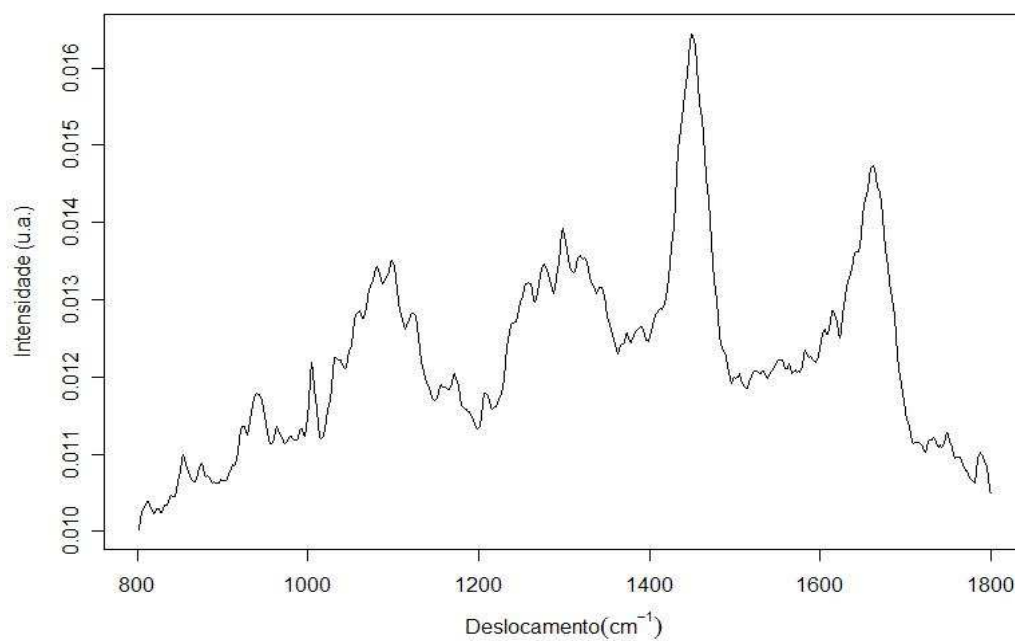


Figura 36 - Espectro observado para a segunda unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

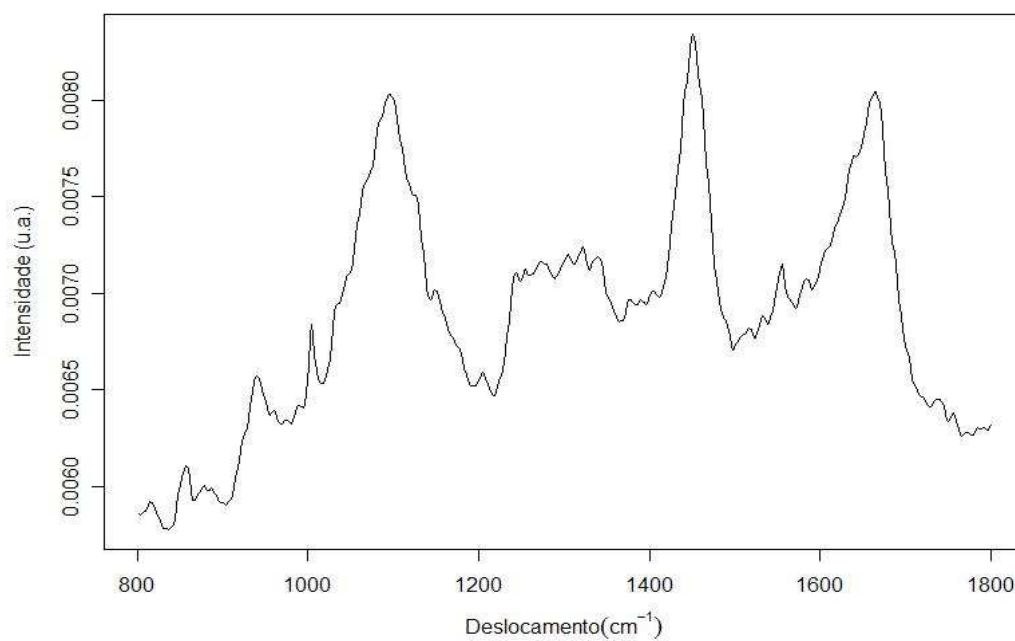


Figura 37 - Espectro observado para a terceira unidade amostral do grupo Neve pigmentado

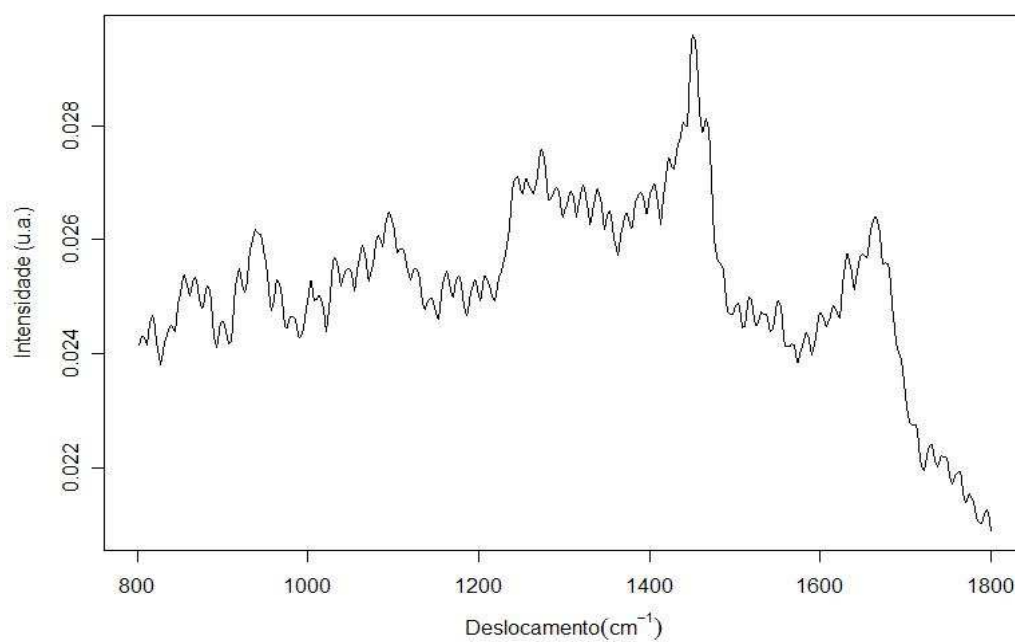


Figura 38 - Espectro observado para a quarta unidade amostral do grupo Neve pigmentado

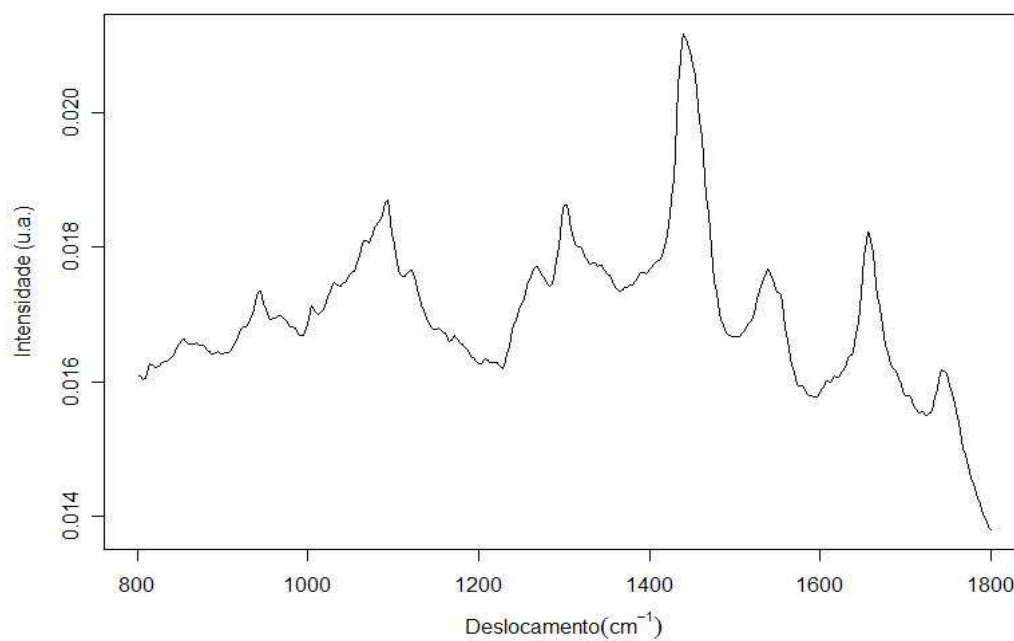


Figura 39 - Espectro observado para a quinta unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

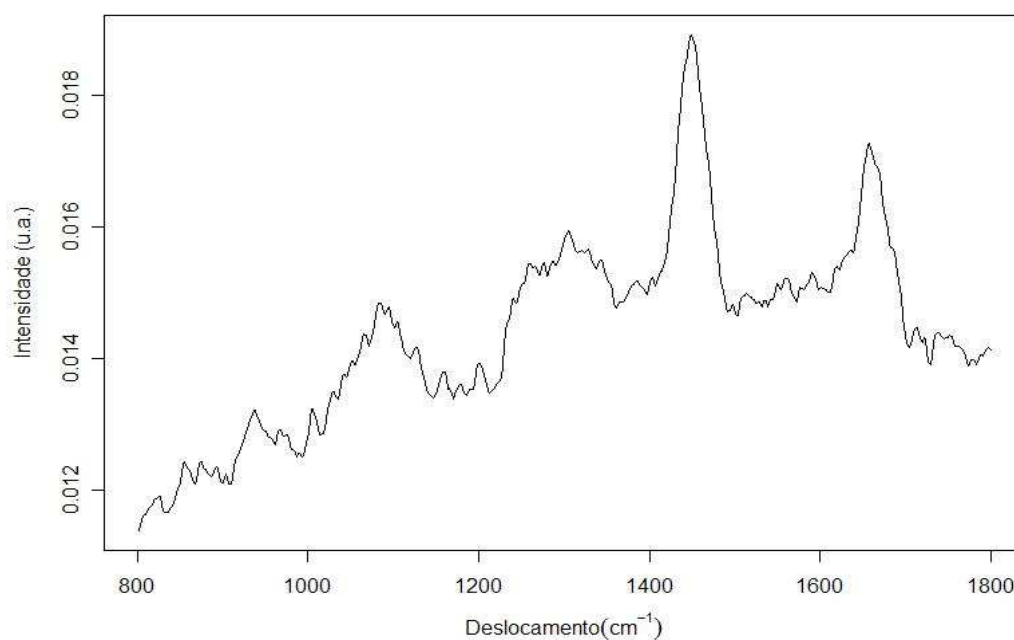


Figura 40 - Espectro observado para a sexta unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

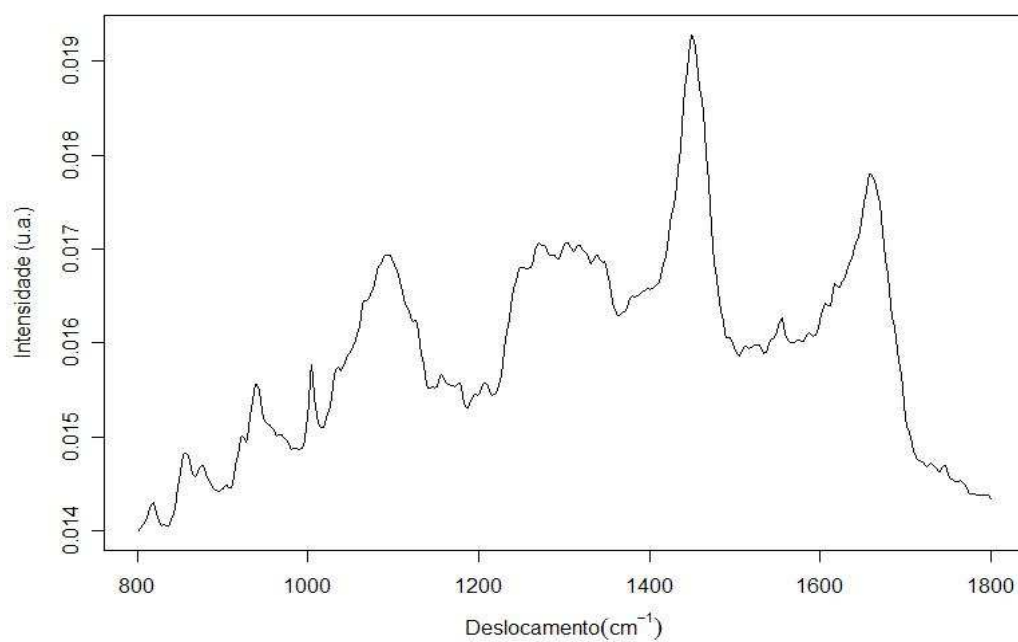


Figura 41 - Espectro observado para a sétima unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

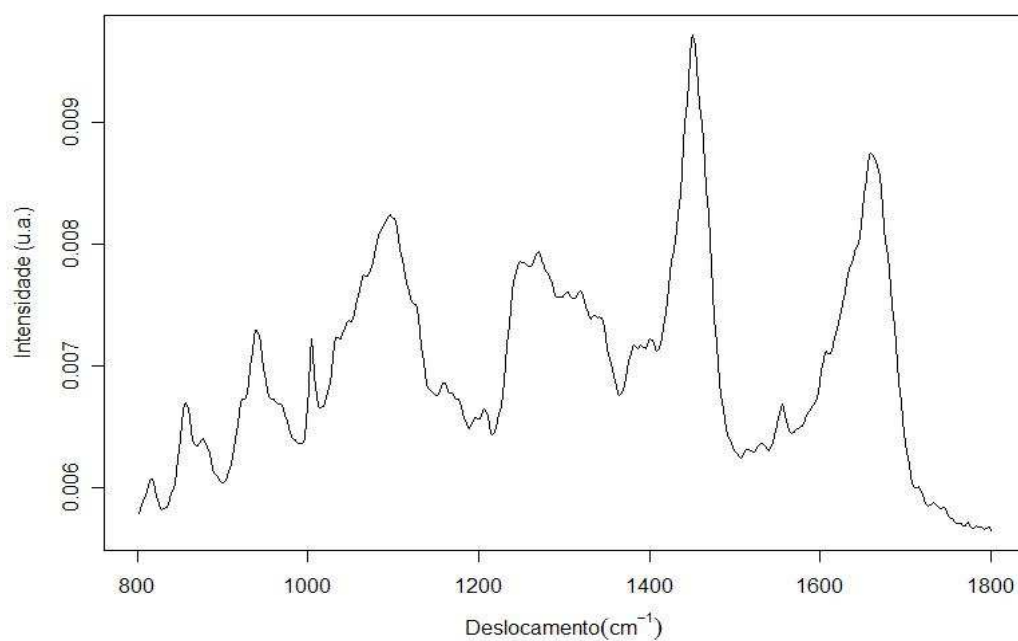


Figura 42 - Espectro observado para a oitava unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

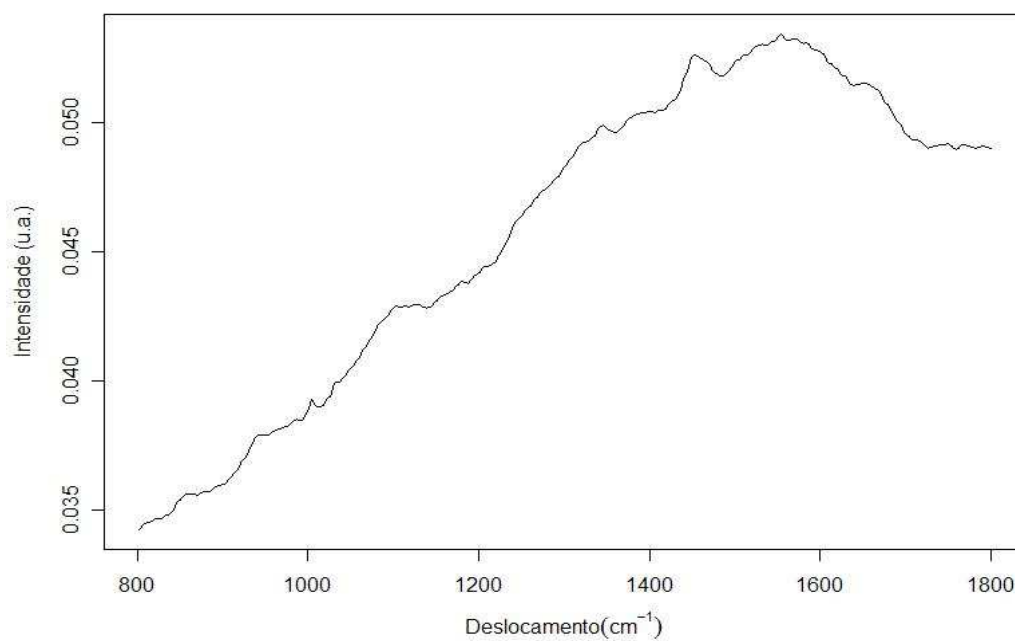


Figura 43 - Espectro observado para a nona unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

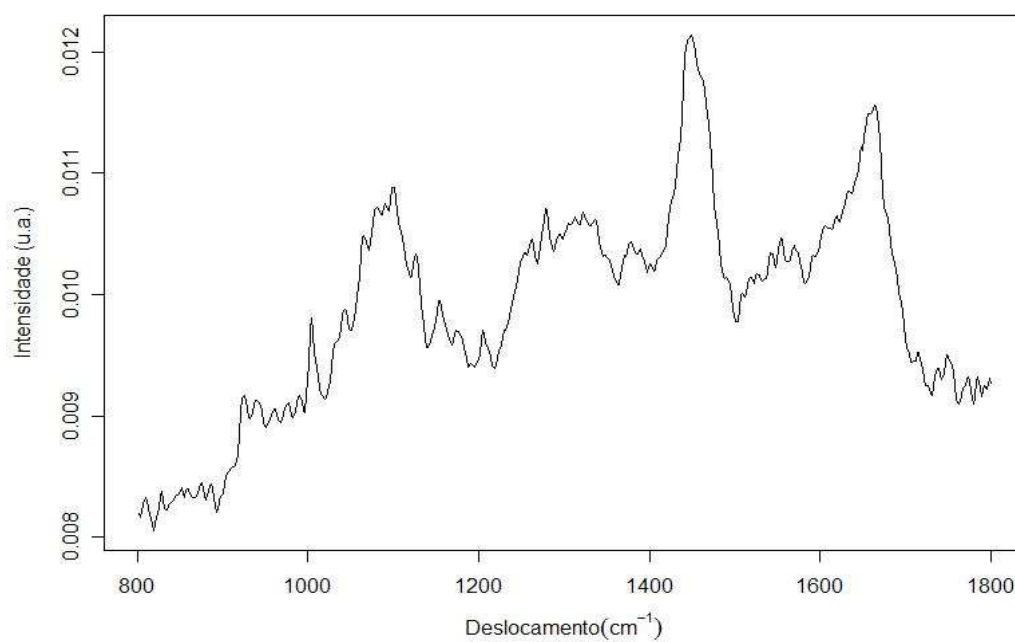


Figura 44 - Espectro observado para a décima unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

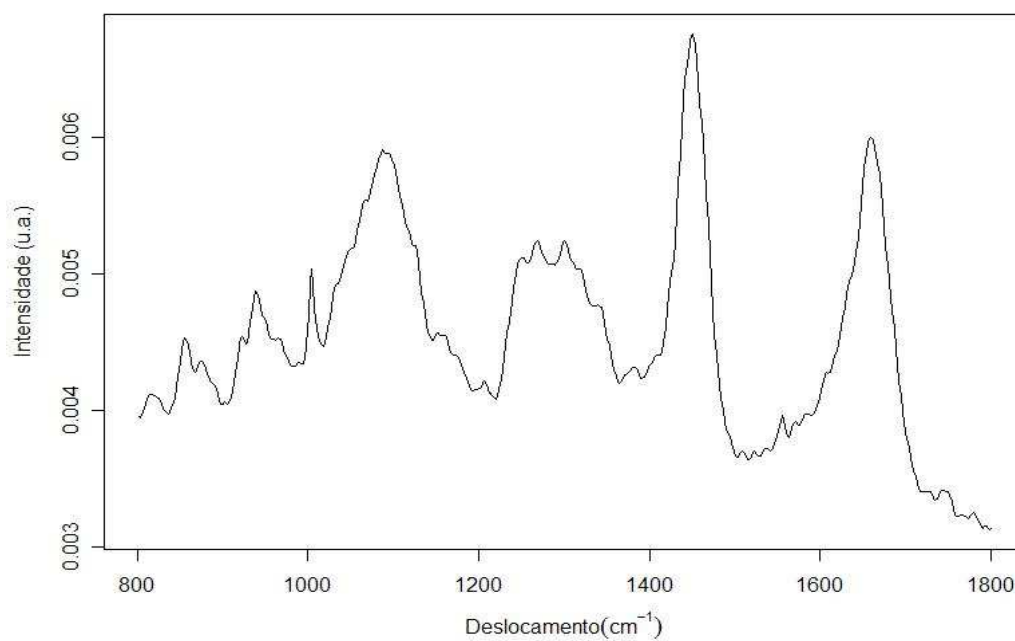


Figura 45 - Espectro observado para a décima primeira unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

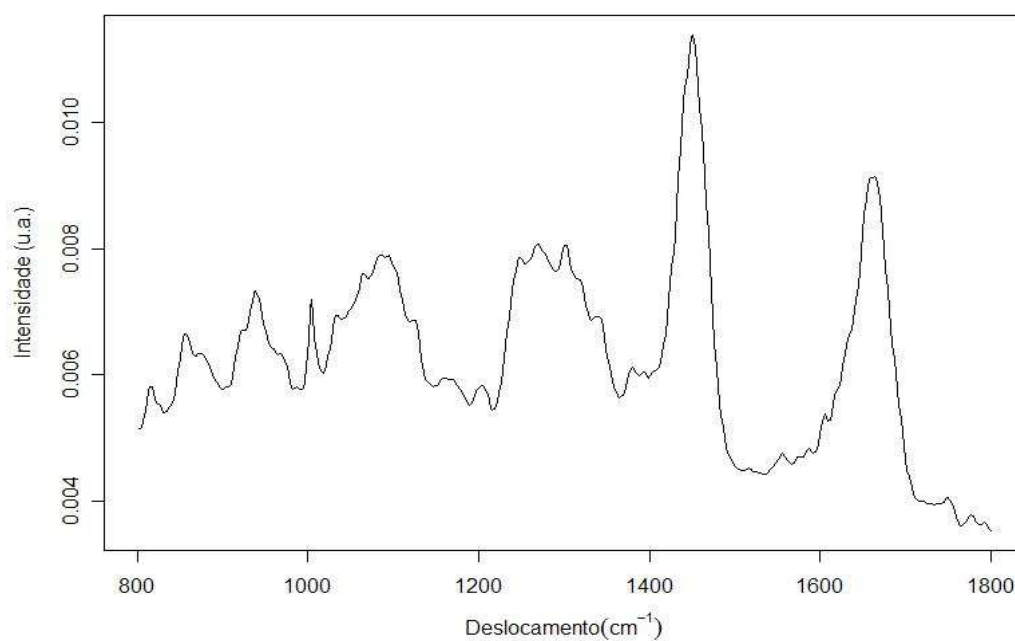


Figura 46 - Espectro observado para a décima segunda unidade amostral do grupo Nevo pigmentado

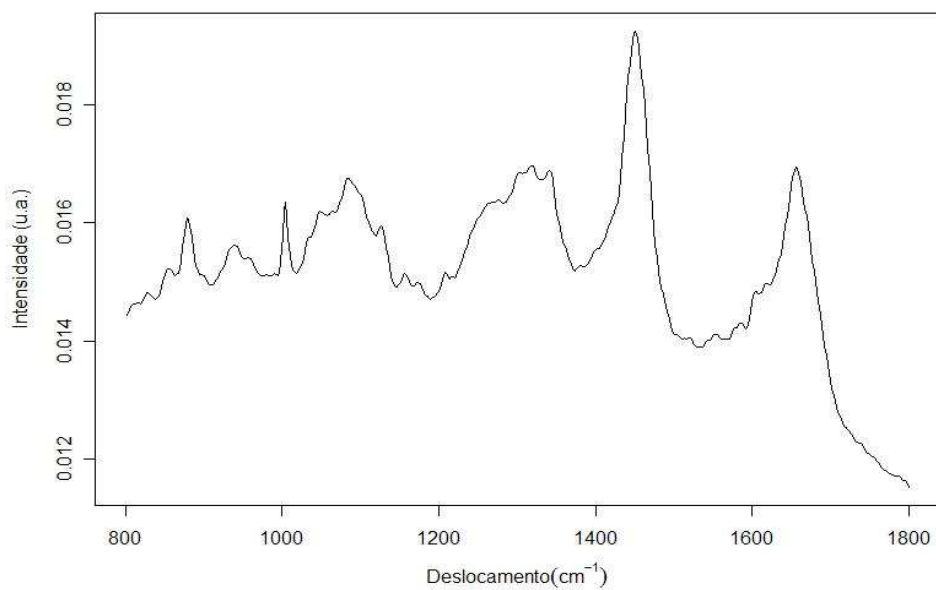


Figura 47 - Espectro observado para a primeira unidade amostral do grupo Melanoma primário

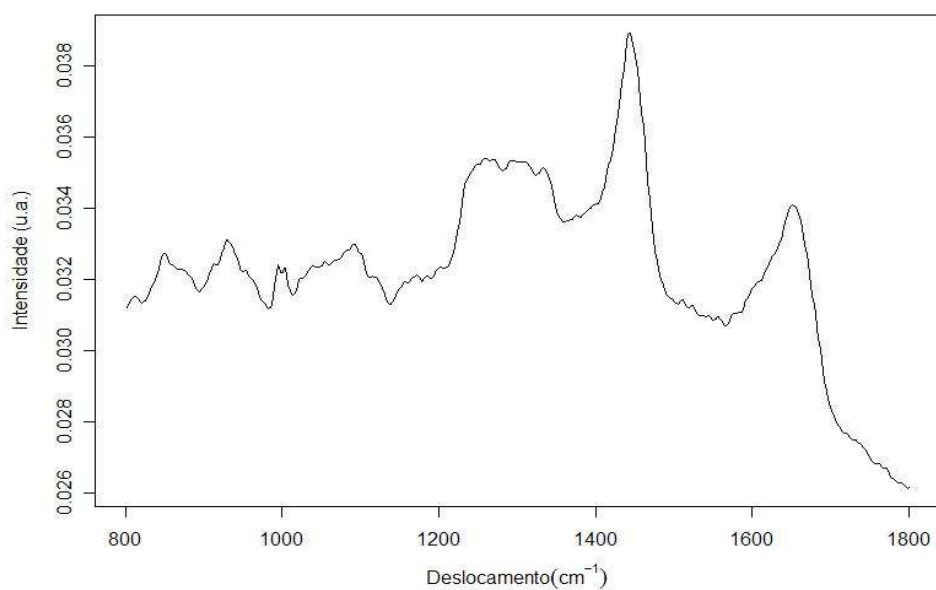


Figura 48 - Espectro observado para a segunda unidade amostral do grupo Melanoma primário

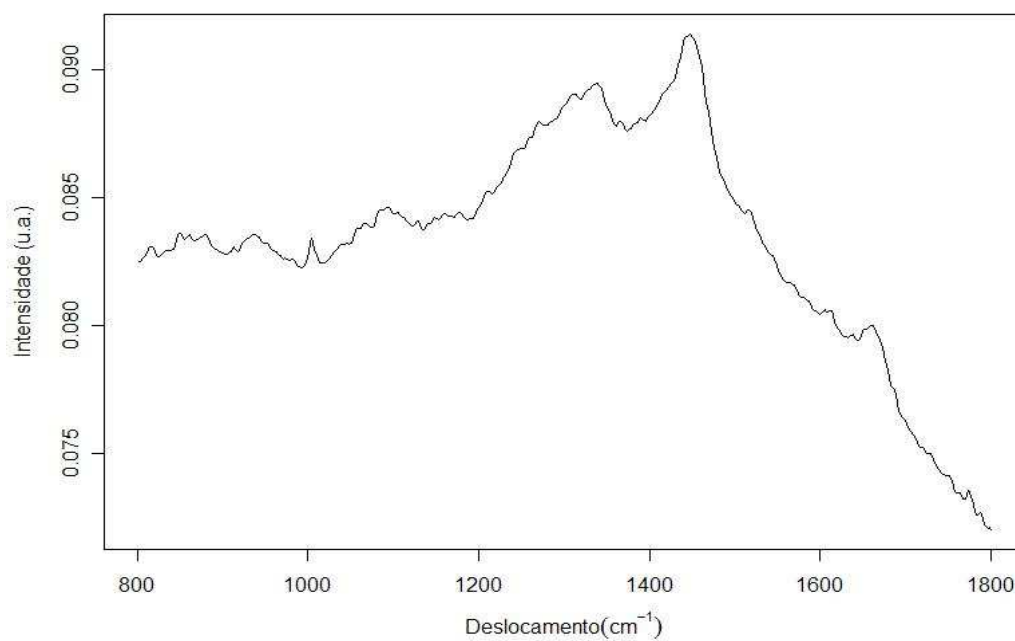


Figura 49 - Espectro observado para a terceira unidade amostral do grupo Melanoma primário

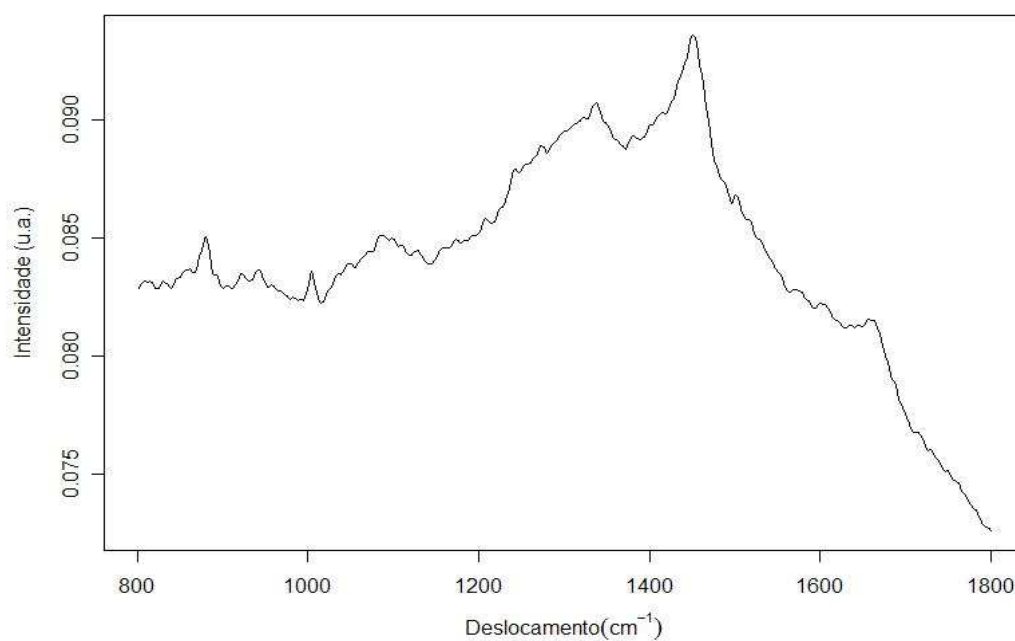


Figura 50 - Espectro observado para a quarta unidade amostral do grupo Melanoma primário

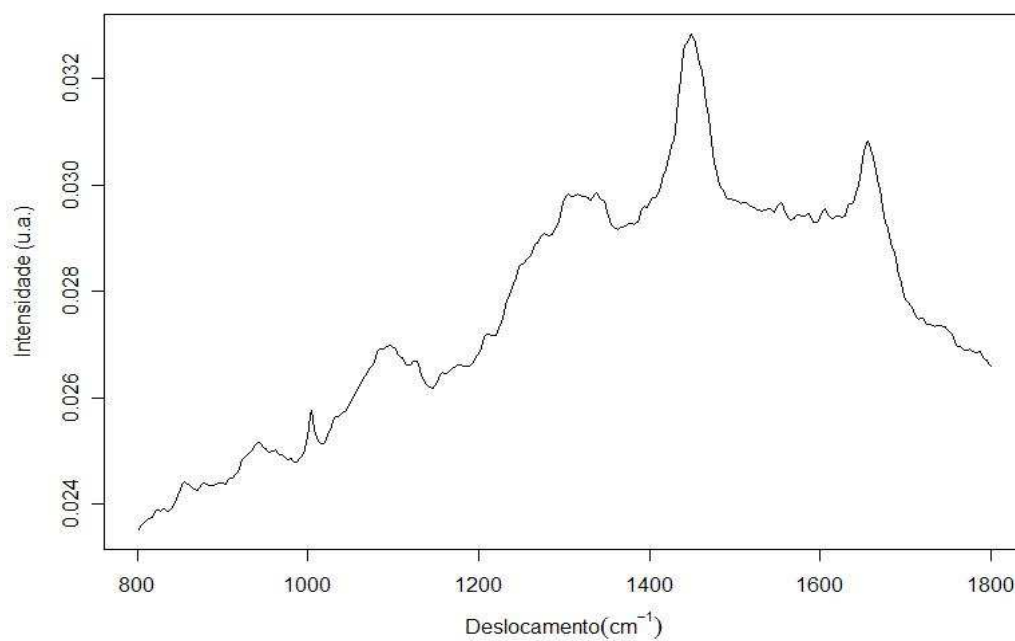


Figura 51 - Espectro observado para a quinta unidade amostral do grupo Melanoma primário

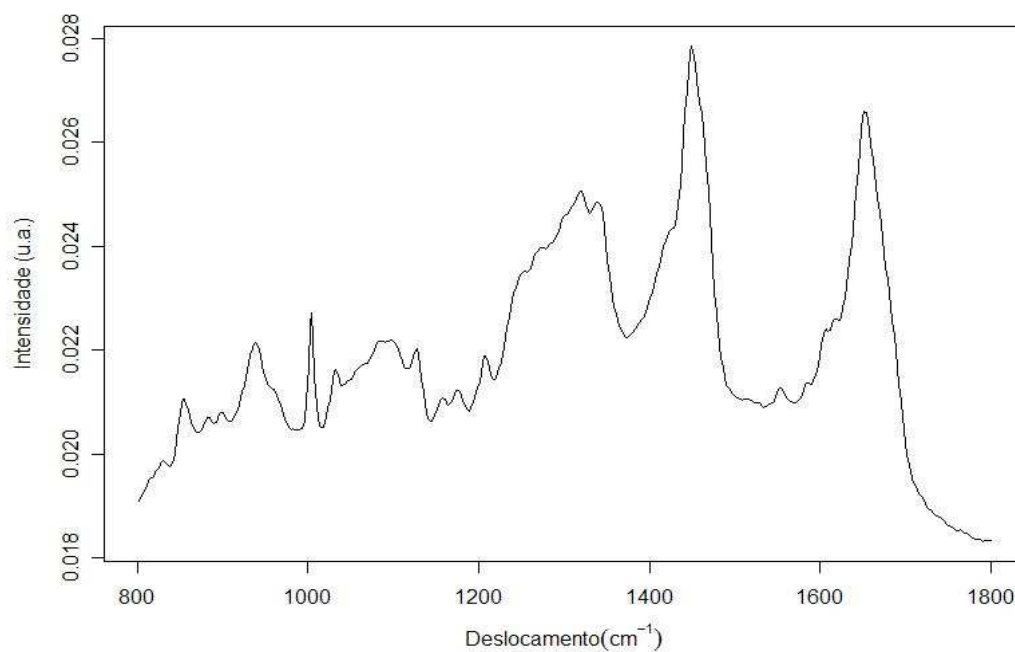


Figura 52 - Espectro observado para a sexta unidade amostral do grupo Melanoma primário

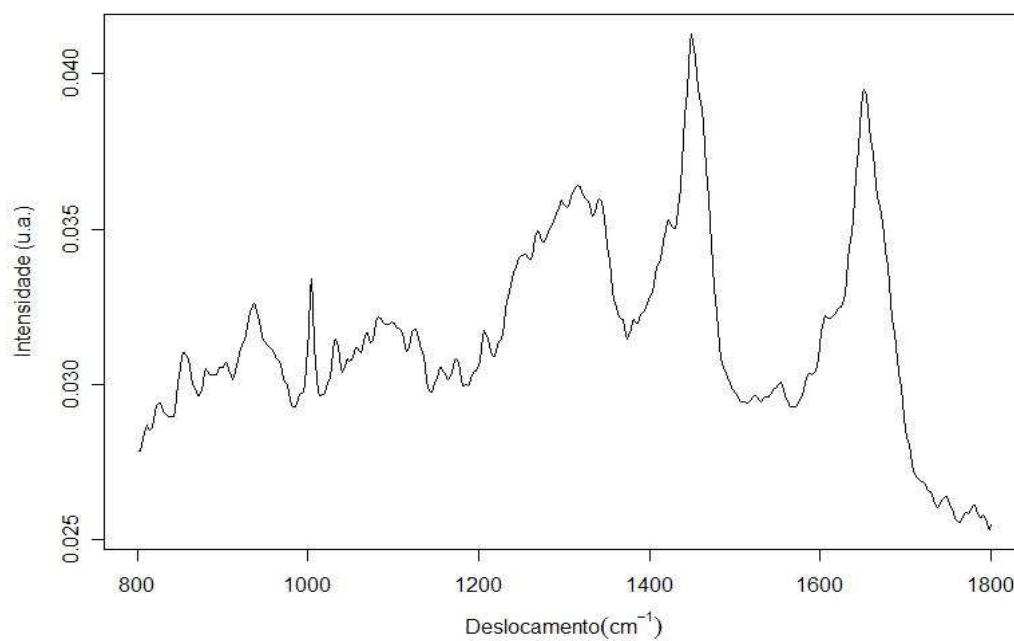


Figura 53 - Espectro observado para a sétima unidade amostral do grupo Melanoma primário

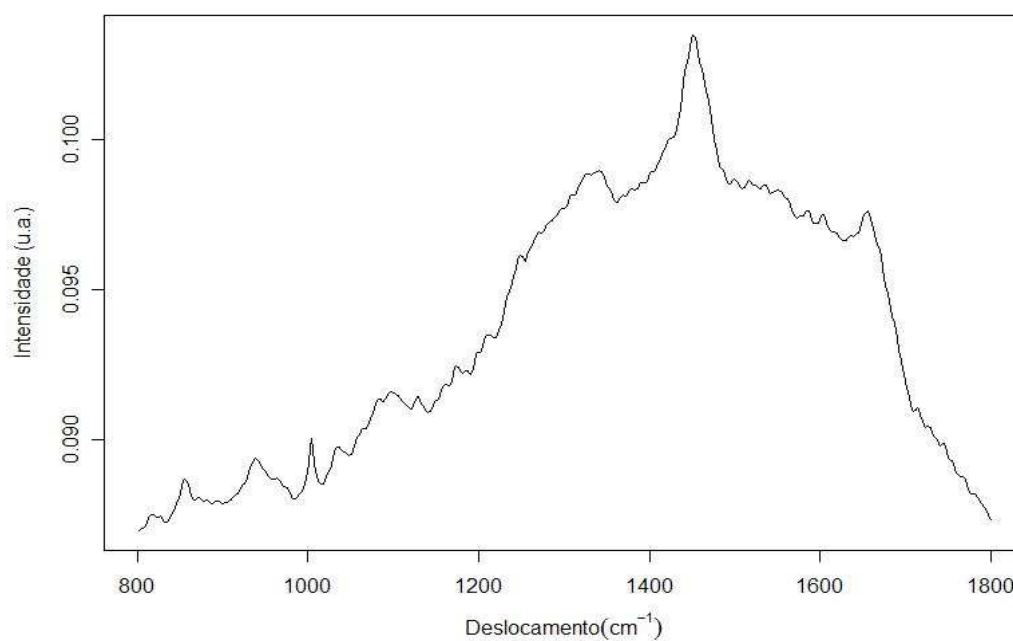


Figura 54 - Espectro observado para a oitava unidade amostral do grupo Melanoma primário

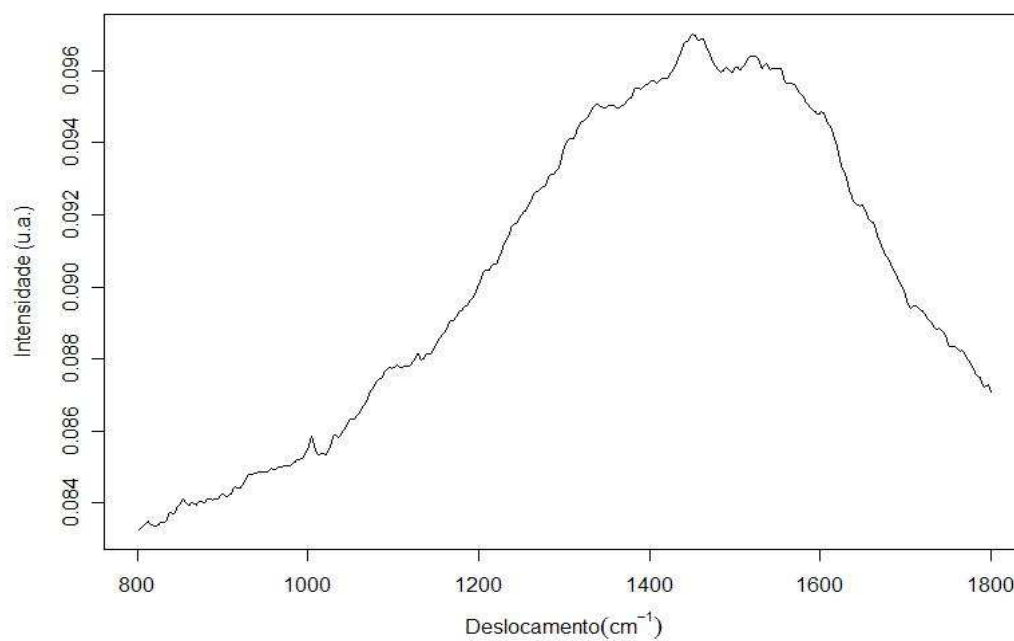


Figura 55 - Espectro observado para a nona unidade amostral do grupo Melanoma primário

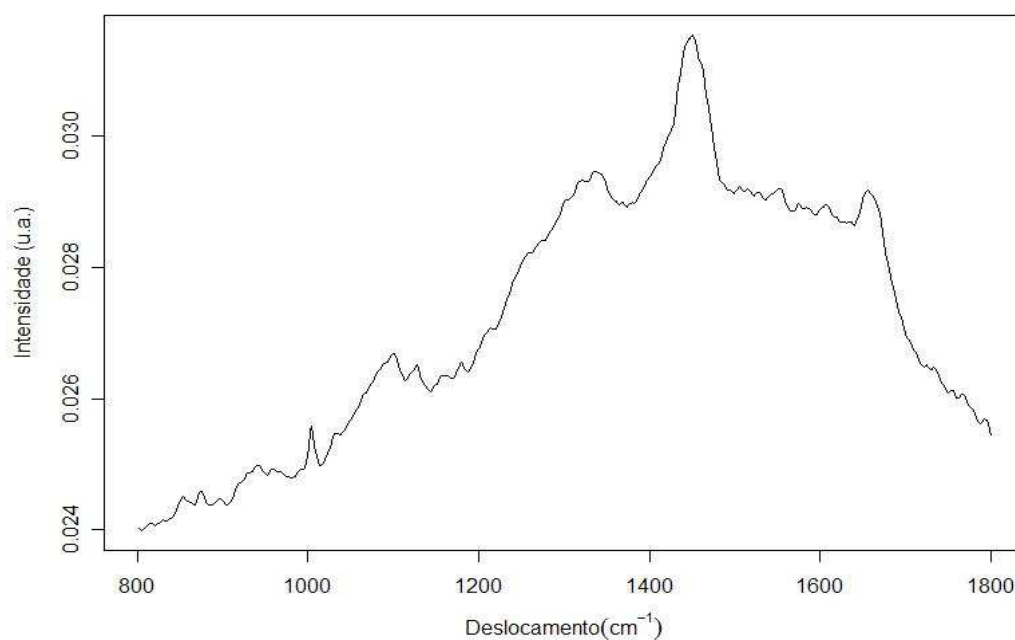


Figura 56 - Espectro observado para a décima unidade amostral do grupo Melanoma primário

ANEXO A
CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1- Título do Projeto

“NEVOS MELANOCÍTICOS E O MELANOMA CUTÂNEO. UM DIAGNÓSTICO COMPARATIVO POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN”.

2- Desenho do Estudo e Objetivos

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem por objetivo comparar as estruturas químicas do melanoma e dos nevos entre si versus pele normal. Isto poderá, no futuro, possibilitar diagnósticos de melanomas mais precisos e mais rápidos, possibilitando um tratamento mais efetivo e precoce do paciente.

3- Descrição dos procedimentos

Você deverá se submeter à cirurgia para retirada de sua lesão. Após a cirurgia, o material retirado, como é habitual, deverá ser submetido a exame anatomopatológico. Uma pequena parte deste material será guardada, congelada em Nitrogênio líquido para, posteriormente ser analisado por exame de espectroscopia, que analisa a dispersão da luz neste fragmento.

4- Relação dos procedimentos rotineiros e como serão realizados

Para colher as informações do Raman-FT, as amostras serão descongeladas e aquecidas à temperatura do ambiente lavando com 0,9% de solução fisiológica. O congelamento do tempo do espectro do Raman era cerca de 4 minutos e a duração total para lidar com as amostras era cerca de 10 minutos, suficiente para prevenir degradação e desidratação das amostras durante análise.

5- Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 3 e 4

Não há nenhum risco ao paciente, visto que o material usado é o que será removido de qualquer forma pela cirurgia.

6- Benefícios para o participante

Esta contribuição é importante, pois com ela existe a possibilidade de darmos mais um passo no estudo do melanoma, podendo no futuro favorecer outros pacientes com a mesma doença.

7- Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar.

Não existem procedimentos alternativos porque o material já foi colhido durante a cirurgia.

8- Garantia de Acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr. Sidney Bandeira Cartaxo**, que pode ser encontrado no seguinte endereço: Av. 9 de Julho 520 - Vila Ady-Anna – CEP 12243-001 – São José dos Campos – SP, telefones: (12) 3942-3325 Fax: 3941-1243– Celular: (12) 9713-4999; e-Mail: sidneycartaxo@uol.com.br.

Se você tiver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)** – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj. 14 – Fone: (11) 5571-1062 ou Fax: (11) 5539-7162 – e-Mail: cepunifesp@epm.br.

9- Liberdade

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento pela Instituição.

10- Direito de Confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

11- Atualização dos Resultados da Pesquisa

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

12- Despesas e Compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13- Dano Pessoal

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14- Compromisso do Pesquisador

O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “NEVOS MELANOCÍTICOS E O MELANOMA CUTÂNEO. UM DIAGNÓSTICO COMPARATIVO POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN”.

Eu, discuti com o Dr. **Sidney Bandeira Cartaxo** sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou, claro, também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data: ___/___/___

Assinatura da testemunha

Data: ___/___/___

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Sidney Bandeira Cartaxo

Data: ___/___/___

ANEXO C

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INFORMAÇÕES AO PACIENTE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: “NEVOS MELANOCÍTICOS E O MELANOMA CUTÂNEO. UM DIAGNÓSTICO COMPARATIVO POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN”.

1. PESQUISADOR: Dr. Sidney Bandeira Cartaxo

INFORMAÇÕES AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA

RESUMO:

Você deverá se submeter à cirurgia para retirada de sua lesão. Após a cirurgia, o material retirado, como é habitual, deverá ser submetido a exame anatomopatológico. Uma pequena parte deste material será guardada, congelada em Nitrogênio líquido para, posteriormente ser analisado por exame de espectroscopia, que analisa a dispersão da luz neste fragmento.

JUSTIFICATIVA

O objetivo deste estudo é comparar as estruturas químicas do melanoma e dos nevos entre si versus pele normal. Isto poderá, no futuro, possibilitar diagnósticos de melanomas mais precisos e mais rápidos, possibilitando um tratamento mais efetivo e precoce do paciente.

RISCOS

Não há nenhum risco ao paciente, visto que o material usado é o que será removido de qualquer forma pela cirurgia.

BENEFÍCIOS

Esta contribuição é importante, pois com ela existe a possibilidade de darmos mais um passo no estudo do melanoma, podendo no futuro favorecer outros pacientes com a mesma doença.

São Paulo, setembro de 2005.

Sidney Bandeira Cartaxo