

RENATA ANDRADE BITAR

**ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN APLICADA PARA O
DIAGNÓSTICO DO MELANOMA CUTÂNEO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2009

RENATA ANDRADE BITAR

**ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN APLICADA PARA O
DIAGNÓSTICO DO MELANOMA CUTÂNEO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos

Co-orientador: Prof. Airton Abrahão Martin

Co-orientador: Prof. Heitor Francisco de Carvalho Gomes

São Paulo

2009

Bitar, Renata Andrade

Espectroscopia Micro-Raman aplicada para o diagnóstico do melanoma cutâneo./ Renata Andrade Bitar. -- São Paulo, 2009.

xvii, 129f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.

Título em Inglês: Micro Raman spectroscopy applied to cutaneous melanoma diagnosis.

1. Análise Espectral Raman. 2. Melanoma. 3. Biometria.
4. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. 5. Diagnóstico por Imagem.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

À minha mãe, Liliana.

Suas Mãos

*Aquele doce que ela faz
quem mais saberia fazê-lo?*

*Tentam. Insistem, caprichando.
Mandam vir o leite mais nobre.
Ovos de qualidade são os mesmos,
manteiga, a mesma,
iguais açúcar e canela.
É tudo igual. As mãos (as mães?)
são diferentes.*

Carlos Drummond de Andrade

Ao meu Pai, Sulimar (in memorian).

Gostava tanto de você

Não sei porquê você se foi

Quantas saudades eu senti

E de tristezas vou viver

E aquele adeus não pude dar

Você marcou em minha vida

Viveu, morreu na minha história

Chego a ter medo do futuro

E da solidão que em minha porta bate

E eu gostava tanto de você

Gostava tanto de você

Eu corro, fujo desta sombra

Em sonho vejo este passado

E na parede do meu quarto

Ainda está o seu retrato

Não quero ver pra não lembrar

Pensei até em me mudar

Lugar qualquer que não exista

O pensamento em você

E eu gostava tanto de você

Gostava tanto de você

Composição de Edson Trindade e Interpretação de Tim Maia

Ao Bráulio, meu marido

Além da Terra, além do Céu

*Além da Terra, além do Céu,
no trampolim do sem-fim das estrelas,
no rastro dos astros,
na magnólia das nebulosas.
Além, muito além do sistema solar,
até onde alcançam o pensamento e o coração,
vamos!
vamos conjugar
o verbo fundamental essencial,
o verbo transcendente, acima das gramáticas
e do medo e da moeda e da política,
o verbo sempreamar,
o verbo pluriamar,
razão de ser e de viver.*

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

À **PROF^a. DR^a. LYDIA MASAKO FERREIRA**, titular da Disciplina de Cirurgia Plástica e Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), agradeço pela oportunidade de ter podido conviver com um grupo de profissionais imensamente interessados no desenvolvimento de pesquisas de qualidade.

Ao **PROF. DR. IVAN DUNSHEE DE ABRANCHES OLIVEIRA SANTOS**, chefe da Disciplina de Cirurgia Plástica e orientador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), mais do que um orientador, o tenho como referência de conduta.

Ao **PROF. DR. ALFREDO GRAGNANI FILHO**, professor afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica e vice-coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo incentivo contínuo.

À **PROF^a. DR^a. MILVIA MARIA SIMÕES E SILVA ENOKIHARA**, professora do Departamento de Dermatologia, Setor de Dermatopatologia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo grande apoio e carinho durante a fase de análises histológicas.

Ao **PROF. DR. HEITOR FRANCISCO DE CARVALHO GOMES**, professor adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, co-orientador deste projeto de pesquisa, pela amizade e carinho.

Aos **PROF^a. DR^a. LEILA BLANES**, **PROF. DR. JOSÉ LUIS GONÇALVES BRETOS** e **PROF^a. DR^a. MONICA TALARICO DUAILIBI**, professores colaboradores da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela disposição e cuidado na correção deste trabalho nas fases de desenvolvimento; suas observações e seus incentivos foram fundamentais para a qualidade final.

Aos demais docentes da Disciplina de Cirurgia Plástica e do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo

(UNIFESP), muito obrigada pelas contribuições na tese e por me fazerem enxergar os trabalhos científicos sob novas perspectivas.

Aos **PROF^a. DR^a. MIRIAN NACAGAMI SOTTO**, professora associada e médica supervisora da Universidade de São Paulo, **PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO DE ALMEIDA**, professor adjunto do Departamento de Patologia, Disciplina de Dermatologia Infecciosa e Parasitária da UNIFESP, **PROF. DR. ALEXANDRE KATALINIC DUTRA**, professor colaborador da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP e **PROF. DR. LUIZ EDUARDO ABLA**, professor adjunto visitante da Disciplina de Cirurgia Plástica, membros da Banca Examinadora da referente Tese, pela arguição generosa e pertinente que engrandeceu profundamente este estudo.

Ao **DR. SIDNEY BANDEIRA CARTAXO**, pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela companhia nas viagens.

À **DR^a. ANDREA DE OLIVEIRA FERNANDES**, pós-graduanda do Programa de pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela amizade e apoio.

Aos demais pós-graduandos do Programa de pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), obrigada por compartilharem seus conhecimentos com muito carinho, tornando a convivência rica e muito agradável.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica e do Programa de pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP): **SILVANA DE ASSIS, MARTA DOS REIS E SANDRA DA SILVA**, muito obrigada por carinhosamente tornar esta passagem mais organizada, segura e bem humorada.

Ao **PROF. DR. DIETER NAUMANN**, coordenador do laboratório “P13 – Biomedical Spectroscopy” do Robert Koch Institut, Berlim, Alemanha, pelo incentivo nestes anos de convivência, por apoiar esse projeto, gentilmente auxiliando no desenho metodológico, bem como fornecendo as janelas de CaF₂.

À **PROF^a. DR^a. ANITA MAHADEVAN-JANSEN**, professora associada de Engenharia Biomédica do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade de Vanderbilt, Nashville, TN, EUA, por dividir seu entusiasmo humanitário em relação à pesquisa, mostrando que o sucesso é a consequência natural para aqueles que multiplicam e dividem seus conhecimentos.

Ao **PROF. DR. HERCULANO DA SILVA MARTINHO**, professor do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC (UFABC), seu companheirismo tem sido além de qualquer forma de homenagem. O agradecimento profundamente pelo apoio, encorajamento e amizade.

Ao **PROF. DR. AIRTON ABRAHÃO MARTIN**, coordenador do Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, professor da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), agradeço por me apresentar a possibilidade da carreira científica e por me expor a situações que favoreceram enormemente meu crescimento pessoal.

À **PROF^a. DR^a. ANA MARIA DO ESPÍRITO SANTO**, professora da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Sua força me encoraja diariamente.

À **PROF^a. DR^a. KUMIKO KOIBUCHI SAKANE**, professora da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), pelo crescente entusiasmo em valorizar quem somos e pelos ensinamentos profissionais que vieram abrilhantar este trabalho.

Aos colegas de iniciação científica, de mestrado e de doutorado do LEVB e para aqueles que por lá estiveram (demais pós-graduandos): a vocês muito obrigada pela agradabilíssima convivência, pelo estímulo a sobrevivência, pelos estudos em conjunto, pela generosidade em me ajudarem a crescer profissionalmente. Além do mais, obrigada pela sincera amizade que agora cultivamos.

Aos pacientes, que mesmo com suas angústias e sofrimentos ainda tiveram a nobreza de valorizar um futuro incerto: investiram parte de si para melhorar a vida do próximo. Muito obrigada.

Epígrafe

"Tô bem de baixo prá poder subir
Tô bem de cima prá poder cair
Tô dividindo prá poder sobrar
Desperdiçando prá poder faltar
Devagarinho prá poder caber
Bem de leve prá não perdoar
Tô estudando prá saber ignorar
Eu tô aqui comendo para vomitar

Tô te explicando
Prá te confundir
Tô te confundindo
Prá te esclarecer
Tô iluminando
Prá poder cegar
Tô ficando cego
Prá poder guiar

Devagarinho prá poder rasgar
Olho fechado prá te ver melhor
Com alegria prá poder chorar
Desesperado prá ter paciência
Carinhoso prá poder ferir
Lentamente prá não atrasar
Atrás da vida prá poder morrer
Eu tô me despedindo prá poder voltar"

TÔ

(Elton Medeiros - Tom Zé)

ESTUDANDO O SAMBA, 1976 (Gel Continental)

Sumário

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	vii
LISTAS	xii
RESUMO	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	8
3. LITERATURA	10
4. MÉTODOS	25
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES	99
ANEXOS	101
REFERÊNCIAS	121
ABSTRACT	129

Lista de Figuras

- Figura 1. (a) Criostato da Leica modelo CM 1100. (b) Em detalhe, parte interna do criostato preparado para confecção das lâminas histológicas por congelação: pincéis, fragmento de tecido recoberto pelo Tissue Freezing Medium (TFM) e lâminas de CaF_2 (específico para espectroscopia na região do infravermelho do espectro eletromagnético). _____ 28
- Figura 2. Esquema de montagem do Espectrômetro Micro-Raman: (1) Laser @785 nm; (2) Espelhos refletor; (3) Telescópio; (4) Filtro Notch (@785 nm); (5) Microscópio óptico invertido + Estágio translador; (6) Lente convergente; (7) Espectrômetro; (8) Detector CCD; (9) Microcomputador _____ 29
- Figura 3. Montagem experimental para Espectroscopia Micro-Raman. Posicionamento do conjunto amostra de melanoma cutâneo e janela de CaF_2 ao microscópio invertido apoiados sobre duas lâminas de vidro convencionais. Objetiva de aumento de 40 vezes. _____ 31
- Figura 4. Esquema representativo da área de mapeamento esquematizadas para aquisição dos espectros Micro-Raman: (a) Pele Normal área de 0,3 mm x 0,8 mm totalizando 24 espectros com resolução de pixel de $10 \mu\text{m}^2$; (b) Melanoma Cutâneo área de 0,5 mm x 0,5 mm totalizando 25 espectros com resolução de pixel de $10 \mu\text{m}^2$. Área vermelha nas duas imagens representam o spot do laser de excitação sobre as amostras. _____ 32
- Figura 5. Espectro Etaloring mostrando a variação de intensidade em função do comprimento de onda. _____ 34
- Figura 6. Espectro Raman do grupo Pele Normal antes e depois da remoção de spikes. _____ 35
- Figura 7. Correção de Linha de base do espectro do grupo Pele Normal: Polinômio grau 1 (reta). Rotina manual. _____ 36
- Figura 8. Correção de Linha de base do espectros do grupo Pele Normal: Polinômio grau 5. Software Matlab (rotina automática). _____ 36
- Figura 9. (a) Gráfico Box Plot com a distribuição dos 168 espectros adquiridos na epiderme da Pele Normal pré-processada manualmente. A linha preta representa a mediana e a sombra em lilás representa os dados entre o primeiro e o terceiro quartis. (b) Gráfico Box Plot com a distribuição dos 150 espectros adquiridos do Melanoma Cutâneo pré-processados manualmente. A linha preta representa a mediana e a sombra em salmão representa os dados entre o primeiro e o terceiro quartis. _____ 42
- Figura 10. (a) Gráfico Box Plot com a distribuição dos 168 espectros adquiridos na epiderme da Pele Normal. A linha preta representa a mediana e a sombra em salmão representa 75 % (terceiro quartil) dos espectros mais correlacionados. (b) Gráfico Box Plot com a distribuição dos 150 espectros adquiridos da parte nodular do Melanoma Cutâneo. A linha preta representa a mediana e a sombra em azul representa 75% (terceiro quartil) dos espectros mais correlacionados. _____ 43
- Figura 11. Média dos espectros de Pele Normal do Cluster 1 no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 100 vezes; camada córnea da epiderme apresentando queratina, evidenciada pela seta. _____ 52
- Figura 12. Média dos espectros de Pele Normal do Cluster 2 no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 400 vezes; camada basal da epiderme apresentando, em destaque, um melanócito (halo claro). _____ 53
- Figura 13. Média dos espectros de Pele Normal do Cluster 3 no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 400 vezes; camada basal da epiderme apresentando, em destaque, queratinócitos com tonofilamentos, obedecendo a proporção de 10 queratinócitos para 1 melanócito. _____ 54
- Figura 14. Média dos espectros de Pele Normal do Cluster 4 no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 100 vezes; derme papilar em destaque. _____ 55

Figura 15. Média dos espectros de Melanoma Cutâneo do Cluster 1 (manual) ou Cluster 2 (automático) no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 400 vezes; sugestão de melanócitos malignos. _____ 56

Figura 16. Média dos espectros de Melanoma Cutâneo do Cluster 2 (manual) ou Cluster 1, Cluster 3 e Cluster 4 (automático) no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). MC_57: Coloração HE; aumento de 400, pigmentação sugestiva de hemossiderina. MC_75: Coloração HE; aumento de 40 vezes para visualização integral do fragmento; apresenta intensa fibrose. MC_76: Coloração HE; aumento de 20 vezes, aspecto geral do fragmento que apresenta pigmentação (melânica ou hemossiderina), infiltrado inflamatório, necrose e tecido adiposo. _____ 59

Figura 17. Distribuição dos espectros Raman pré-processados manual e automaticamente de Melanoma Cutâneo do Cluster 3 e Cluster 4 (manual) ou Cluster 4 (automático). Fotomicrografia: MC_70: melanoma amelanótico em aumento de 400 vezes, melanócitos malignos sem pigmentação. _____ 60

Figura 18. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 1 (pré-processamento manual). _____ 64

Figura 19. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 2 (pré-processamento manual). _____ 65

Figura 20. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 3 (pré-processamento manual). _____ 66

Figura 21. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 1 (pré-processamento automático). _____ 69

Figura 22. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 2 (pré-processamento automático). _____ 70

Figura 23. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 3 (pré-processamento automático). _____ 71

Figura 24. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 4 (pré-processamento automático). _____ 72

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Valor próprio dos componentes de Pele Normal (Linha de base manual – Polinômio 1º Grau)</i>	45
<i>Tabela 2. Valor próprio dos componentes de Pele Normal (Linha de base automática – Polinômio 5º Grau)</i>	45
<i>Tabela 3. Valor próprio dos componentes de Melanoma (Linha de base manual – Polinômio 1º Grau)</i>	46
<i>Tabela 4. Valor próprio dos componentes de Melanoma (Linha de base automática – Polinômio 5º Grau)</i>	46
<i>Tabela 5. Resultado da Análise de Cluster (Agrupamento) dos 168 espectros de Pele Normal, tanto submetidos pelo pré-processamento manual (polinômio 1º grau) quanto automático (polinômio 5º grau).</i>	48
<i>Tabela 6. Resultado da Análise de Cluster (Agrupamento) dos 150 espectros de Melanoma Cutâneo, tanto submetidos pelo pré-processamento manual (polinômio 1º grau) quanto automático (polinômio 5º grau).</i>	49
<i>Tabela 7. Avaliação dos espectros de Pele Normal em função da disposição dos espectros por cluster em relação à distribuição em profundidade das estruturas celulares da derme e epiderme.</i>	50
<i>Tabela 8. Avaliação da distribuição dos espectros de Melanoma Cutâneo nos agrupamentos em função do diagnóstico histopatológico.</i>	55
<i>Tabela 9. Variabilidade das componentes principais em relação à opção determinada (pré-processamento manual)</i>	62
<i>Tabela 10. Coeficientes da Função Discriminante (LDA) por Opção (pré-processamento pré-processamento manual)</i>	63
<i>Tabela 11. Classificação correta da LDA por Opção (pré-processamento manual)</i>	66
<i>Tabela 12. Variabilidade das componentes principais em relação à Opção determinada (pré-processamento automático)</i>	67
<i>Tabela 13. Coeficientes da Função Discriminante (LDA) por Opção (pré-processamento automático)</i>	68
<i>Tabela 14. Classificação correta da LDA por Opção (pré-processamento automático)</i>	72

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A	Ampere
ANN	Redes neurais artificiais
CaF ₂	Fluoreto de Cálcio
CBC	Carcinoma basocelular
CL	Célula de Langehans
CLA	Análise de Cluster ou Clusterização
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOPA	<i>Dihydroxyphenylalanine</i>
C	Carbono
cm ⁻¹	Número de onda
cm	Centímetro
FT	Transformada de Fourier
H	Hidrogênio
HE	Hematoxilina & Eosina
HMB-45	<i>Human Melanotic Black – 45</i> (Anticorpo monoclonal para Melanoma)
IR ou IV	Infravermelho
J	Joule
KDa	Quilo Dalton
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LDA	Análise Discriminante Linear
LEVB	Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica
m	Minuto
MCC	Carcinoma de células de Merkel
MMP	Metaloproteinases
mW	mili Watt
n	espaço amostral (número de amostra)
N	Nitrogênio
NIR	Infravermelho próximo
NMF	<i>Natural moisturizing factor</i>
NO	Óxido Nitríco
O	Oxigênio
P	Potência

PCA	Análise dos componentes principais
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
s	Segundo
SCTP	Tiol protease do estrato córneo
S/N ratio ou SNR	Relação sinal e ruído
TFM	<i>Tissue freezing medium</i>
UNIVAP	Universidade do Vale de Paraíba
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VIS	Visível
W	Watt
@	“comprimento de onda em...”
~	Aproximadamente
µm	Micrômetro
°C	Grau Celsius

Resumo

Introdução: A avaliação de lesões pigmentadas de pele para o diagnóstico precoce de melanoma primário é baseada na análise macro e microscópica dessas lesões, por meio de modelos morfológicos pré-estabelecidos para cada padrão histopatológico. Entretanto, a sensibilidade e a especificidade diagnósticas dependem da experiência dos avaliadores. Frente a esta problemática, estudos referentes à automatização de métodos diagnósticos estão sendo discutidos. A Biópsia Óptica é um dos métodos experimentais estudados, cuja principal vantagem é a extração de informações sobre os caracteres bioquímicos das amostras avaliadas, de forma reprodutível, cuja interpretação dependerá de algoritmos matemáticos desenvolvidos exclusivamente para essa finalidade. Uma das técnicas de Biópsia Óptica é a Espectroscopia Raman, conhecida por ser uma ferramenta altamente compatível para estudos em sistemas biológicos, e que tem sido utilizada nos últimos 15 anos na avaliação de lesões neoplásicas para promoção de diagnóstico tanto *in vivo* quanto *in vitro*. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade de algoritmos de pré-processamento e de classificação para espectros Micro-Raman de epiderme de pele normal e de melanoma cutâneo espesso. **Métodos:** Para a aquisição dos espectros Micro-Raman, sete amostras de pele normal e seis amostras de melanoma cutâneo foram preparadas do mesmo modo para análise histopatológica por congelação. Foi construído um espectrômetro Micro-Raman, composto por *laser* de excitação @785 nm, circuito óptico composto por lentes, filtros e espelhos, microscópio óptico invertido e detector de CCD. Coletados os 168 espectros de pele normal e os 150 de melanoma cutâneo, a classificação dos subtipos estruturais foi realizada por meio da Análise dos Componentes Principais e da Análise de Clusterização e a classificação diagnóstica entre Pele Normal e Melanoma Cutâneo foi desempenhada pela aplicação da Análise dos Componentes Principais e da Análise Discriminante Linear. **Resultados:** A atribuição dos modos vibracionais se referiu à região de deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} , destacando-se os modos de 1260, 1300, 1380, 1440, 1550, 1650 cm^{-1} , referentes aos ácidos nucleicos, Amida III e lipídios, respiração do anel aromático C=C das bandas da melanina, estiramento simétrico CH de lipídios e proteínas e estiramento C=O de proteínas e C=C de lipídios. A classificação dos grupos espectrais e atribuição celular foi possível para os dois grupos, sendo atribuídos a cada um deles quatro subgrupos: para a pele normal foi possível inferir os espectros referentes à camada córnea, queratinócitos, melanócitos e colágeno; para o melanoma, os subgrupos espectrais foram atribuídos para melanoma acral (queratina), melanoma com alta pigmentação melânica, pigmentação por hemossiderina, tecido inflamatório, necrótico e fibroso. A classificação diagnóstica foi possível com sensibilidade entre 39,1 % e 100 % e especificidade entre 54,8 % a 100 %, dependendo do subgrupo confrontado. **Conclusão:** Os espectros, os tipos de pré-processamento e os algoritmos de classificação foram viáveis para associação dos tipos histológicos e diagnóstico do Melanoma Cutâneo.

1. INTRODUÇÃO

Passaram-se mais de 200 anos desde que o médico parisiense René Laennac descreveu o melanoma pela primeira vez na Europa. Este relato foi publicado em 1812, onde foi consagrada a expressão “melanoma” para descrever a doença. Esta doença foi descrita como de aparecimento “dramático”, com persistente crescimento anual de 3 a 7 % em populações caucasianas com pele bronzeadas de sol (Jhappan et al., 2003).

O médico australiano V. J. McGovern foi provavelmente o primeiro a sugerir que a luz do sol pudesse ser o agente ambiental potencial para a formação do melanoma. Em 1952, no artigo intitulado “Melanoblastoma”, McGovern notou que “a pessoa pré-disposta à transformação maligna é aquela que apresenta pele pálida, que não se bronzeia à exposição solar, e que apresenta sardas (efélides)”. Mais tarde, estudos epidemiológicos confirmaram as observações de McGovern, e desta forma acredita-se que a maioria dos melanomas sejam causadas por excessiva exposição à luz solar (Armstrong, Kricger, 1995; Armstrong, Kricger, 1997; MacKie, 1998; Marks, 2000; Rigel, Carucci, 2000; Jemal et al., 2001).

A literatura tem demonstrado que a detecção precoce e a remoção cirúrgica em fases iniciais reduz a mortalidade do melanoma e que, em consequência, a identificação do melanoma em fases curáveis deve ser encorajada. A sensibilidade do diagnóstico clínico difere enormemente, variando 40 a 80 % de índice de diagnóstico clínico correto, dependendo da especialização do médico (Cassileth et al., 1986; Morton, Mackie, 1998; Chen et al., 2001). Dificuldades em diagnosticar o melanoma maligno cutâneo se dão devido a sua semelhança com algumas lesões benignas de pele, como o nevo pigmentado, ceratose seborréica, e outros tipos de cânceres de pele como carcinoma basocelular pigmentado (Mackie, 2000; Kanzler, Mraz-Genrhard, 2001).

A biópsia excisional, seguida do exame histopatológico, é considerada o padrão ouro de diagnóstico do melanoma cutâneo (Slater, 2000). Porém, remover cada lesão pigmentada de pele parece inaceitável, principalmente nos casos de lesões gigantes ou múltiplas, em especial quando localizadas em regiões cosmeticamente importantes, como a face. Frente ao risco de se promover cicatrizes. Portanto, o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico não-invasiva é de suma importância para a detecção precisa do melanoma cutâneo,

bem como o controle clínico de lesões displásicas, evitando-se assim múltiplas biópsias. Apesar de muitas tentativas de implementação de técnicas instrumentais como metodologia não-invasiva de confiança para detecção de melanoma cutâneo (como fotografias, dermatoscopia, ultra-sonografia de alta frequência da pele). Este modelo ainda não foi estabelecido (Harland et al., 2000; Bafounta et al., 2001; Kittler et al., 2002; Prichard et al., 2002).

Parte do desenvolvimento em biotecnologia tem intensificado as pesquisas na instrumentação auxiliar para a análise físico-química dos tecidos, visando investigar as estruturas e as interações dos sistemas biomoleculares. Dentre estes avanços tecnológicos, a espectroscopia óptica vem se estabilizando como uma ferramenta prática para as análises de amostras sólidas, líquidas ou soluções de arranjos moleculares altamente complexos, como as macromoléculas de interesse biológico.

Espectroscopia é o método utilizado para análise de elementos simples, da estrutura química de compostos inorgânicos ou grupos funcionais de uma substância orgânica utilizando radiação eletromagnética. Sempre quando se excita uma substância com uma fonte de energia, esta pode tanto emitir como absorver radiação em determinado comprimento de onda, permitindo desta forma a observação do comportamento da amostra. Os resultados providenciam dados sobre a estrutura, tais como geometria de ligação, natureza química de ligandos de um dado átomo, comprimentos de ligações químicas. A base da espectroscopia é a natureza ondulatória das radiações eletromagnéticas, cuja variável é a frequência fundamental, que determina o número de oscilações realizadas pela onda por unidade de tempo. O comprimento de onda e a distância percorrida pela onda durante um período de tempo correspondente a uma unidade de frequência.

O conjunto de técnicas espectroscópicas especialmente a espectroscopia vibracional (Raman e/ou Absorção no Infravermelho) quando aplicado à análise de tecido biológico com finalidade diagnóstica e denominado de "Biópsia Óptica". Estas técnicas são altamente sensíveis na detecção dos compostos endógenos dos sistemas biológicos e podem ser utilizadas de maneira minimamente invasiva *in vivo* ou em uso laboratorial para análise química de fragmentos de lesão sem qualquer fixação/coloração. Portanto, tem-se discutido

amplamente o potencial de aplicação clínica destas técnicas como métodos diagnósticos seguros e rápidos (Andrus, et al., 1998). A informação diagnóstica é fornecida pela assinatura espectral singular de cada amostra, permitindo a diferenciação entre tecidos biológicos normais e doentes por meio da análise de seus espectros. A Espectroscopia Raman é uma das técnicas da Espectroscopia Vibracional que tem sido largamente utilizada na pesquisa sobre a caracterização de câncer (Colthup et al., 1990; Bitar et al., 2006).

A Espectroscopia Raman é a técnica que promove a informação sobre a estrutura molecular da amostra investigada, sendo utilizada por mais de 70 anos em análises químicas não-destrutivas (Edwards et al., 1995; Hanlon et al., 2000). A Espectroscopia Raman vem sendo empregada por diversos pesquisadores no aprimoramento da técnica para detecção precisa e minimamente invasiva de diversos tumores genitais, cerebrais, mamários, da laringe, revelando que a transição do tecido normal para o câncer está associada, significativamente, às diferenças nas estruturas bioquímicas, que são refletidas no espectro Raman (Liu et al., 1992; Mizuno et al., 1994; Hanlon et al., 2000; Stone et al., 2000, Bitar et al., 2006).

O Efeito Raman é o espalhamento inelástico da luz produzido por íons, átomos e moléculas, relacionado à mudança de frequência da luz incidente quando espalhada. Quando um feixe de luz monocromática incide em uma molécula cujas dimensões são menores que o comprimento de onda da luz incidente, ocorre o fenômeno do espalhamento. Uma parte da energia monocromática dos fótons incidentes é transferida para as moléculas de tal maneira que alguns dos elétrons pertencentes aos diferentes níveis de energia se tornam, então, excitados, ocorrendo aumento na frequência de vibração de algumas ligações desta molécula. Para esta molécula voltar ao seu estado fundamental, mais estável que o estado excitado, existe a necessidade de que esta energia seja entregue novamente ao meio. Esta variação na frequência entre a energia emitida e a espalhada pela molécula é um fenômeno dependente da massa da molécula e dos tipos de ligações que a constitui. A estrutura da molécula, massa atômica, tipos de ligações, substitutos moleculares, geometria molecular e pontes de hidrogênio afetam a constante de força vibracional que dita a vibração molecular. Sendo assim, existem diversos movimentos que constituem o conjunto de modos vibracionais normais.

Entre estes podemos citar: modo de estiramento entre duas ligações atômicas; modo de dobramento entre três átomos conectados por duas ligações; e modo de deformação fora do plano que muda a estrutura da molécula de plana para angular (Sala, 1995). Os deslocamentos de frequência da luz espalhada são apresentados em forma de espectros. As bandas espectrais, ou modos vibracionais, representam as vibrações características das ligações químicas pertencentes às moléculas da substância estudada. Conseqüentemente, as intensidades relativas e formas das bandas no espectro Raman carregam informações detalhadas sobre a composição da estrutura molecular da amostra (Lyng et al., 2007).

A maior vantagem da Espectroscopia Raman é que pode ser empregada em amostras complexas ou impuras, requerendo apenas pequenas quantidades de cada componente, sendo ainda aplicável para biomoléculas em estado de agregação. A Espectroscopia Raman pode ser usada para caracterizar diretamente a estrutura da água, proteínas, lipídios e carboidratos nos estados fisiológicos normais e possíveis alterações no estado patológico (Pimentel, McClellan, 1971; Nielsen et al, 1982; Tu, 1986; Miura & Thomas, 1995).

O grupo pioneiro no estudo em pele por Espectroscopia Raman (FT-Raman) foi o de Barry & Williams, que publicou as assinaturas espectrais Raman do estrato córneo humano obtido *in vitro* (Barry et al, 1992; Williams et al, 1994). Neste estudo, o estrato córneo foi separado das camadas subjacentes através de aquecimento e digestão por tripsinase. Espectros FT-Raman, livres de fluorescência, foram adquiridos *in vitro*. Concluiu-se que a Espectroscopia Raman é uma ferramenta valiosa e de grande potencial para investigação da natureza molecular do estrato córneo. Desde então, a espectroscopia Raman tem sido aplicada em um grande número de estudos da pele humana *in vitro*. Estes estudos envolveram a caracterização da permeabilidade do estrato córneo, a análise da estrutura molecular dos queratinócitos e a caracterização de condições patológicas da pele. Williams et al. (1994) compararam o espectro de queratinócitos a vários tipos de tecidos como pele, calo, cabelo e unha. As principais diferenças encontradas foram no conteúdo de enxofre dos tecidos que continham queratina dura e queratina mole.

Delhaye & Dhamelincourt (1975) e Rosasco et al (1975) afirmaram que a introdução da microscopia óptica na espectroscopia Raman não incluiu

mudanças fundamentais nesta técnica. Desta forma, a espectroscopia Micro-Raman pode ser vista como a técnica Raman fundamental com a resolução melhorada, simplesmente. Todavia, as possibilidades de exploração científica, principalmente na área da saúde, têm se mostrado abundantes. A oportunidade de acompanhamento dos fenômenos fisiológicos ao nível celular é uma das principais potencialidades. Entretanto, poucos trabalhos discutem na literatura sobre um método não-invasivo que permite análise da composição molecular da pele em função da distância da superfície cutânea com similar detalhamento e resolução espacial (Caspers et al, 2001; Choi et al, 2005; Short et al, 2006; Lieber et al, 2008).

Neste âmbito, tem sido possível medir concentrações moleculares dos constituintes da pele, como por exemplo a concentração de água no estrato córneo em função da distância da superfície da pele (resolução de profundidade de 5 μm) avaliando semi-quantitativamente os principais constituintes do natural *moisturizing factor* (lactato e uréia); monitorar os núcleos de células epidérmicas e da membrana basal normais e com alteração maligna, por meio da observação das diferentes contribuições dos ácidos nucléicos, histonas e proteínas (actina) e colágeno; realizar o diagnóstico dermatológico do BCC, SCC, e do melanoma cutâneo com espectros Raman (Caspers et al, 2001; Choi et al, 2005; Short et al, 2006; Lieber et al, 2008).

A associação entre os espectros Raman e a estrutura do tecido cutâneo normal e do melanoma é um passo necessário para a aplicação da Espectroscopia Raman como ferramenta de imagem diagnóstica. A identificação dos espectros Micro-Raman das estruturas da epiderme e derme papilar normal e seus respectivos espectros encontrados no melanoma espesso são relevantes para a contínua discussão sobre os métodos de aquisição dos espectros, pré-processamento, influência da melanina como fonte de informação diagnóstica e método estatístico de classificação.

Diversos trabalhos foram publicados caracterizando os espectros da melanina *in vitro* (Capozzi et al, 2005; Perna et al, 2005) e *in vivo* (Huang et al, 2004; Huang et al, 2005; Huang et al, 2006). Melanina foi extraída dos melanossomos isolados do fígado da *Rana esculenta L.*, e preparada como filme fino em substrato de quartzo. O espectro Micro-Raman obtido deste filme fino

apresentou as bandas D, D', G, G' centradas em 1347, 1407, 1554 e 1608 cm^{-1} , respectivamente. Nos espectros obtidos *in vivo* de pele humana normal pigmentada e com desordens associadas à pigmentação, estas bandas foram deslocadas, apresentando dois modos vibracionais intensos e muito largos em 1580 e 1380 cm^{-1} (Huang et al., 2004; Huang et al, 2005; Huang et al., 2006).

O pré-processamento espectral utilizado na maioria dos trabalhos exploram a capacidade de remoção do *background* de fluorescência e filtragem dos ruídos, sem considerar que essas informações podem ser relevantes para caracterização mais completa da estrutura, seja célula ou tecido. Concordam que esses procedimentos devem ser feitos com o máximo de rigor objetivo, sem influência humana e antes de qualquer análise estatística dos espectros Raman. Como proposto por Afseth et al. (2006), após a avaliação da habilidade em extrair informações robustas de diferentes algoritmos de pré-processamento dos espectros Raman de diferentes amostras, a correção de linha deve ser realizada antes dos métodos de normalização.

Para eficiência máxima da técnica, diversos estudos propuseram algoritmos automáticos que removessem a influência da fluorescência da melanina dos espectros Raman. Entretanto, não discutiram sobre a influência da energia dos modos vibracionais da melanina nestes espectros. Por essa razão, o presente estudo auxiliará no entendimento das potenciais aplicações da Espectroscopia Micro-Raman nos tecidos pigmentados.

2. OBJETIVO

Avaliar a viabilidade de algoritmos de pré-processamento e de classificação para espectros Micro-Raman de epiderme de pele normal e de melanoma cutâneo espesso.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Existe uma grande variedade de métodos *in vivo* para detecção do câncer de pele. A busca pela técnica, ou conjunto de procedimentos, que permita a análise completa minimamente invasiva do tecido cutâneo e que possa detectar precocemente suas doenças reflete o escopo de diversos grupos de pesquisa. O conjunto de técnicas espectroscópicas (Raman, Infravermelho e Fluorescência) é conhecido como “Biópsia Óptica” quando caracteriza tecidos biológicos com finalidade diagnóstica.

A espectroscopia Raman no Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (NIR-FT-Raman), pode eliminar virtualmente a fluorescência normalmente encontrada nos constituintes celulares e promover um sinal com boa relação entre o sinal e o ruído (S/N ratio), suficiente para promover de maneira bem sucedida a avaliação dos espectros por meio de métodos quimiométricos. Fendel et al (1998) utilizaram uma fibra-óptica para espectroscopia NIR-FT-Raman, a qual permitia a esterilização e a prevenção de acidentes com a radiação *laser*, viabilizando o uso de experimentos clínicos *in vivo* viáveis. Os espectros Raman da pele normal foram dominados por bandas referentes ao tecido conjuntivo, principalmente Colágeno Tipo I. O espectro Raman da pele com doença inflamatória mostrou um decréscimo do conteúdo lipídico e de água. O Sarcoma de Kaposi mostrou características tumorais principalmente nos modos vibracionais da Amida III e da estrutura protéica. Observaram também uma clara separação dos espectros Raman da pele normal dos neoplasmas benignos e malignos realizados por meio da Análise de Cluster (CLA). Concluíram que para a promoção de diagnóstico de doenças de pele um maior número de amostras poderiam ser analisadas e seus padrões definidos, considerando alguns aspectos recorrentes da pele, como pigmentação e inflamação.

Gniadecka et al (1998) obtiveram espectros FT-Raman de pele humana intacta, cabelo, unha e estrato córneo isolado, caracterizando as diferenças nas conformações moleculares das proteínas e dos lipídios presentes em cada uma destas estruturas. Os modos vibracionais referentes a Amida I e a Amida III indicaram que a maioria das proteínas em todas as amostras apresentam estrutura secundária α -helix. As posições das ligações de estiramento S—S das proteínas revelaram uma alta estabilidade das pontes de dissulfeto na

unha e no cabelo. Por meio da análise dos grupos —CH foram encontrados que na unha e no cabelo as proteínas apresentaram aspecto mais enovelado, interagindo com o ambiente em menor grau. A posição específica dos lipídios no cabelo, na unha e no estrato córneo sugeriu estruturas ordenadas, lamelares e cristalinas, ao contrário da pele intacta onde foi encontrada maior fluidez. A estrutura da água revelou estar mais presente na pele intacta, estrato córneo e unha. Todos esses achados demonstraram o poder da Espectroscopia Raman na análise da pele e de seus anexos, podendo ser utilizada para estudos das alterações estruturais ligadas a doenças associadas a esse órgão.

Pappas et al (2000) revisaram os avanços no desenvolvimento dos equipamentos e discutiram as diversas aplicações da espectroscopia Raman para o diagnóstico em Biologia, Química e Medicina.

Caspers et al (2001) utilizaram a Espectroscopia Raman Confocal, como método óptico não-invasivo para medir concentrações moleculares dos constituintes da pele. Foi demonstrado que esta técnica pôde ser aplicada para determinar a concentração de água no estrato córneo em função da distância da superfície da pele, com uma resolução de profundidade de 5 μm . Os resultados da concentração *in vivo* foram compatíveis qualitativa e quantitativamente com dados previamente publicados, obtidos por análises *in vitro* de amostras de pele por meio de Micro-EDX (Microespectroscopia de Raio-X). Concentrações semi-quantitativas foram determinadas para os principais constituintes do fator de hidratação natural (*natural moisturizing factor*), para lactato e uréia. Neste estudo, foi discutida que a descrição detalhada dos sinais obtidos por essa metodologia permitiu a extração de informações da pele por meio dos espectros Raman. Nenhum outro método não-invasivo existente permite análise da composição molecular da pele em função da distância da superfície cutânea com similar detalhamento e resolução espacial. Desta forma, pode-se esperar que a Espectroscopia Raman Confocal encontrará muitas aplicações nas pesquisas básicas e aplicadas em Dermatologia.

Gniadecka et al (2003) analisaram a região de baixa freqüência dos espectros Raman da pele para relacionar sua estrutura à água. Foi previamente demonstrado por meio de diversas técnicas que o conteúdo de água e

possivelmente sua estrutura sejam alteradas em alguns tumores malignos. Para elucidar essa possível alteração da estrutura da água, Gniadecka e colaboradores analisaram, por meio da Espectroscopia NIR-FT-Raman, biópsias selecionadas de tumores de pele benignos (ceratose seborréica e nevo pigmentado) e malignos (melanoma cutâneo e carcinoma basocelular). Primeiramente, não foram observadas diferenças no conteúdo de água entre esses dois grupos de tumores de pele, com exceção da ceratose seborréica, na qual o conteúdo de água diminuiu. Foi encontrado um aumento da estrutura tetraédrica (livre) da água nos tumores malignos e em peles normais jovens, e tumores benignos com danos causados pelo sol. Esses achados puderam adicionar um entendimento sobre as alterações moleculares do câncer de pele.

Gniadecka et al (2004) investigaram se as alterações químicas do melanoma cutâneo detectadas pelos espectros Raman analisados por meio de Redes Neurais Artificiais (ANN) poderiam ser utilizadas com propósito diagnóstico. Os espectros NIR-FT-Raman foram obtidos de amostras de melanoma cutâneo (n=22) e outros tumores de pele que podem ser confundidos com o melanoma: nevo pigmentado (n=41), carcinoma basocelular (n=48), ceratose seborréica (n=23) e pele normal (n=89). Análise de sensibilidade das frequências espectrais utilizadas pelas ANN foi realizada para determinar a importância dos componentes individuais dos espectros Raman. Uma inspeção visual dos espectros Raman sugeriu que o melanoma poderia ser diferenciado do nevo pigmentado, do carcinoma basocelular, da ceratose seborréica e da pele normal, devido ao decréscimo na intensidade do modo vibracional Amida I em $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$. Além do mais, o melanoma e o carcinoma basocelular mostraram um aumento na intensidade do modo vibracional específico para lipídios em $\sim 1310 \text{ cm}^{-1}$ e 1330 cm^{-1} , respectivamente. As alterações das bandas usadas para inspeção visual foram também independentemente identificadas pela ANN realizada para promoção de diagnóstico. A sensibilidade e a especificidade do diagnóstico do melanoma para essa metodologia foram 85 % e 99 %, respectivamente. Como conclusão, propuseram que a ANN dos espectros NIR-FT-Raman de pele poderão compor um novo método rápido e automático para o diagnóstico de câncer de pele em amostras não-fixadas.

Huang et al (2004) adquiriram, de maneira bem sucedida, espectros Raman *in vivo* da melanina de pele humana utilizando um espectrômetro NIR-Raman. Os sinais Raman *in vivo* da melanina cutânea observados foram similares aos observados dos espectros de eumelanina natural e sintética. O espectro da melanina é dominado por dois modos vibracionais intensos e largos em 1580 e 1380 cm^{-1} , os quais podem ser interpretados como originários do estiramento “em plano” do anel aromático e estiramento linear da ligação C—C dentro do anel, juntamente com algumas contribuições da vibração C—H dos grupos metil e metileno. Variações nas frequências dos picos e larguras de banda destes dois sinais Raman, devido aos diferentes ambientes biológicos, puderam ser observadas na melanina das diferentes fontes. A habilidade de adquirir o único espectro da melanina coletado *in vivo* sugere que a espectroscopia Raman pode ser utilizada como método clínico não-invasivo para análise e diagnóstico *in locu* da pele pigmentada.

Estudos bioquímicos prévios demonstraram que existem diferenças na estrutura lipídica na pele normal e da pele acometida por psoríase. A espectroscopia Raman é a única técnica a possibilitar o estudo da estrutura molecular dos lipídios, das proteínas e da água diretamente sobre a pele, simultaneamente. Osada et al (2004) utilizaram a NIR-FT-Raman para estudar as alterações na estrutura molecular e conformação das proteínas e lipídios do estrato córneo de pele de pacientes saudáveis e de pacientes com psoríase. Espectros Raman foram obtidos a partir de áreas do estrato córneo do antebraço, cotovelo e calcanhar de 11 pacientes com psoríase. Repetiu-se o procedimento nas mesmas áreas, com mesmo número de pacientes com a mesma idade para o grupo de pessoas saudáveis. Os espectros do estrato córneo diferiram entre a psoríase e a pele normal, mas não foram diferentes quando analisados os modos vibracionais dos lipídios. Entretanto, a estrutura cristalina dos lipídios estava fragmentada nas lesões de psoríase (determinada pela relação do modo de estiramento simétrico do metileno C—H). A maior diferença espectral foi vista na estrutura molecular das proteínas. Nos espectros das lesões de psoríase, a posição do pico de Amida I, em comparação com a pele normal, se apresentou deslocada no número de ondas mais altas, sugerindo o desenrolamento

(“*unfolding*”) das proteínas. Além do mais, as alterações das ligações de estiramento das pontes de dissulfeto das proteínas foram encontradas nas lesões de psoríase, resultado de uma ligação de menor energia favorável de uma conformação *gauche-gauche-trans* (banda $\sim 520\text{ cm}^{-1}$). Lesões de psoríase e estrato córneo normal estatisticamente não se diferenciaram no conteúdo de água. Esses achados definiram que existem anormalidades moleculares no estrato córneo em psoríase.

Sigurdsson et al (2004) reportaram o problema da influência da fluorescência na extração das características dos espectros Raman de lesões de pele. Neste estudo, aplicaram um modelo automático baseado em Redes Neurais Artificiais (ANN) de remoção de *background* (sinal de fundo) de fluorescência em espectros Raman de algumas lesões de pele (melanoma primário, carcinoma basocelular, nevo pigmentado e ceratose seborréica) antes da aplicação da Análise dos Componentes Principais (PCA), onde observaram uma melhor similaridade dos espectros.

Capozzi et al (2005) analisaram espectros da melanina obtidos do fígado do anfíbio *Rana esculenta L.* A melanina foi isolada dos melanossomos e depositada sob a forma de filme fino em substratos de quartzo. Para obtenção dos espectros Raman, foram consideradas a absorção e fotoluminescência sob temperatura ambiente. Os espectros Raman foram analisados considerando a contribuição dos modos vibracionais dos diferentes grupos funcionais da estrutura da melanina. As medidas de absorção e fotoluminescência suportam o modelo que a melanina consiste de nano-agregados de estruturas oligoméricas, ao contrário de heteropolímero estendido.

Choi et al (2005) utilizaram Espectroscopia Micro-Raman Confocal em estudo de diagnóstico dermatológico do Carcinoma Basocelular (CBC), carcinoma de pele mais comumente encontrado. Os tecidos de CBC foram obtidos de fragmentos de amostras coletadas de biópsia excisional de dez pacientes e, posteriormente, analisadas por Espectroscopia Micro-Raman Confocal. Os sinais de autofluorescência dos tecidos, o que interfere nos sinais Raman, foram fortemente reduzidos usando o ajuste confocal da *slit* (abertura de entrada) do espectrômetro. A distinção entre as diferenças espectrais dos

tecidos de pele normal e CBC, sob a observação dos modos vibracionais Amida I e estiramento simétrico da ligação PO_2 , mostrou que a técnica de Espectroscopia Raman tem forte potencial para ser usada com ferramenta de diagnóstico sem a utilização de ferramenta estatística para tratamentos dos dados. Este grupo também observou que foi possível diferenciar precisamente o tecido tumoral do CBC ao tecido normal adjacente usando a técnica de Espectroscopia Micro-Raman Confocal medida em profundidade. Desta forma, concluíram que a Espectroscopia Raman poderá ser utilizada como método de diagnóstico dermatológico.

Gao et al (2005) reportaram o uso da Espectroscopia NIR-FT Raman para analisar os queratinócitos da pele humana, normal e posterior à transformação maligna. As análises indicaram que as diferenças entre os espectros Raman foram específicas quando comparadas às células imortalizadas (HPK1A), e às células malignas *ras-transformed* (HPK1A-*ras*). Além disso, diferenças espectrais importantes foram observadas no DNA isolado destas células, particularmente quando observados os valores da relação entre os picos $843/810 \text{ cm}^{-1}$ de $1,6 \pm 0,13$ nas células HPK1A e $0,68 \pm 0,09$ nas células HPK1A-*ras* (média \pm S.D., $n = 12$, $p < 0,001$) indicando alterações específicas na conformação das estruturas dos marcadores seguidas à transformação maligna. Subseqüentemente, analisaram o efeito de um inibidor de crescimento de ceratinócitos, o análogo da Vitamina D (EB 1089), nos espectros Raman dos dois tipos celulares intactos e nas alterações do índice $843/810 \text{ cm}^{-1}$ do DNA isolados das duas linhas celulares. Alterações específicas foram observadas nas células intactas na região espectral entre 750 a 1300 cm^{-1} . Além do mais, o índice $843/810 \text{ cm}^{-1}$ do DNA isolado das células HPK1A não foi afetado pelo EB1089, entretanto aumentou tão significativamente no DNA isolado das células HPK1A-*ras* que aproximou o valor encontrado ao valor das células normais ($1,07 \pm 0,10$). Estes dados sugeriram que as análises Raman do DNA, em particular o índice $843/810 \text{ cm}^{-1}$ puderam promover índices úteis relacionando a transformação maligna e a eficiência de agentes anti-câncer.

Huang et al (2005) avaliaram a habilidade diagnóstica das técnicas de espectroscopia óptica: espectroscopia Raman no NIR, espectroscopia de

autofluorescência no NIR e a composição das duas técnicas citadas, para detecção *in vivo* de tumores malignos. Para esta proposta, foram implantadas células de fibrossarcoma Meth-A na região subcutânea inferior de camundongos Balb/c. Um sistema de aquisição rápida tipo dispersivo no NIR foi aplicado para medidas Raman e Autofluorescência com *laser* de excitação em @785 nm. Espectros *in vivo* NIR Raman associados ao *background* de autofluorescência das peles e dos tumores dos camundongos foram adquiridos em 5 segundos. Técnicas estatísticas multivariadas, incluindo Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante Linear (LDA), foram usadas para desenvolver algoritmos diagnósticos para diferenciação do tumor da pele normal baseados em suas características espectrais. A classificação espectral do tecido tumoral foi testada usando *leave-one-out*, método *cross-validation*, e a Curva de ROC (*receiver operating characteristic*) foi usada para avaliar a performance do algoritmo diagnóstico proposto. Trinta e dois espectros Raman *in vivo*, Autofluorescência NIR e espectros compostos (Raman e Autofluorescência) foram analisados (16 normais e 16 tumores). Os resultados da classificação foram obtidos por meio dos modelos de *cross-validation* (validação cruzada) do modelo LDA baseados nos espectros sensibilidade de 81,3 %, 93,8 % e 93,8 %; especificidade de 100 %, 87,5 % e 100 %; e precisão diagnóstica de 90,6 %, 90,6 % e 96,9 %, respectivamente. A Curva de ROC mostrou que o algoritmo de classificação mais efetivo foi o obtido por meio dos espectros da técnica composta por Raman e Autofluorescência NIR.

Perna et al (2005) extraíram melanina do fígado de *Rana esculenta L.* e depositaram sobre um filme de quartzo para caracterizar as propriedades ópticas da melanina. Realizaram estudos por espectroscopia Raman, espectroscopia de absorção e fotoluminescência onde puderam concluir que a melanina é formada por agrupamentos de diferentes tamanhos. Os maiores agrupamentos determinaram as pontes de absorção, e os menores foram descritos como responsáveis pela emissão de radiação.

Shen et al (2005) utilizaram Micro-espectroscopia Raman Confocal para caracterizar células de carcinoma gástrico tanto isoladas em meio de cultura quanto no tecido. Baseados nos espectros obtidos de células únicas em cultura,

células de carcinoma gástrico foram examinadas com sucesso e sustentaram um índice de 58,06 % de classificação correta. A alta SNR (relação sinal/ruído) dos espectros dos tecidos de mucosa gástrica e das células isoladas foi obtida por coleta de espectros que não excederam três minutos, sem preparação prévia das amostras. Comparando os espectros do tecido da mucosa gástrica com os espectros das mesmas células isoladas (normal e maligna), foram encontradas algumas alterações nos espectros, incluindo a diminuição na intensidade do pico 1587 cm^{-1} nas células normais e a alteração da forma do pico 1660 cm^{-1} nas células malignas. Contudo, características espectrais de célula única também diferiram daquelas do tecido gástrico nas bandas 1525 cm^{-1} e 1156 cm^{-1} , onde estas duas bandas são específicas dos carotenóides. Estes resultados demonstraram a possibilidade de um diagnóstico de carcinoma gástrico rápido por meio da associação da micro-espectroscopia Raman a uma fibra-óptica por controle remoto.

A Micro-espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FT-IR), em combinação com a Análise de Cluster (CLA), tem sido amplamente usada para caracterização de tecidos e sua discriminação entre cancerosos e não-cancerosos. O objetivo principal do trabalho de Tfayli et al (2005) foi o estudo *in vitro* para demonstrar a aplicabilidade da imagem espectral IR em separar, em amostras obtidas de blocos de parafina, nevo pigmentado de melanoma. Os espectros FT-IR foram coletados de amostras de blocos de parafina, sem deparafinização. Desconsiderando a contribuição do sinal da parafina nestes espectros, foi possível encontrar regiões espectrais importantes para discriminação. A imagem espectral foi primeiramente realizada para localizar as diferentes camadas da pele (derme e epiderme). Espectros extraídos destas imagens foram submetidos a algoritmos de classificação hierárquica, o que permitiu a discriminação dos melanomas e nevos, usando janelas espectrais selecionadas que correspondem às vibrações do DNA e conteúdo de melanina.

Afseth et al (2006) propuseram métodos de pré-processamento dos espectros Raman de diferentes amostras biológicas e avaliaram seus efeitos na habilidade em extrair informações robustas. Quatro conjuntos de dados Raman foram escolhidos para cobrirem diferentes aspectos dos espectros Raman dos sistemas biológicos. Foram escolhidas amostras de óleo de salmão, amostras de

sucos, carne de salmão, misturas de gorduras, proteínas e água, que foram pré-processadas por diversos métodos amplamente descritos e avaliados por *Partial Least Squares Regression* (PLSR) para comparação dos efeitos dos tratamentos. O principal resultado sugeriu que a correção de linha de base seja realizada antes dos métodos de normalização.

Chan et al (2006) mostraram, por Espectroscopia Micro-Raman, a comparação entre espectros de célula única de linfócitos. Foram utilizadas para discriminação células não fixadas de linfócitos humanos e linfócitos transformados das linhas celulares Jurkat e Raji, baseados nas assinaturas biomoleculares Raman. Foi demonstrado que os espectros Raman de célula única promovem “impressão digital” altamente reprodutível para cada tipo celular. Os picos característicos, sendo a maioria deles referente ao DNA e proteínas, permitiram o discernimento entre os linfócitos normais e transformados com alto índice de confiança ($p < 0,05$). Os espectros foram também comparados e analisados por PCA para demonstrar que as células normais e transformadas se agruparam distintamente quando comparados dois componentes principais (PC's). Este método mostrou sensibilidade de 98,3 % e 97,2 % de especificidade para classificação do grupo normal e transformado. Estes resultados demonstraram o potencial de aplicação da Espectroscopia Micro-Raman confocal como ferramenta diagnóstica para detecção de câncer por meio de célula única baseada na assinatura bioquímica intrínseca, como consequência eliminando a necessidade de rastreamento de fluoróforos.

Ellis et al (2006) destacaram a potencialidade da Espectroscopia Raman em diagnosticar precocemente uma doença, rapidamente, de maneira não-invasiva e sem equívocos, com múltiplos benefícios. Dentre essas possibilidades são incluídas as intervenções precoces de estratégias terapêuticas que viabilizam a redução da morbidade e mortalidade, considerando a economia de recursos dos sobrecarregados sistemas de saúde. Muitas doenças resultam de distúrbios metabólicos e, por essa razão, seria lógico monitorar diretamente o metabolismo. Uma das estratégias empregadas pela emergente ciência de “*metabolomic*” é encontrar as “impressões digitais” metabólicas, as quais envolvem um método rápido e de alta eficiência na análise global e para discriminação das amostras de diferentes origens. Este trabalho revisou um seletivo

número de publicações que envolveram a descrição das potenciais ferramentas diagnósticas: Espectroscopia Raman e IR.

Sob excitação luminosa na região do espectro ultravioleta e visível, a melanina é essencialmente uma substância não-fluorescente. Huang et al (2006) reportaram em seu estudo algumas propriedades fluorescentes da melanina obtidas na região do infravermelho próximo (NIR), e exploraram o potencial e aplicação da técnica de Fluorescência NIR para avaliação de doenças ligadas à pigmentação da pele. O espectro de fluorescência NIR foi obtido usando uma fibra-óptica acoplada ao espectrômetro NIR sob excitação *laser* de @785 nm. Medidas *in vitro* foram realizadas em amostras sintéticas de DOPA (*dihydroxyphenylalanine*) melanina, melanina extraída dos sacos de tinta de Sepia, cabelo humano, pêlo de animal e pena de pássaro. Comparação em pares dos espectros dos anexos das peles brancas e negras mostrou que a melanização do cabelo, do pêlo ou da pena mais do que dobrou a fluorescência no NIR. As medidas de autofluorescência NIR *in vivo* foram obtidas das regiões dorsal e volar do antebraço de 52 voluntários. A parte dorsal do antebraço, que é mais escura que a pele da parte volar, exibiu maior intensidade nos espectros de fluorescência NIR. Pacientes acometidos por vitiligo (n=4), nevo composto (n=3), nevo de Ota (n=1), melanoma superficial (n=3) e hiperpigmentação pós-inflamatória (n=1) também foram avaliados. Os espectros de fluorescência NIR foram mais intensos nas lesões quando comparados ao tecido normal adjacente, exceto no vitiligo, onde o inverso se mostrou verdadeiro. Os espectros de fluorescência NIR da melanina observados promoveram uma nova abordagem para detecção e quantificação *in vivo* e *in vitro* da melanina que poderá ser útil na análise de lesões pigmentadas de pele.

Mendelsohn et al (2006) afirmaram que o tecido cutâneo é um excelente modelo para o desenvolvimento de microscopia vibracional e imageamento para aplicações biomédicas. Além disso, permite a caracterização de seus vários estratos, por meios dos seus componentes, em quantidades ínfimas, para promover o imageamento com resolução microscópica, observando as alterações conformacionais e de concentração de lipídios e proteínas. Desta forma, pode ser possível monitorar o efeito de drogas exógenas. Neste estudo, foram demonstrados esses procedimentos desde a exposição de espectros da

variação dos lipídios até o desenvolvimento de algoritmo analítico, que permitiu o imageamento das diferenças entre lipossomos tratados que se tornaram permeáveis, e aqueles não submetidos a qualquer tratamento.

Short et al (2006) afirmam ser possível monitorar por Espectroscopia Micro-Raman Confocal os núcleos de células epidérmicas da membrana basal normais e com alteração maligna. Foram observadas diferenças claras entre esses espectros. Os espectros do núcleo do tumor apresentaram diferentes contribuições dos ácidos nucléicos, histonas e proteínas (actina) em relação às células epidérmicas normais. Neste estudo, também foram caracterizados espectros da derme vizinha a tumor, que apresentaram características espectrais de deficiência em colágeno e alterações estruturais.

A região mais externa da epiderme, o estrato córneo, tem como função promover uma barreira de proteção à perda de água e contra substâncias exógenas. A integridade funcional do estrato córneo depende do complexo processo de maturação e exfoliação, o qual freqüentemente é perturbado gerando algumas das doenças de pele. Neste contexto, Zhang et al (2006) estudaram os corneócitos isolados de diferentes profundidades do estrato córneo da pele humana saudável por Espectroscopia de imagem IR e microscopia Raman. Ambos, IR e Raman mostraram espectros individuais dos corneócitos com características que favoreceram a identificação da profundidade por meio da variação da composição bioquímica/espectral. As alterações espectrais foram identificadas como advindas das alterações das concentrações do principal constituinte do fator de hidratação natural (*natural moisturizing factor* - NMF), importante na manutenção da hidratação do estrato córneo. Um decréscimo considerável na concentração de NMF foi observado nos corneócitos isolados da superfície do estrato córneo comparados aos corneócitos provenientes de camadas mais profundas do estrato córneo. Pelos espectros IR, por ser uma técnica quantitativa, foi possível medir as concentrações relativas de NMF nos corneócitos.

Cao et al (2007) desenvolveram um novo método de remoção do *background* de fluorescência gerado pelos tecidos nos espectros Raman. Os autores afirmam que estes espectros são constituídos de ruído, fluorescência e espalhamento Raman. Com o objetivo de extrair somente o espalhamento

Raman, tanto o ruído quanto a fluorescência devem ser removidos, idealmente sem interferência humana e preservando os dados originais. Os autores desenvolveram um método de subtração de *background*, aplicaram estes parâmetros em espectros Raman e compararam a outros métodos usuais. Como conclusão, o método “*Adaptive Minmax*” se mostrou significativamente melhor do que os outros métodos aplicados, possibilitando sua implementação como parte modular de sistemas de diagnóstico automatizados Raman *in vivo*.

Lyng et al (2007) investigaram o potencial da espectroscopia Raman como uma ferramenta para detectar alterações bioquímicas do câncer cervical. Espectros Raman foram adquiridos sob duas formas: de substâncias purificadas (proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos) e de fragmentos de tecido cervical normal, neoplasia intra-epitelial cervical e carcinoma invasivo de 40 pacientes voluntárias, a fim de obter uma visão da composição bioquímica de células e tecidos. A análise estatística multivariada foi realizada para desenvolver um modelo de classificação para discriminar o tecido normal do anormal. Os resultados mostram que a espectroscopia Raman apresentou alta sensibilidade para identificar a composição bioquímica que possibilitou a discriminação entre o tecido cervical normal, o carcinoma invasivo e a neoplasia intra-epitelial cervical (NIC).

Os avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de uma variedade de ferramentas de varredura que viabilizaram exames *in vivo* de tecidos humanos. Todos esses sistemas preservam a integridade física do tecido e ao mesmo tempo pesquisam se podem estudar este tecido em seu estado nativo. Diferentes modalidades estão sendo atualmente utilizadas para investigar o tecido cutâneo, dentre as quais muitas ainda estão em fase experimental, como ultrassonografia de alta resolução, tomografia de coerência óptica, ressonância magnética por imagem e os métodos espectroscópicos. Meyer et al (2007) demonstram seus próprios resultados e revisam a influência dos métodos de espectroscopia a *laser* como ferramentas não-invasivas para diagnóstico dermatológico.

Perna et al (2007) extraíram o pigmento de melanina do fígado de *Rana esculenta L.*, depositaram sob a forma de filmes finos em um substrato de quartzo e avaliaram por espectroscopia Raman, FT-IR e Fluorescência. O

resultados mostram que a melanina pode ser descrita como um biopolímero muito semelhantes aos semicondutores amorfos composto por grupos de nanoclusters com tamanhos diferentes. Além disso, as recentes análises químicas da melanina do fígado de *Rana esculenta* L. têm demonstrado que os melanossomos contêm principalmente eumelanina, entretanto, uma menor quantidade de feomelanina.

A microscopia vibracional e construção de imagem química (ou imageamento) podem oferecer diversas vantagens para uma variedade de aplicações dermatológicas, desde estudos de células isoladas (como estudos dos corneócitos) até a caracterização dos componentes endógenos do tecido intacto. Zhang et al (2007) descrevem duas aplicações para ilustrar o poder destas técnicas da pesquisa do tecido cutâneo. Primeiramente, foi demonstrada a flexibilidade para investigar as alterações estruturais nos componentes individuais dos corneócitos. Dois solventes, DMSO (Dimetilsulfóxido) e clorofórmio/metanol, comumente utilizados em pesquisas dermatológicas, mostraram induzir uma intensa alteração, porém reversível, na estrutura secundária das proteínas (de α -*helix* para β -*sheet*) dos corneócitos isolados. Em segundo lugar, a análise fatorial (*factor analysis*) das imagens planas adquiridas com microscopia Raman confocal para a profundidade de 70 μ m em pele de porco intactas, demonstraram o delineamento específico das regiões espectrais da pele. Dois componentes, em particular, os quais geralmente são difíceis de identificar por outros métodos de análise, foram observados neste estudo. Uma pequena região foi formada a partir da conformação ordenada da fase dos lipídios contendo colesterol. Além disso, a presença de células nucleadas no tecido (sendo a maioria queratinócitos) foi revelada pela assinatura espectral de fosfodiésteres e citosinas do DNA celular.

Kunapareddy et al (2008) estimaram as alterações bioquímicas da necrose celular em modelo *in vitro* utilizando células de melanoma maligno humano (MEL-28) por meio da Espectroscopia Micro-Raman. A morte celular por necrose foi realizada por combinação de privação de oxigênio e glicose e os procedimentos espectroscópicos foram realizados com as células vivas (tempo 0) e com as células mortas nos tempos: 24, 48 e 72 horas. As estimativas quantitativas da composição bioquímica de células vivas e mortas foram feitas por ajuste estatístico dos espectros Raman com base nas bandas das proteínas, lipídios, RNA, DNA e glicogênio. A diminuição na quantidade relativa de lipídios e

RNA e um aumento em relação ao conteúdo protéico, foram observadas em células mortas. Uma comparação entre os espectros indicaram a existência de alterações na conformação de proteínas e ácidos nucleicos em nessas células.

Lieber et al (2008) investigaram o potencial da técnica de Espectroscopia Micro-Raman (NIR) na diferenciação entre tecidos normais e lesões cutâneas malignas. Trinta e nove amostras (39 pacientes) de pele normal, CBC, CEC e melanoma foram investigados. Espectros Raman foram coletados na superfície e em cinco intervalos de 20 μm de profundidade cada, até uma profundidade de, pelo menos, 100 μm . Modelos estatístico não-lineares baseados nas técnicas MRDF (*Maximum Representation and Discrimination Feature*) e SMLR (*Sparse Multinomial Logistic Regression*) foram desenvolvidos para a ordenação dos espectros Raman em relação à histopatologia. Os espectros Raman foram classificados em relação ao estados patológicos tendo apresentado sensibilidade e especificidade máxima de 100 %.

Zhao et al (2008) desenvolveram um Espectrômetro Raman para coletas rápidas (menos de 1 segundo) de espectros *in vivo* com potenciais para aplicação clínica. Foram medidos 289 amostras divididas entre lesões malignas e benignas de pele. Para analisar os espectros Raman foram utilizadas *PLS-Regression* (*Partial Least Square Regression*) e Análise Discriminante (LDA). Como resultado foi possível diferenciar as lesões cutâneas benignas (sensibilidade 91 % e especificidade 75 %) e melanoma maligno de lesões pigmentadas benignas (sensibilidade 97 %, especificidade 78 %).

4. MÉTODOS

Este foi um estudo primário, observacional, experimental, prospectivo, analítico, randomizado e aberto, que seguiu os Princípios Éticos, segundo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução no 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP por meio do protocolo N° 1895/07 (Anexo 1).

4.1 Seleção dos Pacientes

Os pacientes que participaram deste estudo foram atendidos pelo Setor de Tumores do Tegumento, da Disciplina de Cirurgia Plástica do Hospital São Paulo UNIFESP. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), os pacientes, sem terem qualquer prejuízo ao diagnóstico e tratamento de suas doenças, autorizaram o uso do fragmento das amostras de melanoma cutâneo primário e pele normal. Todas as amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de parte da lesão primária removida durante a cirurgia ressectiva. Foram obtidas 13 amostras, sendo uma amostra coletada por paciente de cada grupo diagnóstico. Desta forma, foram obtidas 7 amostras da pele normal e 6 amostras de melanoma cutâneo primário. A inclusão de pacientes foi feita por ordem de atendimento.

4.1.1 Critérios de inclusão para aquisição das amostras

Neste estudo foram utilizadas amostras de melanoma cutâneo primário de pacientes atendidos no ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital São Paulo - UNIFESP. Este procedimento não comprometeu qualquer pesquisa diagnóstica. As peles normais, retiradas destes mesmos pacientes, foram obtidas dos tecidos excedentes que seriam desprezados após a realização dos retalhos ou da elipse de pele da peça cirúrgica. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pela equipe de cirurgiões plásticos do ambulatório supracitado.

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 (Breslow, 1970). Lesões consideradas suspeitas, pequenas (menores que 2 cm), e/ou com componente de crescimento somente na fase radial ou horizontal não foram utilizados para não interferir no diagnóstico histopatológico final. No momento

cirúrgico, um pequeno fragmento medindo de 0,1 a 0,3 cm foi obtido da porção caudal da peça através de uma incisão no sentido longitudinal. A coleta do material foi realizada quando a peça cirúrgica já estava fora do paciente, portanto não houve intervenção direta no paciente, evitando a manipulação do sítio da lesão e, conseqüentemente, a propagação hematogênica. A peça cirúrgica principal foi então enviada para exame anatomopatológico de rotina. Não houve prejuízo ao diagnóstico, pois a casuística compôs-se de casos com lesões primárias com biópsias prévias. Os pequenos fragmentos colhidos não atingiram toda a espessura da lesão e, desta forma, a espessura de Breslow pôde ser medida normalmente.

4.1.2 Armazenamento das amostras

Imediatamente após a remoção dos tecidos, todas as amostras foram devidamente identificadas, colocadas em tubos criogênicos Nalgene® e, em seguida, armazenadas em nitrogênio líquido a 196°C negativos no Banco de Tumores Cutâneos da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Para o transporte ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) em São José dos Campos, São Paulo, onde as medidas foram realizadas, todas as amostras foram acondicionadas em um tambor criogênico específico para transporte, e lá armazenadas em refrigerador à temperatura 80°C negativos.

4.1.3 Preparo das Amostras para Espectroscopia

O seccionamento dos tecidos das amostras de pele normal e melanoma cutâneo seguiram o posicionamento preconizado em Histologia para análise de pele normal e avaliação de biópsia para melanoma cutâneo. Para a realização dos cortes, foi utilizado um Criostato (Leica CM 1100) (Figura 1) à temperatura de - 28°C, com as amostras ainda congeladas sem qualquer fixação química.

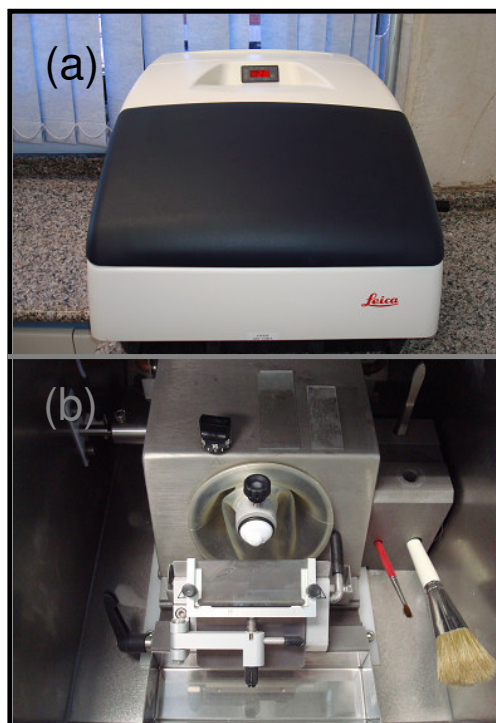


Figura 1. (a) Criostato da Leica modelo CM 1100. (b) Em detalhe, parte interna do criostato preparado para confecção das lâminas histológicas por congelação: pincéis, fragmento de tecido recoberto pelo *Tissue Freezing Medium* (TFM) e lâminas de CaF_2 (específico para espectroscopia na região do infravermelho do espectro eletromagnético).

Para cada uma das 13 amostras, foi confeccionado um fragmento com espessura de $16\ \mu\text{m}$, como preconizado para as pesquisas em espectroscopia vibracional. Os fragmentos foram montados individualmente em janela de Fluoreto de Cálcio (CaF_2). Após o corte, as amostras foram imediatamente posicionadas sobre a janela de CaF_2 , onde foram cuidadosamente lavadas com solução fisiológica estéril 0,9 % para remoção completa do TFM, e posteriormente secas em temperatura ambiente (21°C) até que o excesso de solução fisiológica evaporasse. Este procedimento foi realizado individualmente para cada uma das 13 amostras no momento da realização das medidas Micro-Raman. A cada final de experimento, as amostras medidas foram descartadas. A janela de CaF_2 foi limpa, mergulhada em ultrassom (Maxi Clean 1450 – Unique[®]) com acetona por 20 minutos, posteriormente em ultrassom com água destilada por mais 20 minutos, e seca em estufa (Modelo A-HT 515 – Fanem[®]) para assegurar que grande parte das moléculas de água presente na estrutura interna evaporasse. Esta etapa foi realizada pelo próprio pesquisador.

4.2 Espectroscopia Micro-Raman

As medidas espectroscópicas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, UNIVAP, São José dos Campos. O espectrômetro utilizado para esse experimento foi um Raman Dispersivo acoplado a um microscópio óptico construído por uma equipe multidisciplinar formada por físicos, engenheiros e biomédicos, incluídos professores, alunos de mestrado, iniciação científica e o próprio pesquisador. Todo o procedimento experimental está descrito detalhadamente nas próximas sessões.

4.2.1 Configuração do Sistema Micro-Raman

O Sistema Raman Dispersivo é formado basicamente pelo *laser* de excitação Raman, Microscópio, Componentes Ópticos Elementares e Espectrômetro para a região visível (VIS) e infravermelho próximo (NIR) do espectros de radiação eletromagnética, descritos a seguir (Figura 2).

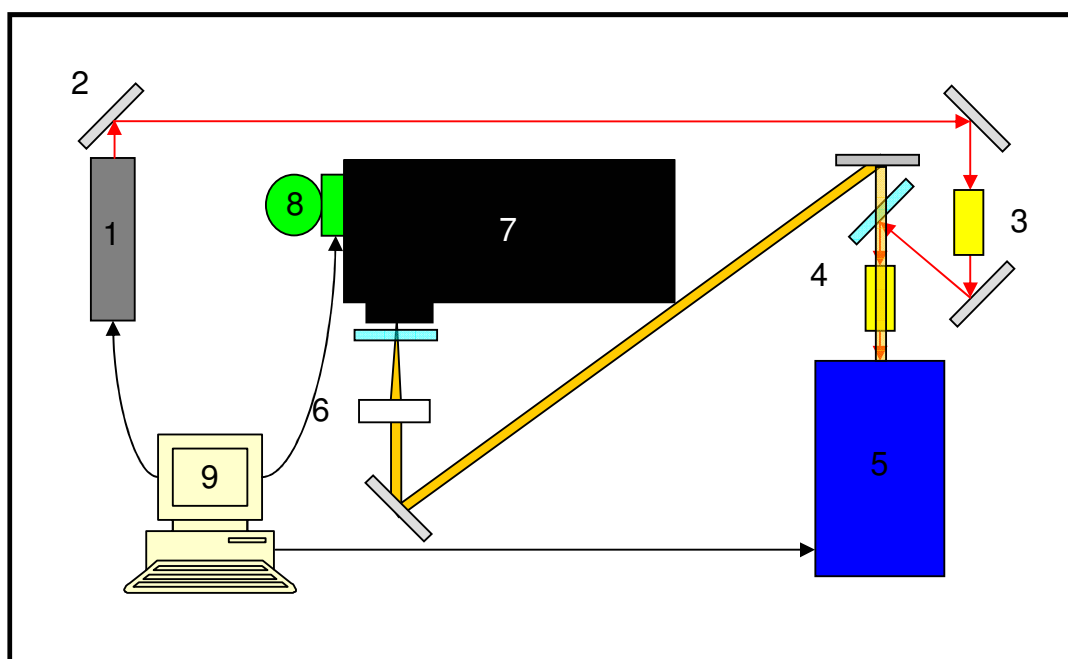


Figura 2. Esquema de montagem do Espectrômetro Micro-Raman: (1) *Laser* @785 nm; (2) Espelhos refletores; (3) Telescópio; (4) Filtro *Notch* (@785 nm); (5) Microscópio óptico invertido + Estágio translador; (6) Lente convergente; (7) Espectrômetro; (8) Detector CCD; (9) Microcomputador

***Laser* de Excitação**

Para a configuração sugerida para este sistema Micro-Raman foi utilizado o *laser* de diodo de cavidade externa, sintonizável, centralizado em @785 nm (Sacher *Laser Technik*). No experimento foi utilizada a potência máxima de saída de 110 mW para excitação Raman com intensidade viável.

Circuito Óptico

Para guiar a luz *laser* geradora de energia de excitação das amostras ao espectrômetro foi necessária a construção de circuitos ópticos a partir de filtros, *beamsplitters*, lentes e espelhos (*Newport, Semrock e Edmund Optics*). A disposição dos elementos foi otimizada para maximizar a potência gerada pelo *laser* de excitação no final do caminho óptico e gerar perdas mínimas do sinal Raman das amostras. Todo o sistema foi montado em uma sala totalmente escura, com temperatura controlada em 21°C, sem janelas e com paredes pretas para evitar qualquer interferência de fontes luminosas externas ou de reflexão interna do circuito.

Microscópio Óptico Invertido

O microscópio óptico escolhido para compor esta configuração foi o Microscópio Leica Invertido DMIRB. O microscópio invertido foi escolhido pois seu sistema óptico se encontra próximo da mesa óptica, facilitando a montagem do circuito óptico que integrou *laser* de excitação, microscópio e espectrômetro. A lente objetiva utilizada para a montagem foi de 40 vezes de aumento, com abertura numérica de 0,55 (Leica). A esse microscópio foi acoplada uma câmera de CCD (Leica DFC 280) para captura de imagens.

Espectrômetro Raman

O Espectrômetro utilizado foi o Acton Spectra Pro 2500i. Acoplado ao Espectrômetro, para a captura de imagens e espectros, existe uma câmera de CCD (Acton – Princeton Instruments – Modelo SPEC-10). Todas as imagens e espectros foram observadas ao microcomputador por meio do *software* WinSpec/32 v.2.5.20 2 (Copyright® 1992-1999, 2000-2003 Roper Scientific, VBS).

4.2.2 Aquisição dos Espectros Micro-Raman

Os fragmentos de Pele Normal e de Melanoma Cutâneo adequadamente montados na janela de CaF_2 foram posicionados (cada fragmento em seu momento experimental) no Microscópio Óptico (Leica - DMIRB), tal procedimento pode ser observado na Figura 3. Nesta fase, a objetiva de aumento de 40 vezes foi posicionada e a imagem dos fragmentos visualizadas na tela do computador. Neste momento, foram escolhidas e fotografadas as regiões dos fragmentos que onde foram adquiridos os espectros Micro-Raman.

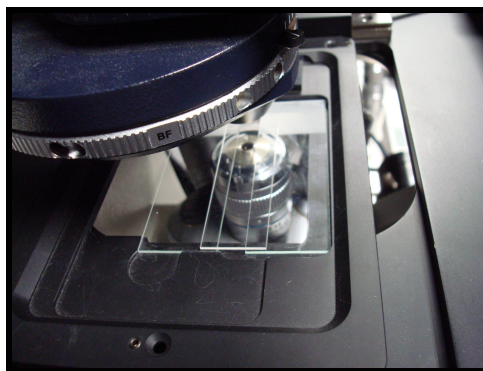


Figura 3. Montagem experimental para Espectroscopia Micro-Raman. Posicionamento do conjunto amostra de melanoma cutâneo e janela de CaF_2 ao microscópio invertido apoiados sobre duas lâminas de vidro convencionais. Objetiva de aumento de 40 vezes.

A lente objetiva de aumento de 40 vezes possibilitou que o *spot* (ponto focal) de *laser* de excitação Raman tivesse aproximadamente $10\ \mu\text{m}$ de diâmetro, conferindo a dimensão de cada ponto de coleta espectral. Este diâmetro foi estimado considerando o comprimento de onda do *laser* de excitação (@780 nm), o aumento da lente objetiva e sua distância focal (40x e 0,55) por meio da Teoria de Difração Fresnel-Kirchhoff. Para cada uma das sete amostras de Pele Normal, foram selecionadas regiões retangulares de $0,3\ \text{mm}$ ($30\ \mu\text{m}$) de altura por $0,8\ \text{mm}$ ($80\ \mu\text{m}$) de largura. Este retângulo, dividido em três linhas e oito colunas, possibilitou que 24 regiões tivessem seus espectros coletados. Para as seis amostras de região nodular do Melanoma Cutâneo, foram selecionadas regiões de $0,5\ \text{mm} \times 0,5\ \text{mm}$ ($50\ \mu\text{m}^2$) para o mapeamento ponto-a-ponto. Foram coletados 25 espectros de cada amostra, em diferentes pontos distantes por passos de $10\ \mu\text{m}$ nas direções *x* e *y*. Para o experimento Micro-Raman os passos e as distâncias entre os espectros foram

ajustados por microcontrolador instalado ao sistema Raman por meio do *software Prior ActiveX Demonstration Programme v.6.3* (Figura 4).

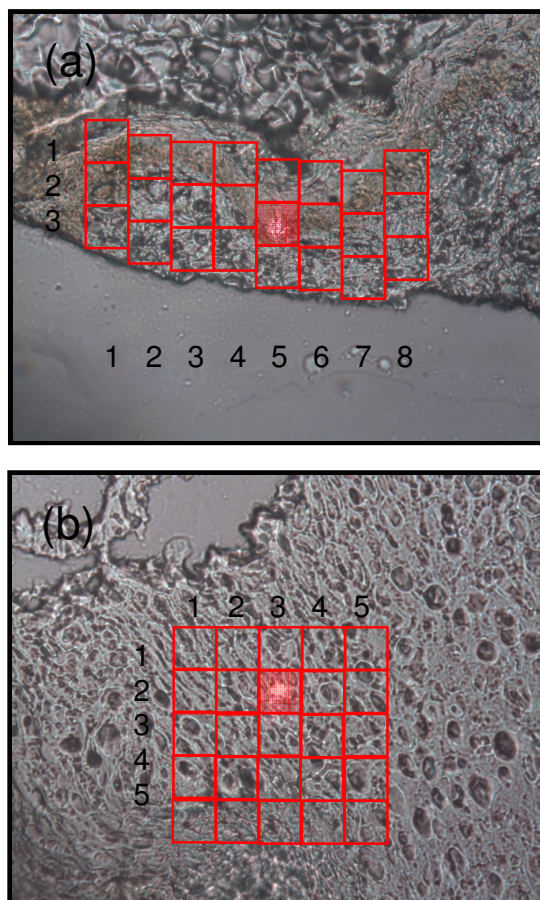


Figura 4. Esquema representativo da área de mapeamento esquematizadas para aquisição dos espectros Micro-Raman: **(a)** Pele Normal área de 0,3 mm x 0,8 mm totalizando 24 espectros com resolução de pixel de $10 \mu\text{m}^2$; **(b)** Melanoma Cutâneo área de 0,5 mm x 0,5 mm totalizando 25 espectros com resolução de pixel de $10 \mu\text{m}^2$. Área vermelha nas duas imagens representam o *spot* do *laser* de excitação sobre as amostras.

A potência do *laser* de excitação medida na saída da lente objetiva de 40 vezes foi de $\sim 10 \text{ mW}$, a resolução espectral usada foi de 4 cm^{-1} , com tempo de aquisição dos espectros de 120 segundos, divididos em 2 acumulações de 60 segundos de exposição para adquirir um espectro Raman.

Os sinais espalhados pela amostra foram guiados ao espectrômetro por meio de um segundo caminho óptico composto por lentes e filtros descrito previamente. Acoplada ao espectrômetro, uma câmera de CCD coletou os sinais Raman gerados. Os dados capturados pelo detector da câmera de CCD (modo “espectro”) foram transferidos para o computador gerando os espectros Raman.

4.3 Análise Histológica

Previamente ao preparo no criostato para o experimento Micro-Raman, um pequeno fragmento representativo de cada uma das 13 amostras foi separado, identificado e fixado em solução formalina 10 % e convencionalmente emblocados em parafina para seguida coloração e fixação por H&E. Estas lâminas foram utilizadas para auxiliar na identificação e na classificação das estruturas presentes nos tecidos de Pele Normal e Melanoma Cutâneo. Esta análise histopatológica foi realizada no Departamento de Patologia da UNIFESP. Desta análise foram identificadas, além da certificação do diagnóstico, as estruturas celulares presentes no fragmento estudado, para que desta forma fosse possível correlacionar cada espectro com sua respectiva estrutura.

4.4 Análise Estatística

Para efetiva análise dos espectros Raman com a finalidade de se promover o diagnóstico entre pele normal e melanoma cutâneo por meio das características bioquímicas individuais evidenciadas neste estudo, os espectros foram processados e analisados estatisticamente em três etapas consecutivas: (1) Pré-processamento dos dados espectrais; (2) Classificação dos grupos espectrais e atribuição celular; e (3) Classificação Diagnóstica.

4.4.1 Pré-processamento dos dados espectrais

Nesta etapa, os espectros precisaram se tornar adequados para poderem ser comparados na etapa de análise propriamente dita. Existem alguns artefatos que foram incluídos nos espectros durante sua aquisição, e que nesta etapa puderam ser minimizados sem prejuízo ao sinal coletado. Estes artefatos foram principalmente: (a) efeito *Elatoing*; (b) interferência de *Spikes* (ou raios cósmicos); (c) emissão de Autofluorescência e (d) a diferença de intensidade entre os espectros.

Antes de ser realizada qualquer análise estatística, foi escolhida a região espectral entre 1200 e 1800 cm^{-1} , que compreende parte da região de “impressão digital” Raman dos sistemas biológicos (600-2000 cm^{-1}). Pelo tipo de espectrômetro (Dispersivo) e grade de difração (600 linhas/mm) utilizados na configuração do sistema, obtiveram-se espectros na região espectral entre 400 e 2000 cm^{-1} . Entretanto, devido

interferência da radiação *Rayleigh* (espalhamento elástico da amostra cujo comprimento de onda é semelhante ao do *laser* de excitação e intensidade muito maior do que a do espalhamento Raman) no detector de CCD do espectrômetro, esta região foi reduzida. Esta interferência é conhecida como efeito *Etaíing*. Quando se trabalha da região de infravermelho próximo (NIR), o silício contido nos detectores CCD se torna cada vez mais transparente. A superfície posterior, por onde a luz entra no CCD de configuração *back-illuminated*, é tipicamente revestida por cobertura antirreflexo. Estes revestimentos não são perfeitos e sua eficácia varia em função do comprimento de onda, sendo que a maioria dos revestimentos do detector de CCD não são otimizados para o NIR. Quando a luz passa pelo detector de CCD, encontra um sanduíche de camadas de dióxido de silício e sílica. A diferença entre os índices de refração dos dois materiais acaba por produzir uma grande reflexão; sendo assim, a luz percorre, indo e voltando, a CCD por diversas vezes criando um padrão de onda construtiva ou destrutiva. Este padrão é o efeito *Etaíing* que interferiu nos espectros Raman na região coletada. Para minimizar esse efeito, o alinhamento do sistema Raman construído atentou-se para melhor desvio do espalhamento Rayleigh da entrada do espectrômetro. Mesmo assim, nem toda a radiação foi desviada, influenciando o espectro Raman principalmente na região abaixo de 1200 cm^{-1} .

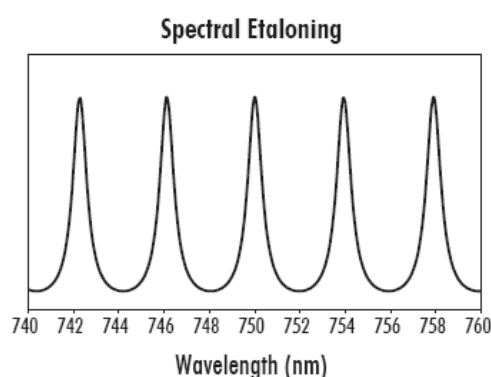


Figura 5. Espectro *Etaíing* mostrando a variação de intensidade em função do comprimento de onda.

Raios C3smicos s3o radia33es naturais cujo poder de penetra33o 3 muito superior ao de qualquer outra radia33o conhecida. No caso do equipamento utilizado neste estudo, o resultado da intera333o entre o raio c3smico secund3rio e o sil3cio do

detector de CCD foram os *spikes*. Estas interferências foram removidas com auxílio de programação específica do *software* Matlab[®] (Version 6.1.0.450 Release 12.1, The MathWorks, Inc.) (Figura 6).

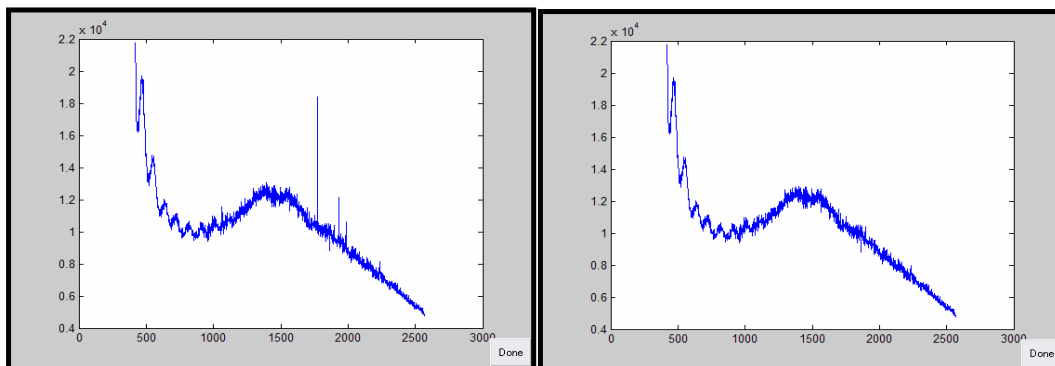


Figura 6. Espectro Raman do grupo Pele Normal antes e depois da remoção de *spikes*.

A autofluorescência ou autoluminescência é o principal artefato que influencia a maneira na qual os espectros Raman são apresentados. A autofluorescência é reflexo da excitação e da emissão de energia de alta intensidade por componentes absorvedores intrínsecos da amostra analisada. No caso da pele normal e, principalmente, do melanoma, o principal componente absorvedor é a melanina, que emite um sinal de fluorescência bastante intenso que quase inviabiliza a visualização das bandas Raman. A metodologia comumente utilizada para remoção da fluorescência é a Correção de Linha de Base.

A etapa de pré-processamento foi realizada por meio de uma rotina matemática especificamente desenvolvida em ambiente Matlab[®], gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Anita Mahadevan-Jansen (Vanderbilt University, USA). Urge salientar que nesta fase os dados foram DUPLICADOS, resultando em duas planilhas iguais, contendo, cada qual os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo. Cada planilha foi utilizada para um pré-processamento, e posterior análise estatística, individualmente. Todos os espectros em um único comando foram pré-processados em relação à remoção dos *spikes* e correlação de linha de base, por meio de um polinômio de 1^º grau (pré-processamento manual) (Figura 7) e 5^º grau (pré-processamento automático) (Figura 8). Finalizados esses procedimentos, todos os espectros foram agrupados em uma única planilha do Microsoft[®] Excel 2002 e exportados para o

software Minitab®15.1.0.0.I., onde o procedimento de Normalização Vetorial foi executado.

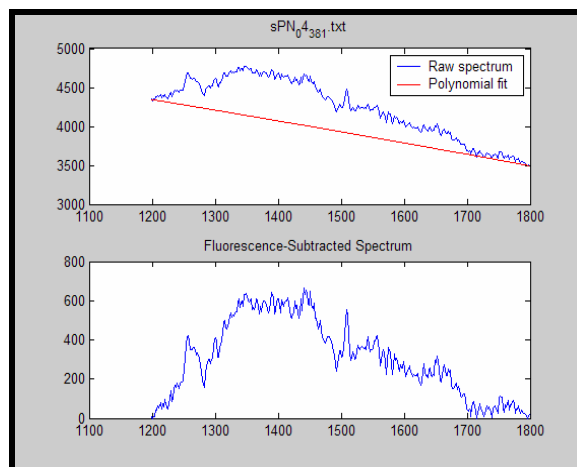


Figura 7. Correção de Linha de base do espectro do grupo Pele Normal: Polinômio grau 1 (reta). Rotina manual.

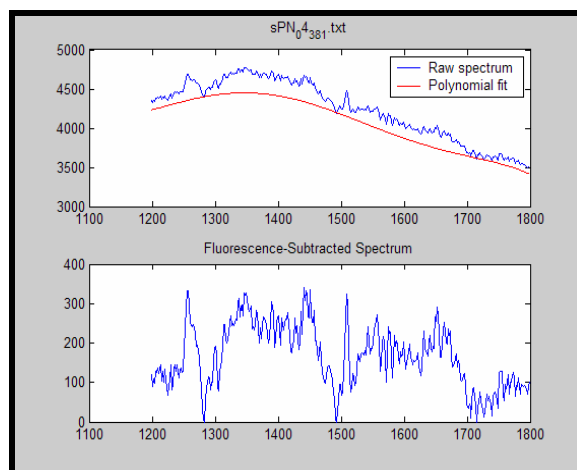


Figura 8. Correção de Linha de base do espectros do grupo Pele Normal: Polinômio grau 5. Software Matlab (rotina automática).

A diferença de intensidade entre os espectros Raman pode ser resultado de fatores experimentais, tais como mínimas variações do *laser* de excitação, que por consequência desalinha o caminho óptico do sistema Raman dispersivo, diminuindo a potência final do *laser* de excitação; dificuldade de padronização do foco do *laser* de excitação na amostra de tecidos intactos, devido à grande rugosidade deste sistema frente às ínfimas grandezas as quais se trabalha neste tipo de experimento. A ferramenta matemática utilizada para corrigir essas variações é a Normalização.

Para que os procedimentos acima descritos fossem executados, os espectros Raman obtidos foram armazenados e convertidos para o formato ASCII tornando-se compatíveis aos softwares Origin[®]7.0 SR0 (Microcal Software Inc, Northampton, MA, USA), Matlab[®] (Version 6.1.0.450 Release 12.1, The MathWorks, Inc.) e Minitab[®]15.1.0.0. I na realização das análises matemáticas.

4.4.2 Classificação dos grupos espectrais e atribuição celular

Neste estudo foram utilizados testes e técnicas estatísticas não-paramétricas, porque as condições (suposições) para a aplicação de técnicas e testes paramétricos, como a normalidade (teste de Anderson-Darling) e homocedasticidade (homogeneidade das variâncias, teste de Levene), não foram encontradas.

O grau de associação entre duas variáveis foi observado a partir da análise de correlação. O teste para o coeficiente de correlação foi empregado como no caso da média e variância, para testar o coeficiente de correlação entre as variáveis (espectros) de Pele Normal e Melanoma Cutâneo. O teste escolhido foi o teste de Correlação de Spearman, que se baseou na ordenação de duas variáveis sem qualquer restrição quanto à distribuição de valores. Essa ferramenta estatística é mais utilizada para dados não-paramétricos. Quando são feitas diversas correlações ao mesmo tempo (como realizado neste estudo, onde foram comparados todos os espectros um a um), os resultados são geralmente ordenados em uma única tabela, chamada de Matriz de Correlação. Essa técnica serviu para mensurar o quanto as variáveis estavam interligadas. O resultado positivo do teste de correlação (ou seja, a alta correlação entre os espectros Raman de pele normal e melanoma cutâneo) reuniu argumentos na utilização da ferramenta estatística Análise dos Componentes Principais (PCA) para redução das variáveis.

Como primeira análise, pretendeu-se encontrar os espectros característicos da pele normal e do melanoma cutâneo separadamente. Para esta etapa, a PCA seguida da Análise de Cluster (CLA), sub-rotinas do software Minitab[®]15.1.0.0. I, foram aplicadas ao conjunto de espectros. Na CLA, para determinar a distância entre dois agrupamentos, foi utilizado nas variáveis *Average Linkage Method* (Distância Euclidiana). O agrupamento final dos *clusters* identifica as características comuns das variáveis por similaridade (*Similarity Level*) de 95%. A decisão final sobre o

agrupamento, onde o gráfico Dendrograma é formado, definiu, por meio de linhas transversais, o final de cada agrupamento.

Por meio da observação dos Dendrogramas da pele normal e do melanoma, nesta etapa avaliados separadamente, foram identificados os espectros que compuseram cada um dos agrupamentos definidos. Estes agrupamentos foram comparados aos resultados histopatológicos onde foram identificadas as relações entre os espectros (forma e posicionamento no mapeamento) e as respectivas estruturas celulares. Encontradas as correlações, os espectros foram caracterizados por meio do gráfico de *Box Plot* (também conhecido por *box-and-whisker plots* ou diagramas de caixas) para que se pudesse observar o espectro Raman de cada *cluster*. Essa avaliação foi importante para o entendimento da futura classificação destes dados.

4.4.3 Classificação Diagnóstica

A classificação diagnóstica entre os espectros das diferentes estruturas/espectros encontrados de Pele Normal e Melanoma Cutâneo foi realizado por meio da observação da composição espectral dos *clusters* e dos gráficos de *Box Plot* de cada subgrupo encontrado, os espectros foram pareados (Pele Normal e Melanoma) em função da aparente similaridade, e foram, em seguida, submetidos à Análise Discriminante Linear (LDA), separadamente para os espectros submetidos a pré-processamento manual (subtração de linha de base pelo polinômio de 1º grau - uma reta) e para espectros submetidos a pré-processamento automático (subtração de linha de base por uma polinômio de 5º grau).

Para o pré-processamento manual, os dados foram pareados por similaridade entre os espectros e características histológicas. Sendo assim, foram analisados três pareamentos, neste estudo chamados de “Opções”, da seguinte forma: (a) **Opção 1**: Cluster 1 do MC *versus* Cluster 2 do PN, ou seja, Melanoma acral lentiginoso, com muita queratina pigmentada (MC) *versus* melanócitos pigmentados; (b) **Opção 2**: Cluster 2 do MC *versus* Clusters 4 e 1 do PN, ou seja, Melanoma com alta pigmentação *versus* epiderme e tecido conjuntivo da Pele Normal; (c) **Opção 3**: Clusters 3 e 4 do MC *versus* Cluster 3 do PN, ou seja, melanoma amelanótico com queratinócitos normais.

Para o pré-processamento automático, os dados foram analisados através de quatro pareamentos (“Opções”), da seguinte forma: (a) **Opção 1**: Cluster 1 do MC

versus Cluster 3 do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e pigmentação por hemossiderina (MC) *versus* queratinócitos normais (PN); (b) **Opção 2:** *Cluster 2* do MC *versus Cluster 2* do PN, ou seja, melanoma acral lentiginoso (alta concentração de queratina) (MC) *versus* melanócitos normais (PN); (c) **Opção 3:** *Cluster 3* do MC *versus Cluster 1* do PN, ou seja, melanoma com tecido adiposo e necrótico (MC) *versus* epiderme da pele normal (PN); (c) **Opção 4:** *Cluster 4* do MC *versus Cluster 4* do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e fibras colágenas abundantes (MC) *versus* colágeno normal derme (PN).

5. RESULTADOS

Neste capítulo estão compreendidos os resultados das análises histológicas: de pele normal e de melanoma cutâneo, realizadas por meio da observação das fotomicrografias das amostras congeladas e das lâminas coradas por HE e dos espectros Micro-Raman gráficos e tabelas provenientes de todas as etapas de análise e classificação. A apresentação dos resultados foi dividida em: (a) espectros micro-Raman e atribuição dos modos vibracionais; (b) classificação dos grupos espectrais e atribuição celular; e (c) diagnóstico diferencial entre pele normal e melanoma cutâneo.

5.1 Espectros Micro-Raman e atribuição dos modos vibracionais

Para este estudo, o nível de significância (ou erro estatístico) admitido foi de 5 %, valor que indica o quanto foi admitido errar nas conclusões estatísticas. Desta forma, se mostra apropriado lembrar que todos os intervalos de confiança do trabalho foram construídos com 95 % de confiança estatística.

Foram utilizados testes e técnicas estatísticas não-paramétricas, pois como já mencionado previamente, as condições (suposições) para a utilização de técnicas e testes paramétricos, como a normalidade (teste de Anderson-Darling) e homocedasticidade ou homogeneidade das variâncias (teste de Levene), não foram encontradas (principalmente a normalidade) no conjunto de dados. Os resultados do teste de Normalidade podem ser observados nos Anexos 3, 4, 5 e 6 para o grupo Pele Normal pré-processado manualmente, para o grupo Melanoma pré-processado manualmente, para o grupo Pele Normal pré-processado automaticamente e para o grupo Melanoma pré-processado automaticamente, respectivamente.

Como resultado do Teste para o Coeficiente de Correlação de Spearman, foram verificados que todos os espectros foram bem correlacionados. As tabelas de correlação relacionaram cada espectro a todos os outros gerando uma tabela de grandes dimensões (28224 dados para cada pré-processamento do grupo Pele Normal e 22500 dados para cada pré-processamento do grupo Melanoma Cutâneo), sendo que por essa razão, propositalmente, não foram incluídas na tese.

Estabelecido que há boa correlação entre os espectros do grupo Pele Normal e Melanoma Cutâneo, para a primeira observação dos espectros adquiridos foram desenhados gráficos de *Box Plot* para o grupo Pele Normal e para o grupo

Melanoma Cutâneo, pré-processados manualmente e automaticamente, que podem ser observadas, respectivamente, nas Figuras 9 e 10.

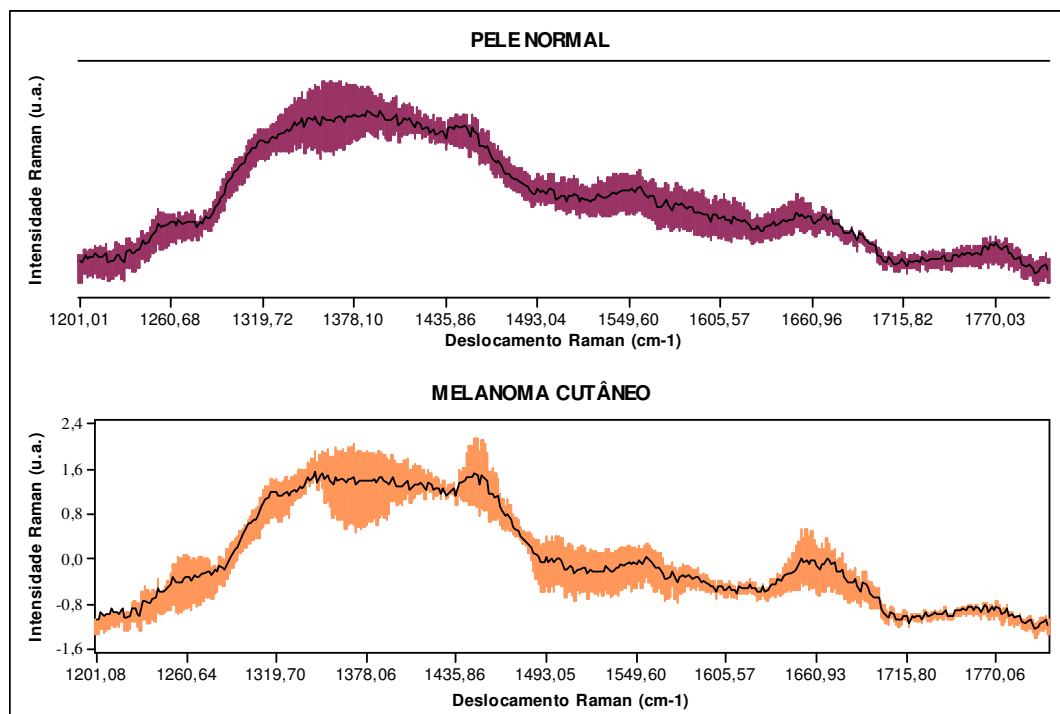


Figura 9. (a) Gráfico *Box Plot* com a distribuição dos 168 espectros adquiridos na epiderme da Pele Normal pré-processada manualmente. A linha preta representa a mediana e a sombra em lilás representa os dados entre o primeiro e o terceiro quartis. (b) Gráfico *Box Plot* com a distribuição dos 150 espectros adquiridos do Melanoma Cutâneo pré-processados manualmente. A linha preta representa a mediana e a sombra em salmão representa os dados entre o primeiro e o terceiro quartis.

Na Figura 9 observam-se os gráficos *Box Plot*, no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} para: (a) distribuição dos 168 espectros adquiridos na epiderme da Pele Normal e (b) distribuição dos 150 espectros adquiridos na epiderme da parte nodular do Melanoma Cutâneo pré-processados manualmente. As linhas pretas representam a mediana e as sombras coloridas (lilás e salmão) representam inferiormente à mediana 25 % dos espectros e superiormente à mediana 75 % dos espectros.

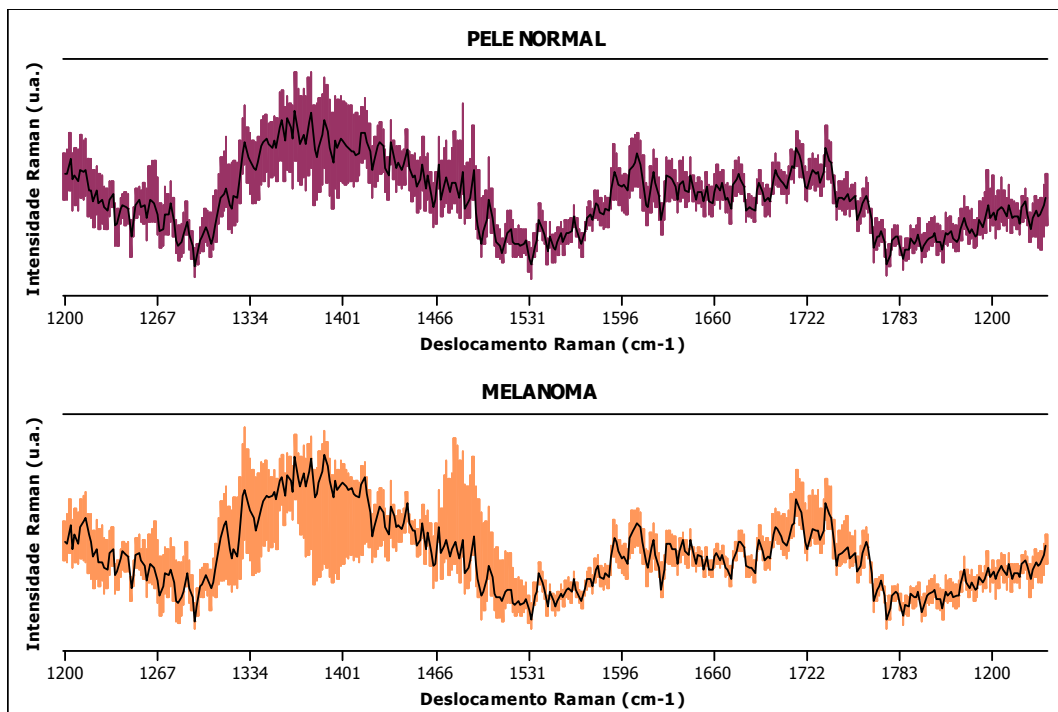


Figura 10. (a) Gráfico *Box Plot* com a distribuição dos 168 espectros adquiridos na epiderme da Pele Normal. A linha preta representa a mediana e a sombra em salmão representa 75% (terceiro quartil) dos espectros mais correlacionados. (b) Gráfico *Box Plot* com a distribuição dos 150 espectros adquiridos da parte nodular do Melanoma Cutâneo. A linha preta representa a mediana e a sombra em azul representa 75% (terceiro quartil) dos espectros mais correlacionados.

Na Figura 10 observam-se os gráficos *Box Plot*, no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} para: (a) distribuição dos 168 espectros adquiridos na epiderme da Pele Normal e (b) distribuição dos 150 espectros adquiridos na epiderme da parte nodular do Melanoma Cutâneo pré-processados automaticamente. As linhas pretas representam a mediana e as sombras coloridas (lilás e salmão) representam inferiormente à mediana 25% dos espectros e superiormente à mediana 75% dos espectros.

As variações espectrais encontradas nas Figuras 9 e 10 puderam ser inferidas para as seguintes bandas (ou modos vibracionais): a região entre 1290 e 1490 cm^{-1} , onde ainda se destacou o pico em 1440 cm^{-1} e as bandas centradas em 1260 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1770 cm^{-1} . Esses modos vibracionais podem ser atribuídos ao conteúdo bioquímico presente na epiderme e derme, sendo, principalmente colágeno, elastina, queratina e lipídios. As regiões espectrais entre 1200 a 1300 cm^{-1} (Triptofano, Fenilalanina e Amida III em proteínas) e 1440 cm^{-1} (vibração CH_2 em proteínas e lipídios) apresentaram diferenças de intensidade em relação aos

estratos da pele. Estas diferenças se mostraram mais marcantes entre a Pele Normal e o Melanoma Cutâneo. Para o Melanoma cutâneo, na região de 1260 cm^{-1} , a mediana não se mostrou muito evidente, entretanto, houve muita variação entre os espectros, identificando que essa região, que bioquimicamente infere a presença de Triptofano, Fenilalanina e Amida III em proteínas, está alterada em algumas estruturas encontradas nos tecidos de melanoma deste estudo: tecido inflamatório, colágeno e queratina. A banda em 1440 cm^{-1} , referente à vibração CH_2 em proteínas e lipídios, apresentou diferenças de intensidade marcantes, possivelmente em relação aos diferentes tipos celulares descritos para o Melanoma Cutâneo (Nodular), como por exemplo tecido inflamatório, colágeno, queratina, tecido adiposo e tecido necrótico. O pico em 1650 cm^{-1} referente à proteínas (Amida I) e lipídios, assim como o pico em 1550 cm^{-1} (Triptofano) se apresentaram menos intensos no tecido de Pele Normal em relação ao Melanoma Cutâneo. Essas diferenças são evidentes variações espectrais em função da profundidade (dos estratos da pele) e do estado patológico (Melanoma).

É importante ressaltar que a região entre 1290 e 1490 cm^{-1} (com centro em 1380 cm^{-1}) e a banda em 1550 cm^{-1} identificam a presença de melanina. Essas características espectrais refletem as bandas D, D', G, G' encontradas no espectro da melanina isolada, centradas em 1347 , 1407 , 1554 e 1608 cm^{-1} , respectivamente. Esses modos vibracionais podem ser atribuídos ao estiramento do anel aromático da ligação $\text{C}=\text{C}$. Mudanças na frequência e largura destas bandas (D e G) podem ocorrer devido ao ambiente biológico quando a melanina é observada nos tecidos, tanto *in vitro* (em tecidos) quanto *in vivo*. Mostra-se interessante mostrar neste momento um espectro característico da melanina isolada coletada *in vitro*, para facilitar a compreensão da grande diferença inferida aos espectros seguintes pela aplicação do método de pré-processamento automático (subtração de um polinômio de 5º Grau).

5.2 Classificação dos grupos espectrais e atribuição celular

Por meio da técnica de algoritmo Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise de Cluster (CLA) foi possível qualificar as variações dos diferentes estados fisiopatológicos pelas estruturas presentes nos estratos da Pele Normal e dos tipos celulares do Melanoma Nodular.

Nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 podem ser observados os resultados dos Valores Próprios (Eigenvalues ou Autovalores) das maiores componentes criadas pela aplicação da PCA nos espectros dos grupos Pele Normal e Melanoma Cutâneo, tanto para o pré-processamento manual quanto para o pré-processamento automático. Cada componente (PC) mostrou inclusive o percentual de variabilidade de explicação da variabilidade total. Como poderá ser observado nas tabelas seguintes, em destaque estão as Componentes Principais com Valores Próprios superiores a quatro. Estas PC's foram selecionadas porque têm alto grau de explicabilidade.

Tabela 1. Valor próprio dos componentes de Pele Normal (Linha de base manual – Polinômio 1º Grau)

Pele Normal	Valor Próprio	Variabilidade	Acumulada
PC 1	131,31	78,2%	
PC 2	15,16	9,0%	87,2%
PC 3	7,97	4,7%	91,9%
PC 4	6,15	3,7%	95,6%
PC 5	2,01	1,2%	96,8%

Tabela 2. Valor próprio dos componentes de Pele Normal (Linha de base automática – Polinômio 5º Grau)

Pele Normal	Valor Próprio	Variabilidade	Acumulada
PC 1	77,79	46,3%	
PC 2	21,40	12,7%	59,0%
PC 3	16,40	9,8%	68,8%
PC 4	9,50	5,7%	74,5%
PC 5	3,67	2,2%	76,7%

Para o Grupo Pele Normal, pode ser observado que tanto para o pré-processamento manual quanto automático, foram escolhidas para compor a Análise de Cluster (CLA), as quatro primeiras componentes principais. Para o pré-processamento manual, até a quarta componente foram descritos 95,6 % da variabilidade acumulada, e para o pré-processamento automático, 74,5 %. O maior acúmulo de variabilidade até o PC4 no pré-processamento manual reflete que um menor número de componentes pode descrever todo o conjunto de dados porque não extraiu de forma eficiente os artefatos (diga-se, fluorescência) dos espectros. De forma análoga, pode também ser dito que o grupo pele normal pré-processado automático expressou mais ruídos.

Tabela 3. Valor próprio dos componentes de Melanoma (Linha de base manual – Polinômio 1º Grau)

Melanoma	Valor Próprio	Variabilidade	Acumulada
PC 1	115,60	77,1%	
PC 2	19,34	12,9%	90,0%
PC 3	8,78	5,9%	95,9%
PC 4	2,26	1,5%	97,4%
PC 5	0,08	0,5%	97,9%

Tabela 4. Valor próprio dos componentes de Melanoma (Linha de base automática – Polinômio 5º Grau)

Melanoma	Valor Próprio	Variabilidade	Acumulada
PC 1	72,98	48,7%	
PC 2	30,41	20,3%	69,0%
PC 3	16,48	11,0%	80,0%
PC 4	4,66	3,1%	83,1%
PC 5	1,84	1,2%	84,3%

Para o grupo Melanoma pré-processado manualmente, os PC1, PC2 e PC3 ofereceram uma explicabilidade de 95,9 % da variabilidade original dos espectros. Para o grupo Melanoma Cutâneo pré-processado automaticamente, os PC1, PC2, PC3 e PC4 explicaram 83,1 % da variabilidade original. Para ambos os grupos o índice de explicabilidade foi extremamente elevado, entretanto, para o grupo Melanoma pré-processado automaticamente, foi necessário para o índice de explicabilidade próximo ao primeiro pré-processamento a inclusão do PC4, também devido ao ruído. Aqui pode ser dito que o pré-processamento manual não extraiu de forma eficiente a fluorescência dos espectros de melanoma cutâneo.

Os resultados dos coeficientes das componentes principais selecionadas de cada um dos espectros coletados podem ser observadas nas Tabelas A, B, C e D, respectivamente referentes à Pele Normal (A e B), Melanoma Cutâneo (C e D), A e C para pré-processamento manual e B e D para pré-processamento automático (Anexos 7, 8, 9 e 10).

Encontradas as componentes principais que melhor descrevem o conjunto de espectros para as quatro observações, os valores dos PC's (Anexos 7, 8, 9 e 10) foram

utilizados na Análise de *Cluster* (CLA), para identificação e agrupamento dos espectros que compuseram cada uma das quatro observações (vide descrição de *Box Plot*).

As Tabelas 5 e 6 exibem o resultado da CLA em relação ao posicionamento dos espectros em relação ao *cluster*. Para todas as quatro situações sugeridas neste estudo (grupos Pele Normal e Melanoma e respectivos pré-processamentos) a distribuição dos espectros foi equilibrada e satisfatória. Por coincidência, para os grupos Pele Normal e Melanoma, sob as duas formas de pré-processamento, os espectros se ajustaram em quatro subgrupos, embora 8,92 % dos espectros de Pele Normal e 1,33 % dos espectros de Melanoma Cutâneo não se posicionaram de maneira similar nos diferentes pré-processamentos. Essa observação pode ser verificada nas Tabelas 5, 6, 7 e 8 onde 5 e 6 apresentam os resultados da Análise de Cluster para Pele Normal e Melanoma Cutâneo, respectivamente. As Tabelas 7 e 8 apresentam um resumo dos resultados, incluindo resultado importante: a descrição das características histológicas estabelecidas para cada um dos *subclusters*, bem como a possível explicação para as alterações de alocações para alguns dos espectros.

Tabela 5. Resultado da Análise de Cluster (Agrupamento) dos 168 espectros de Pele Normal, tanto submetidos pelo pré-processamento manual (polinômio 1º grau) quanto automático (polinômio 5º grau).

Espectros	Manual	Automático
PN 01 1 1	1	1
PN 01 1 2	1	1
PN 01 1 3	1	1
PN 01 1 4	2	2
PN 01 1 5	2	2
PN 01 1 6	2	2
PN 01 1 7	2	2
PN 01 1 8	2	2
PN 01 2 1	3	2
PN 01 2 2	1	1
PN 01 2 3	1	1
PN 01 2 4	2	2
PN 01 2 5	2	2
PN 01 2 6	2	2
PN 01 2 7	2	2
PN 01 2 8	2	2
PN 01 3 1	4	2
PN 01 3 2	3	2
PN 01 3 3	1	1
PN 01 3 4	1	1
PN 01 3 5	1	1
PN 01 3 6	1	1
PN 01 3 7	2	2
PN 01 3 8	2	2
PN 02 1 1	3	3
PN 02 1 2	4	4
PN 02 1 3	4	4
PN 02 1 4	4	4
PN 02 1 5	4	4
PN 02 1 6	4	4
PN 02 1 7	4	4
PN 02 1 8	4	4
PN 02 2 1	3	3
PN 02 2 2	4	4
PN 02 2 3	4	4
PN 02 2 4	4	4
PN 02 2 5	4	4
PN 02 2 6	4	4
PN 02 2 7	4	4
PN 02 2 8	4	4
PN 02 3 1	4	4
PN 02 3 2	4	4
PN 02 3 3	4	1
PN 02 3 4	4	4
PN 02 3 5	4	4
PN 02 3 6	4	4
PN 02 3 7	4	4
PN 02 3 8	4	4
PN 03 1 1	1	3
PN 03 1 2	1	4
PN 03 1 3	1	3
PN 03 1 4	1	3
PN 03 1 5	1	1
PN 03 1 6	1	3
PN 03 1 7	1	1
PN 03 1 8	1	3
PN 03 2 1	3	3
PN 03 2 2	1	3
PN 03 2 3	3	3
PN 03 2 4	1	1
PN 03 2 5	3	3
PN 03 2 6	3	3
PN 03 2 7	3	3
PN 03 2 8	3	3
PN 03 3 1	3	3
PN 03 3 2	3	3
PN 03 3 3	3	3
PN 03 3 4	3	3
PN 03 3 5	3	3
PN 03 3 6	3	3
PN 03 3 7	3	3
PN 03 3 8	3	3
PN 04 1 1	1	1
PN 04 1 2	1	1
PN 04 1 3	1	1
PN 04 1 4	1	1
PN 04 1 5	1	1
PN 04 1 6	1	1
PN 04 1 7	1	1
PN 04 1 8	1	1
PN 04 2 1	4	2
PN 04 2 2	4	4
PN 04 2 3	1	1
PN 04 2 4	4	4
PN 04 2 5	1	1
PN 04 2 6	1	1
PN 04 2 7	1	1
PN 04 2 8	1	1
PN 04 3 1	4	4
PN 04 3 2	4	2
PN 04 3 3	4	2
PN 04 3 4	4	4
PN 04 3 5	4	4
PN 04 3 6	4	4
PN 04 3 7	4	4
PN 04 3 8	4	4
PN 05 1 1	a1	1
PN 05 1 2	1	1
PN 05 1 3	1	3
PN 05 1 4	3	3
PN 05 1 5	1	2
PN 05 1 6	3	3
PN 05 1 7	1	1
PN 05 1 8	3	3
PN 05 2 1	3	3
PN 05 2 2	3	3
PN 05 2 3	4	2
PN 05 2 4	1	1
PN 05 2 5	3	3
PN 05 2 6	3	2
PN 05 2 7	1	1
PN 05 2 8	1	1
PN 05 3 1	3	2
PN 05 3 2	3	2
PN 05 3 3	3	3
PN 05 3 4	4	2
PN 05 3 5	1	1
PN 05 3 6	1	1
PN 05 3 7	3	3
PN 05 3 8	3	3
PN 06 1 1	4	4
PN 06 1 2	4	4
PN 06 1 3	4	4
PN 06 1 4	4	4
PN 06 1 5	4	4
PN 06 1 6	4	4
PN 06 1 7	4	4
PN 06 1 8	4	4
PN 06 2 1	4	4
PN 06 2 2	4	4
PN 06 2 3	4	4
PN 06 2 4	4	4
PN 06 2 5	4	4
PN 06 2 6	4	4
PN 06 2 7	4	4
PN 06 2 8	4	4
PN 06 3 1	4	4
PN 06 3 2	4	4
PN 06 3 3	4	4
PN 06 3 4	4	4
PN 06 3 5	4	4
PN 06 3 6	4	4
PN 06 3 7	4	4
PN 06 3 8	4	4
PN 07 1 1	1	1
PN 07 1 2	4	4
PN 07 1 3	4	3
PN 07 1 4	4	4
PN 07 1 5	4	4
PN 07 1 6	4	4
PN 07 1 7	4	4
PN 07 1 8	4	4
PN 07 2 1	4	4
PN 07 2 2	4	4
PN 07 2 3	4	4
PN 07 2 4	4	4
PN 07 2 5	4	4
PN 07 2 6	4	4
PN 07 2 7	4	4
PN 07 2 8	4	4
PN 07 3 1	4	4
PN 07 3 2	4	4
PN 07 3 3	4	4
PN 07 3 4	4	4
PN 07 3 5	4	4
PN 07 3 6	4	4
PN 07 3 7	4	4
PN 07 3 8	4	4

Tabela 6. Resultado da Análise de Cluster (Agrupamento) dos 150 espectros de Melanoma Cutâneo, tanto submetidos pelo pré-processamento manual (polinômio 1º grau) quanto automático (polinômio 5º grau).

Espectros	Reta	Polino						
MC 57 1 1	2	1	MC 70 1 3	3	4	MC 75 2 2	2	4
MC 57 1 2	2	1	MC 70 1 4	4	4	MC 75 2 3	2	4
MC 57 1 3	2	1	MC 70 1 5	4	4	MC 75 2 4	2	4
MC 57 1 4	2	1	MC 70 2 1	3	4	MC 75 2 5	2	4
MC 57 1 5	2	1	MC 70 2 2	3	4	MC 75 3 1	2	4
MC 57 2 1	2	1	MC 70 2 3	3	4	MC 75 3 2	2	4
MC 57 2 2	2	1	MC 70 2 4	3	4	MC 75 3 3	2	4
MC 57 2 3	2	1	MC 70 2 5	3	4	MC 75 3 4	2	4
MC 57 2 4	2	1	MC 70 3 1	3	4	MC 75 3 5	2	3
MC 57 2 5	2	1	MC 70 3 2	4	4	MC 75 4 1	2	4
MC 57 3 1	2	1	MC 70 3 3	4	4	MC 75 4 2	2	4
MC 57 3 2	2	1	MC 70 3 4	3	4	MC 75 4 3	2	4
MC 57 3 3	2	1	MC 70 3 5	3	4	MC 75 4 4	2	4
MC 57 3 4	2	1	MC 70 4 1	2	3	MC 75 4 5	2	3
MC 57 3 5	2	1	MC 70 4 2	4	4	MC 75 5 1	2	4
MC 57 4 1	2	1	MC 70 4 3	3	4	MC 75 5 2	2	4
MC 57 4 2	2	1	MC 70 4 4	3	4	MC 75 5 3	2	4
MC 57 4 3	2	1	MC 70 4 5	3	4	MC 75 5 4	2	4
MC 57 4 4	2	1	MC 70 5 1	2	3	MC 75 5 5	2	3
MC 57 4 5	2	1	MC 70 5 2	4	4	MC 81 1 1	2	3
MC 57 5 1	2	1	MC 70 5 3	1	4	MC 81 1 2	2	3
MC 57 5 2	2	1	MC 70 5 4	3	4	MC 81 1 3	2	3
MC 57 5 3	2	1	MC 70 5 5	3	4	MC 81 1 4	2	3
MC 57 5 4	2	1	MC 74 1 1	2	4	MC 81 1 5	2	3
MC 57 5 5	2	1	MC 74 1 2	2	4	MC 81 2 1	2	3
MC 58 1 1	1	2	MC 74 1 3	2	4	MC 81 2 2	2	3
MC 58 1 2	1	2	MC 74 1 4	2	4	MC 81 2 3	2	3
MC 58 1 3	1	2	MC 74 1 5	2	4	MC 81 2 4	2	3
MC 58 1 4	1	2	MC 74 2 1	2	4	MC 81 2 5	2	3
MC 58 1 5	1	2	MC 74 2 2	2	4	MC 81 3 1	2	3
MC 58 2 1	2	3	MC 74 2 3	2	4	MC 81 3 2	2	3
MC 58 2 2	1	2	MC 74 2 5	2	4	MC 81 3 3	2	3
MC 58 2 3	1	2	MC 74 3 1	2	4	MC 81 3 4	2	3
MC 58 2 4	1	2	MC 74 3 2	2	4	MC 81 3 5	2	3
MC 58 2 5	1	2	MC 74 3 3	2	4	MC 81 4 1	2	3
MC 58 3 1	1	2	MC 74 3 4	2	4	MC 81 4 2	2	3
MC 58 3 2	3	2	MC 74 3 5	2	4	MC 81 4 3	2	3
MC 58 3 3	1	2	MC 74 4 1	2	4	MC 81 4 4	2	3
MC 58 3 4	1	2	MC 74 4 2	2	4	MC 81 4 5	2	3
MC 58 3 5	1	2	MC 74 4 3	2	4	MC 81 5 1	2	3
MC 58 4 1	1	2	MC 74 4 4	2	4	MC 81 5 2	2	3
MC 58 4 2	1	2	MC 74 4 5	2	4	MC 81 5 3	2	3
MC 58 4 3	1	2	MC 74 5 1	2	4	MC 81 5 4	2	3
MC 58 4 4	1	2	MC 74 5 2	2	4	MC 81 5 5	2	3
MC 58 4 5	1	2	MC 74 5 3	2	4			
MC 58 5 1	1	2	MC 74 5 4	2	4			
MC 58 5 2	1	2	MC 74 5 5	2	4			
MC 58 5 3	1	2	MC 75 1 1	2	4			
MC 58 5 4	1	2	MC 75 1 2	2	4			
MC 58 5 5	1	2	MC 75 1 3	2	4			
MC 70 1 1	3	4	MC 75 1 4	2	4			
MC 70 1 2	3	4	MC 75 1 5	2	4			
			MC 75 2 1	2	4			

Tabela 7. Avaliação dos espectros de Pele Normal em função da disposição dos espectros por cluster em relação à distribuição em profundidade das estruturas celulares da derme e epiderme.

	MANUAL			AUTOMATICO			
Profundidade	0-10 μm	10-20 μm	20-30 μm	Profundidade	0-10 μm	10-20 μm	20-30 μm
Cluster 1	25 (58%)	12 (27%)	6 (13%)	Cluster 1	17 (49%)	11 (31%)	7 (20%)
Cluster 2	5 (42%)	5 (42%)	2 (16%)	Cluster 2	6 (25%)	9 (37,5%)	9 (37,5%)
Cluster 3	4 (13%)	12 (40%)	14 (47%)	Cluster 3	11 (33,3%)	11 (33,3%)	11 (33,3%)
Cluster 4	22 (26%)	27 (33%)	34 (41%)	Cluster 4	22 (29%)	25 (32%)	29 (39%)

Na Tabela 7 estão organizados os resultados obtidos pela CLA do grupo Pele Normal, para os dois tipos de pré-processamento. Esta tabela resume a Tabela 5 e ainda inclui a descrição da localização (profundidade da epiderme e derme) onde foram coletados os espectros. Esta descrição foi possível pois o mapeamento espectral realizado teve o cuidado de nomear os espectros em função de seu posicionamento (mimetizando o jogo “batalha naval”).

Baseando-se na descrição teórica e das lâminas histológicas deste estudo, os espectros concentrados na região entre a superfície (0 μm) e 10 μm são referentes às estruturas da epiderme; entre 10 μm e 20 μm , os espectros de epiderme (camada basal) e derme papilar; e entre 20 μm e 30 μm , os espectros referentes à derme papilar.

Neste trabalho, foram analisados sete pequenos fragmentos de pele normal, sem os derivados ou anexos da pele (glândulas sudoríparas, pêlos, glândulas sebáceas e unhas) oriundos de diversas partes do corpo, sem distinção do tipo de pele pela classificação de Fitzpatrick; e seis fragmentos de biópsia de melanoma cutâneo espesso, de diversos tipos histológicos. As fotomicrografias com coloração HE foram adquiridas com auxílio de um patologista experiente na análise de melanoma cutâneo, no Departamento de Patologia (Escola Paulista de Medicina) da Universidade Federal de São Paulo.

Dentre as sete amostras analisadas, três delas apresentaram características histológicas que fugiram da normalidade esperada para a Pele Normal. A amostra PN_03 apresentou elastose solar, o que influenciou os aspectos referentes ao colágeno presente na derme, pois como amplamente discutido na literatura, as alterações referentes à estrutura do colágeno são expressas nos espectros Raman e factíveis de classificação. Do mesmo modo, a amostra PN_04

também apresentou alterações na pele em função da exposição solar: a camada córnea da epiderme apresentou hiperqueratose com presença atípicas de células nucleadas, embora não tenha apresentado elastose solar. A amostras PN_06 apresentou edema intracitoplásmico, artefato gerado durante o procedimento de congelação-descongelação para armazenamento. Todos os espectros desta amostra foram alocados no *Cluster 4* (manual e automático), mostrando que não houve diferença espectrais entre os estratos devido ao edema.

Por essa razão, com o intuito de expressar adequadamente a relação entre os *clusters* e os respectivos estratos os quais estavam caracterizando, optou-se por expressar os resultados em percentagem (%) ao invés do número absoluto de espectros alocados em cada *cluster*. Foi estabelecida a relação entre o número de espectros de cada estrato (0-10, 10-20 e 20-30 μm) em função do número total de espectro em cada *cluster*.

Desta forma, como pode ser observado na Figura 11, o *Cluster 1*, tanto sob o pré-processamento manual quanto automático, expressaram a maioria dos espectros da epiderme, referindo-se principalmente à queratina, embora também tenha havido influência de pigmentação melânica (melanócitos e queratinócitos). Na fotomicrografia está representado um fragmento de pele normal, apresentando as estruturas normalmente presentes: epiderme, seguida das dermes papilar, reticular (contendo a glândula sebácea e o folículo piloso) e reticular profunda, melanócitos e queratinócitos. A camada córnea, destacada pelas setas, em uma das amostras apresentou hiperqueratose (aumento da camada de queratina com presença de núcleos celulares – paraqueratose).

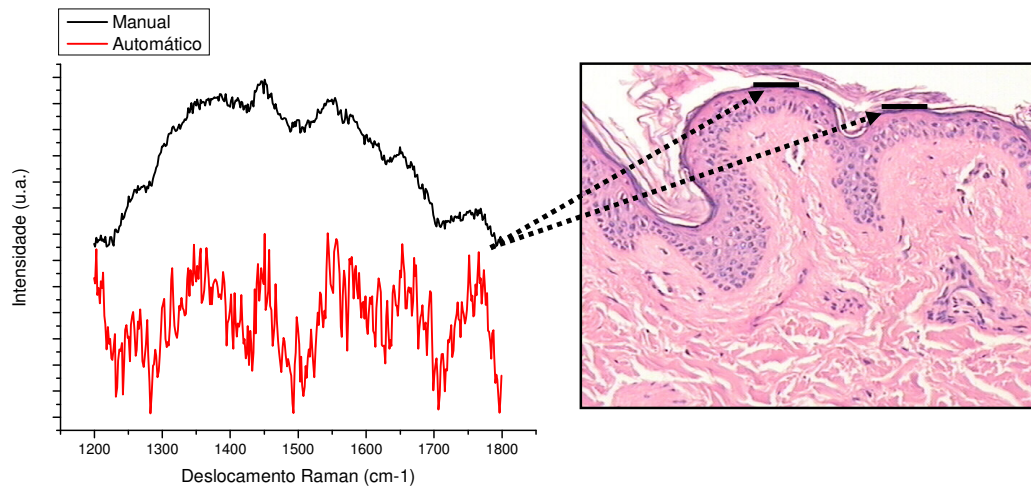


Figura 11. Média dos espectros de Pele Normal do *Cluster 1* no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 100 vezes; camada córnea da epiderme apresentando queratina, evidenciada pela seta.

Na Figura 12, o *Cluster 2* (manual) apresentou 84 % dos seus espectros entre 0-20 μm de profundidade, igualmente distribuídos; quando pré-processados automaticamente, com artefactos minimizados, a distribuição destes espectros (com proporção de 75 %) foram distribuídas nas duas camadas mais profundas (10-30 μm). Pode, desta maneira, ser sugerido que este espectros sejam representantes dos melanócitos, pois quando sob influência da melanina (manual) se confundiam os queratinócitos com melanossomas, e sem a influência da pigmentação (automático) foram alocadas adequadamente nos estratos mais profundos da epiderme (camada basal) em contato com a derme papilar. Na fotomicrografia, observa-se a epiderme e a derme papilar, destacando a distribuição proporcional (1:10) entre melanócitos e queratinócitos. Sugere-se sugerido que em destaque a observação de um melanócito normal. Este melanócito se encontra na camada córnea preservada, apresentando um halo claro, que o diferencia das demais células pigmentadas vizinhas, os queratinócitos.

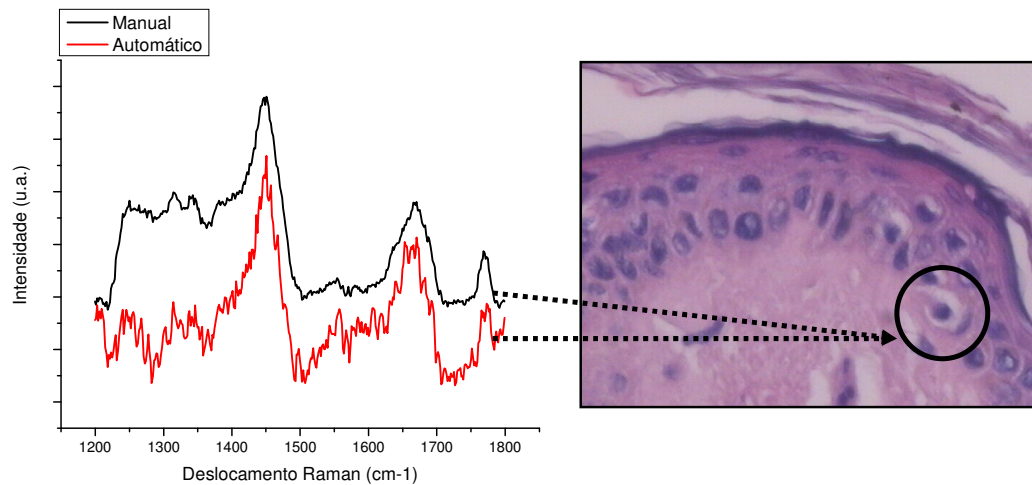


Figura 12. Média dos espectros de Pele Normal do *Cluster 2* no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 400 vezes; camada basal da epiderme apresentando, em destaque, um melanócito (halo claro).

De maneira análoga à explicação do *Cluster 2*, o reposicionamento dos espectros no *Cluster 3* (Figura 13) em função aos dois tipos de pré-processamento foi influenciado pela presença (manual) e ausência (automático) da influência da melanina. No *Cluster 3* (manual), 87 % dos espectros se concentraram nas camadas mais profundas; no *Cluster* (automático), os espectros se posicionaram igualmente nas três camadas determinadas. Esse comportamento sugere que estes espectros sejam referentes aos queratinócitos (que compõem 90 % das células da epiderme) que se distribuem uniformemente por essa camada. Deve-se sempre recordar que a localização dos espectros em função dos estrato não pôde ser realizada com exata precisão, pois existem inúmeras diferenças interpacientes, principalmente em relação à espessura da derme, que influenciaram estes resultados. Na Figura 13 pode ser observada a região da camada basal, uma pigmentação marrom, sugerindo melanina distribuída em sua maioria dos queratinócitos. As estruturas pigmentadas são os queratinócitos alojados em toda a extensão da epiderme.

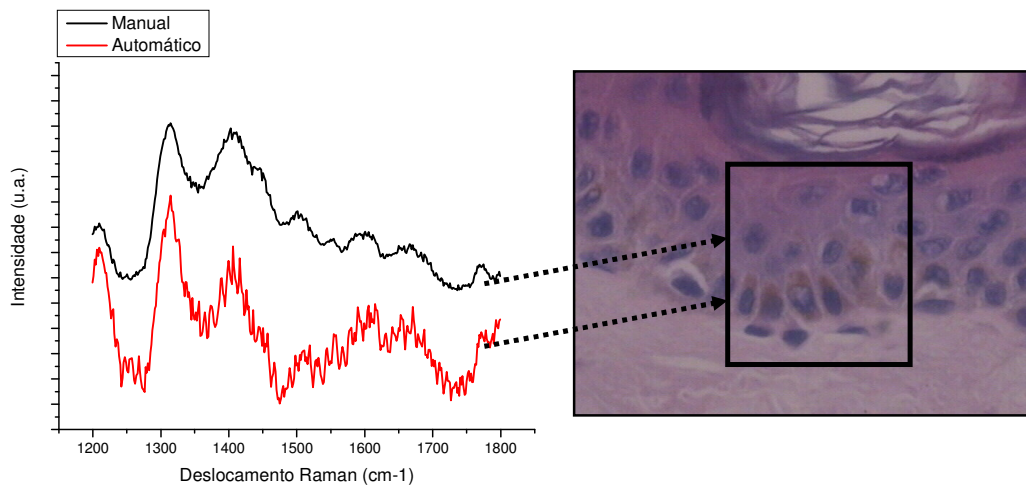


Figura 13. Média dos espectros de Pele Normal do *Cluster 3* no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 400 vezes; camada basal da epiderme apresentando, em destaque, queratinócitos com tonofilamentos, obedecendo a proporção de 10 queratinócitos para 1 melanócito.

No *Cluster 4* (Figura 14) foram alocados a maioria dos espectros do grupo Pele Normal obtidos neste experimento. Como mencionado anteriormente, as alterações provenientes dos artefatos de técnica descaracterizaram espectralmente as células de algumas amostras que acabaram por participar deste grupo; nesta amostra houve comprometimento exagerado das características estruturais da pele devido aos procedimentos de congelação e descongelação, notado pelo aspecto vacuolizado de algumas células (edema intracitoplasmático) gerado pela hidrofília das células. Apesar deste inconveniente, ainda foi possível estabelecer que o *Cluster 4* caracterizou a camada de 20 a 30 μm sob as duas rotinas de pré-processamento, podendo se considerar que este cluster agrupou aspectos referentes à estruturas do tecido conjuntivo, como por exemplo, o colágeno. Em uma das amostras, foi observada a degradação basofílica do colágeno, ou elastose solar (coloração mais azulada e desorganização das fibras colágenas da derme papilar).

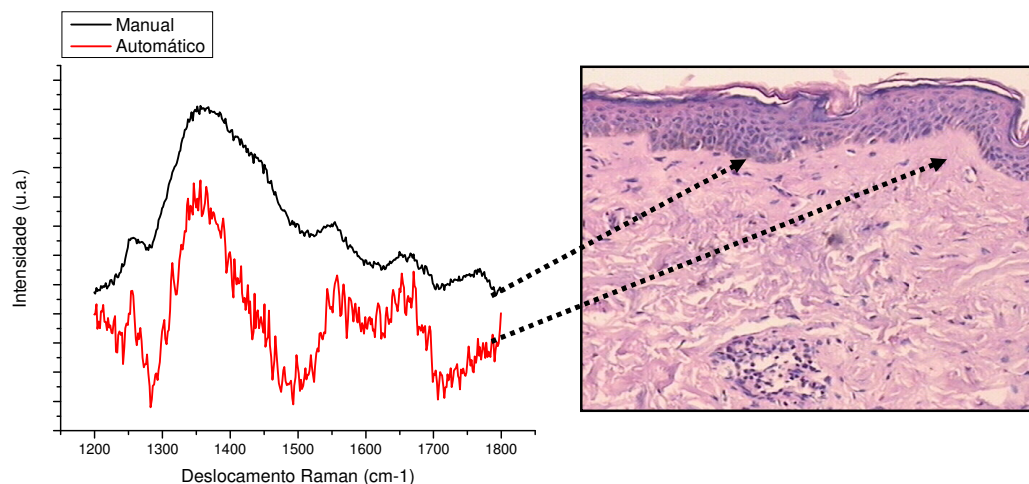


Figura 14. Média dos espectros de Pele Normal do *Cluster 4* no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 100 vezes; derme papilar em destaque.

Na Tabela 8 estão organizados os resultados obtidos pela PCA+CLA aplicados ao Melanoma Cutâneo, para os dois tipos de pré-processamento. Esta tabela resume a Tabela 6 e ainda inclui a descrição histopatológica em função dos agrupamentos obtidos. Diferentemente da Pele Normal, os espectros do Melanoma Cutâneo foram distribuídos de acordo com o tipo histológico descrito para cada paciente, apesar de terem também sido mapeados e nomeados em função de seu posicionamento.

Tabela 8. Avaliação da distribuição dos espectros de Melanoma Cutâneo nos agrupamentos em função do diagnóstico histopatológico.

MANUAL	AUTOMATICO	MC	Diagnóstico		
Cluster 1	24	Cluster 2	24	58	Melanoma + ↑Queratina + ↓Pigmento
Cluster 2	103	Cluster 1	25	57	Melanoma + ↑Inflamação + ↑Pigmento (Hemossiderina)
		Cluster 3	31	81	Melanoma + Necrose + Tec. Adiposo + ↑Pigmento
		Cluster 4	25	76	Melanoma + ↑Fibras colágenas (tendão) + ↑Pigmento
		Cluster 4	22	75	Melanoma + ↑Intensa Fibrose + ↓Inflamação + ↑Pigmento
Cluster 3+4	23	Cluster 4	23	70	Melanoma Amelanótico + ↑Inflamação

Diferentemente da Pele Normal, os espectros do Melanoma não obedeceram a mesma distribuição dos espectros entre os *clusters* para os dois pré-processamentos. Desta forma, independentemente do nome (*Cluster 1*, por exemplo) estes não descrevem o mesmos espectros no pré-processamento manual e no automático. Desta forma, deve-se consultar eventualmente a Tabela 8 para entender as futuras referências a esses agrupamentos na etapa de classificação.

Como pode ser observado na referida tabela, O *Cluster 1* (manual) foi chamado de *Cluster 2* (automático), agrupando os espectros da amostra MC_58, que em sua maioria foi composta por queratina contendo alguns pontos com pigmento, sugerindo um melanoma acral lenatiginoso (Figura 15). O sinal Raman da queratina influenciou fortemente que esses espectros fosse alocados separadamente. Na fotomicrografia da camada córnea do epitélio se observaram células atípicas com núcleo apresentando alterações. Quando analisadas as camadas mais inferiores do epitélio para verificar a origem das células pigmentadas atípicas no estrato córneo, notaram-se alguns agrupamentos que podem indicar, devido aos artefatos de congelação apresentados neste fragmento, serem melanócitos malignos com pigmentação em seu interior. Entretanto, se destaca nesta amostra a abundante quantidade de queratina.

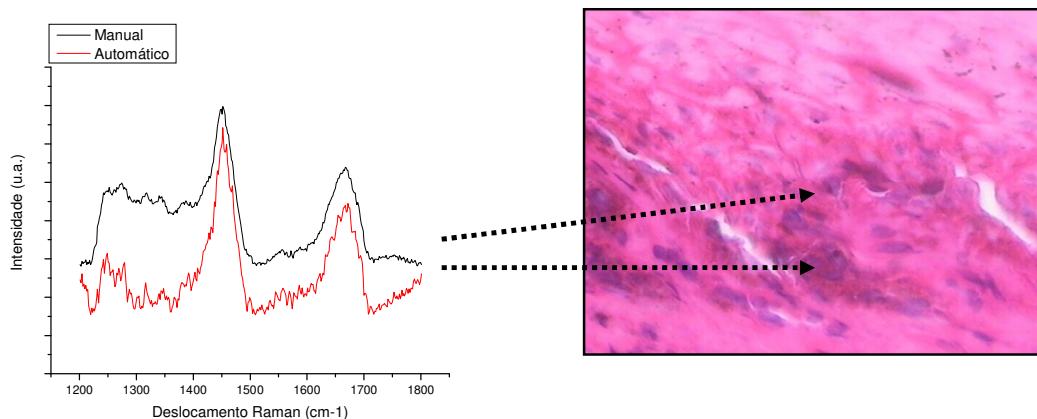


Figura 15. Média dos espectros de Melanoma Cutâneo do *Cluster 1* (manual) ou *Cluster 2* (automático) no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). Fotomicrografia: Coloração HE; aumento 400 vezes; sugestão de melanócitos malignos.

O *Cluster 2* (manual) foi composto pelos espectros das amostras MC_57, MC_75, MC_76 e MC_81, que com o pré-processamento automático foram subdivididos em três *clusters*. Como pode ser visto na Tabela 8 e na descrição destas lâminas, a característica principal que descreve todo o grupo é a presença de intensa pigmentação; como suposto para o pré-processamento manual, as características espectrais (fluorescência) referentes à pigmentação seriam mantidas. Quando aplicado o pré-processamento automático, essa influência foi minimizada, subdividindo estes espectros em três grupos.

O primeiro grupo foi composto pela amostra MC_57, cujas características histológicas sugerem que este tenha sido separado pela presença de forte pigmentação por hemossiderina e presença de intenso infiltrado inflamatório. Além dos melanócitos malignos, encontra-se infiltrado inflamatório abundante. Foi proposto pelo patologista que este fragmento fosse submetido a exames imunohistoquímicos (proteína S-100 e Melan A) para diagnóstico diferencial entre melanoma e carcinoma espinocelular, por ser uma lesão onde não haviam muitos melanócitos malignos com pigmentação. A maioria dos pigmentos identificados tinham aspecto grosseiro, grande, irregular e de cor castanho-clara, sendo indicado (pela coloração HE) que fosse hemossiderina e não melanina. Para confirmação seria necessário realizar nestas amostras métodos de impregnação argênica (Fontana Masson e Azul da Prússia) para diferenciar os dois pigmentos. Mesmo com dificuldade, foram encontradas células com atipias sugerindo malignidade (núcleos grandes, irregulares e apresentando nucléolo evidente destacado do núcleo por coloração diferenciada – mais claro ou mais escuro).

O segundo grupo foi composto pelos espectros da amostra MC_81, cuja presença de tecido adiposo e necrose favoreceram a sua separação dos demais espectros. Tratava-se de um fragmento de melanoma contendo apenas a derme, onde foram encontrados além dos melanócitos malignos (com muito pigmento), adipócitos, tecido inflamatório e tecido necrótico.

O terceiro subgrupo foi formado pelos espectros das amostras MC_75, MC_76 e MC_70 (proveniente da soma do *Cluster 3* e *Cluster 4* no pré-processamento manual, que será explicado mais detalhadamente adiante). As características histológica mais marcantes deste grupo são a presença de

colágeno altamente condensado, proveniente (supostamente) de um tendão e de uma intensa fibrose, e a presença de tecido inflamatório.

A fotomicrografia do fragmento MC_75 mostrou epiderme e derme, apesar do artefato na fase de corte do fragmento que comprometeu a avaliação da epiderme. Não foram encontrados nesta região melanócitos atípicos e tampouco muitas estruturas (melanócitos ou queratinócitos) com pigmento. Na derme, foram observados inúmeros melanócitos malignos pigmentados, alguns apresentando mitoses atípicas, além de fibrose intensa e discreto infiltrado. Além destas observações, foram encontradas diversas células com pseudoinclusão intranuclear, ou seja, ocorrência do citoplasma dentro do núcleo. A diferença entre um nucléolo evidente é que neste caso, esta evidência dentro do núcleo se mostra maior e mais clara. Essas alterações nucleares também podem ser encontradas em nevos, não sendo característica de uma alteração atípica importante em relação à agressividade da lesão.

Na fotomicrografia da amostra MC_76 foi visto um fragmento exclusivamente composto por derme altamente pigmentada, contendo melanócitos atípicos, sem no entanto inflamatório. Podem ser observados os melanócitos com características patognomônicas de melanoma: células com alterações nucleares graves e pigmento melânico em seu interior. O melanoma é um único tumor que produz melanina. Ainda nessa mesma figura, as fibras colágenas se apresentaram com aspectos fortemente ondulados com os núcleos celulares enfileirados, não sugerindo aspecto de fibrose, mas fásia de tendão.

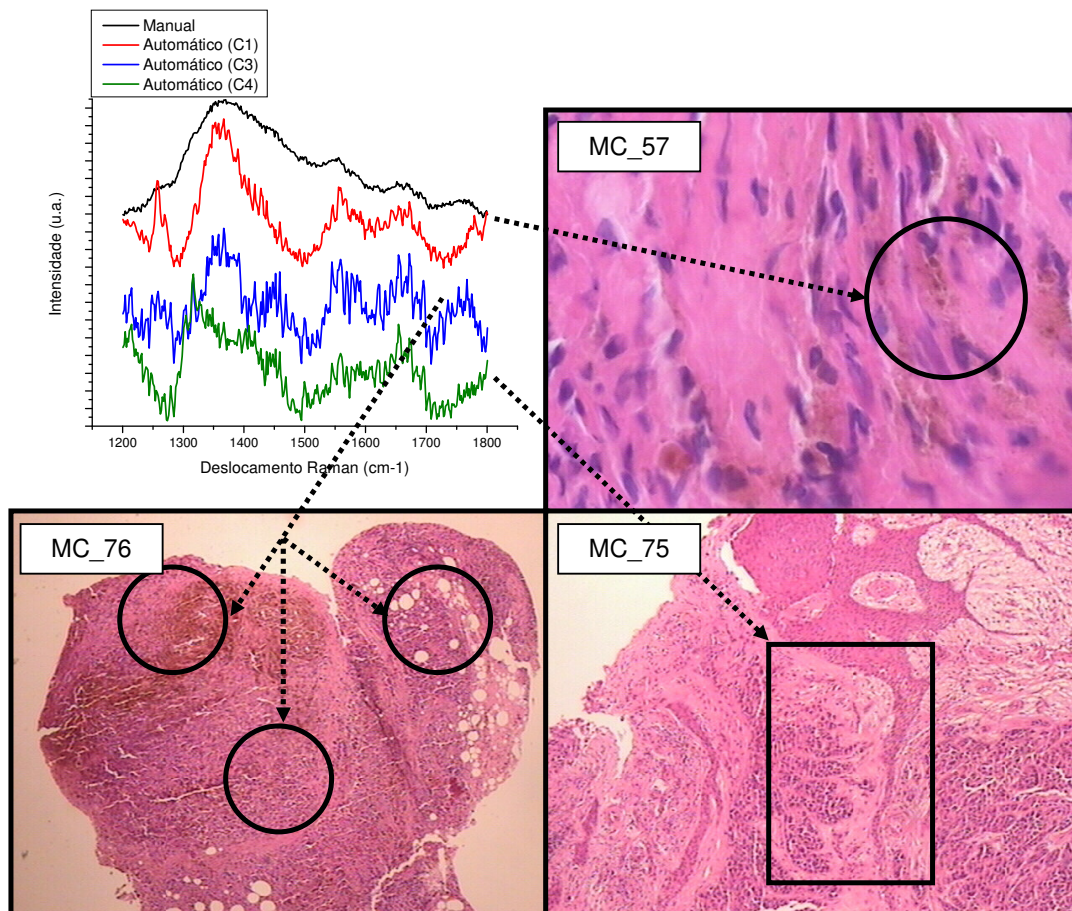


Figura 16. Média dos espectros de Melanoma Cutâneo do *Cluster 2* (manual) ou *Cluster 1*, *Cluster 3* e *Cluster 4* (automático) no deslocamento Raman entre 1200 a 1800 cm^{-1} pré-processados manual (preto) e automaticamente (vermelho). MC_57: Coloração HE; aumento de 400, pigmentação sugestiva de hemossiderina. MC_75: Coloração HE; aumento de 40 vezes para visualização integral do fragmento; apresenta intensa fibrose. MC_76: Coloração HE; aumento de 20 vezes, aspecto geral do fragmento que apresenta pigmentação (melânica ou hemossiderina), infiltrado inflamatório, necrose e tecido adiposo.

A soma dos espectros do *Cluster 3* e *Cluster 4* (manual) se referem aos espectros da amostra MC_70. A principal característica desta amostra é ser um melanoma amelanótico. Independentemente do pré-processamento utilizado, esta amostra foi separada das demais, evidenciando a forte influência da pigmentação nos espectros e a importância de saber caracterizá-los. É importante também dizer que inicialmente (manual) estes espectros foram subdivididos em dois agrupamentos, supostamente devido à distribuição das células inflamatórias na

região de 500 μm x 500 μm onde os 25 espectros foram coletados. Isso também explica a razão pela qual esses espectros foram alocados juntamente com os espectros MC_75 e MC_76 quando submetidos ao pré-processamento automático. Em resumo, os espectros destas três amostras foram alocados juntos em função das características histológicas de inflamação e a presença de fibras colágenas fortemente marcadas.

A fotomicrografia da amostra MC_70 pode ser considerada um melanoma amelanótico, pois observando-se a epiderme e derme deste fragmento não são encontradas regiões pigmentadas por melanina. Na epiderme não foram encontrados melanócitos malignos, entretanto, na derme, observou-se inúmeros melanócitos malignos viáveis sem pigmentação e vasto infiltrado inflamatório. Podem ser visualizados os melanócitos malignos sem pigmentação, identificados por possuírem núcleos grandes e irregulares em relação às demais células, além de apresentarem nucléolo grande e evidente com coloração mais clara que a do núcleo.

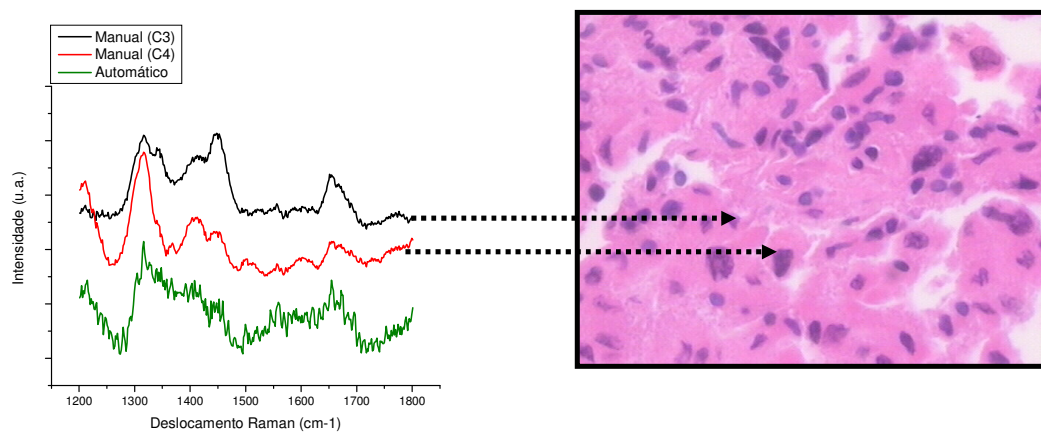


Figura 17. Distribuição dos espectros Raman pré-processados manual e automaticamente de Melanoma Cutâneo do *Cluster 3* e *Cluster 4* (manual) ou *Cluster 4* (automático). Fotomicrografia: MC_70: melanoma amelanótico em aumento de 400 vezes, melanócitos malignos sem pigmentação.

5.3 Classificação Diagnóstica

Determinadas as características espectrais e histopatológicas referentes aos grupos Pele Normal e Melanoma Cutâneo, finalmente se justifica o confronto desses espectros com a finalidade de classificação diagnóstica.

Por meio da técnica de algoritmo Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise de Discriminante (LDA) foi possível classificar os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo, subdivididos nos respectivos tipos histológicos no confronto par-a-par (normal *versus* maligno). A LDA foi realizada separadamente para os espectros resultantes dos pré-processamentos manual e automático.

Primeiramente foram relatados os resultados da LDA realizadas para o conjunto de espectros submetidos a pré-processamento manual (subtração de linha de base pelo polinômio de 1º grau - uma reta). O pareamento dos espectros normais *versus* malignos obedeceu os resultados descritos anteriormente, sendo estes pareados por similaridade entre os espectros e características histológicas (por exemplo: melanócito normal *versus* melanócito maligno). Sendo assim, foram analisados três pareamentos, neste estudo chamados de “Opções”, da seguinte forma: (a) **Opção 1**: Cluster 1 do MC *versus* Cluster 2 do PN, ou seja, Melanoma acral lentiginoso, com muita queratina pigmentada (MC) *versus* melanócitos pigmentados; (b) **Opção 2**: Cluster 2 do MC *versus* Clusters 4 e 1 do PN, ou seja, Melanoma com alta pigmentação *versus* epiderme e tecido conjuntivo da Pele Normal; (c) **Opção 3**: Clusters 3 e 4 do MC *versus* Cluster 3 do PN, ou seja, melanoma amelanótico com queratinócitos normais.

Observando a Tabela 9, que relaciona a variabilidade das componentes principais (PC's) em relação à Opção determinada (manual), foi possível estabelecer que as PC's explicam bastante da variabilidade dos grupo de espectros de cada uma das opções, favorecendo o uso destas duas primeiras componentes (PC1 e PC2) para a LDA (assim como anteriormente foram usadas na CLA).

Tabela 9. Variabilidade das componentes principais em relação à opção determinada (pré-processamento manual)

Variabilidade	PC1	PC2	Acumulado
Opção 1	92,8%	3,3%	96,1%
Opção 2	88,4%	6,5%	94,9%
Opção 3	77,2%	11,2%	88,4%

A soma da explicabilidade dos espectros (valor acumulado de PC1 e PC2) para as Opções foram de: Opção 1, 96,1%; Opção 2, 94,6%; e Opção 3, 88,4%. A alta explicabilidade com apenas duas componentes se deve ao fato de que o conjunto de espectros que estão sendo confrontados na PCA têm características espectrais bastante distintas, estabelecendo que apenas informações mais gerais possibilitaram sua descrição e, contudo, a classificação.

Utilizando-se dos escores de identificação PC1 e PC2 de cada um dos espectros dos grupos (PN e MC, separados por tipo de pré-processamento - manual e automático) e lhes dando pesos adequados, a Análise Discriminante Linear (LDA), resultada na função discriminante, determinou a existência de diferença estatística significativa entre os escores médios (Tabelas 10 e 13). A técnica utilizou a maximização da variância entre grupos, utilizando a matriz de variância/covariância. As Figuras 38, 39 e 40 para o pré-processamento Manual e 41, 42, 43 e 44 para o pré-processamento automático, mostraram o número e a composição das dimensões (representadas em vermelho e azul para Melanoma e Pele Normal, respectivamente) de discriminação entre dois grupos formados a partir do conjunto de variáveis independentes (PC1 e PC2 de cada um dos espectros). O percentual de casos corretamente classificados (Tabelas 11 e 14, pré-processamento manual e automático, respectivamente) pôde ser inferido.

Os coeficientes das funções discriminantes devem ser analisados em sinal (positivo e negativo) e magnitude (diferença entre estes valores dos grupos comparados). Variáveis com altos coeficientes são mais discriminantes do que outras com baixos coeficientes (perto de zero). A potencialidade discriminante (Constante, PC1 e PC2) reflete a correlação de cada variável independente (PC1 e PC2 de cada um dos espectros) com a função discriminante. Na Tabela 10

podem ser observados os coeficientes de correlação da função discriminante para cada uma das opções sugeridas.

Tabela 10. Coeficientes da Função Discriminante (LDA) por Opção (pré-processamento pré-processamento manual)

	Função Discriminante	MC	PN
Opção 1	Constante	-397,0	-396,3
	PC1	4760,2	4751,1
	PC2	81,6	99,1
Opção 2	Constante	-179,5	-163,8
	PC1	5303,7	5066,2
	PC2	-251,0	-244,2
Opção 3	Constante	-61,4	-66,2
	PC1	914,2	949,5
	PC2	70,1	70,3

Na Opção 1, o valor da Constante foi de -397,0 e -396,3; PC1 4760,2 e 4751,1 e PC2, 81,6 e 99,1 para MC e PN, respectivamente. Na Opção 2 o valor da Constante foi de -179,5 e -163,8; PC1, 5303,7 e 5066,2; e PC2, -251,0 e -244,2 para MC e PN, respectivamente. Na Opção 3 o valor da Constante foi de -61,4 e -66,2; PC1 914,2 e 949,5 e PC2, 70,1 e 70,3 para MC e PN, respectivamente.

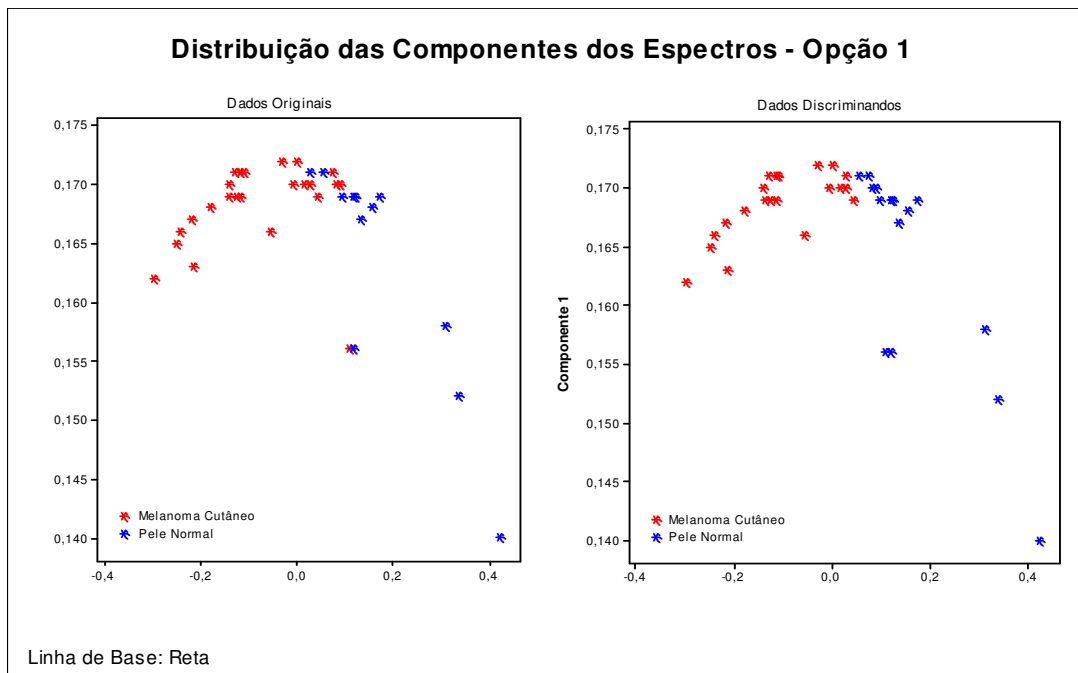


Figura 18. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 1 (pré-processamento manual).

Na Figura 18, o gráfico da esquerda mostra a dispersão “original” (sem aplicação da função discriminante) dos escores (PC1 e PC2) de cada um dos espectros, sendo os caracteres vermelhos representativos do grupo Melanoma e os caracteres azuis, da Pele Normal. O gráfico da direita representa a dispersão dos dados (ainda vermelho para Melanoma e azul para Pele Normal) após a aplicação da função discriminante. Notem, que os caracteres se mantiveram na mesma posição nos dois gráficos, entretanto as cores, de alguns caracteres foram alteradas. É pela observação destas alterações que pode ser compreendida a função discriminante aplicada aos dados. A função discriminante “acertou” quando a mesma cor foi mantida nos dois gráficos e “errou” quando as cores foram alteradas de azul para vermelho ou vice-versa. Essa avaliação é válida para todos os gráficos de função discriminante apresentados neste trabalho (Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24).

Na Figura 18 pode ser observado o gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pré-processados manualmente para Opção 1 (Cluster 1 do MC *versus* Cluster 2 do PN, ou seja, Melanoma acral lentiginoso, com muita queratina pigmentada (MC) *versus*

melanócitos pigmentados). Com a aplicação desta função discriminante, foi possível classificar corretamente 86,1 % dos espectros MC e PN, sendo 83,3 % de sensibilidade e 91,7 % de especificidade (Tabela 11).

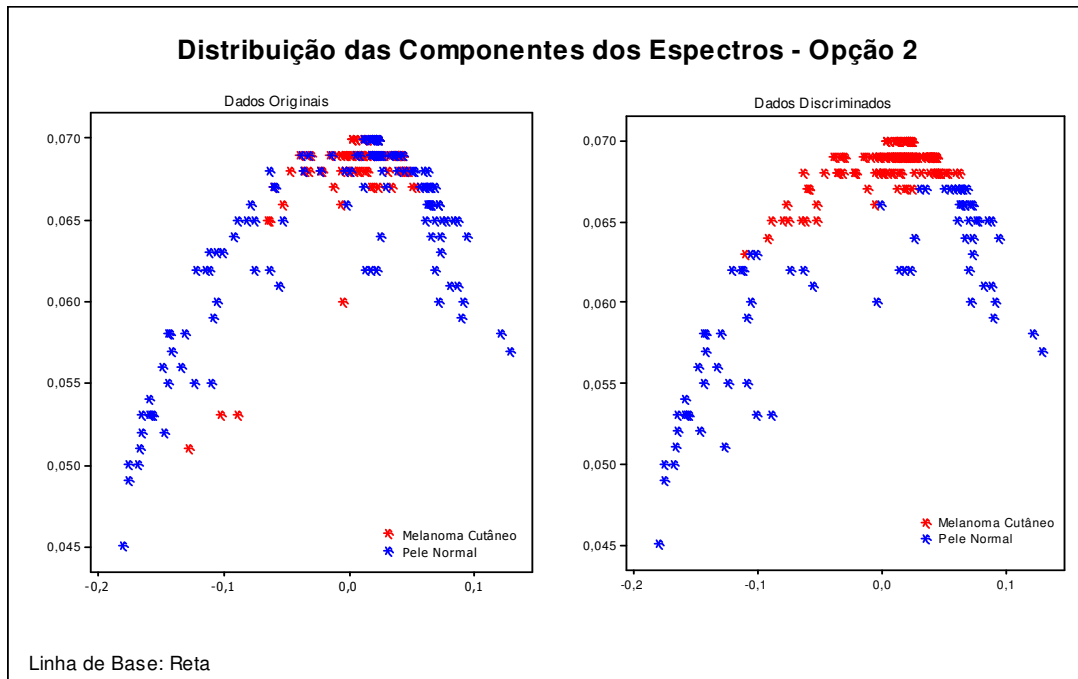


Figura 19. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 2 (pré-processamento manual).

A Figura 19 representa o gráfico da função discriminante para os espectros MC e PN na Opção 2, sendo Cluster 2 do MC *versus* Clusters 4 e 1 do PN, ou seja, Melanoma com alta pigmentação *versus* epiderme e tecido conjuntivo da Pele Normal. Para a Opção 2, a função discriminante classificou os dados corretamente em 72,11 % dos casos, sendo 93,2 % de sensibilidade e 54,8 % de especificidade (Tabela 11).

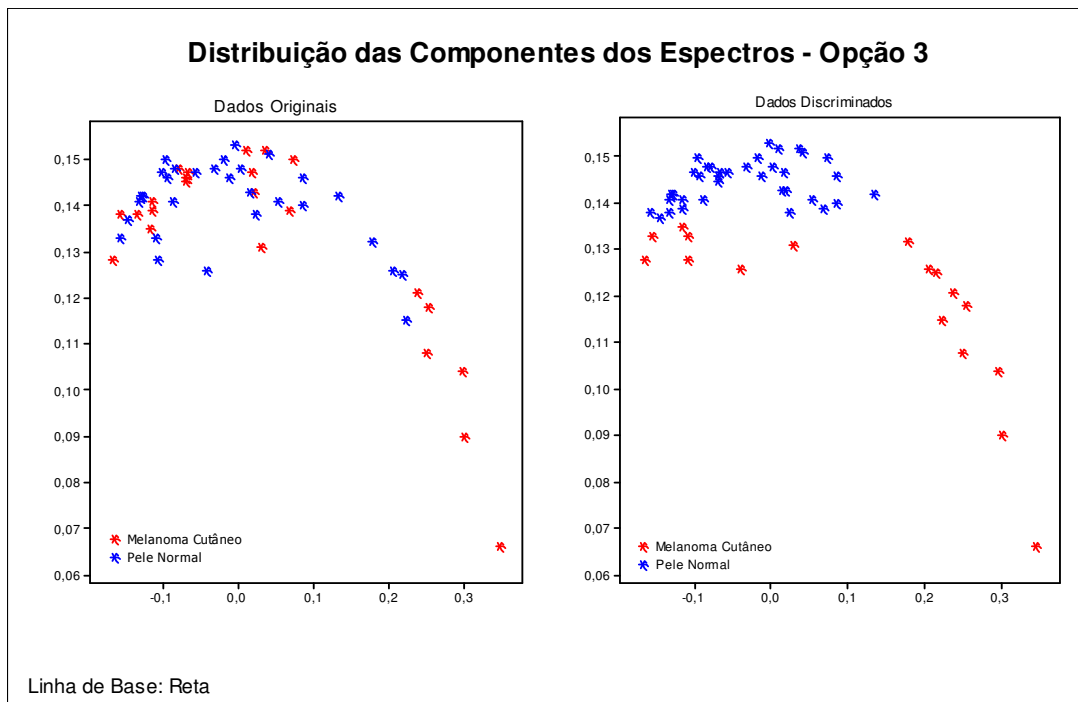


Figura 20. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 3 (pré-processamento manual).

Na Figura 20 observa-se o resultado da função discriminante para a Opção 3 (Clusters 3 e 4 do MC *versus* Cluster 3 do PN, ou seja, melanoma amelanótico com queratinócitos normais). Para esta opção, foi possível classificar corretamente os dados em 58,5 % das tentativas, resultando em 39,1 % de sensibilidade e 73,3 % de especificidade (Tabela 11).

Na Tabela 11 podem ser observados da classificação correta da LDA por Opção para o pré-processamento Manual (Polinômio de 1^o Grau).

Tabela 11. Classificação correta da LDA por Opção (pré-processamento manual)

Classificação Correta	MC	PN	Total
Opção 1	83,3%	91,7%	86,1%
Opção 2	93,2%	54,8%	72,1%
Opção 3	39,1%	73,3%	58,5%

Finalmente, foram relatados os resultados da LDA realizadas para o conjunto de espectros submetidos a pré-processamento automático (subtração de linha de base por um polinômio de 5º grau). O pareamento dos espectros Pele Normal *versus* Melanoma Cutâneo obedeceu a mesma metodologia aplicada anteriormente, sendo assim. Pareados por similaridade espectral e características histológicas. Foram analisados quatro pareamentos (“Opções”), da seguinte forma: (a) **Opção 1:** *Cluster 1* do MC *versus Cluster 3* do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e pigmentação por hemossiderina (MC) *versus* queratinócitos normais (PN); (b) **Opção 2:** *Cluster 2* do MC *versus Cluster 2* do PN, ou seja, melanoma acral lentiginoso (alta concentração de queratina) (MC) *versus* melanócitos normais (PN); (c) **Opção 3:** *Cluster 3* do MC *versus Cluster 1* do PN, ou seja, melanoma com tecido adiposo e necrótico (MC) *versus* epiderme da pele normal (PN); (d) **Opção 4:** *Cluster 4* do MC *versus Cluster 4* do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e fibras colágenas abundantes (MC) *versus* colágeno normal derme (PN).

Observando a Tabela 12 que relaciona a variabilidade das componentes principais (PC's) em relação à Opção determinada, foi possível estabelecer que as PC's explicam bastante da variabilidade dos grupo de espectros de cada uma das opções, favorecendo o uso destas duas primeiras componentes (PC1 e PC2) para a LDA (assim como anteriormente foram usadas na CLA).

Tabela 12. Variabilidade das componentes principais em relação à Opção determinada (pré-processamento automático)

Variabilidade	PC1	PC2	Acumulado
Opção 1	55,7%	23,7%	79,4%
Opção 2	77,2%	6,6%	83,8%
Opção 3	51,0%	8,0%	59,0%
Opção 4	65,7%	10,1%	75,8%

A soma da explicabilidade dos espectros (valor acumulado de PC1 e PC2) para as Opções foram de: Opção 1, 79,4 %; Opção 2, 83,8 %; Opção 3, 59,0 %; e Opção 4, 75,8 %. A alta explicabilidade com apenas duas componentes se deve ao fato de que o conjunto de espectros que estão sendo

confrontados na PCA têm características espectrais bastante distintas, estabelecendo que apenas informações mais gerais possibilitem sua descrição. Foi averiguado que os PC's (pré-processamento manual) tiveram o grau de explicabilidade maior em relação aos PC's (pré-processamento automático) em função da exposição de caracteres mais singulares das células no pré-processamento automático (minimização de artefatos espectrais).

Na Tabela 13 podem ser observados os coeficientes de correlação da função discriminante para cada uma das opções sugeridas.

Tabela 13. Coeficientes da Função Discriminante (LDA) por Opção (pré-processamento automático)

Função Discriminante		MC	PN
Opção 1	Constante	-53,1	-97,7
	PC1	909,0	1256,2
	PC2	-162,0	-349,0
Opção 2	Constante	-88,8	-76,6
	PC1	1179,7	1093,7
	PC2	134,8	135,8
Opção 3	Constante	-20,9	-21,8
	PC1	339,5	346,8
	PC2	16,9	26,4
Opção 4	Constante	-35,6	-18,9
	PC1	714,7	522,2
	PC2	200,8	111,1

Na Opção 1, o valor da Constante foi de 53,1 e 97,7; PC1, 909,0 e 1256,2; e PC2, -162,0 e 349,0 para MC e PN, respectivamente. Na Opção 2, o valor da Constante foi de -88,8 e -76,6; PC1, 1179,1 e 1093,7; e PC2, 134,8 e -135,8 para MC e PN, respectivamente. Na Opção 3, o valor da Constante foi de -20,9 e -21,8; PC1, 339,5 e 346,8 e PC2, 16,9 e 26,4 para MC e PN, respectivamente. Na Opção 4, o valor da Constante foi de -35,6 e -18,9; PC1, 714,7 e 522,2 e PC2, 200,8 e 111,1 para MC e PN, respectivamente.

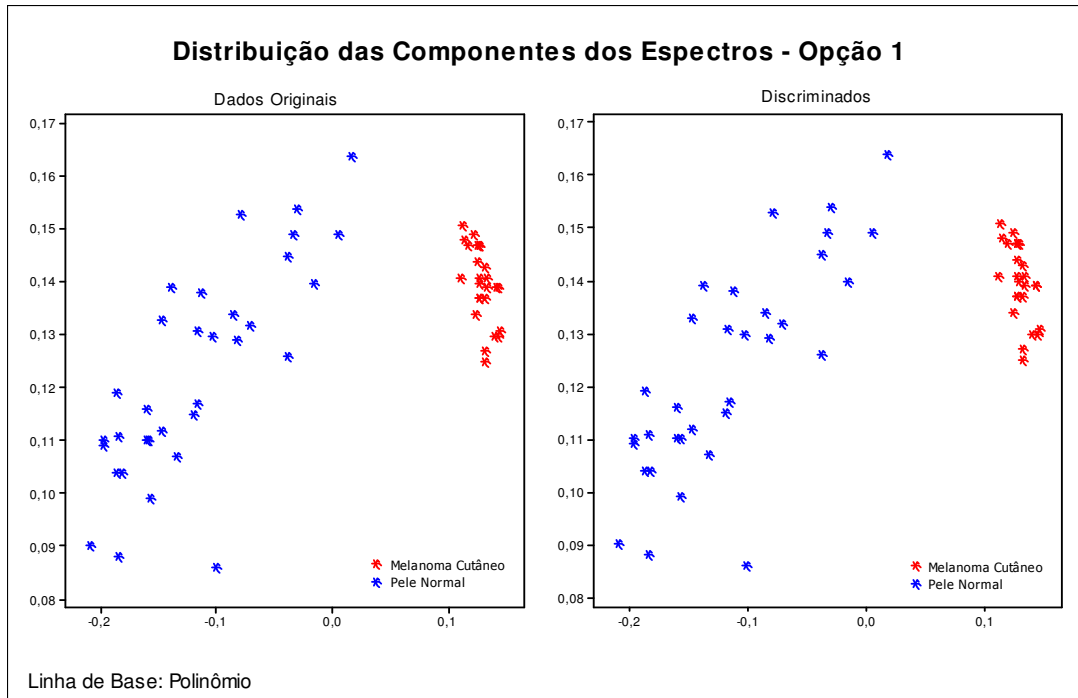


Figura 21. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 1 (pré-processamento automático).

Na Figura 21 pode ser observado o gráfico da função discriminante para Opção 1, sendo esta formada pelo *Cluster 1* do MC *versus Cluster 3* do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e pigmentação por hemossiderina (MC) *versus* queratinócitos normais (PN). Na Opção 1 foi possível classificar com exatidão os espectros (100 % de sensibilidade e 100 % de especificidade (Tabela 14).

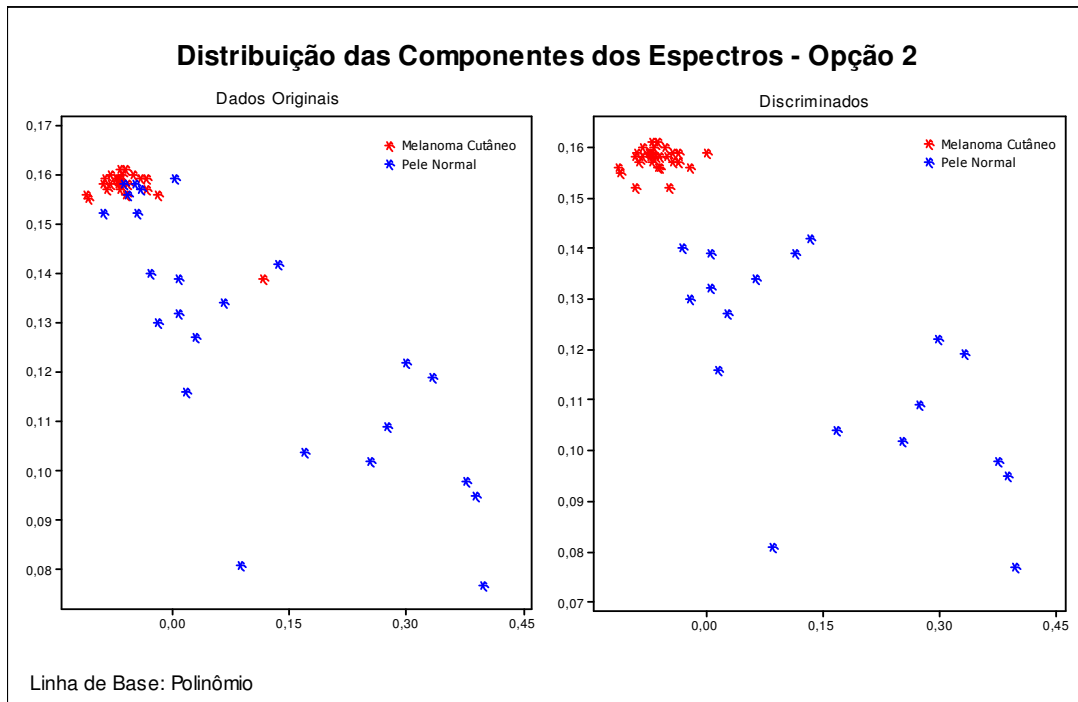


Figura 22. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 2 (pré-processamento automático).

A Figura 22 representa o resultado da aplicação da função discriminante para a Opção 2 (*Cluster 2* do MC *versus Cluster 2* do PN, ou seja, melanoma acral lentiginoso (alta concentração de queratina) (MC) *versus* melanócitos normais (PN)). Na Opção 2 foi possível classificar corretamente 83,3 %, com 95,8 % de sensibilidade e 70,8 % de especificidade (Tabela 14).

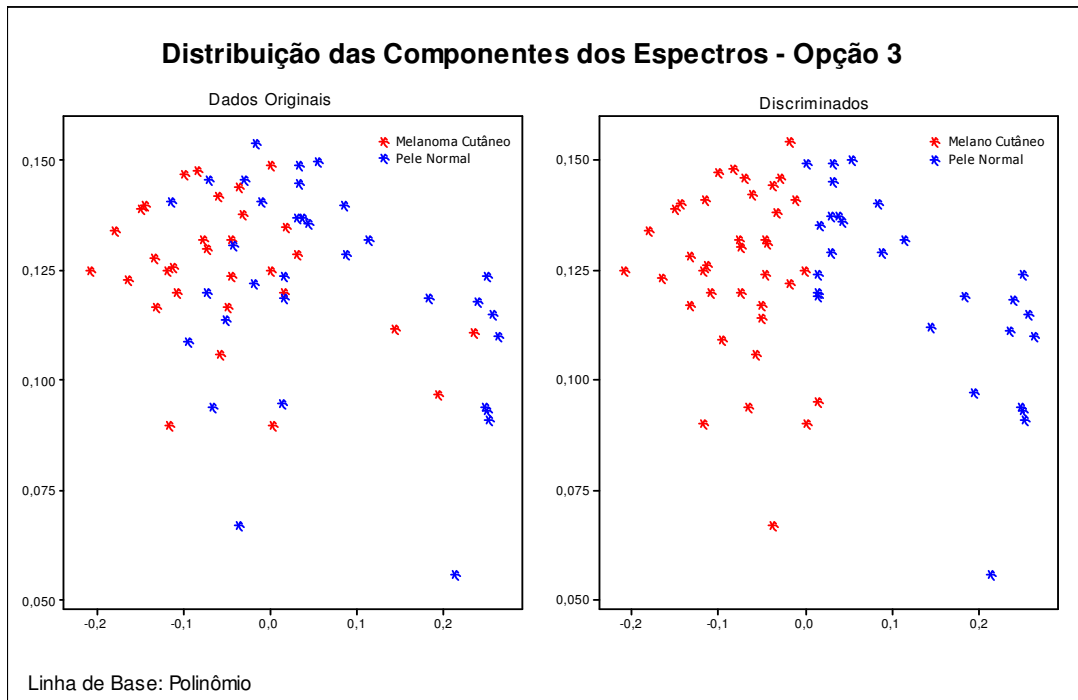


Figura 23. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 3 (pré-processamento automático).

Na Figura 23 estão representados os gráficos da função discriminante para a Opção 3, que designa: *Cluster 3* do MC *versus Cluster 1* do PN, ou seja, melanoma com tecido adiposo e necrótico (MC) *versus* epiderme da pele normal (PN). Na Opção 3 foi possível classificar corretamente 68,8% (77,4 % de sensibilidade e 60,6 % de especificidade) (Tabela 14).

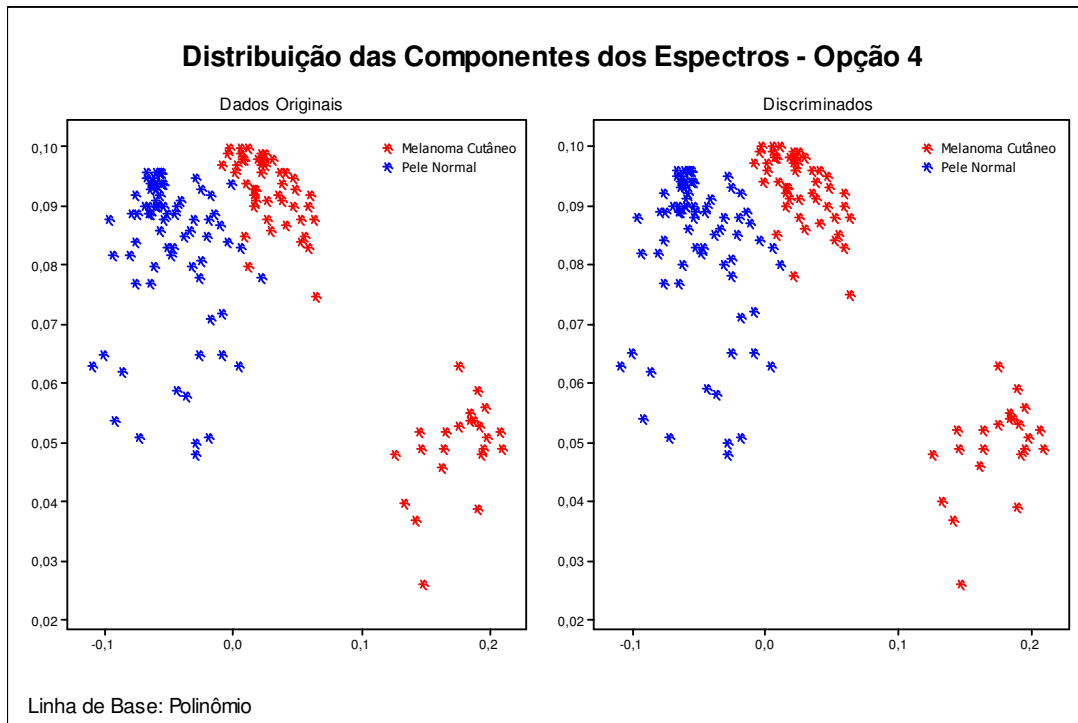


Figura 24. Gráfico da função discriminante para os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo pareados na Opção 4 (pré-processamento automático).

A Figura 24 apresenta a função discriminante para a Opção 4: *Cluster 4* do MC *versus Cluster 4* do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e fibras colágenas abundantes (MC) *versus* colágeno normal derme (PN). Na Opção 4 foi possível classificar corretamente 97,9% (98,6% de sensibilidade e 97,4% de especificidade).

Na Tabela 14 podem ser observados os dados referentes a classificação dos espectro de Pele Normal e Melanoma Cutâneo submetidos à rotina de pré-processamento automático (Polinômio de 5º Grau).

Tabela 14. Classificação correta da LDA por Opção (pré-processamento automático)

Classificação Correta	MC	PN	Total
Opção 1	100%	100%	100%
Opção 2	95,8%	70,8%	83,3%
Opção 3	77,4%	60,6%	68,8%
Opção 4	98,6%	97,4%	97,9%

6. DISCUSSÃO

A Espectroscopia Vibracional Raman vem sendo introduzida na pesquisa Biomédica, permitindo a pesquisa sobre a conformação molecular de biocompostos em seus micro-ambientes naturais (Liu et al, 1992; Mizuno et al, 1994; Gniadecka et al, 1998). Existem questões abertas relacionando dados histológicos e informações bioquímicas obtidas por meio dos espectros Raman. Devido à variedade de estruturas presentes nos tecidos biológicos, incluindo seus produtos metabólicos, a aplicação da espectroscopia Raman deve ser direcionada para extrair informações pontuais, para que essa relação possa ser estabelecida.

O aumento de resolução do Espectrômetro Raman para observação das células é uma técnica relativamente nova, iniciada nos anos 90. Por essa razão, ainda são necessárias discussões sobre alguns os pontos metodológicos apontados neste estudo: armazenamento das amostras, análise citológica e histológica do espécimes para compreensão fisiológica e bioquímica frente aos espectros, pré-processamento dos espectros Raman e algoritmo para classificação destes espectros.

O armazenamento prévio das amostras para os experimentos Micro-Raman pode ser realizado basicamente sob duas formas: as amostras podem ser originárias de um banco de dados (blocos de parafina), ou frescas, obtidas diretamente de um fragmento de biópsia e estocadas a temperaturas inferiores à 70°C negativos sem qualquer conservante.

Tfayli et al (2005) e Lyng et al (2007) utilizaram fragmentos de amostras em parafina de tecidos humanos para caracterização por espectroscopia vibracional. Tfayli et al (2005) utilizaram amostras de nevo pigmentado e melanoma para caracterização por FT-IR. As amostras foram preparadas a partir do seccionamento de 10 µm dos blocos de parafina das respectivas lesões. O seccionamento dos blocos foi realizado de tal maneira que as amostras para a medida deveriam estar totalmente compostas por epiderme afetada pela proliferação dos melanócitos, evitando a presença de zona de epiderme normal. As amostras, logo depois de cortadas, foram fixadas em janelas de ZnSe, específicas para medidas em FT-IR, com uma gota de albumina e água destilada, sendo ambos processos de fixação.

Lyng et al (2007) utilizaram amostras provenientes de blocos de parafina de tecido de tonsilas, fígado, próstata e colo uterino. As amostras destes trabalhos foram seccionadas paralelamente com espessura de 10 μm , montadas em substratos de vidro e secas a condições ambiente. A parafina das amostras foi removida antes das investigações Raman por meio de banhos de imersão de Xileno (BDH), Etanol absoluto (Merck) e Industrial Methylated Spirits 95 % (Lennox), e posteriormente secas à temperatura ambiente. As amostras foram seccionadas em dois fragmentos, sendo um desses fixados e corado com H&E usado como referência e o outro usado para as medidas Raman e FT-IR.

A principal vantagem de se utilizar amostras provenientes de blocos de parafina é a abundância de amostras disponíveis que poderiam ser utilizadas no experimento. Além disso, essas amostras já poderiam ter sido avaliadas profundamente (histologia e imunohistoquímica), o que facilitaria muito a compreensão conjunta dos fenômenos fisiológicos e espectros. A influência da parafina nos espectros é facilmente identificada pelo pico em 1378 cm^{-1} , que matematicamente pode ser subtraído. Entretanto, a principal desvantagem da utilização deste método é a influência do processo de emblocamento das amostras e a remoção da parafina para os experimentos espectroscópicos – denaturação de proteínas e eliminação dos lipídios. Sendo os espectros vibracionais (Raman ou IR) a assinatura bioquímica das amostras deste tecidos, essas importantes alterações moleculares estariam presentes.

Por essa razão optou-se neste estudo, assim como Short et al (2006), a utilização de amostras de Pele Normal e de Melanoma Cutâneo frescas originárias de fragmentos de biópsia. Como já mencionado, esse fragmentos não influenciaram negativamente o diagnóstico do paciente. Parte desse material foi congelado em Nitrogênio líquido para ser utilizado no experimento de Espectroscopia Micro-Raman; o restante da peça cirúrgica, enviada para exame histológico para confirmação diagnóstica.

Neste trabalho, foram analisados sete pequenos fragmentos de pele normal, de tamanho aproximado de 5 x 5 mm, sem os derivados ou anexos da pele (glândulas sudoríparas, pêlos, glândulas sebáceas e unhas) oriundos de diversas partes do corpo, exceto palmas das mãos e plantas dos pés, sem

distinção do tipo de pele pela classificação de Fitzpatrick. A espessura destes fragmentos não foi maior que 2 mm, sendo, portanto, constituídos exclusivamente de epiderme e derme. O seccionamento das amostras foi realizado com auxílio de criomicrotomo, obtendo-se fragmentos com 16 μm de espessura, posicionado sobre lâmina de CaF_2 , para aquisição dos espectros Micro-Raman e fotomicrografias que auxiliaram no entendimento histológico. O diagnóstico conclusivo das amostras foi feito sob a análise das amostras coradas em HE originárias dos blocos de parafina confeccionados de fragmentos separados das mesmas amostras antes dos experimentos Micro-Raman. Esse é um procedimento amplamente aplicado nos estudos de Espectroscopia Raman em diagnóstico de Câncer (Gniadecka et al, 1998; Gniadecka et al, 2004; Bitar et al, 2006).

Embora não tenha sido o objetivo do estudo detalhar os pormenores histológicos dos espécimes de Pele Normal e Melanoma Cutâneo, acreditou-se ser conveniente salientar algumas das características destas estruturas com base na descrição da Literatura. Essa razão se deve ao fato de que certamente são as alterações bioquímicas (por consequência, histológicas) que promoveram as diferenças espectrais encontradas para caracterização dos subgrupos de Pele Normal e Melanoma e promoção de classificação. Espera-se ser importante, neste momento, descrever mais detalhadamente sobre as estruturas encontradas para a introdução de elementos para construção de uma interface compreensível entre os achados histológicos, bioquímicos e espectrais. De acordo com Lieber et al (2008), a precisa correlação histológica dos sítios de medida Raman poderá permitir que estruturas morfológicas tenham seus espectros Raman específicos.

A epiderme é uma camada de epitélio pavimentoso estratificado. Na pele espessa, podem ser distinguidas cinco camadas na epiderme. Começando da mais profunda em direção à superfície, há o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso, o estrato lúcido e o estrato córneo. O estrato lúcido não está presente na pele delgada (Ross, 1993).

O estrato basal é adjacente à lâmina basal. É chamado também de estrato germinativo por conter células em divisão. As células recém-produzidas movem-se para a superfície, para substituir as que descamam (Ross, 1993). É

constituído por células prismáticas ou cubóides, basófilas, repousando sobre a membrana basal que separa a derme da epiderme. A camada basal, rica em células-tronco da epiderme, é também chamada de germinativa. Apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável, junto com a camada seguinte (camada espinhosa), pela constante renovação da epiderme. As células da camada basal contém filamentos intermediários de queratina, que vão se tornando mais numerosos à medida que a célula avança para a superfície. As queratinas constituem a metade das proteínas da camada córnea (Junqueira, Carneiro, 10ed., 2004).

O estrato córneo é a camada mais superficial da epiderme. Suas células não possuem mais núcleo tampouco organelas. A membrana celular é espessa e sua superfície externa é recoberta, ao menos nas camadas mais profundas, por glicolípido; o interior das células está repleto de queratina. A espessura do estrato córneo varia consideravelmente, sendo maior na pele espessa; aumenta quando há exposição solar ou atrito. Neste estudo foi observada a presença de hiperqueratose (aumento da camada de queratina com presença de núcleos celulares – paraqueratose) em uma das amostras. Na epiderme, há quatro tipos de células: queratinócito, melanócito, célula de Langerhans e célula de Merkel (Ross, 1993).

Os queratinócitos são as células mais numerosas da epiderme. São as células que se tornam queratinizadas e que sintetizam a barreira impermeável à água. A queratina (glicoproteína) contém, pelo menos, seis polipeptídeos diferentes, com peso molecular entre 40 a 70 kDa. A deposição dos tonofilamentos se modifica à medida que os queratinócitos se diferenciam. As células da camada basal apresentam queratina de baixo peso molecular, enquanto os queratinócitos mais diferenciados sintetizam queratina de maior peso molecular. Ao mesmo tempo em que os queratinócitos produzem queratina, também produzem um glicolípido que funciona como uma barreira lipídica impermeável a água. Este glicolípido está acondicionado na célula como corpos lamelares membranosos (ou grânulos e cobertura membranosos). Os corpos lamelares, são produzidos por uma via intracelular da qual participa o aparelho de Golgi, sendo em seguida descarregados no espaço intercelular pelas células do estrato granuloso. O

glicolípido se espalha de modo a encher o espaço intercelular, formando uma barreira para a água (Ross, 1993).

Esse conjugado (glicolípido) foi identificado como composto por esfingosinas 1-(3'-O-acil)- β -D-glucosil-N-(omega-hidroxyacil), que contém 30 a 32 carbono-hidroxiácidos como amidas, e ácido linoléico esterificado como glicose. Esse conjunto de moléculas agregadas ao ácido graxo melhoram a capacidade de ação da barreira contra a difusão de água (Wertz & Downing, 1982). A maioria dos lipídios da lamela lipídica do estrato córneo é formada por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. Podem ser identificadas cerca de seis subclasses de ceramidas, que variam dependendo da espécie, local ou patologia, evidenciando, desta forma, a importância de se caracterizar a organização das ceramidas que compõem as lamelas do estrato córneo (Bouwstra et al, 1999).

A cor da pele é devida à pigmentação da epiderme. O principal deles é a melanina, um produto dos melanócitos. Os melanócitos são células que se originam das cristas neurais do embrião e invadem a pele entre a 12^a e a 14^a semanas de vida intra-uterina (Junqueira, Carneiro, 10ed., 2004). Os melanócitos são células arredondadas, com prolongamentos dendríticos longos, localizadas principalmente no estrato basal. Estas células não têm ligações desmossômicas com os queratinócitos vizinhos, e seus numerosos prolongamentos dendríticos se estendem pelas duas camadas inferiores da epiderme (Ross, 1993). Os melanócitos representam a segunda maior população de células da epiderme, cerca de 1 a 2%, entretanto a população de queratinócitos, o maior grupo de células, é de 95% do total da população de células da epiderme (Reedy et al, 1998; Yaar & Gilchrist, 2001).

O sistema pigmentar da pele é baseado em dois tipos celulares: melanócitos e queratinócitos, interagindo como uma unidade funcional. A atividade desta unidade é a determinação da cor da pele. Desta forma, aparentemente, os queratinócitos, assim como recebem a melanina, podem também regular tanto o crescimento quanto a diferenciação dos melanócitos (Romero-Graillet et al, 1996). Os melanócitos produzem melanina por um processo que implica a transformação da tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA), pela enzima tirosinase e a subsequente transformação da DOPA em

melanina (melanização dos melanossomas). Esse processo de formação ocorre em corpos membranosos chamados melanossomas, derivados do aparelho de Golgi. Os melanossomas maduros são transferidos para os queratinócitos através da passagem dos prolongamentos dendríticos. Este tipo de transferência célula-a-célula é chamado de secreção citócrina. Nos indivíduos de raça branca, a melanina é degradada por atividade lisossômica dos queratinócitos. Na pele dos indivíduos de raça negra, os melanossomas são mais estáveis. O bronzeamento após a exposição à luz solar é devida à produção de melanina (Ross, 1993).

Tão importante quanto discutir sobre as células componentes da epiderme da pele é descrever a matriz extracelular. É amplamente discutido na literatura que o micro-ambiente o qual a célula se insere fortemente influencia seu comportamento. Enzimas proteolíticas influenciam a maturação do estrato córneo e sua função como barreira protetora. Apesar disso, as proteases envolvidas na fisiologia do estrato córneo ainda não foram totalmente caracterizadas.

Este estudo limitou-se em estudar a região da derme mais próxima à junção com a epiderme. Esta região, conhecida como derme papilar apresenta limitação extremamente irregular, quando observada ao microscópio óptico. Cortes de pele, perpendiculares à superfícies, revelam numerosas protusões digitiformes de tecido conjuntivo, chamadas de papilas dérmicas. Estas papilas projetam-se para a superfície inferior da epiderme, situada acima e são complementadas por uma série de projeções ou evaginações epidérmicas semelhantes chamadas cristas epidérmicas ou cristas interpapilares, que se projetam para a derme (Ross, 1993). A camada papilar, é constituída por tecido conjuntivo frouxo. Localiza-se imediatamente sob a epiderme e é separada desta pela lâmina basal (Colágeno Tipo I e III) (Messenger et al, 1991). Trata-se de camada relativamente fina, que se estende até as papilas e cristas dérmicas (portanto, sendo parte constitutiva delas). Contém vasos sangüíneos responsáveis pela irrigação da epiderme, mas não entram em contato direto. Contém também prolongamentos nervoso; alguns deles terminam na derme e outros penetram na lâmina basal para entrar no compartimento epitelial.

Para reforçar a inserção da epiderme ao tecido conjuntivo subjacente, as células basais da epiderme apresentam os hemidesmossomas, ao longo da

membrana celular basal da célula basal (Ross, 1993). Os hemidesmossomas são sítios de adesão celular que conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto de queratina. Tem a capacidade de transmitir sinais da matrix extracelular ao interior das células basais. Essa transmissão pode modular a organização do citoesqueleto, proliferação, apoptose e diferenciação por meio de sítios de fosforilação das fosfoproteínas que constituem os hemidesmossomos (e desmossomos) ainda não profundamente conhecidos (Mirjam & Roel, 1999).

A matriz extracelular da derme se apresenta como um amálgama complexo composto por membros de diversas famílias de proteínas, que definem a integridade da estrutura e diversas funções fisiológicas. A família mais abundante é a do colágeno, sendo mais de 20 tipos identificados até o momento. O colágeno está diretamente envolvido na formação das redes fibrilares e microfibrilares da matriz extracelular, membrana basal, assim como outras estruturas da matriz. A expressão específica e síntese das proteínas estruturais (fibrilas, microfibrilas, colágeno, glicoproteínas) definem as características fisiológicas dessa matriz (Green & Jones, 1996).

Importantes proteínas envolvidas na regulação da matriz extracelular são as metaloproteinases (MMPs). Evidências sugerem que as MMPs participam ativamente no processo de invasão e metástase dos tumores, pois os primeiros membros das famílias das MMPs foram identificados em culturas de células de linhagens tumorais. A colagenase tipo IV (presente em abundância na derme papilar), conhecida atualmente por gelatinases A e B assim como PUMP-I, são sintetizadas por células normais sob condições associadas ao remodelamento fisiológico. A diferença entre a produção das enzimas em condições fisiológicas ou neoplásicas pode ser referida ao fato de que as enzimas das células tumorais podem estar super-expressas ou podem estimular a produção de fator de crescimento autócrino. As células tumorais também podem ser responsáveis pela sinalização das células e da matriz do hospedeiro que podem regular negativamente a expressão das MMPs das células normais, podendo desta forma supor que as MMPs são tumor-dependentes (Gelse et al, 2003).

Na Tabela 7 está descrito o resultado da classificação dos espectros de Pele Normal por tipo histológico. Esta tabela descreveu a localização onde foram

coletados os espectros, dessa forma possibilitando identificação da estrutura celular. Esta descrição foi possível pois o mapeamento espectral realizado teve o cuidado de nomear os espectros em função de seu posicionamento. Baseando-se na descrição teórica e das lâminas histológicas deste estudo, os espectros concentrados na região entre a superfície (0 μm) e 10 μm são referentes às estruturas da epiderme; entre 10 μm e 20 μm , os espectros de epiderme (camada basal) e derme papilar; e entre 20 μm e 30 μm , os espectros referentes à derme papilar.

O *Cluster 1* expressou um componente presente na maioria das células da epiderme: a queratina, embora também tenha havido influência de pigmentação melânica (melanócitos e queratinócitos). O *Cluster 2* (manual) apresentou espectros entre 0-20 μm de profundidade, igualmente distribuídos; quando pré-processados automaticamente, com artefatos minimizados, a distribuição destes espectros foram distribuídas nas duas camadas mais profundas (10-30 μm). Pode, desta forma, ser sugerido que estes espectros sejam representantes dos melanócitos, pois quando sob influência da melanina (manual) se confundiam com os queratinócitos com melanossomas, e sem a influência da pigmentação (automático) foram alocadas adequadamente nos estratos mais profundos epiderme (camada basal) em contato com a derme papilar. De maneira análoga a explicação do *Cluster 2*, o reposicionamento dos espectros no *Cluster 3* em função aos dois tipos de pré-processamento foi influenciado pela presença (manual) e ausência (automático) da influência da melanina. No *Cluster 3* (manual), os espectros se concentraram nas camadas mais profundas; no *Cluster* (automático), os espectros se posicionaram igualmente nas três camadas determinadas. Esse comportamento sugere que estes espectros sejam referentes aos queratinócitos e distribuíram-se uniformemente por essa camada. No *Cluster 4* caracterizou a camada de 20 a 30 μm sob as duas rotinas de pré-processamento, podendo se considerar que este cluster agrupou aspectos referentes à estruturas do tecido conjuntivo, como por exemplo, o colágeno (Figuras 34 e 35).

Para os espectros de Pele Normal (sob os dois tipos de pré-processamento) as mesmas bandas Raman foram encontradas, no entanto,

apresentando intensidades diferentes: a região entre 1290 e 1490 cm^{-1} , onde ainda se destacou o pico em 1440 cm^{-1} e as bandas centradas em 1260 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1770 cm^{-1} . Esses modos vibracionais podem ser atribuídos ao conteúdo bioquímico presente na epiderme e derme, sendo, principalmente colágeno, elastina, queratina e lipídios. As regiões espectrais entre 1200 a 1300 cm^{-1} (Triptofano, Fenilalanina e Amida III em proteínas) e 1440 cm^{-1} (vibração CH_2 em proteínas e lipídios) apresentaram diferenças de intensidade em relação aos estratos da pele. O pico em 1650 cm^{-1} referente à proteínas (Amida I), lipídios e água, assim como o pico em 1550 cm^{-1} (Triptofano) se apresentaram menos intensos no tecido de pele normal. Essas diferenças são evidentes variações espectrais em função da profundidade (dos estratos da pele).

A importância de se estabelecer os padrões espectrais de “normalidade” serve de parâmetro de referência para estudo de todas e quaisquer alterações pertencentes ao tecido em questão (Gniadecka et al, 1998). O trabalho desenvolvido por esse grupo estabeleceu e discutiu os principais modos vibracionais da pele humana e seus anexos normais, favorecendo a compreensão das alterações que são encontradas nos espectros das patologias cutâneas. A localização dos modos vibracionais de Amida I e III indicou que a maioria das proteínas manifestou a mesma estrutura secundária (α -*helix*). A posição do modo de estiramento S—S das proteínas revelou a alta estabilidade das pontes de dissulfeto nos cabelos e unhas. A análise dos modos vibracionais dos grupos —CH mostrou que nos cabelos e nas unhas a conformação (*fold*ing = enovelamento) das proteínas está muito bem estruturada, permitindo interação com estruturas adjacentes em pequenos graus. A posição específica dos modos dos lipídios em unha, cabelo e estrato córneo sugeriu uma estrutura cristalina lamelar e ordenada. Na pele normal, os lipídios foram encontrados distribuídos por toda a estrutura. Durante a análise das estruturas dos aglomerados de água, foi revelado que este composto está presente em todos os tecidos analisados.

As proteínas do cabelo e das unhas estão altamente compactadas/enoveladas. A vibração de estiramento da ligação CH das proteínas está representada na região espectral de 2800 a 3000 cm^{-1} (região de alta frequência Raman – não observada neste estudo) e na região de 1425 a 1453 cm^{-1}

(TU, 1986). As bandas de 1425 a 1453 cm^{-1} representam vibração de dobramento em tesoura (δ) da $\delta(\text{CH}_2)$ dos lipídios e dobramento $\delta(\text{CH}_2)\delta(\text{CH}_3)$ das proteínas (Barry et al, 1992; Gniadecka et al, 1998). Na pele, estas bandas foram representadas em $\approx 1447 \text{ cm}^{-1}$ no estrato córneo, no cabelo e na unha; e em toda pele houve deslocamento para $\approx 1451 \text{ cm}^{-1}$.

Embora não tivessem sido observados neste estudo na região espectral entre 1000 e 1200 cm^{-1} , é importante descrever como as diferenças nos modos vibracionais referentes aos lipídios refletem a estrutura analisada. Os lipídios se apresentam mais ordenados no cabelo, na unha e no estrato córneo em relação à pele normal. Com a transição do cristal para a solução, a fluidez de lipídio aumenta e a ordem do empacotamento lateral das cadeias acil diminui, favorecendo o surgimento de uma estrutura mais caótica. A fluidez do lipídio e a sua conformação intramolecular podem ser determinadas por meio da observação da intensidade das bandas na região de 1000 a 1150 cm^{-1} (Gniadecka et al, 1998). No estado cristalino, todas as cadeias têm a conformação trans representadas pela conformação 1066 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} . A liquefação dos lipídios causa a transição para uma estrutura de conformação mais caótica, caracterizada pelo desaparecimento das bandas 1066 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} e o aparecimento da banda em 1100 cm^{-1} . Nos espectros da unha, cabelo e estrato córneo, as bandas de 1066 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} são mais proeminentes, enquanto que no espectro da pele foi dominado pelas bandas em 1100 cm^{-1} . Essas informações implicam que a estrutura é mais ordenada na unha, no cabelo e no estrato córneo, enquanto a fluidez é maior na pele.

A maioria das moléculas de água está conectada a diversos compostos. As vibrações intermoleculares da ligação do Hidrogênio à água incluem as duas bandas de estiramento da ligação OH na região de 2800 a 3400 cm^{-1} (não observada), e a banda de dobramento em $\approx 1645 \text{ cm}^{-1}$. O modo de dobramento é mais fraco que os modos de estiramento, e ainda é obscurecido pela vibração da Amida I em 1650 cm^{-1} . O estiramento simétrico da ligação OH é encontrado na região de 3250 cm^{-1} , enquanto o componente Raman em 3400 cm^{-1} foi apontado ao estiramento assimétrico da ligação OH. Desta forma, pode se estabelecer o

conteúdo de água crescentemente nas estruturas: unha, cabelo, estrato córneo e pele (Gniadecka et al, 1998).

Lyng et al (2007) estudando células epiteliais de diversos tecidos por Espectroscopia Micro-Raman identificou regiões espectrais comuns a esses tecidos. O pico 1004 cm^{-1} , o mais intenso no espectro da fenilalanina, pôde ser atribuído ao modo de vibração de estiramento entre os carbonos do anel fenil. O dipeptídeo Arginina-Lisina foi um novo pico em 1665 cm^{-1} , identificado pelo estiramento C=O da ligação peptídica Amida I. Os espectros das células basais mostraram bandas em 724 , 779 e 1578 cm^{-1} ; características dos ácidos nucléicos; bandas referentes ao glicogênio em 482 (deformação do esqueleto do glicogênio); 849 (deformação aromática CCH); 938 (deformação CCH); 1082 (estiramento CC) e 1336 cm^{-1} (balanço da vibração de CH_3CH_2). No tecido conjuntivo, as bandas referentes ao colágeno em 850 , 940 e 1245 cm^{-1} .

Nos espectros obtidos neste estudo, especialmente nos espectros resultantes da subtração por polinômio de 1º grau, na região entre 1290 e 1490 cm^{-1} (com centro em 1380 cm^{-1}) e a na banda em 1550 cm^{-1} , a presença de melanina pôde ser identificada. Essas características espectrais refletem as bandas D, D', G, G' encontradas no espectro da melanina isolada (do fígado de *Rana esculenta L*), centradas em 1347 , 1407 , 1554 e 1608 cm^{-1} , respectivamente. Esses modos vibracionais podem ser atribuídos ao estiramento do anel aromático da ligação C=C. Mudanças na frequência e largura destas bandas (D e G) podem ocorrer devido ao ambiente biológico quando a melanina é observada nos tecidos, tanto *in vitro* (em tecidos) quanto *in vivo* (Perna et al, 2005).

Nos primeiros resultados em espectroscopia de pele humana, foram discutidas as influências da pigmentação da pele nos espectros. No estudo de Gniadecka et al (1998) foi encontrado que as peles com pigmentação tipo III e IV e cabelos escuros mostraram elevação na região de 1800 a 2300 cm^{-1} , atribuídas ao *background* de fluorescência advindo da forte pigmentação. Entretanto, a maior parte dos componentes das proteínas, dos lipídios e da água mostraram independência a esse fator, quando observados as frequências de seus modos vibracionais.

Esta dúvida levantada propôs o desenvolvimento do estudo de Huang et al (2004) que analisaram a melanina cutânea através da espectroscopia Raman *in vivo*. Neste estudo, foram adquiridos espectros Raman *in vivo* da melanina na pele humana com a utilização de um espectrômetro Raman no infravermelho próximo. Estes espectros foram comparados aos espectros Raman obtidos de eumelanina sintética e natural obtida comercialmente. Nestes espectros foram encontrados dois picos principais, um em 1580 cm^{-1} e outro em 1380 cm^{-1} , que foram interpretados como sendo originários das vibrações de estiramento dos anéis aromáticos e ligação C—C dentro dos anéis aromáticos, e contribuições de vibrações da ligação C—H dos grupos metil e metileno. Através da observação de espectros Raman de melanina coletados *in vitro* de duas fontes sendo nanquim isolado da espécie *Sépie officinalis* (M-2649) e eumelanina sintética DOPA (M-8631), e da identificação das bandas de melanina nos espectros de pele humana de indivíduos voluntários brancos e negros, de cabelo humano e de pelo de gato, concluíram que não existem variações destas bandas nestes tecidos.

A influência dos modos vibracionais Raman da Melanina em qualquer tecido que a contenha aparentemente é a mesma, entretanto, pelo fato de ser um pigmento escuro, a melanina age como um absorvedor de energia (fótons do *laser* de excitação Raman). Essa energia absorvida é capaz de excitar os níveis de energia eletrônicos dessa molécula favorecendo a emissão de fluorescência. A fluorescência emitida pela melanina é capaz de obscurecer os sinais Raman emitidos por qualquer amostra pigmentada, dificultando em parte a análise, pois o gráfico Raman gerado com influência da fluorescência se apresenta com a linha de base bastante deslocada por uma “barriga” de grande intensidade. Desta forma, o diagnóstico diferencial entre os variados tipos de tecidos pigmentados poderiam ser realizados em função das outras bandas que compõem os espectros dos tecidos biológicos, independentemente da influência do sinal (Raman ou autofluorescência) da Melanina. Por essa razão, este estudo teve como proposta comparar dois métodos matemáticos de tratamento do sinal Raman para remoção do *background* de fluorescência.

Os Melanomas encontrados neste estudo foram classificados baseados na clínica e confirmados pela anatomia patológica (Melanoma Acral e Melanoma Nodular). O mais agressivo e potencialmente letal, o melanoma nodular é caracterizado pelo padrão de crescimento vertical, penetrando tanto na camada superior da epiderme quanto abaixo da camada dérmica, representado uma condição com alto potencial de formação de metástases (Barnhill & Mihm, 1993; Elder, 1998). No presente estudo, foram utilizadas somente amostras com progressão vertical, em fase nodular, maiores que 2 mm de espessura. Lembrando, destas amostras foram somente coletadas exatamente do nódulo para que não houvesse comprometimento das avaliações diagnósticas e prognósticas de rotina dos pacientes doadores.

O melanoma lentiginoso acral é uma proliferação superficial melanocítica que promove espessamento irregular localizado na epiderme. Geralmente ocorre na pele glabra das regiões palmares e plantares, e nas regiões ungueais e periungueais, sendo a plantar o local mais comum. O crescimento vertical tumorigênico pode ser anunciado pelo início de um nódulo, com desenvolvimento de ulceração. Entretanto, alguns melanomas acrais podem ser invasivos na profundidade, enquanto permanecem inteiramente planos, porque a camada córnea espessa atua como uma barreira para o crescimento exófito (Lever, Schaumburg-Lever, 1991).

Histologicamente, as lesões são chamadas de “lentiginosas” porque a maioria das células lesionais é isolada e localizada próximo à junção dermoepidérmica, especialmente na periferia da lesão. Usualmente, no entanto, algumas células tumorais podem ser encontradas nas camadas superiores da epiderme, especialmente perto das áreas de invasão nos centros das lesões. No centro destas lesões, a atipia citológica severa uniforme é de fácil evidência. Pode haver um infiltrado linfocítico liquenóide que pode obscurecer em grande parte a junção dermoepidérmica e, em alguns casos, isso pode ser tão intenso a ponto de simular um processo inflamatório. Na maioria das lesões, são observadas tanto células tumorais fusiformes quanto arredondadas, e em muitos casos, células dendríticas pigmentadas são proeminentes. A pigmentação é muitas vezes pronunciada, resultado da presença de melanófagos na derme

superior e de grandes agregados de melanoma no *stratum corneum* largo (Lever, Schaumburg-Lever, 1991).

O melanoma nodular, por definição, contém apenas crescimento vertical tumorogênico. A lesão começa como uma pápula variavelmente pigmentada que aumenta de tamanho muito rapidamente para se tornar um nódulo que muitas vezes ulcera. Os critérios ABCD não se aplicam aos melanomas nodulares, os quais muitas vezes são pequenos, simétricos e bem circunscritos. Eles podem ser conspicuamente pigmentados, oligomelanóticos ou amelanóticos. Quando outros fatores de risco, tais como a espessura são controlados, o prognóstico do melanoma nodular não é pior que o de outras formas de melanoma (Lever, Schaumburg-Lever, 1991).

Histologicamente há crescimento contíguo de melanócitos uniformemente atípicos na derme, formando uma massa tumoral muitas vezes assimétrica. A assimetria é geralmente aparente ao nível citológico com variação no tamanho, forma e pigmentação celulares e na disposição da resposta do hospedeiro, tal que uma metade da lesão não é uma imagem em espelho da outra metade. Todavia, a silhueta da lesão inteira pode ser bastante simétrica em um melanoma nodular, em virtude da ausência de um componente adjacente. Há um infiltrando linfocitário variável em torno da base ou no interior do tumor. A epiderme freqüentemente está ulcerada, ou há uma escama-crosta aderente. Em um melanoma nodular, a penetração pagetóide da epiderme por células tumorais é limitada à porção sobrejacente ao tumor dérmico e, em alguns casos, o comprometimento epidérmico pode ser inteiramente limitado em grau. Por essa razão, o melanoma nodular pode ser difícil ou impossível de distinguir de um melanoma metastático de pele e, quando o tumor é amelanótico, a distinção de outras malignidades pode exigir imunohistoquímica (Lever, Schaumburg-Lever, 1991).

Diversos estudos concordam que o melanoma cutâneo é um dos cânceres que apresentam mais metástases nos humanos. A capacidade dos melanócitos malignos de invadir a matriz extracelular e outros tecidos, se deve ao repertório particular dos receptores de adesão. Diversas integrinas são expressas pelos melanomas, onde é destacado o receptor de vitronectina. Essa molécula de

adesão habilita as células do melanoma a se conectarem a uma grande variedade de componentes da matriz extracelular que contenham a seqüência Arg-Gli-Asp (Cheresh, 1991).

Na Tabela 8 estão organizados os resultados obtidos pelo algoritmo PCA seguido por CLA aplicados aos espectros de Melanoma Cutâneo, para os dois tipos de pré-processamento. Incluiu-se a descrição histopatológica em função dos agrupamentos obtidos. Diferentemente da Pele Normal, os espectros do Melanoma Cutâneo foram distribuídos de acordo com o tipo histológico descrito para cada paciente, apesar de terem também sido mapeados e nomeados em função de seu posicionamento.

O *Cluster 1/2* (manual/automático) foi em sua maioria composto por queratina contendo alguns pontos com pigmento, sugerindo um melanoma acral lenatiginoso. O sinal Raman da queratina influenciou fortemente que esses espectros fosse alocados separadamente. O *Cluster 2* (manual, subdivididos em três *clusters* no pré-processamento automático) foi composto pelos espectros de estruturas com intensa pigmentação. Quando aplicado o pré-processamento automático, essa influência foi minimizada, subdividindo estes espectros em três grupos separados pela presença de forte pigmentação por hemossiderina e presença de intenso infiltrado inflamatório, tecido adiposo e necrose e colágeno altamente condensado (intensa fibrose) e tecido inflamatório. A soma dos espectros do *Cluster 3* e *Cluster 4* (manual) se referem aos espectros de um melanoma amelanótico. Independentemente do pré-processamento utilizado, esta amostra foi separada das demais, evidenciado a forte influência da pigmentação nos espectros e a importância de saber caracterizá-los. Nas Figuras 36 e 37 podem ser observados os gráficos de *Box Plot* representado a distribuição dos espectros do grupo Melanoma Cutâneo em função dos *Clusters*. A Figura 36 representa o pré-processamento manual e a Figura 37, o automático. É importante notar, quando se observam juntamente as figuras comparando os *clusters* similares, que a maioria dos caracteres espectrais foram também mantidos.

As características espectrais encontradas para o grupo Melanoma (independentemente do tipo de pré-processamento) se mostraram mais evidentes

na região entre 1290 e 1490 cm^{-1} , onde ainda se destacou o pico em 1440 cm^{-1} , onde a variação entre os espectros se mostrou muito intensa; e nas bandas centradas em 1260 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1770 cm^{-1} , da mesma forma que na Pele Normal. Na região de 1260 cm^{-1} a mediana não se mostrou muito evidente, porém, houve muita variação entre os espectros, identificando que essa região, que bioquimicamente infere a presença de Triptofano, Fenilalanina e Amida III em proteínas, está alterada em algumas estruturas encontradas nos tecidos de melanoma deste estudo: tecido inflamatório, colágeno e queratina. A banda em 1440 cm^{-1} , referente à vibração CH_2 em proteínas e lipídios, apresentou diferenças de intensidade marcantes, possivelmente em relação aos diferentes tipos celulares descritos para o Melanoma Cutâneo (Nodular), como por exemplo tecido inflamatório, colágeno, queratina, tecido adiposo e tecido necrótico. O pico em 1550 cm^{-1} (Triptofano) se apresentou de mesma intensidade que no tecido normal, quando observada a mediana, mas as variações apresentaram grande diferença de intensidade. O pico em 1650 cm^{-1} referente à proteínas (Amida I) e lipídios, mostrou maior intensidade em relação ao tecido de pele normal, descrito anteriormente, inclusive maior variação entre os espectros. Ainda neste grupo, a região entre 1290 e 1490 cm^{-1} (com centro em 1380 cm^{-1}) e a banda em 1550 cm^{-1} identificam a presença de melanina. As mesmas características espectrais apareceram refletindo as bandas D, D', G, G' encontradas no espectro da melanina isolada, centradas em 1347, 1407, 1554 e 1608 cm^{-1} , respectivamente.

A aplicação da técnica Micro-Espectroscopia Raman para classificação dos espectros de melanoma e lesões pigmentadas é ainda escassa na literatura. No entanto, os trabalhos existentes são reveladores em relação aos vieses experimentais.

Tfayli et al (2005) utilizaram a Espectroscopia FT-IR para caracterizar e classificar pele normal, nevo pigmentado e melanoma. Embora a técnica utilizada para aquisição dos espectros nesse estudo não tenha sido a mesma do trabalho de Tfayli et al (2005), é importante, a título informativo, que os resultados sejam aqui relatados mais detalhadamente, pois neste trabalho os autores conseguiram discriminar os espectros por meio dos modos vibracionais de suas importantes

biomoléculas: DNA e melanina. Os modos vibracionais das macromoléculas biológicas representadas pelos espectros Raman e IR são próximos por essas técnicas serem complementares entre si, podendo ser estabelecida uma relação comparativa entre os resultados. Neste estudo, o resultados das associações histológicas em relação aos grupos espectrais foram muito parecidos com o de Tfayli et al (2005). Entretanto, como detalhado a seguir, Tfayli et al não consideraram os sinais espectrais da queratina para classificação dos espectros de Melanoma e Nevo pigmentado, prejudicando o método aplicado.

Short et al (2006) em estudo preliminar de imagens Micro-Raman de células cutâneas normais e malignas, abrangendo a região de deslocamento Raman de 200 a 4000 cm^{-1} caracterizaram melanócitos e queratinócitos. A resolução espacial utilizada foi de 0,5 μm obtida de fragmentos de biópsias de pele montados em janelas de BaF_2 de baixa fluorescência. Os espectros Raman do DNA, do RNA, dos lipídios, das proteínas e da melanina purificada foram obtidos, analisados e comparados aos espectros das células cutâneas com o objetivo alvo de compreender como os componentes estão distribuídos sobre as células, e como a distribuição muda entre células diferentes. Por meio da técnica de Análise Discriminante Linear foi possível classificar os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo, subdivididos nos respectivos tipos histológicos no confronto par-a-par (normal *versus* maligno). Foram encontrados os picos intensos centrados em 1450 e 1670 cm^{-1} , atribuídos aos modos vibracionais CH_2 (lipídios) e Amida I (proteínas), respectivamente. Os modos vibracionais entre 1200 e 1300 cm^{-1} foram atribuídos as vibrações da Amida III; entre 850 a 950 cm^{-1} à vibração do *backbone* das proteínas. Os aminoácidos fenilalanina e tirosina contribuíram com o modos vibracionais em 623, 644, 1002, 1031 e 1600 cm^{-1} .

Lyng et al (2007) caracterizaram carcinomas. Encontraram algumas diferenças espectrais comparando os tecidos normais aos carcinomas. As bandas de glicogênio em 482, 849 e 938 cm^{-1} desapareceram nos carcinomas, assim como houve diminuição do pico 1082 cm^{-1} . Os espectros dos carcinomas apresentaram bandas mais proeminentes em 724, 779 e 1578 cm^{-1} e novas bandas em 829, 852, 1002, 1098 e 1240 cm^{-1} referente aos aminoácidos.

Também foram encontradas bandas distintas em 1366 cm^{-1} , 1484 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} , além do aumento da intensidade da banda Amida I (1655 cm^{-1}).

Embora Nijssen et al (2002) quando avaliou espectros de BCC não relatou alterações da derme circunvizinha ao tumor, no presente estudo, observou-se mudanças nos espectros em relação à intensidade e à forma das bandas relacionadas às proteínas. Short et al (2006) descreveu que os espectros da derme coletados em sítios distantes aos tumor foram indistinguíveis daqueles espectros do colágeno ou da elastina dos tecidos normais. Frushour & Koenig (1975) estudou as diferenças entre os espectros Raman de colágeno, gelatina e elastina. As diferenças encontradas entre o colágeno e o colágeno termicamente desnaturado (gelatina) foi um aumento do pico em 940 cm^{-1} e uma redução do pico em 1210 cm^{-1} . No entanto, eles não mostraram alterações significativas à pico próximo de 1270 cm^{-1} , diferentemente do presente estudo que mostrou alterações significativas deste pico, principalmente no tecido maligno. Frushour & Koenig (1975) propuseram que o pico de 1270 cm^{-1} estivesse relacionado ao modo vibracional da Amida III em regiões pobre de cadeias α -helix do aminoácido prolina, que não são afetadas pelas transições terminais do colágeno/gelatina (que ocorrem à 37°C). As alterações do colágeno nos tumores são conhecidas, pois é sabido que o colágeno é degradado em várias fases pela ação das colagenases secretadas por células malignas (Harris et al, 1972; Harris et al, 1974; Pilcher et al, 1997; Varani et al, 2000; Chung et al, 2004). Por essa razão, sugere-se que os espectros (ou modos vibracionais relativos) de colágeno encontrados no presente estudo (no grupo Melanoma Cutâneo), estivessem representando o colágeno em estágio mais avançado de degradação. Porém, mais trabalhos são necessários para se confirmar esta hipótese. (Short et al, 2006).

De acordo com Lieber et al (2008) existem uma grande disparidade entre os espectros de Melanoma, de carcinomas não-melanocíticos e de tecidos normais. Portanto, de forma esperada, os espectros Raman são mais sensíveis à pigmentação em relação às variações espectrais das sutis diferenças bioquímicas entre estes tecidos. Esta observação reforça o argumento para o desenvolvimento de uma técnica de medidas Raman resolvida em profundidade (no caso do

trabalho de Lieber et al (2008)) e da abordagem de caracterização celular ponto-a-ponto e submissão a dois tipos de pré-processamento desenvolvidos pelo presente estudo. Essas abordagens tiveram por finalidade entender o efeito das variações inerentes ao pigmento sobre as alterações espectrais que seriam a base de diagnóstico.

Por essa razão, no presente estudo os espectros tiveram a linha de base corrigida de duas formas: manualmente, sendo realizada por meio da subtração do *background* (de fluorescência) por um polinômio de 1º grau (reta); e automaticamente, sendo realizada por meio de um polinômio de 5º grau. Finalizados esses procedimentos, tanto manualmente quanto automaticamente, todos os espectros foram normalizados vetorialmente. A diferença entre a subtração do *background* para correção de linha de base por meio de polinômios de 1º e 5º graus se refere a remoção da influência da fluorescência da pigmentação melânica nos espectros Raman. Pelo polinômio de 1º grau manteve-se nos espectros a influência da melanina, gerando contudo alguns artefatos, e pelo polinômio de 5º grau esta influência da fluorescência foi removida, sendo criados alguns artefatos experimentais e exaltando as características singulares dos espectros Raman.

A autofluorescência ou autoluminescência é o principal artefato que influencia a maneira na qual os dados são apresentados. A autofluorescência é reflexo da excitação e da emissão de energia de alta intensidade por componentes absorvedores intrínsecos da amostra analisada. No caso da pele normal e, principalmente, do melanoma, o principal componente absorvedor é a melanina, que emite um sinal de fluorescência bastante intenso que quase inviabiliza a visualização das bandas Raman. A autoluminescência emitida pela melanina e a melhor maneira de evitá-la e/ou removê-la sem alterar os espectros Raman são objetos de estudo de vários grupos mundialmente, e neste estudo foram discutidas as influências deste processamento frente às análises de classificação e validação dos espectros. A dúvida ainda reside na potencialidade de informação da melanina frente à possibilidade de diagnóstico do melanoma cutâneo em relação a outras doenças de pele (pigmentadas ou não). Por essa

razão, neste estudo foram realizadas as análises de classificação e de validação sob os resultados dos dois tipos de pré-processamento dos dados.

Em trabalho publicado por Afseth et al (2006), onde foram estudadas algumas possibilidades de pré-processamento dos espectros Raman de tecidos biológicos, foi discutido principalmente a importância da efetividade do método escolhido para obtenção de um resultado robusto e com informação quantitativa para ser avaliado. Foi sugerido que os métodos de correção de linha de base fossem aplicados antes dos métodos de normalização. No presente trabalho, concordando com o trabalho de Afseth et al (2006), foi utilizado o método de normalização da intensidade total (*total intensity normalization*) depois de uma adequada correção de linha de base (Afseth et al, 2006). Em contrapartida, Tfayli et al (2005) e Lyng et al (2007), para o pré-processamento dos dados, utilizaram a região espectral de 800 a 1440 cm^{-1} e os espectros foram normalizados de 0 a 1 em relação ao pico máximo. Entretanto, normalizar os espectros na banda de Amida I é considerar que esse conteúdo é idêntico em cada coleta.

Finalizados os procedimentos de pré-processamentos dos dados espectrais, o conjunto de dados já está pronto para ser analisado. Inúmeros algoritmos de classificação podem ser elaborados com as ferramentas de análises multivariadas existentes. A exemplo, a Análise dos Componentes Principais (PCA) é geralmente utilizada para reduzir o número de parâmetros necessários para representar a variância em um conjunto de dados espectrais, ou seja, resolver um conjunto de dados espectrais em alguns componentes principais e poder desta forma identificar e isolar as informações importantes do conjunto de dados.

As análises de classificação dos espectros é um assunto à parte, pois, dependendo do objetivo proposto pelo trabalho, podem ser escolhidas diferentes ferramentas de análise. Em contrapartida, frente às inúmeras possibilidades de análises, existe o início de um consenso sobre a necessidade de se aplicar metodologias de análises multivariadas, que, em princípio, favoreçam a redução dos dados espectrais evidenciando características importantes dos dados para futura classificação, e que a classificação proposta seja avaliada por outro método estatístico.

Para esta etapa, a PCA, CLA e LDA, sub-rotinas do software Minitab®15.1.0.0. I, foram aplicadas ao conjunto de espectros. Estas técnicas estatísticas multivariadas são conhecidas por serem ferramentas poderosas de análise de dados com muitas variáveis que contêm grande população de padrões individuais. Em particular, o PCA tem provado ser uma ferramenta valiosa para a redução efetiva de dados através da descoberta de padrões espectrais que revelam as principais características do conjunto analisado.

Tfayli et al (2005) utilizaram para a classificação dos espectros a Análise de Clusterização Hierárquica (HCA) por meio do software do próprio espectrômetro IR, o OPUS (Bruker Optik GmbH, Alemanha). HCA propõe o agrupamento dos espectros por similaridade, por meio do cálculo da Distância Euclidiana entre o conjunto de espectros analisados. O resultado deste processo pôde ser visualizado em um “diagrama de árvore”, conhecido como Dendrograma, apresentando um reagrupamento dos espectros em clusters de acordo com escala de heterogeneidade. As distâncias interespectrais foram primeiramente calculadas por meio da primeira derivada da banda normalizada Amida I, e posteriormente por outras combinações de regiões espectrais. As distâncias intra-grupamentos foram asseguradas pelo algoritmo de Mínima Variância de Ward (Tfayli et al, 2005)

Lyng et al (2007) construíram as matrizes com os espectros normalizados (software Excel 2003, v. 11.0), antes de serem exportados para o *software* Minitab para desenvolver a Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante Linear (LDA). O *software Minitab Release 14.1 Statistical Software Analysis Programme* foi utilizado para produzir os escores do PCA e LDA, assim como desenvolver a validação *leave-one-out* da classificação proposta. Neste trabalho, o algoritmo de avaliação foi repetido para todos os 498 espectros obtidos. Dentre todos os espectros, 492 foram corretamente classificados com normal, carcinoma invasivo ou NIC. O teste de validação cruzada classificou erroneamente seis espectros, sendo dois normais que foram classificados como carcinoma invasivo; quatro foram tanto carcinoma invasivo quanto NIC tendo classificações invertidas. O importante é que nenhuma amostra patológica foi classificada como normal. Baseado na validação cruzada, os valores de

sensibilidade e especificidade calculados foram de 99,5 % e 100 % respectivamente para o tecido normal; 99 % e 99,2 % respectivamente para o NIC; e 98,5% e 99% respectivamente para o carcinoma invasivo. Lyng et al (2007) apontaram que esses valores otimistas ocorreram devido à aplicação do método LDA com a validação cruzada *leave-one-out*.

No presente estudo, os espectro de Pele Normal e Melanoma Cutâneo submetidos à rotina de pré-processamento manual foram classificados corretamente na Opção 1 (Cluster 1 do MC *versus* Cluster 2 do PN, ou seja, Melanoma acral lentiginoso, com muita queratina pigmentada (MC) *versus* melanócitos pigmentados) em 86,1 % dos casos, com 83,3 % de sensibilidade e 91,7 % de especificidade; Opção 2 (Cluster 2 do MC *versus* Clusters 4 e 1 do PN, ou seja, Melanoma com alta pigmentação *versus* epiderme e tecido conjuntivo da Pele Normal), classificados corretamente 72,11 %, com 93,2 % de sensibilidade e 54,8 % de especificidade; Opção 3 (Clusters 3 e 4 do MC *versus* Cluster 3 do PN, ou seja, melanoma amelanótico com queratinócitos normais), classificados corretamente 58,5 %, com 39,1 % de sensibilidade e 73,3 % de especificidade. Para a rotina de pré-processamento automático, os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo foram classificados da seguinte forma: na Opção 1 (*Cluster 1* do MC *versus Cluster 3* do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e pigmentação por hemossiderina (MC) *versus* queratinócitos normais (PN)) foi possível classificar com exatidão os espectros (100 % de sensibilidade e 100 % de especificidade); na Opção 2 (*Cluster 2* do MC *versus Cluster 2* do PN, ou seja, melanoma acral lentiginoso (alta concentração de queratina) (MC) *versus* melanócitos normais (PN)) foi possível classificar corretamente 83,3 % (95,8 % de sensibilidade e 70,8 % de especificidade); na Opção 3 (*Cluster 3* do MC *versus Cluster 1* do PN, ou seja, melanoma com tecido adiposo e necrótico (MC) *versus* epiderme da pele normal (PN)) foi possível classificar corretamente 68,8 % (77,4 % de sensibilidade e 60,6 % de especificidade); na Opção 4 (*Cluster 4* do MC *versus Cluster 4* do PN, ou seja, melanoma com intenso infiltrado inflamatório e fibras colágenas abundantes (MC) *versus* colágeno normal derme (PN)) foi possível classificar corretamente 97,9 % (98,6 % de sensibilidade e 97,4 % de especificidade).

Tfayli et al (2005) encontraram três zonas espectrais: 3050 a 3360 cm^{-1} , 1485 a 1800 cm^{-1} e 800 a 1440 cm^{-1} , referentes aos modos vibracionais Amida I e Amida III. Para distinguir os espectros da epiderme do nevo e do melanoma, HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) foi aplicado na região espectral de 800 a 1440 cm^{-1} , sem a janela entre 1370 a 1385 cm^{-1} (referente à parafina). Primeiramente, o algoritmo HCA levou à classificação dos espectros da epiderme em dois clusters, mas sem qualquer agrupamento dos espectros das mesmas amostras: o primeiro cluster correspondeu às secções fixadas no substrato de ZnSe com albumina diluída em água, e o segundo grupo às secções fixadas com água destilada, evidenciando a forte influência do *background* nos espectros. Diferentemente do ocorrido no presente estudo onde nenhum produto de fixação foi utilizados nas amostras que foram utilizadas nas medidas Micro-Raman. Desta forma, Tfayli et al (2005) precisaram eliminar a contribuição no espectro do líquido de fixação. Foram eliminadas (matematicamente) as bandas referentes aos modos vibracionais da albumina (860, 922, 996, 1043, e 1112 cm^{-1}) e mantidas as mais intensas bandas entre 800 a 1440 cm^{-1} : sete bandas foram finalmente retidas para o desenvolvimento do HCA. Como descrito anteriormente, diversos autores ressaltaram a posição dos picos Raman dos tecidos biológicos e suas alterações (de intensidade e deslocamento) em relação ao ambiente inserido (Gniadecka et al, 1998, Gniadecka et al, 2003; Gniadecka et al, 2004; Bitar et al, 2006, Perna et al, 2007; Lieber et al, 2008). Contudo, Tfayli et al (2005) conseguiram que os espectros de cada biópsia fossem classificados no mesmo cluster (seis amostras e seis clusters), independentemente da natureza da lesão (nevo ou melanoma). As sete bandas da região entre 800 a 1440 cm^{-1} promoveram uma boa classificação das amostras, entretanto, a discriminação entre nevo e melanoma não foi satisfatória. Ainda de acordo com Tfayli et al (2005), a discriminação não satisfatória ocorreu porque as duas lesões (nevo e Melanoma) eram originárias dos melanócitos, não afetando a função dos queratinócitos; como consequência, para guiar a classificação entre melanoma e nevo, a queratina não foi considerada na observação das sete bandas. Foram encontradas, todavia, três bandas para queratina: 1222 a 1254 cm^{-1} , 1072 a 1092 cm^{-1} e 1026 a 1036 cm^{-1} .

Sabe-se que os nevos epidérmicos são formações hamartomatosas que têm origem no folheto ectodérmico e mesodérmico e são caracterizados por diferentes tipos de lesões cutâneas. Apresentam-se clinicamente como placas discretamente elevadas, cor da pele ou hiperocrômicas e, na evolução, tornam-se aveludadas e verrucosas (Pavone et al., 1991). Dependendo do tipo celular predominante, queratinócitos ou apêndices cutâneos, darão origem aos diferentes tipos de nevos, ou seja, queratinocítico, sebáceo, comedônico e das glândulas écrinas e apócrinas (Rogers, 1992). No presente estudo, onde uma das amostras de Melanoma Cutâneo apresentou muita queratina (Melanoma Acral) foi possível classificar corretamente em 86 % e 83 % quando comparados com o melanócito normal, no pré-processamento manual e automático respectivamente; os queratinócitos normais quando comparados com um melanoma pigmentado (entretanto sem muita queratina), promoveu neste estudo uma classificação de 100 %.

Finalmente, depois de removerem as regiões referentes à parafina, albumina e queratina, quatro janelas espectrais foram aplicadas para classificação dos nevos e do melanoma: 1390 a 1410 cm^{-1} , 1325 a 1350 cm^{-1} , 1270 a 1290 cm^{-1} e 1200 a 1215 cm^{-1} . Novamente o algoritmo de classificação descrito anteriormente foi aplicado, resultando em três clusters: (i) nevo pigmentado, (ii) e (iii) melanoma cutâneo. As vibrações moleculares associadas às quatro bandas espectrais foram identificadas: duas bandas, 1200 a 1215 e 1270 a 1290 cm^{-1} puderam ser atribuídas às vibrações do grupo PO_2 do DNA; enquanto as bandas 1325 a 1350 e 1390 a 1410 cm^{-1} puderam ser atribuídas à melanina. O mesmo procedimento foi realizado para os espectros da derme, porém sem sucesso de discriminação entre melanoma e nevo, pois houve muita contribuição dos modos vibracionais referentes ao colágeno (1200 a 1290 cm^{-1}) (Tfayli et al, 2005).

No presente estudo, foi possível classificar os espectros de Pele Normal e Melanoma Cutâneo baseados nos espectros referentes ao tecido conjuntivo da derme (Pele Normal) em relação aos Melanomas (inclusive com presença de infiltrado inflamatório, que espectralmente apresentam-se nas mesmas regiões de deslocamento Raman), com 72 % e 97,9 % de acurácia para o pré-processamento manual e automático, respectivamente.

Muitas questões permanecem abertas, como por exemplo, a baixa taxa de classificação correta entre o Melanoma Amelanótico e queratinócitos normais (58 % - Opção 3 do pré-processamento manual). Mesmo as discussões supramencionadas necessitam de mais experimentos para sua fundamentação. Com o conhecimento adquirido no presente estudo, onde foi possível discriminar os espectros Raman referentes à diferentes estruturas histológicas da Pele Normal e do Melanoma Cutâneo (Nodular) julga-se necessária a complementação desse conhecimento com a repetição do experimento com a técnica de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho. Sendo esta a técnica complementar ao Raman, com a vantagem de não apresentar fluorescência, essa abordagem poderá auxiliar na compreensão dos espectros adquiridos, por possibilitar a construção de uma imagem química por meio dos espectros IR adquiridos pontualmente.

7. CONCLUSÕES

Os espectros, os tipos de pré-processamento e os algoritmos de classificação foram viáveis para associação dos tipos histológicos e diagnóstico do Melanoma Cutâneo.

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 8 de fevereiro de 2008.
CEP 1895/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) RENATA ANDRADE BITAR
Co-Investigadores: Aírton Abrahão Martin, Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Diagnóstico do melanoma cutâneo por micro-espectroscopia Raman**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco.

OBJETIVOS: Promover o diagnóstico diferencial do melanoma cutâneo através da espectroscopia óptica micro-Raman em melanócitos, ceratinócitos e células de tecido conjuntivo de pele normal, nevo pigmentado, melanoma cutâneo e metástase linfonodal.

RESUMO: Os pacientes que participarão deste estudo serão atendidos pelo setor de tumores do tegumento, do Departamento de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Serão utilizadas amostras de melanoma cutâneo e linfonodos acometidos com metástase de melanoma. Os tecidos de pele normal e nevo pigmentado foram cedidos pelos pacientes de São José dos Campos. Todas as amostras utilizadas neste estudo serão obtidas de parte da lesão primária e metastática removida durante a cirurgia ressectiva. Serão obtidas 10 amostras, sendo uma amostra coletada por paciente, de cada grupo diagnóstico. Serão constituídos, portanto, 10 amostras de pele normal, 10 amostras de nevo pigmentado, 10 amostras de melanoma cutâneo primário e 10 amostras de melanoma metastático em tecido linfonodal. Imediatamente após a remoção dos tecidos, todas as amostras serão devidamente identificadas e armazenadas em nitrogênio líquido, até o momento da realização da micro-espectroscopia Raman no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da UNIVAP em São José dos Campos. Para investigação comparativa, as lâminas serão coradas com HE e analisadas por um patologista..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico não -invasiva é de crucial importância para a detecção precisa do melanoma maligno cutâneo. A espectroscopia Raman é uma técnica que promove a informação sobre a estrutura molecular da amostra investigada e tem sido utilizada no monitoramento e diagnóstico de patologias in vivo e in vitro. Este estudo visa promover o diagnóstico diferencial de pele normal, nevo pigmentado, melanoma cutâneo e metástase linfonodal, através da espectroscopia de Raman..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados.

TCLE: Apresentado o TCLE dos pacientes que cederão parte das amostras coletadas para diagnóstico..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo.

ANEXO 2 - Consentimento Pós-Informado

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Diagnóstico do Melanoma Cutâneo por Micro-Espectroscopia Raman

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa o desenvolvimento de uma técnica de diagnóstico de lesões pigmentadas de pele, melanoma primário e metastático através da Micro-Espectroscopia Raman. Esta técnica óptica experimental envolve a aquisição de informações sobre a lesão analisada através de um equipamento constituído por um laser que, posicionado sobre a lesão previamente removida do paciente, coleta informações sobre esse tecido sem destruí-lo. Essas informações são processadas por um computador e gerados gráficos de cada tipo de lesão. A partir destes gráficos, as análises serão realizadas.

A coleta das lesões para este procedimento experimental será realizada no momento da cirurgia de remoção da lesão, posteriormente à separação do material necessário para todas as análises recomendadas para promoção de diagnóstico e tratamento da enfermidade. Desta forma, o procedimento para aquisição da amostra será realizado fora do paciente, sem qualquer prejuízo ou desconforto para o mesmo. Não há benefício direto para o participante, pois se trata de estudo experimental.

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 na Instituição. Todas as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. 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.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Renata Bitar, que poderá ser encontrada no endereço Rua Napoleão de Barros, 715. 4º andar. Telefone(s) (11) 5571-6579 / 5576-4118. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 E-mail: cepunifesp@epm.br

Eu, Renata Bitar, assumo o compromisso como pesquisadora principal deste projeto, de utilizar todos os dados e o material coletados somente para esta pesquisa.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Diagnóstico do Melanoma Cutâneo por Micro-Espectroscopia Raman". Eu discuti com o Dra. Renata Bitar sobre a minha decisão em participar nesse 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.

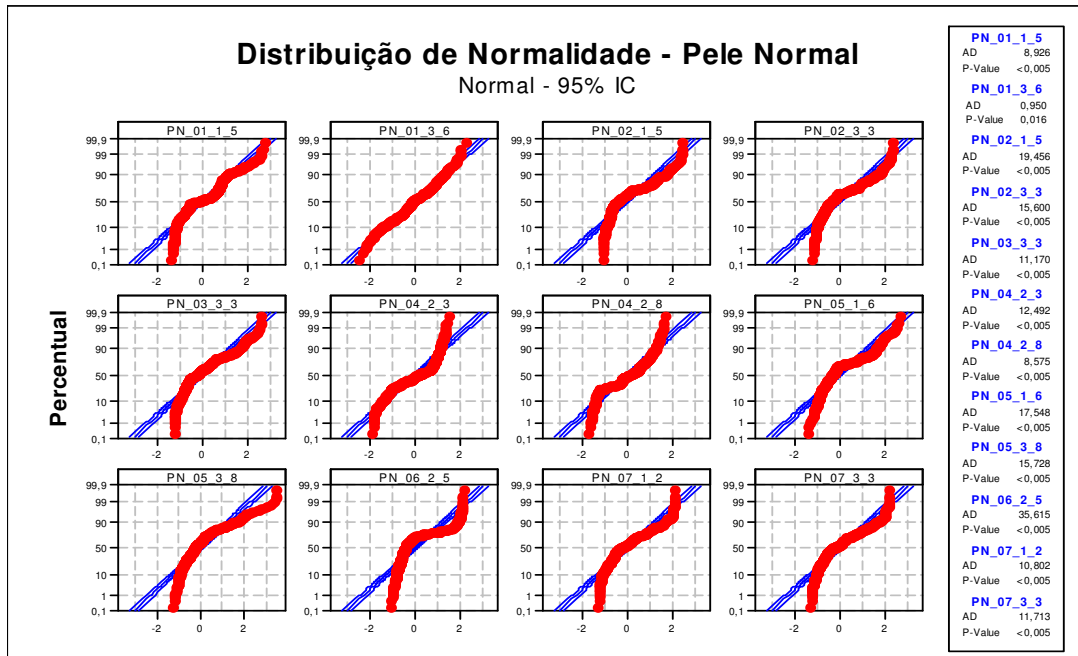
Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

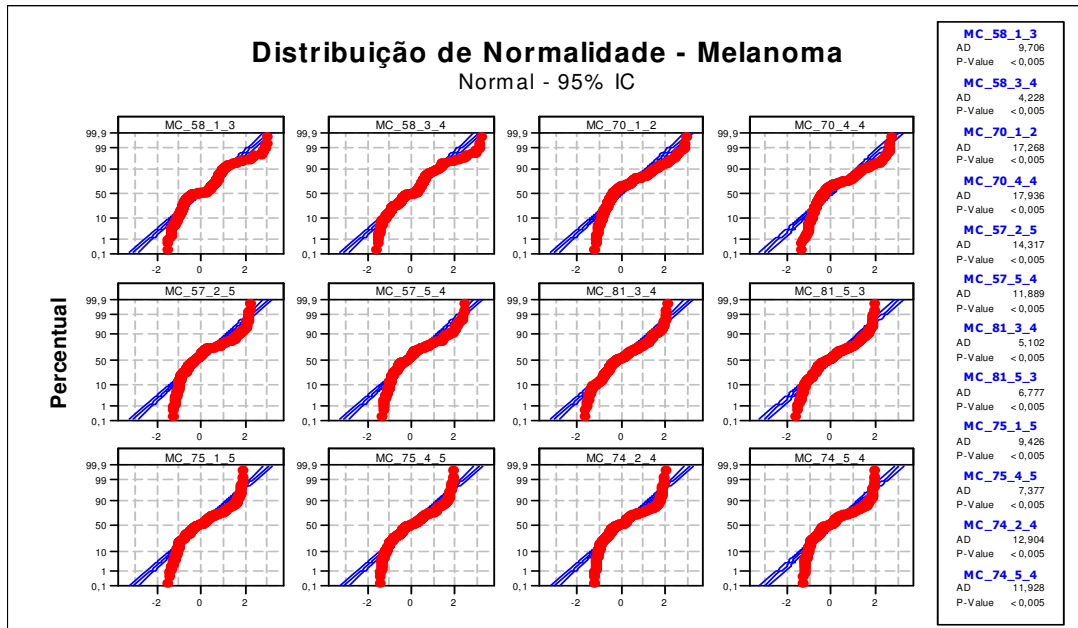
Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

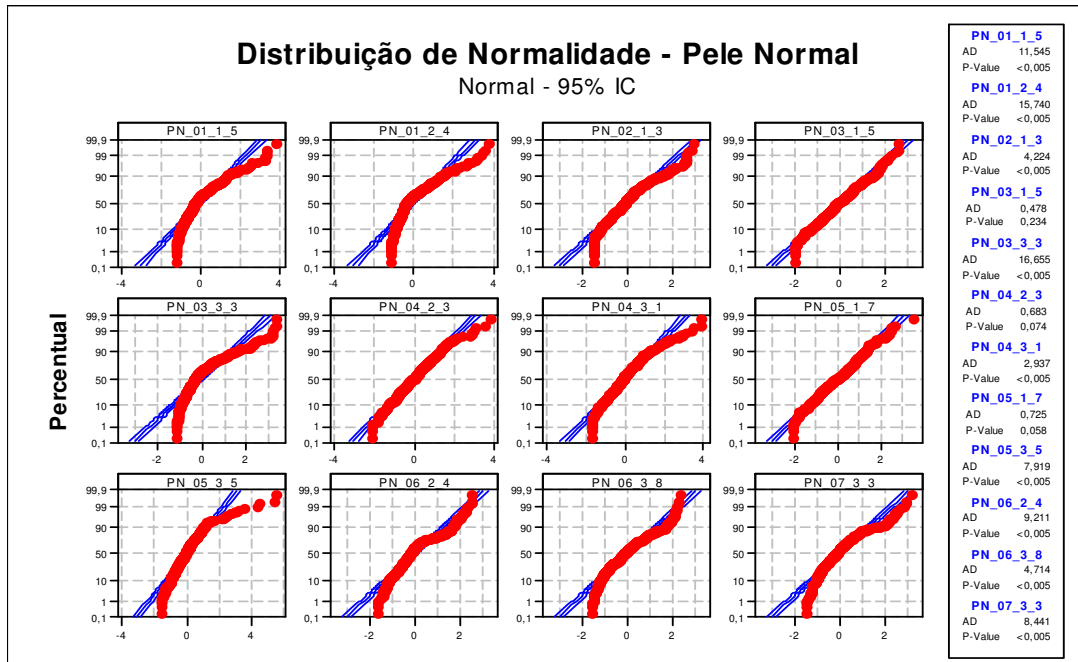
ANEXO 3



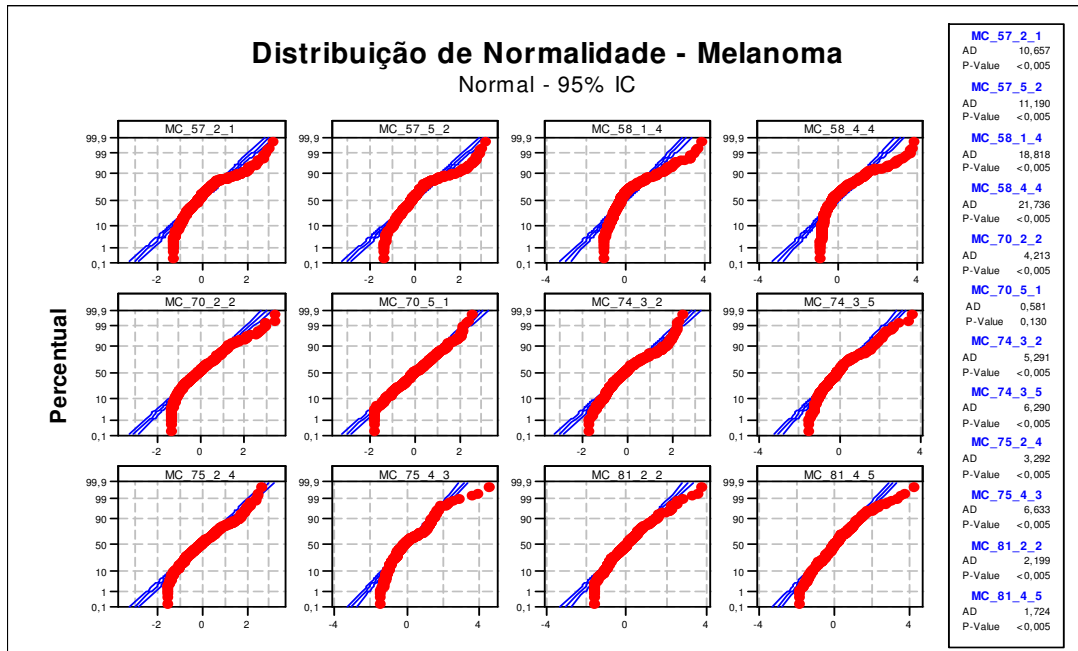
ANEXO 4



ANEXO 5



ANEXO 6



ANEXO 7. Coeficientes das componentes e Clusters do grupo de Pele Normal (pré-processamento manual).

spectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
PN_01_1_1	0,07	0,094	0,104	0,054	1
PN_01_1_2	0,063	0,147	0,063	-0,01	1
PN_01_1_3	0,061	0,174	0,02	-0,014	1
PN_01_1_4	0,058	-0,051	0,234	0,097	2
PN_01_1_5	0,064	-0,054	0,204	0,087	2
PN_01_1_6	0,055	-0,089	0,191	0,11	2
PN_01_1_7	0,061	-0,06	0,216	0,096	2
PN_01_1_8	0,056	-0,058	0,224	0,116	2
PN_01_2_1	0,076	-0,007	0,067	0,084	3
PN_01_2_2	0,078	0,037	0,112	0,066	1
PN_01_2_3	0,06	0,179	0,017	0,007	1
PN_01_2_4	0,054	-0,082	0,235	0,093	2
PN_01_2_5	0,039	-0,118	0,232	0,123	2
PN_01_2_6	0,059	-0,065	0,17	0,076	2
PN_01_2_7	0,073	-0,061	0,153	0,075	2
PN_01_2_8	0,062	-0,068	0,207	0,095	2
PN_01_3_1	0,079	-0,029	0,089	0,017	4
PN_01_3_2	0,073	-0,068	0,081	0,068	3
PN_01_3_3	0,064	0,157	0,073	0,06	1
PN_01_3_4	0,07	0,122	0,087	0,047	1
PN_01_3_5	0,064	0,166	0,026	0,019	1
PN_01_3_6	0,054	0,186	0,04	-0,026	1
PN_01_3_7	0,06	-0,068	0,199	0,132	2
PN_01_3_8	0,062	-0,072	0,205	0,097	2
PN_02_1_1	0,074	0,03	-0,086	0,073	3
PN_02_1_2	0,082	-0,05	-0,029	-0,083	4
PN_02_1_3	0,084	-0,051	-0,002	-0,055	4
PN_02_1_4	0,083	-0,048	-0,026	-0,07	4
PN_02_1_5	0,083	-0,053	-0,018	-0,061	4
PN_02_1_6	0,081	-0,057	0,008	-0,089	4
PN_02_1_7	0,081	-0,064	0,014	-0,074	4
PN_02_1_8	0,081	-0,052	0,018	-0,091	4
PN_02_2_1	0,08	-0,021	-0,089	0,042	3
PN_02_2_2	0,084	-0,039	-0,034	-0,061	4
PN_02_2_3	0,082	-0,056	-0,02	-0,067	4
PN_02_2_4	0,083	-0,049	-0,014	-0,065	4
PN_02_2_5	0,074	-0,083	0,033	-0,065	4
PN_02_2_6	0,079	-0,062	0,007	-0,061	4
PN_02_2_7	0,081	-0,062	0,011	-0,054	4
PN_02_2_8	0,082	-0,054	0,001	-0,064	4
PN_02_3_1	0,079	-0,049	-0,025	-0,104	4
PN_02_3_2	0,081	-0,051	-0,016	-0,087	4
PN_02_3_3	0,079	-0,063	-0,011	-0,071	4
PN_02_3_4	0,084	-0,054	-0,012	-0,045	4
PN_02_3_5	0,076	-0,057	0,041	-0,092	4
PN_02_3_6	0,08	-0,048	0,027	-0,094	4
PN_02_3_7	0,081	-0,048	0,008	-0,087	4
PN_02_3_8	0,075	-0,062	0,058	-0,086	4
PN_03_1_1	0,083	0,059	-0,027	0,048	1
PN_03_1_2	0,085	0,038	-0,008	0,021	1

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
PN_03_1_3	0,078	0,104	-0,033	0,038	1
PN_03_1_4	0,082	0,075	-0,026	0,044	1
PN_03_1_5	0,066	0,164	-0,019	0,027	1
PN_03_1_6	0,085	0,041	-0,028	0,013	1
PN_03_1_7	0,063	0,17	-0,022	0,026	1
PN_03_1_8	0,086	0,037	-0,025	0,006	1
PN_03_2_1	0,084	-0,025	-0,038	0,067	3
PN_03_2_2	0,078	0,072	-0,065	0,074	1
PN_03_2_3	0,047	-0,119	-0,153	0,195	3
PN_03_2_4	0,077	0,115	0,007	0,011	1
PN_03_2_5	0,062	-0,099	-0,123	0,169	3
PN_03_2_6	0,084	-0,024	-0,053	0,068	3
PN_03_2_7	0,082	0,037	-0,058	0,068	3
PN_03_2_8	0,084	0	-0,02	0,066	3
PN_03_3_1	0,078	-0,042	-0,086	0,123	3
PN_03_3_2	0,086	-0,018	-0,017	0,032	3
PN_03_3_3	0,053	-0,101	-0,157	0,187	3
PN_03_3_4	0,085	-0,027	-0,04	0,048	3
PN_03_3_5	0,077	-0,065	-0,079	0,099	3
PN_03_3_6	0,077	-0,054	-0,091	0,091	3
PN_03_3_7	0,074	-0,075	-0,086	0,137	3
PN_03_3_8	0,08	-0,034	-0,091	0,095	3
PN_04_1_1	0,078	0,104	0,026	0,031	1
PN_04_1_2	0,084	0,057	0,03	0,02	1
PN_04_1_3	0,081	0,088	0,02	0,028	1
PN_04_1_4	0,076	0,122	0,028	0,013	1
PN_04_1_5	0,08	0,09	-0,034	0,054	1
PN_04_1_6	0,083	0,075	0,013	0,031	1
PN_04_1_7	0,078	0,112	0,015	0,016	1
PN_04_1_8	0,071	0,146	0,008	0,014	1
PN_04_2_1	0,079	-0,021	0,13	-0,01	4
PN_04_2_2	0,084	0,005	0,06	-0,027	4
PN_04_2_3	0,071	0,148	0,01	0,006	1
PN_04_2_4	0,082	0,051	0,077	-0,009	4
PN_04_2_5	0,071	0,137	0,018	-0,007	1
PN_04_2_6	0,077	0,118	0,007	0,004	1
PN_04_2_7	0,07	0,145	0,026	0,002	1
PN_04_2_8	0,081	0,085	0,014	-0,002	1
PN_04_3_1	0,084	-0,026	0,053	-0,023	4
PN_04_3_2	0,078	-0,03	0,124	-0,008	4
PN_04_3_3	0,081	-0,036	0,092	0,026	4
PN_04_3_4	0,085	-0,002	0,042	-0,008	4
PN_04_3_5	0,084	-0,028	0,033	-0,022	4
PN_04_3_6	0,085	-0,038	0,016	-0,006	4
PN_04_3_7	0,086	-0,016	0,022	-0,015	4
PN_04_3_8	0,085	0,022	0,045	0	4
PN_05_1_1	0,066	0,163	-0,045	0,04	1
PN_05_1_2	0,061	0,182	-0,013	0,008	1
PN_05_1_3	0,076	0,1	-0,046	0,08	1
PN_05_1_4	0,071	0,058	-0,121	0,148	3

PN_05_1_5	0,079	0,046	0,064	0,092	1	PN_06_3_2	0,085	-0,012	-0,011	-0,068	4
PN_05_1_6	0,074	-0,071	-0,042	0,138	3	PN_06_3_3	0,08	-0,085	-0,039	-0,049	4
PN_05_1_7	0,065	0,159	-0,053	0,06	1	PN_06_3_4	0,082	-0,059	-0,005	-0,083	4
PN_05_1_8	0,042	-0,066	-0,18	0,224	3	PN_06_3_5	0,081	-0,048	-0,019	-0,091	4
PN_05_2_1	0,067	-0,073	-0,138	0,146	3	PN_06_3_6	0,083	-0,032	-0,012	-0,077	4
PN_05_2_2	0,065	-0,058	-0,152	0,162	3	PN_06_3_7	0,08	-0,064	-0,055	-0,064	4
PN_05_2_3	0,085	-0,02	0,032	0,038	4	PN_06_3_8	0,085	-0,025	-0,016	-0,065	4
PN_05_2_4	0,073	0,11	-0,054	0,043	1	PN_07_1_1	0,084	0,067	0	-0,003	1
PN_05_2_5	0,071	-0,076	-0,087	0,082	3	PN_07_1_2	0,085	-0,006	-0,023	-0,061	4
PN_05_2_6	0,081	-0,032	0,016	0,12	3	PN_07_1_3	0,085	-0,013	-0,029	-0,049	4
PN_05_2_7	0,069	0,153	-0,027	0,03	1	PN_07_1_4	0,086	-0,008	-0,03	-0,06	4
PN_05_2_8	0,064	0,166	-0,045	-0,005	1	PN_07_1_5	0,085	-0,002	-0,03	-0,069	4
PN_05_3_1	0,077	-0,065	0,008	0,109	3	PN_07_1_6	0,085	-0,008	-0,023	-0,065	4
PN_05_3_2	0,08	-0,027	0,055	0,091	3	PN_07_1_7	0,086	-0,009	-0,03	-0,058	4
PN_05_3_3	0,069	-0,046	-0,103	0,15	3	PN_07_1_8	0,085	-0,009	-0,025	-0,061	4
PN_05_3_4	0,084	-0,002	0,061	0,004	4	PN_07_2_1	0,086	-0,005	-0,024	-0,06	4
PN_05_3_5	0,067	0,152	0,015	-0,023	1	PN_07_2_2	0,086	-0,005	-0,025	-0,058	4
PN_05_3_6	0,067	0,126	-0,028	0,025	1	PN_07_2_3	0,086	-0,007	-0,031	-0,057	4
PN_05_3_7	0,067	-0,054	-0,123	0,174	3	PN_07_2_4	0,086	-0,008	-0,029	-0,06	4
PN_05_3_8	0,044	-0,11	-0,154	0,231	3	PN_07_2_5	0,086	-0,011	-0,026	-0,059	4
PN_06_1_1	0,085	0,025	-0,001	-0,055	4	PN_07_2_6	0,086	-0,006	-0,028	-0,056	4
PN_06_1_2	0,085	0,005	-0,003	-0,063	4	PN_07_2_7	0,086	-0,01	-0,024	-0,061	4
PN_06_1_3	0,086	-0,008	-0,001	-0,059	4	PN_07_2_8	0,086	-0,006	-0,026	-0,062	4
PN_06_1_4	0,08	-0,072	-0,056	-0,056	4	PN_07_3_1	0,085	0,005	-0,03	-0,064	4
PN_06_1_5	0,085	-0,024	-0,013	-0,062	4	PN_07_3_2	0,085	-0,008	-0,025	-0,062	4
PN_06_1_6	0,085	-0,022	0,001	-0,064	4	PN_07_3_3	0,086	-0,011	-0,025	-0,062	4
PN_06_1_7	0,081	-0,077	-0,019	-0,057	4	PN_07_3_4	0,085	-0,015	-0,008	-0,061	4
PN_06_1_8	0,084	-0,026	-0,007	-0,08	4	PN_07_3_5	0,086	-0,008	-0,027	-0,06	4
PN_06_2_1	0,083	-0,047	-0,016	-0,055	4	PN_07_3_6	0,085	0	-0,033	-0,055	4
PN_06_2_2	0,071	-0,117	-0,049	-0,066	4	PN_07_3_7	0,085	-0,007	-0,017	-0,069	4
PN_06_2_3	0,084	-0,041	-0,024	-0,057	4	PN_07_3_8	0,085	0,002	-0,02	-0,065	4
PN_06_2_4	0,073	-0,077	-0,034	-0,075	4						
PN_06_2_5	0,073	-0,111	-0,05	-0,061	4						
PN_06_2_6	0,082	-0,055	-0,025	-0,047	4						
PN_06_2_7	0,085	-0,03	-0,025	-0,072	4						
PN_06_2_8	0,075	-0,064	-0,039	-0,097	4						
PN_06_3_1	0,075	-0,071	-0,034	-0,099	4						

ANEXO 8. Coeficientes das componentes e Clusters do grupo de Pele Normal (pré-processamento automático).

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
PN_01_1_1	0,029	-0,139	-0,078	0,082	1
PN_01_1_2	0,036	-0,135	-0	0,171	1
PN_01_1_3	0,021	-0,115	0,054	0,216	1
PN_01_1_4	0,019	-0,143	-0,149	-0,091	2
PN_01_1_5	0,021	-0,141	-0,145	-0,103	2
PN_01_1_6	0,013	-0,101	-0,177	-0,048	2
PN_01_1_7	0,01	-0,136	-0,147	-0,1	2
PN_01_1_8	0,014	-0,143	-0,151	-0,059	2
PN_01_2_1	0,05	-0,074	-0,142	0,035	2
PN_01_2_2	0,016	-0,089	-0,095	0,088	1
PN_01_2_3	0,029	-0,117	0,04	0,191	1
PN_01_2_4	0,015	-0,141	-0,158	-0,073	2
PN_01_2_5	0,014	-0,104	-0,159	-0,015	2
PN_01_2_6	0,018	-0,101	-0,143	-0,022	2
PN_01_2_7	0,018	-0,116	-0,139	-0,058	2
PN_01_2_8	0,017	-0,144	-0,155	-0,072	2
PN_01_3_1	0,024	-0,081	-0,069	0,019	2
PN_01_3_2	0,032	-0,059	-0,166	0,023	2
PN_01_3_3	0,018	-0,135	-0,045	0,133	1
PN_01_3_4	0,032	-0,121	-0,089	0,131	1
PN_01_3_5	0,045	-0,101	0,001	0,144	1
PN_01_3_6	0,015	-0,119	0,05	0,21	1
PN_01_3_7	0,022	-0,119	-0,175	-0,091	2
PN_01_3_8	0,013	-0,124	-0,147	-0,056	2
PN_02_1_1	0,062	0,087	-0,086	0,107	3
PN_02_1_2	0,096	0,019	0,051	-0,004	4
PN_02_1_3	0,094	0,008	0,031	-0,054	4
PN_02_1_4	0,093	-0,002	0,055	0,019	4
PN_02_1_5	0,071	0,04	0	-0,034	4
PN_02_1_6	0,085	0,014	0,054	-0,067	4
PN_02_1_7	0,089	-0,033	0,048	-0,078	4
PN_02_1_8	0,059	-0,019	0,078	-0,014	4
PN_02_2_1	0,068	0,089	-0,087	-0,045	3
PN_02_2_2	0,1	0,027	0,036	-0,019	4
PN_02_2_3	0,083	0,04	0,051	-0,022	4
PN_02_2_4	0,09	0,01	0,027	0,006	4
PN_02_2_5	0,072	0,028	0,026	-0,053	4
PN_02_2_6	0,069	-0,006	0,062	-0,099	4
PN_02_2_7	0,08	0,004	0,014	-0,012	4
PN_02_2_8	0,09	0,01	0,023	-0,025	4
PN_02_3_1	0,093	-0,002	0,042	-0,02	4
PN_02_3_2	0,063	0,003	0,069	0,027	4
PN_02_3_3	0,086	-0,018	0,018	0,025	1
PN_02_3_4	0,1	0,011	0,008	-0,011	4
PN_02_3_5	0,075	-0,04	0,07	-0,072	4
PN_02_3_6	0,063	-0,006	0,07	-0,083	4
PN_02_3_7	0,076	-0,015	0,075	-0,057	4
PN_02_3_8	0,097	0,009	0,035	-0,019	4
PN_03_1_1	0,093	0,051	-0,057	-0,002	3
PN_03_1_2	0,089	0,012	-0,044	-0,057	4

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
PN_03_1_3	0,084	0,052	-0,027	0,035	3
PN_03_1_4	0,091	0,033	-0,073	0,042	3
PN_03_1_5	0,06	-0,004	0,046	0,138	1
PN_03_1_6	0,091	0,044	-0,024	-0	3
PN_03_1_7	0,051	-0,016	0,038	0,114	1
PN_03_1_8	0,1	0,045	-0,026	-0,032	3
PN_03_2_1	0,066	0,1	-0,097	-0,027	3
PN_03_2_2	0,064	0,086	-0,086	0,086	3
PN_03_2_3	0,045	0,162	-0,112	0,053	3
PN_03_2_4	0,041	-0,068	0,006	0,09	1
PN_03_2_5	0,052	0,154	-0,115	0,037	3
PN_03_2_6	0,043	0,078	-0,084	0,015	3
PN_03_2_7	0,076	0,089	-0,095	0,069	3
PN_03_2_8	0,074	0,054	-0,097	0,02	3
PN_03_3_1	0,052	0,102	-0,125	0,064	3
PN_03_3_2	0,087	0,066	-0,061	-0,05	3
PN_03_3_3	0,042	0,169	-0,107	0,046	3
PN_03_3_4	0,086	0,094	-0,078	-0,02	3
PN_03_3_5	0,069	0,124	-0,116	-0	3
PN_03_3_6	0,065	0,116	-0,084	0,028	3
PN_03_3_7	0,043	0,119	-0,123	0,005	3
PN_03_3_8	0,064	0,131	-0,104	0,037	3
PN_04_1_1	0,07	-0,096	-0,026	0,087	1
PN_04_1_2	0,077	-0,06	-0,051	0,053	1
PN_04_1_3	0,075	-0,096	-0,04	0,106	1
PN_04_1_4	0,075	-0,107	-0,015	0,107	1
PN_04_1_5	0,085	0,013	-0,063	0,135	1
PN_04_1_6	0,089	-0,059	-0,048	0,095	1
PN_04_1_7	0,071	-0,09	0,005	0,134	1
PN_04_1_8	0,055	-0,095	0,023	0,128	1
PN_04_2_1	0,047	-0,15	-0,063	-0,106	2
PN_04_2_2	0,076	-0,115	-0,003	-0,039	4
PN_04_2_3	0,061	-0,086	0,045	0,11	1
PN_04_2_4	0,066	-0,109	-0,016	-0,042	4
PN_04_2_5	0,064	-0,125	0,059	0,045	1
PN_04_2_6	0,084	-0,087	0,049	0,077	1
PN_04_2_7	0,059	-0,116	0,037	0,105	1
PN_04_2_8	0,084	-0,08	0,049	0,044	1
PN_04_3_1	0,065	-0,088	-0,011	-0,056	4
PN_04_3_2	0,053	-0,149	-0,071	-0,102	2
PN_04_3_3	0,056	-0,143	-0,103	-0,058	2
PN_04_3_4	0,075	-0,043	-0,018	-0,01	4
PN_04_3_5	0,062	-0,032	-0,01	-0,058	4
PN_04_3_6	0,097	-0,026	-0,035	-0,047	4
PN_04_3_7	0,098	-0,034	-0,018	-0,053	4
PN_04_3_8	0,087	-0,062	-0,028	-0,071	4
PN_05_1_1	0,058	0,004	0,015	0,238	1
PN_05_1_2	0,046	-0,076	0,062	0,22	1
PN_05_1_3	0,087	0,043	-0,088	0,096	3
PN_05_1_4	0,055	0,131	-0,065	0,115	3

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
PN_05_1_5	0,07	-0,066	-0,141	0,002	2
PN_05_1_6	0,06	0,066	-0,133	0,041	3
PN_05_1_7	0,072	0,03	-0,029	0,199	1
PN_05_1_8	0,047	0,146	-0,084	0,109	3
PN_05_2_1	0,055	0,128	-0,096	0,054	3
PN_05_2_2	0,042	0,154	-0,103	0,049	3
PN_05_2_3	0,082	-0,028	-0,102	-0,065	2
PN_05_2_4	0,09	-0,026	0,023	0,09	1
PN_05_2_5	0,051	0,125	-0,14	0,041	3
PN_05_2_6	0,071	0,009	-0,169	-0,006	2
PN_05_2_7	0,075	-0,028	0,02	0,191	1
PN_05_2_8	0,068	-0,013	0,081	0,172	1
PN_05_3_1	0,072	0,015	-0,13	-0,01	2
PN_05_3_2	0,074	-0,041	-0,142	-0,036	2
PN_05_3_3	0,053	0,115	-0,12	0,029	3
PN_05_3_4	0,076	-0,083	-0,066	-0,105	2
PN_05_3_5	0,053	-0,081	0,07	0,113	1
PN_05_3_6	0,034	-0,012	0,005	0,072	1
PN_05_3_7	0,033	0,141	-0,118	0,012	3
PN_05_3_8	0,035	0,149	-0,128	0,051	3
PN_06_1_1	0,096	-0,049	0,06	-0,026	4
PN_06_1_2	0,101	-0,039	0,06	-0,07	4
PN_06_1_3	0,101	-0,022	0,047	-0,082	4
PN_06_1_4	0,099	0,041	0,015	-0,042	4
PN_06_1_5	0,102	-0,032	0,044	-0,046	4
PN_06_1_6	0,097	-0,028	0,034	-0,075	4
PN_06_1_7	0,101	0,023	0,016	-0,078	4
PN_06_1_8	0,102	-0,026	0,049	-0,06	4
PN_06_2_1	0,101	-0,012	0,037	-0,04	4
PN_06_2_2	0,096	0,016	0,015	0,017	4
PN_06_2_3	0,099	0,009	0,048	-0,056	4
PN_06_2_4	0,093	0,024	0,019	-0,057	4
PN_06_2_5	0,098	0,016	-0,006	-0,018	4
PN_06_2_6	0,098	0,002	0,002	-0,059	4
PN_06_2_7	0,106	0,003	0,048	-0,056	4
PN_06_2_8	0,092	0,016	0,025	-0,063	4
PN_06_3_1	0,1	-0,002	0,032	-0,056	4
PN_06_3_2	0,104	-0,015	0,048	-0,065	4

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
PN_06_3_3	0,104	0,025	0,005	-0,017	4
PN_06_3_4	0,095	-0,021	0,045	-0,081	4
PN_06_3_5	0,087	0,007	0,05	-0,083	4
PN_06_3_6	0,105	-0,02	0,029	-0,056	4
PN_06_3_7	0,104	0,032	0,023	-0,055	4
PN_06_3_8	0,101	-0,006	0,04	-0,08	4
PN_07_1_1	0,1	-0,03	0,005	0,052	1
PN_07_1_2	0,099	0,015	0,055	-0,001	4
PN_07_1_3	0,074	0,087	0,008	0,051	3
PN_07_1_4	0,102	0,022	0,049	-0,032	4
PN_07_1_5	0,102	0,022	0,063	-0,015	4
PN_07_1_6	0,093	0,008	0,057	-0,04	4
PN_07_1_7	0,105	0,024	0,062	-0,013	4
PN_07_1_8	0,103	0,005	0,059	-0,007	4
PN_07_2_1	0,106	0,012	0,063	-0,032	4
PN_07_2_2	0,103	0,015	0,059	-0,015	4
PN_07_2_3	0,101	0,028	0,071	0,002	4
PN_07_2_4	0,105	0,024	0,057	-0,014	4
PN_07_2_5	0,103	0,015	0,064	-0,016	4
PN_07_2_6	0,104	0,024	0,064	-0,01	4
PN_07_2_7	0,103	0,015	0,065	-0,028	4
PN_07_2_8	0,098	0,014	0,041	-0,011	4
PN_07_3_1	0,102	0,022	0,063	0,002	4
PN_07_3_2	0,104	0,011	0,052	-0,003	4
PN_07_3_3	0,102	0,011	0,061	0,011	4
PN_07_3_4	0,099	0,001	0,056	-0,052	4
PN_07_3_5	0,099	0,009	0,059	-0,012	4
PN_07_3_6	0,099	0,006	0,066	0,008	4
PN_07_3_7	0,097	0,018	0,061	-0,031	4
PN_07_3_8	0,105	0,016	0,054	-0,034	4

ANEXO 9. Coeficientes das componentes e Clusters do grupo de Melanoma (pré-processamento manual).

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4
MC_58_1_1	0,068	-0,15	-0,029	-0,064
MC_58_1_2	0,063	-0,159	-0,062	-0,046
MC_58_1_3	0,069	-0,143	-0,064	-0,019
MC_58_1_4	0,056	-0,173	-0,073	0,032
MC_58_1_5	0,054	-0,178	-0,06	-0,061
MC_58_2_1	0,073	-0,075	-0,153	0,127
MC_58_2_2	0,054	-0,179	-0,06	-0,023
MC_58_2_3	0,058	-0,164	-0,087	-0,016
MC_58_2_4	0,057	-0,166	-0,091	0,025
MC_58_2_5	0,053	-0,182	-0,054	-0,021
MC_58_3_1	0,065	-0,152	-0,038	-0,109
MC_58_3_2	0,082	-0,08	0,021	-0,026
MC_58_3_3	0,043	-0,196	-0,012	-0,048
MC_58_3_4	0,063	-0,149	-0,097	0,084
MC_58_3_5	0,057	-0,17	-0,028	-0,072
MC_58_4_1	0,045	-0,189	-0,074	-0,067
MC_58_4_2	0,057	-0,173	-0,05	-0,091
MC_58_4_3	0,047	-0,188	-0,061	-0,066
MC_58_4_4	0,058	-0,168	-0,048	-0,103
MC_58_4_5	0,061	-0,164	-0,045	-0,01
MC_58_5_1	0,039	-0,193	-0,09	-0,031
MC_58_5_2	0,044	-0,19	-0,069	-0,048
MC_58_5_3	0,044	-0,188	-0,082	-0,064
MC_58_5_4	0,053	-0,176	-0,085	-0,054
MC_58_5_5	0,062	-0,157	-0,069	-0,036
MC_70_1_1	0,086	-0,064	0,005	0,121
MC_70_1_2	0,071	-0,084	0,149	0,092
MC_70_1_3	0,085	-0,061	0,07	0,084
MC_70_1_4	0,027	-0,062	0,301	-0,038
MC_70_1_5	0,004	-0,075	0,306	-0,127
MC_70_2_1	0,078	-0,089	-0,005	0,2
MC_70_2_2	0,073	-0,06	0,178	0,045
MC_70_2_3	0,082	-0,089	0,035	0,146
MC_70_2_4	0,083	-0,081	0,023	0,153
MC_70_2_5	0,08	-0,084	0,078	0,13
MC_70_3_1	0,081	-0,094	0,029	0,124
MC_70_3_2	0,042	-0,079	0,261	-0,008
MC_70_3_3	0,039	-0,067	0,282	-0,044
MC_70_3_4	0,077	-0,065	0,143	0,111
MC_70_3_5	0,084	-0,066	0,071	0,039
MC_70_4_1	0,068	0,006	-0,131	0,206
MC_70_4_2	0,024	-0,053	0,288	-0,099
MC_70_4_3	0,076	-0,066	0,154	0,056
MC_70_4_4	0,06	-0,121	0,148	0,148
MC_70_4_5	0,072	-0,094	0,142	0,12
MC_70_5_1	0,066	0,004	-0,167	0,219
MC_70_5_2	0,035	-0,067	0,28	-0,054
MC_70_5_3	0,07	-0,132	-0,014	0,155
MC_70_5_4	0,066	-0,087	0,172	0,012
MC_70_5_5	0,082	-0,082	0,071	0,07

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4
MC_57_1_1	0,09	0,028	-0,016	-0,122
MC_57_1_2	0,09	0,039	-0,003	-0,105
MC_57_1_3	0,09	0,034	-0,019	-0,11
MC_57_1_4	0,091	0,032	-0,004	-0,103
MC_57_1_5	0,089	0,036	-0,005	-0,122
MC_57_2_1	0,089	0,042	0,006	-0,105
MC_57_2_2	0,09	0,039	-0,007	-0,122
MC_57_2_3	0,09	0,035	-0,007	-0,121
MC_57_2_4	0,089	0,036	-0,009	-0,127
MC_57_2_5	0,091	0,033	-0,004	-0,082
MC_57_3_1	0,09	0,037	-0,01	-0,093
MC_57_3_2	0,09	0,04	0	-0,114
MC_57_3_3	0,09	0,038	-0,011	-0,112
MC_57_3_4	0,089	0,034	-0,014	-0,137
MC_57_3_5	0,089	0,042	-0,011	-0,126
MC_57_4_1	0,088	0,026	0,008	-0,182
MC_57_4_2	0,089	0,032	-0,007	-0,144
MC_57_4_3	0,091	0,027	-0,013	-0,099
MC_57_4_4	0,09	0,035	-0,003	-0,115
MC_57_4_5	0,09	0,035	-0,008	-0,119
MC_57_5_1	0,09	0,032	-0,008	-0,11
MC_57_5_2	0,09	0,035	-0,005	-0,117
MC_57_5_3	0,09	0,031	-0,014	-0,114
MC_57_5_4	0,09	0,041	-0,012	-0,095
MC_57_5_5	0,09	0,034	-0,005	-0,111
MC_81_1_1	0,082	0,05	-0,111	0,108
MC_81_1_2	0,084	0,045	-0,109	0,048
MC_81_1_3	0,078	0,014	-0,098	-0,158
MC_81_1_4	0,085	0,057	-0,089	0,085
MC_81_1_5	0,089	0,041	-0,045	-0,013
MC_81_2_1	0,087	0,044	-0,076	0,03
MC_81_2_2	0,088	0,045	-0,068	0,048
MC_81_2_3	0,09	0,035	-0,03	0,002
MC_81_2_4	0,09	0,03	-0,041	0,002
MC_81_2_5	0,09	0,037	-0,029	-0,027
MC_81_3_1	0,083	0,044	-0,12	0,065
MC_81_3_2	0,088	0,042	-0,071	0,067
MC_81_3_3	0,084	0,034	-0,076	-0,096
MC_81_3_4	0,088	0,043	-0,062	0,017
MC_81_3_5	0,09	0,028	-0,027	-0,036
MC_81_4_1	0,088	0,042	-0,06	0,019
MC_81_4_2	0,089	0,043	-0,049	0,052
MC_81_4_3	0,087	0,045	-0,066	0,04
MC_81_4_4	0,088	0,049	-0,034	-0,003
MC_81_4_5	0,09	0,029	-0,025	-0,065
MC_81_5_1	0,09	0,038	-0,02	-0,041
MC_81_5_2	0,088	0,036	-0,039	-0,024
MC_81_5_3	0,087	0,041	-0,048	0,014
MC_81_5_4	0,09	0,018	0,02	-0,097
MC_81_5_5	0,089	0,03	-0,012	-0,114

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4
MC_75_1_1	0,09	0,042	0,022	0,065
MC_75_1_2	0,089	0,046	0,056	0,046
MC_75_1_3	0,091	0,044	0,019	0,029
MC_75_1_4	0,091	0,035	0,007	0,048
MC_75_1_5	0,091	0,036	0,005	0,013
MC_75_2_1	0,091	0,039	0,015	0,035
MC_75_2_2	0,09	0,045	0,035	0,056
MC_75_2_3	0,09	0,042	0,035	0,038
MC_75_2_4	0,091	0,041	-0,002	0,022
MC_75_2_5	0,091	0,043	0,005	0,032
MC_75_3_1	0,091	0,043	0,025	0,037
MC_75_3_2	0,089	0,044	0,032	0,085
MC_75_3_3	0,09	0,048	0,017	0,072
MC_75_3_4	0,09	0,049	0,009	0,055
MC_75_3_5	0,09	0,038	-0,022	0,106
MC_75_4_1	0,091	0,042	0,015	0,016
MC_75_4_2	0,09	0,041	0,032	0,043
MC_75_4_3	0,088	0,047	0,026	0,096
MC_75_4_4	0,09	0,042	0	0,037
MC_75_4_5	0,09	0,044	-0,008	0,079
MC_75_5_1	0,09	0,038	0,035	-0,036
MC_75_5_2	0,089	0,049	0,046	0,075
MC_75_5_3	0,087	0,054	0,06	0,063
MC_75_5_4	0,091	0,041	0,013	0,032
MC_75_5_5	0,089	0,035	-0,054	0,079
MC_74_1_1	0,091	0,034	0,021	0,004
MC_74_1_2	0,092	0,036	0,005	0,006

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4
MC_74_1_3	0,09	0,038	0,02	0,018
MC_74_1_4	0,091	0,027	0,02	0,012
MC_74_1_5	0,091	0,031	0,043	-0,005
MC_74_2_1	0,091	0,041	0,021	0,008
MC_74_2_2	0,089	0,045	0,001	0,031
MC_74_2_3	0,09	0,048	0,015	0,021
MC_74_2_4	0,091	0,039	0,021	0,006
MC_74_2_5	0,091	0,04	0,011	0,006
MC_74_3_1	0,091	0,043	0,023	0,026
MC_74_3_2	0,091	0,032	0,013	-0,03
MC_74_3_3	0,091	0,036	0,021	0,016
MC_74_3_4	0,089	0,041	0,053	0,026
MC_74_3_5	0,091	0,036	0,025	0,012
MC_74_4_1	0,089	0,042	0,055	0,058
MC_74_4_2	0,091	0,042	0,015	0,032
MC_74_4_3	0,091	0,039	0,018	0,019
MC_74_4_4	0,092	0,036	0,013	0,02
MC_74_4_5	0,089	0,041	0,033	0,068
MC_74_5_1	0,091	0,042	0,022	0,031
MC_74_5_2	0,09	0,039	0,044	-0,002
MC_74_5_3	0,091	0,039	0,02	0,029
MC_74_5_4	0,091	0,037	0,014	0,009
MC_74_5_5	0,091	0,041	0,007	0,033

ANEXO 10. Coeficientes das componentes e Clusters do grupo de Melanoma (pré-processamento automático).

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
MC_57_1_1	0,097	0,01	0,086	0,126	1
MC_57_1_2	0,098	0,033	0,077	0,111	1
MC_57_1_3	0,091	0,016	0,105	0,079	1
MC_57_1_4	0,101	0,023	0,079	0,114	1
MC_57_1_5	0,086	0,017	0,108	0,106	1
MC_57_2_1	0,099	0,032	0,066	0,137	1
MC_57_2_2	0,098	0,034	0,086	0,115	1
MC_57_2_3	0,092	0,031	0,089	0,12	1
MC_57_2_4	0,094	0,027	0,094	0,142	1
MC_57_2_5	0,103	0,019	0,066	0,101	1
MC_57_3_1	0,098	0,023	0,087	0,065	1
MC_57_3_2	0,1	0,035	0,082	0,096	1
MC_57_3_3	0,097	0,032	0,085	0,111	1
MC_57_3_4	0,09	0,03	0,082	0,133	1
MC_57_3_5	0,096	0,028	0,1	0,069	1
MC_57_4_1	0,085	0,021	0,088	0,131	1
MC_57_4_2	0,094	0,024	0,094	0,062	1
MC_57_4_3	0,091	-0,011	0,107	0,08	1
MC_57_4_4	0,095	0,023	0,065	0,113	1
MC_57_4_5	0,095	0,028	0,088	0,086	1
MC_57_5_1	0,093	0,019	0,09	0,072	1
MC_57_5_2	0,102	0,023	0,076	0,116	1
MC_57_5_3	0,085	0,006	0,088	0,142	1
MC_57_5_4	0,094	0,033	0,088	0,114	1
MC_57_5_5	0,098	0,025	0,084	0,105	1
MC_58_1_1	0,006	-0,17	0,031	0,046	2
MC_58_1_2	0,006	-0,174	0,026	0,048	2
MC_58_1_3	0,014	-0,173	0,043	0,006	2
MC_58_1_4	0,018	-0,17	0,039	0,021	2
MC_58_1_5	0,006	-0,175	0,032	0,064	2
MC_58_2_1	0,024	-0,147	0,089	-0,114	3
MC_58_2_2	0,006	-0,177	0,021	0,054	2
MC_58_2_3	0,01	-0,172	0,05	-0,001	2
MC_58_2_4	0,009	-0,174	0,041	0,002	2
MC_58_2_5	0,01	-0,175	0,013	0,065	2
MC_58_3_1	0,003	-0,172	0,029	0,079	2
MC_58_3_2	0,025	-0,15	-0,015	0,036	2
MC_58_3_3	0,011	-0,171	0,002	0,07	2
MC_58_3_4	0,014	-0,174	0,032	-0,014	2
MC_58_3_5	0,001	-0,174	0,01	0,077	2
MC_58_4_1	0,003	-0,172	0,029	0,075	2
MC_58_4_2	0,003	-0,174	0,026	0,081	2
MC_58_4_3	0,008	-0,172	0,025	0,094	2
MC_58_4_4	-0,001	-0,173	0,03	0,095	2
MC_58_4_5	0,006	-0,174	0,019	0,021	2
MC_58_5_1	0	-0,171	0,028	0,068	2
MC_58_5_2	0,004	-0,172	0,031	0,069	2
MC_58_5_3	0,006	-0,17	0,036	0,072	2
MC_58_5_4	0,003	-0,17	0,047	0,056	2
MC_58_5_5	0,004	-0,174	0,035	0,052	2

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
MC_70_1_1	0,059	-0,119	-0,036	-0,027	4
MC_70_1_2	0,074	-0,084	-0,117	-0,015	4
MC_70_1_3	0,062	-0,097	-0,073	-0,012	4
MC_70_1_4	0,057	-0,012	-0,198	-0,02	4
MC_70_1_5	0,059	-0,016	-0,2	-0,017	4
MC_70_2_1	0,051	-0,139	-0,023	-0,062	4
MC_70_2_2	0,066	-0,058	-0,158	-0,069	4
MC_70_2_3	0,056	-0,134	-0,066	-0,056	4
MC_70_2_4	0,06	-0,13	-0,046	-0,061	4
MC_70_2_5	0,064	-0,112	-0,11	0,019	4
MC_70_3_1	0,047	-0,121	-0,042	-0,066	4
MC_70_3_2	0,057	-0,034	-0,195	-0,037	4
MC_70_3_3	0,063	-0,016	-0,189	0,006	4
MC_70_3_4	0,066	-0,094	-0,123	-0,023	4
MC_70_3_5	0,062	-0,102	-0,096	0,007	4
MC_70_4_1	0,038	-0,047	0,092	-0,197	3
MC_70_4_2	0,046	-0,009	-0,193	-0,082	4
MC_70_4_3	0,07	-0,064	-0,148	-0,018	4
MC_70_4_4	0,058	-0,11	-0,118	0,011	4
MC_70_4_5	0,062	-0,094	-0,149	0,003	4
MC_70_5_1	0,022	-0,068	0,075	-0,297	3
MC_70_5_2	0,062	-0,025	-0,159	-0,114	4
MC_70_5_3	0,034	-0,158	-0,03	-0,062	4
MC_70_5_4	0,064	-0,084	-0,134	-0,042	4
MC_70_5_5	0,059	-0,126	-0,072	-0,015	4
MC_74_1_1	0,11	0,009	-0,045	-0,004	4
MC_74_1_2	0,115	0,013	-0,002	-0,013	4
MC_74_1_3	0,098	0,026	-0,053	-0,003	4
MC_74_1_4	0,096	-0,012	-0,049	0,039	4
MC_74_1_5	0,106	0,018	-0,067	0,025	4
MC_74_2_1	0,112	0,027	-0,023	-0,001	4
MC_74_2_2	0,097	0,02	-0,023	-0,016	4
MC_74_2_3	0,102	0,037	-0,048	0,04	4
MC_74_2_4	0,111	0,025	-0,029	0,036	4
MC_74_2_5	0,113	0,027	-0,012	0,006	4
MC_74_3_1	0,111	0,031	-0,047	0,023	4
MC_74_3_2	0,11	0,012	-0,009	0,041	4
MC_74_3_3	0,111	0,018	-0,036	0,039	4
MC_74_3_4	0,099	0,037	-0,074	0,045	4
MC_74_3_5	0,112	0,02	-0,041	0,026	4
MC_74_4_1	0,102	0,03	-0,09	0,016	4
MC_74_4_2	0,106	0,027	-0,038	0,027	4
MC_74_4_3	0,109	0,02	-0,039	0,024	4
MC_74_4_4	0,112	0,013	-0,03	-0,004	4
MC_74_4_5	0,101	0,015	-0,064	-0,042	4
MC_74_5_1	0,111	0,027	-0,044	0,005	4
MC_74_5_2	0,103	0,035	-0,071	0,026	4
MC_74_5_3	0,111	0,023	-0,049	0,007	4
MC_74_5_4	0,114	0,02	-0,025	0,012	4
MC_74_5_5	0,114	0,021	-0,019	0,005	4

Espectros	PC1	PC2	PC3	PC4	Cluster
MC_75_1_1	0,11	0,021	-0,057	-0,022	4
MC_75_1_2	0,1	0,032	-0,094	0,021	4
MC_75_1_3	0,107	0,029	-0,035	-0,031	4
MC_75_1_4	0,104	0,004	-0,03	-0,036	4
MC_75_1_5	0,091	0,004	-0,016	-0,038	4
MC_75_2_1	0,11	0,017	-0,036	0,023	4
MC_75_2_2	0,108	0,02	-0,066	0,013	4
MC_75_2_3	0,103	0,03	-0,07	-0,007	4
MC_75_2_4	0,111	0,018	-0	-0,017	4
MC_75_2_5	0,109	0,023	-0,02	0,028	4
MC_75_3_1	0,101	0,027	-0,048	-0,027	4
MC_75_3_2	0,097	0,028	-0,075	-0,036	4
MC_75_3_3	0,105	0,021	-0,049	-0,03	4
MC_75_3_4	0,107	0,031	-0,032	-0,004	4
MC_75_3_5	0,102	-0,016	-0,005	-0,16	3
MC_75_4_1	0,113	0,022	-0,018	-0,018	4
MC_75_4_2	0,107	0,021	-0,057	0,005	4
MC_75_4_3	0,086	0,03	-0,092	-0,018	4
MC_75_4_4	0,104	0,021	-0,032	-0,031	4
MC_75_4_5	0,109	0,006	-0,016	-0,112	3
MC_75_5_1	0,105	0,033	-0,044	0,027	4
MC_75_5_2	0,104	0,035	-0,091	0,002	4
MC_75_5_3	0,095	0,047	-0,097	0,038	4
MC_75_5_4	0,112	0,025	-0,04	-0,003	4
MC_75_5_5	0,093	-0,021	0,063	-0,127	3
MC_81_1_1	0,053	-0,017	0,122	-0,169	3
MC_81_1_2	0,041	-0,032	0,122	-0,012	3
MC_81_1_3	0,077	-0,003	0,071	-0,062	3
MC_81_1_4	0,082	0,006	0,112	-0,128	3
MC_81_1_5	0,074	-0,014	0,113	-0,148	3
MC_81_2_1	0,047	-0,003	0,127	-0,156	3
MC_81_2_2	0,07	-0,017	0,121	-0,171	3
MC_81_2_3	0,097	-0,014	0,066	-0,062	3
MC_81_2_4	0,081	-0,009	0,067	-0,115	3
MC_81_2_5	0,076	-0,014	0,101	-0,093	3
MC_81_3_1	0,048	-0,013	0,141	-0,166	3
MC_81_3_2	0,072	-0,026	0,106	-0,19	3
MC_81_3_3	0,07	-0,011	0,131	-0,084	3
MC_81_3_4	0,06	-0,002	0,105	-0,147	3
MC_81_3_5	0,08	-0,011	0,061	-0,086	3
MC_81_4_1	0,075	-0,037	0,1	-0,091	3
MC_81_4_2	0,057	-0,013	0,06	-0,129	3
MC_81_4_3	0,075	-0,019	0,092	-0,149	3
MC_81_4_4	0,057	0,006	0,069	-0,051	3
MC_81_4_5	0,074	-0,005	0,109	-0,065	3
MC_81_5_1	0,08	0,011	0,085	-0,025	3
MC_81_5_2	0,057	-0,012	0,111	-0,111	3
MC_81_5_3	0,066	-0,01	0,096	-0,166	3
MC_81_5_4	0,093	-0,013	0,041	-0,041	3
MC_81_5_5	0,092	0,01	0,076	-0,038	3

ANEXO 11. Coeficientes das componentes principais e Opções (pré-processamento automático).

PN_01_1_1	3	0,093	0,25	MC_81_3_4	3	0,124	-0,046	MC_58_4_4	2	0,159	-0,088
PN_01_1_2	3	0,124	0,25	MC_81_3_5	3	0,125	-0,119	MC_58_4_5	2	0,158	-0,06
PN_01_1_3	3	0,115	0,257	MC_81_4_1	3	0,132	-0,046	MC_58_5_1	2	0,156	-0,113
PN_01_2_2	3	0,056	0,214	MC_81_4_2	3	0,106	-0,058	MC_58_5_2	2	0,158	-0,08
PN_01_2_3	3	0,118	0,239	MC_81_4_3	3	0,138	-0,033	MC_58_5_3	2	0,157	-0,086
PN_01_3_3	3	0,091	0,253	MC_81_4_4	3	0,09	-0,118	MC_58_5_4	2	0,155	-0,109
PN_01_3_4	3	0,094	0,248	MC_81_4_5	3	0,126	-0,114	MC_58_5_5	2	0,159	-0,072
PN_01_3_5	3	0,119	0,183	MC_81_5_1	3	0,117	-0,133	PN_02_1_1	1	0,115	-0,121
PN_01_3_6	3	0,11	0,263	MC_81_5_2	3	0,117	-0,051	PN_02_2_1	1	0,129	-0,083
PN_03_1_5	3	0,109	-0,097	MC_81_5_3	3	0,135	0,017	PN_03_1_1	1	0,154	-0,031
PN_03_1_7	3	0,094	-0,067	MC_81_5_4	3	0,123	-0,166	PN_03_1_3	1	0,14	-0,017
PN_03_2_4	3	0,095	0,013	MC_81_5_5	3	0,125	-0,209	PN_03_1_4	1	0,145	-0,04
PN_04_1_1	3	0,137	0,037	PN_01_1_4	2	0,158	-0,065	PN_03_1_6	1	0,149	0,004
PN_04_1_2	3	0,122	-0,019	PN_01_1_5	2	0,157	-0,041	PN_03_1_8	1	0,164	0,016
PN_04_1_3	3	0,145	0,032	PN_01_1_6	2	0,139	0,005	PN_03_2_1	1	0,13	-0,105
PN_04_1_4	3	0,15	0,054	PN_01_1_7	2	0,152	-0,091	PN_03_2_2	1	0,117	-0,117
PN_04_1_5	3	0,12	-0,074	PN_01_1_8	2	0,152	-0,048	PN_03_2_3	1	0,11	-0,198
PN_04_1_6	3	0,146	-0,03	PN_01_2_1	2	0,102	0,253	PN_03_2_5	1	0,119	-0,188
PN_04_1_7	3	0,149	0,032	PN_01_2_4	2	0,156	-0,058	PN_03_2_6	1	0,086	-0,102
PN_04_1_8	3	0,129	0,087	PN_01_2_5	2	0,13	-0,021	PN_03_2_7	1	0,138	-0,114
PN_04_2_3	3	0,136	0,043	PN_01_2_6	2	0,116	0,016	PN_03_2_8	1	0,132	-0,072
PN_04_2_5	3	0,137	0,03	PN_01_2_7	2	0,132	0,005	PN_03_3_1	1	0,112	-0,148
PN_04_2_6	3	0,154	-0,018	PN_01_2_8	2	0,158	-0,049	PN_03_3_2	1	0,149	-0,035
PN_04_2_7	3	0,14	0,084	PN_01_3_1	2	0,081	0,086	PN_03_3_3	1	0,109	-0,198
PN_04_2_8	3	0,146	-0,071	PN_01_3_2	2	0,104	0,168	PN_03_3_4	1	0,153	-0,08
PN_05_1_1	3	0,119	0,015	PN_01_3_7	2	0,159	0,001	PN_03_3_5	1	0,139	-0,14
PN_05_1_2	3	0,132	0,113	PN_01_3_8	2	0,14	-0,03	PN_03_3_6	1	0,131	-0,118
PN_05_1_7	3	0,114	-0,052	PN_04_2_1	2	0,127	0,029	PN_03_3_7	1	0,099	-0,158
PN_05_2_4	3	0,141	-0,115	PN_04_3_2	2	0,134	0,063	PN_03_3_8	1	0,133	-0,148
PN_05_2_7	3	0,141	-0,011	PN_04_3_3	2	0,142	0,133	PN_05_1_3	1	0,134	-0,087
PN_05_2_8	3	0,131	-0,044	PN_05_1_5	2	0,122	0,299	PN_05_1_4	1	0,11	-0,159
PN_05_3_5	3	0,124	0,015	PN_05_2_3	2	0,098	0,376	PN_05_1_6	1	0,107	-0,135
PN_05_3_6	3	0,067	-0,037	PN_05_2_6	2	0,095	0,387	PN_05_1_8	1	0,104	-0,183
MC_58_2_1	3	0,097	0,194	PN_05_3_1	2	0,077	0,397	PN_05_2_1	1	0,116	-0,161
MC_70_4_1	3	0,112	0,144	PN_05_3_2	2	0,119	0,331	PN_05_2_2	1	0,104	-0,188
MC_70_5_1	3	0,111	0,234	PN_05_3_4	2	0,109	0,274	PN_05_2_5	1	0,111	-0,186
MC_75_3_5	3	0,14	-0,145	MC_58_1_1	2	0,156	-0,062	PN_05_3_3	1	0,11	-0,161
MC_75_4_5	3	0,134	-0,18	MC_58_1_2	2	0,16	-0,067	PN_05_3_7	1	0,088	-0,186
MC_75_5_5	3	0,147	-0,101	MC_58_1_3	2	0,159	-0,043	PN_05_3_8	1	0,09	-0,21
MC_81_1_1	3	0,129	0,03	MC_58_1_4	2	0,157	-0,035	PN_07_1_3	1	0,126	-0,04
MC_81_1_2	3	0,09	0,002	MC_58_1_5	2	0,161	-0,069	MC_57_1_1	1	0,143	0,131
MC_81_1_3	3	0,12	-0,11	MC_58_2_2	2	0,161	-0,061	MC_57_1_2	1	0,147	0,117
MC_81_1_4	3	0,148	-0,084	MC_58_2_3	2	0,157	-0,068	MC_57_1_3	1	0,131	0,144
MC_81_1_5	3	0,142	-0,061	MC_58_2_4	2	0,158	-0,069	MC_57_1_4	1	0,147	0,126
MC_81_2_1	3	0,12	0,014	MC_58_2_5	2	0,16	-0,053	MC_57_1_5	1	0,13	0,139
MC_81_2_2	3	0,144	-0,038	MC_58_3_1	2	0,159	-0,068	MC_57_2_1	1	0,148	0,113
MC_81_2_3	3	0,139	-0,151	MC_58_3_2	2	0,139	0,115	MC_57_2_2	1	0,147	0,127
MC_81_2_4	3	0,128	-0,134	MC_58_3_3	2	0,156	-0,021	MC_57_2_3	1	0,137	0,131
MC_81_2_5	3	0,132	-0,078	MC_58_3_4	2	0,159	-0,034	MC_57_2_4	1	0,139	0,142
MC_81_3_1	3	0,125	-0,001	MC_58_3_5	2	0,158	-0,071	MC_57_2_5	1	0,151	0,111
MC_81_3_2	3	0,149	0	MC_58_4_1	2	0,158	-0,09	MC_57_3_1	1	0,139	0,132
MC_81_3_3	3	0,13	-0,075	MC_58_4_2	2	0,16	-0,081	MC_57_3_2	1	0,147	0,125
				MC_58_4_3	2	0,159	-0,074	MC_57_3_3	1	0,141	0,132

MC_57_3_4	1	0,137	0,126	PN_06_2_5	4	0,087	-0,011	MC_70_5_3	4	0,026	0,148
MC_57_3_5	1	0,139	0,141	PN_06_2_6	4	0,088	-0,02	MC_70_5_4	4	0,053	0,191
MC_57_4_1	1	0,127	0,131	PN_06_2_7	4	0,095	-0,067	MC_70_5_5	4	0,049	0,164
MC_57_4_2	1	0,137	0,126	PN_06_2_8	4	0,082	-0,048	MC_74_1_1	4	0,096	0,036
MC_57_4_3	1	0,13	0,143	PN_06_3_1	4	0,09	-0,044	MC_74_1_2	4	0,1	-0,003
MC_57_4_4	1	0,141	0,11	PN_06_3_2	4	0,092	-0,077	MC_74_1_3	4	0,086	0,029
MC_57_4_5	1	0,141	0,126	PN_06_3_3	4	0,094	-0,002	MC_74_1_4	4	0,083	0,059
MC_57_5_1	1	0,134	0,123	PN_06_3_4	4	0,082	-0,081	MC_74_1_5	4	0,093	0,048
MC_57_5_2	1	0,149	0,122	PN_06_3_5	4	0,08	-0,062	MC_74_2_1	4	0,098	0,007
MC_57_5_3	1	0,125	0,131	PN_06_3_6	4	0,091	-0,06	MC_74_2_2	4	0,085	0,008
MC_57_5_4	1	0,14	0,127	PN_06_3_7	4	0,095	-0,029	MC_74_2_3	4	0,09	0,016
MC_57_5_5	1	0,144	0,125	PN_06_3_8	4	0,09	-0,069	MC_74_2_4	4	0,098	0,008
PN_02_1_2	4	0,088	-0,054	PN_07_1_2	4	0,09	-0,054	MC_74_2_5	4	0,099	-0,004
PN_02_1_3	4	0,085	-0,039	PN_07_1_4	4	0,094	-0,054	MC_74_3_1	4	0,098	0,023
PN_02_1_4	4	0,083	-0,047	PN_07_1_5	4	0,094	-0,06	MC_74_3_2	4	0,097	0,002
PN_02_1_5	4	0,065	-0,009	PN_07_1_6	4	0,084	-0,077	MC_74_3_3	4	0,098	0,019
PN_02_1_6	4	0,077	-0,065	PN_07_1_7	4	0,096	-0,057	MC_74_3_4	4	0,087	0,041
PN_02_1_7	4	0,077	-0,077	PN_07_1_8	4	0,093	-0,064	MC_74_3_5	4	0,099	0,025
PN_02_1_8	4	0,051	-0,073	PN_07_2_1	4	0,096	-0,067	MC_74_4_1	4	0,09	0,059
PN_02_2_2	4	0,091	-0,041	PN_07_2_2	4	0,094	-0,063	MC_74_4_2	4	0,093	0,017
PN_02_2_3	4	0,078	-0,026	PN_07_2_3	4	0,093	-0,061	MC_74_4_3	4	0,096	0,022
PN_02_2_4	4	0,08	-0,032	PN_07_2_4	4	0,096	-0,056	MC_74_4_4	4	0,098	0,021
PN_02_2_5	4	0,065	-0,026	PN_07_2_5	4	0,094	-0,064	MC_74_4_5	4	0,088	0,052
PN_02_2_6	4	0,062	-0,087	PN_07_2_6	4	0,096	-0,058	MC_74_5_1	4	0,097	0,024
PN_02_2_7	4	0,071	-0,018	PN_07_2_7	4	0,095	-0,062	MC_74_5_2	4	0,091	0,038
PN_02_2_8	4	0,081	-0,025	PN_07_2_8	4	0,089	-0,046	MC_74_5_3	4	0,098	0,03
PN_02_3_1	4	0,083	-0,052	PN_07_3_1	4	0,094	-0,056	MC_74_5_4	4	0,1	0,011
PN_02_3_2	4	0,058	-0,037	PN_07_3_2	4	0,093	-0,061	MC_74_5_5	4	0,1	0,005
PN_02_3_4	4	0,089	-0,015	PN_07_3_3	4	0,092	-0,058	MC_75_1_1	4	0,096	0,041
PN_02_3_5	4	0,063	-0,11	PN_07_3_4	4	0,089	-0,065	MC_75_1_2	4	0,088	0,063
PN_02_3_6	4	0,054	-0,092	PN_07_3_5	4	0,09	-0,06	MC_75_1_3	4	0,093	0,016
PN_02_3_7	4	0,065	-0,101	PN_07_3_6	4	0,089	-0,066	MC_75_1_4	4	0,091	0,026
PN_02_3_8	4	0,088	-0,031	PN_07_3_7	4	0,089	-0,064	MC_75_1_5	4	0,08	0,011
PN_03_1_2	4	0,078	0,021	PN_07_3_8	4	0,096	-0,061	MC_75_2_1	4	0,097	0,021
PN_04_2_2	4	0,059	-0,044	MC_70_1_1	4	0,048	0,126	MC_75_2_2	4	0,095	0,047
PN_04_2_4	4	0,048	-0,029	MC_70_1_2	4	0,063	0,176	MC_75_2_3	4	0,09	0,047
PN_04_3_1	4	0,05	-0,029	MC_70_1_3	4	0,052	0,144	MC_75_2_4	4	0,097	-0,009
PN_04_3_4	4	0,063	0,004	MC_70_1_4	4	0,049	0,195	MC_75_2_5	4	0,096	0,001
PN_04_3_5	4	0,051	-0,019	MC_70_1_5	4	0,051	0,198	MC_75_3_1	4	0,088	0,026
PN_04_3_6	4	0,083	0,006	MC_70_2_1	4	0,04	0,133	MC_75_3_2	4	0,085	0,055
PN_04_3_7	4	0,084	-0,005	MC_70_2_2	4	0,056	0,196	MC_75_3_3	4	0,092	0,035
PN_04_3_8	4	0,072	-0,009	MC_70_2_3	4	0,046	0,162	MC_75_3_4	4	0,094	0,01
PN_06_1_1	4	0,082	-0,094	MC_70_2_4	4	0,049	0,146	MC_75_4_1	4	0,099	0,006
PN_06_1_2	4	0,088	-0,097	MC_70_2_5	4	0,054	0,184	MC_75_4_2	4	0,094	0,038
PN_06_1_3	4	0,089	-0,08	MC_70_3_1	4	0,037	0,142	MC_75_4_3	4	0,075	0,064
PN_06_1_4	4	0,092	-0,018	MC_70_3_2	4	0,049	0,209	MC_75_4_4	4	0,091	0,018
PN_06_1_5	4	0,089	-0,075	MC_70_3_3	4	0,054	0,187	MC_75_5_1	4	0,092	0,016
PN_06_1_6	4	0,086	-0,058	MC_70_3_4	4	0,055	0,184	MC_75_5_2	4	0,092	0,06
PN_06_1_7	4	0,093	-0,025	MC_70_3_5	4	0,052	0,165	MC_75_5_3	4	0,084	0,052
PN_06_1_8	4	0,09	-0,066	MC_70_4_2	4	0,039	0,19	MC_75_5_4	4	0,099	0,021
PN_06_2_1	4	0,089	-0,052	MC_70_4_3	4	0,059	0,19				
PN_06_2_2	4	0,085	-0,021	MC_70_4_4	4	0,048	0,193				
PN_06_2_3	4	0,09	-0,059	MC_70_4_5	4	0,052	0,207				
PN_06_2_4	4	0,086	-0,034	MC_70_5_2	4	0,053	0,175				

ANEXO 12. Coeficientes das componentes principais e Opções (pré-processamento manual)

EIXO X	Opção	PC1	PC2								
MC 58 3 2	3	0,135	-0,117	MC 58 2 2	1	0,171	-0,111	MC 81 1 1	2	0,065	-0,065
MC 70 1 1	3	0,138	-0,157	MC 58 2 3	1	0,169	-0,127	MC 81 1 2	2	0,066	-0,053
MC 70 1 2	3	0,143	0,02	MC 58 2 4	1	0,169	-0,117	MC 81 1 3	2	0,06	-0,005
MC 70 1 3	3	0,148	-0,079	MC 58 2 5	1	0,171	-0,117	MC 81 1 4	2	0,067	-0,061
MC 70 1 4	3	0,104	0,297	MC 58 3 1	1	0,17	0,081	MC 81 1 5	2	0,069	-0,01
MC 70 1 5	3	0,066	0,346	MC 58 3 3	1	0,163	-0,214	MC 81 2 1	2	0,068	-0,036
MC 70 2 1	3	0,128	-0,166	MC 58 3 4	1	0,166	-0,057	MC 81 2 2	2	0,068	-0,035
MC 70 2 2	3	0,15	0,072	MC 58 3 5	1	0,169	0,043	MC 81 2 3	2	0,069	0,001
MC 70 2 3	3	0,141	-0,115	MC 58 4 1	1	0,167	-0,218	MC 81 2 4	2	0,069	-0,003
MC 70 2 4	3	0,138	-0,134	MC 58 4 2	1	0,172	-0,032	MC 81 2 5	2	0,069	0,005
MC 70 2 5	3	0,145	-0,07	MC 58 4 3	1	0,168	-0,179	MC 81 3 1	2	0,065	-0,063
MC 70 3 1	3	0,139	-0,115	MC 58 4 4	1	0,17	-0,007	MC 81 3 2	2	0,068	-0,047
MC 70 3 2	3	0,121	0,237	MC 58 4 5	1	0,17	0,025	MC 81 3 3	2	0,066	-0,006
MC 70 3 3	3	0,118	0,253	MC 58 5 1	1	0,162	-0,299	MC 81 3 4	2	0,068	-0,021
MC 70 3 4	3	0,152	0,01	MC 58 5 2	1	0,165	-0,249	MC 81 3 5	2	0,069	0,002
MC 70 3 5	3	0,147	-0,068	MC 58 5 3	1	0,166	-0,241	MC 81 4 1	2	0,069	-0,03
MC 70 4 2	3	0,09	0,3	MC 58 5 4	1	0,17	-0,143	MC 81 4 2	2	0,068	-0,023
MC 70 4 3	3	0,152	0,036	MC 58 5 5	1	0,17	0,014	MC 81 4 3	2	0,068	-0,032
MC 70 4 4	3	0,131	0,029	MC 70 5 3	1	0,156	0,107	MC 81 4 4	2	0,068	-0,007
MC 70 4 5	3	0,147	0,017	PN 01 1 4	1	0,171	0,055	MC 81 4 5	2	0,069	0,022
MC 70 5 2	3	0,108	0,25	PN 01 1 5	1	0,167	0,134	MC 81 5 1	2	0,069	0,019
MC 70 5 4	3	0,139	0,067	PN 01 1 6	1	0,152	0,337	MC 81 5 2	2	0,068	0,009
MC 70 5 5	3	0,146	-0,07	PN 01 1 7	1	0,169	0,094	MC 81 5 3	2	0,067	-0,013
PN 01 2 1	3	0,133	-0,156	PN 01 1 8	1	0,171	0,028	MC 81 5 4	2	0,067	0,05
PN 01 3 2	3	0,133	-0,109	PN 01 2 4	1	0,168	0,155	MC 81 5 5	2	0,068	0,031
PN 02 1 1	3	0,128	-0,108	PN 01 2 5	1	0,156	0,117	MC 75 1 1	2	0,069	0,002
PN 02 2 1	3	0,141	-0,088	PN 01 2 6	1	0,14	0,421	MC 75 1 2	2	0,067	0,018
PN 03 2 1	3	0,146	-0,094	PN 01 2 7	1	0,158	0,309	MC 75 1 3	2	0,069	0,01
PN 03 2 3	3	0,125	0,216	PN 01 2 8	1	0,169	0,122	MC 75 1 4	2	0,069	-0,003
PN 03 2 5	3	0,142	0,133	PN 01 3 7	1	0,169	0,118	MC 75 1 5	2	0,07	0,002
PN 03 2 6	3	0,148	-0,084	PN 01 3 8	1	0,169	0,172	MC 75 2 1	2	0,069	0,007
PN 03 2 7	3	0,137	-0,146	MC 58 2 1	2	0,053	-0,089	MC 75 2 2	2	0,069	0,012
PN 03 2 8	3	0,141	-0,132	MC 70 4 1	2	0,053	-0,102	MC 75 2 3	2	0,068	0,015
PN 03 3 1	3	0,15	-0,019	MC 70 5 1	2	0,051	-0,128	MC 75 2 4	2	0,07	0,002
PN 03 3 2	3	0,142	-0,128	MC 57 1 1	2	0,069	0,041	MC 75 2 5	2	0,07	0,003
PN 03 3 3	3	0,132	0,178	MC 57 1 2	2	0,069	0,039	MC 75 3 1	2	0,069	0,012
PN 03 3 4	3	0,147	-0,101	MC 57 1 3	2	0,069	0,034	MC 75 3 2	2	0,068	-0
PN 03 3 5	3	0,148	0,003	MC 57 1 4	2	0,069	0,038	MC 75 3 3	2	0,069	-0,004
PN 03 3 6	3	0,146	-0,012	MC 57 1 5	2	0,068	0,046	MC 75 3 4	2	0,069	-0,002
PN 03 3 7	3	0,151	0,041	MC 57 2 1	2	0,068	0,047	MC 75 3 5	2	0,069	-0,033
PN 03 3 8	3	0,148	-0,032	MC 57 2 2	2	0,069	0,042	MC 75 4 1	2	0,07	0,012
PN 05 1 4	3	0,126	-0,041	MC 57 2 3	2	0,069	0,042	MC 75 4 2	2	0,068	0,013
PN 05 1 6	3	0,153	-0,004	MC 57 2 4	2	0,068	0,044	MC 75 4 3	2	0,068	-0,003
PN 05 1 8	3	0,115	0,222	MC 57 2 5	2	0,069	0,036	MC 75 4 4	2	0,069	-0,006
PN 05 2 1	3	0,146	0,085	MC 57 3 1	2	0,069	0,037	MC 75 4 5	2	0,069	-0,016
PN 05 2 2	3	0,14	0,084	MC 57 3 2	2	0,069	0,043	MC 75 5 1	2	0,069	0,026
PN 05 2 5	3	0,138	0,023	MC 57 3 3	2	0,069	0,035	MC 75 5 2	2	0,068	0,007
PN 05 2 6	3	0,15	-0,096	MC 57 3 4	2	0,068	0,04	MC 75 5 3	2	0,067	0,019
PN 05 3 1	3	0,147	-0,058	MC 57 3 5	2	0,068	0,042	MC 75 5 4	2	0,07	0,006
PN 05 3 2	3	0,142	-0,13	MC 57 4 1	2	0,067	0,054	MC 75 5 5	2	0,069	-0,039
PN 05 3 3	3	0,143	0,015	MC 57 4 2	2	0,068	0,043	MC 74 1 1	2	0,069	0,017
PN 05 3 7	3	0,141	0,053	MC 57 4 3	2	0,069	0,034	MC 74 1 2	2	0,07	0,011
PN 05 3 8	3	0,126	0,204	MC 57 4 4	2	0,069	0,039	MC 74 1 3	2	0,069	0,014
MC 58 1 1	1	0,171	0,073	MC 57 4 5	2	0,069	0,039	MC 74 1 4	2	0,069	0,012
MC 58 1 2	1	0,172	0,001	MC 57 5 1	2	0,069	0,04	MC 74 1 5	2	0,069	0,025
MC 58 1 3	1	0,17	0,089	MC 57 5 2	2	0,069	0,042	MC 74 2 1	2	0,07	0,019
MC 58 1 4	1	0,169	-0,14	MC 57 5 3	2	0,069	0,038	MC 74 2 2	2	0,068	0
MC 58 1 5	1	0,171	-0,131	MC 57 5 4	2	0,069	0,035	MC 74 2 3	2	0,069	0,007
				MC 57 5 5	2	0,069	0,038	MC 74 2 4	2	0,069	0,017

MC 74 2 5	2	0,07	0,014	PN 03 1 2	2	0,068	-0,037	PN 06 1 5	2	0,069	0,035
MC 74 3 1	2	0,069	0,015	PN 03 1 3	2	0,063	-0,101	PN 06 1 6	2	0,069	0,032
MC 74 3 2	2	0,07	0,023	PN 03 1 4	2	0,065	-0,076	PN 06 1 7	2	0,065	0,087
MC 74 3 3	2	0,069	0,017	PN 03 1 5	2	0,054	-0,16	PN 06 1 8	2	0,069	0,04
MC 74 3 4	2	0,067	0,034	PN 03 1 6	2	0,069	-0,038	PN 06 2 1	2	0,067	0,057
MC 74 3 5	2	0,069	0,019	PN 03 1 7	2	0,052	-0,166	PN 06 2 2	2	0,057	0,128
MC 74 4 1	2	0,067	0,024	PN 03 1 8	2	0,069	-0,032	PN 06 2 3	2	0,068	0,052
MC 74 4 2	2	0,069	0,007	PN 03 2 2	2	0,062	-0,075	PN 06 2 4	2	0,059	0,089
MC 74 4 3	2	0,07	0,014	PN 03 2 4	2	0,062	-0,112	PN 06 2 5	2	0,058	0,121
MC 74 4 4	2	0,07	0,011	PN 04 1 1	2	0,063	-0,106	PN 06 2 6	2	0,066	0,064
MC 74 4 5	2	0,068	0,004	PN 04 1 2	2	0,067	-0,059	PN 06 2 7	2	0,069	0,043
MC 74 5 1	2	0,069	0,011	PN 04 1 3	2	0,065	-0,089	PN 06 2 8	2	0,061	0,081
MC 74 5 2	2	0,069	0,028	PN 04 1 4	2	0,062	-0,122	PN 06 3 1	2	0,061	0,087
MC 74 5 3	2	0,069	0,011	PN 04 1 5	2	0,064	-0,092	PN 06 3 2	2	0,069	0,024
MC 74 5 4	2	0,07	0,014	PN 04 1 6	2	0,066	-0,078	PN 06 3 3	2	0,064	0,094
MC 74 5 5	2	0,07	0,006	PN 04 1 7	2	0,063	-0,111	PN 06 3 4	2	0,066	0,072
PN 01 1 1	2	0,055	-0,11	PN 04 1 8	2	0,058	-0,143	PN 06 3 5	2	0,066	0,064
PN 01 1 2	2	0,052	-0,147	PN 04 2 1	2	0,062	0,013	PN 06 3 6	2	0,068	0,045
PN 01 1 3	2	0,05	-0,169	PN 04 2 2	2	0,068	-0,003	PN 06 3 7	2	0,065	0,077
PN 01 2 2	2	0,061	-0,056	PN 04 2 3	2	0,058	-0,144	PN 06 3 8	2	0,069	0,037
PN 01 2 3	2	0,049	-0,176	PN 04 2 4	2	0,065	-0,053	PN 07 1 1	2	0,068	-0,064
PN 01 3 1	2	0,062	0,018	PN 04 2 5	2	0,058	-0,131	PN 07 1 2	2	0,069	0,019
PN 01 3 3	2	0,051	-0,167	PN 04 2 6	2	0,062	-0,114	PN 07 1 3	2	0,069	0,025
PN 01 3 4	2	0,056	-0,134	PN 04 2 7	2	0,057	-0,142	PN 07 1 4	2	0,07	0,021
PN 01 3 5	2	0,053	-0,166	PN 04 2 8	2	0,065	-0,081	PN 07 1 5	2	0,069	0,017
PN 01 3 6	2	0,045	-0,181	PN 04 3 1	2	0,068	0,026	PN 07 1 6	2	0,07	0,021
PN 02 1 2	2	0,067	0,065	PN 04 3 2	2	0,062	0,022	PN 07 1 7	2	0,07	0,022
PN 02 1 3	2	0,068	0,059	PN 04 3 3	2	0,064	0,025	PN 07 1 8	2	0,069	0,022
PN 02 1 4	2	0,067	0,061	PN 04 3 4	2	0,068	0,001	PN 07 2 1	2	0,07	0,018
PN 02 1 5	2	0,067	0,064	PN 04 3 5	2	0,067	0,03	PN 07 2 2	2	0,07	0,018
PN 02 1 6	2	0,066	0,071	PN 04 3 6	2	0,068	0,038	PN 07 2 3	2	0,07	0,02
PN 02 1 7	2	0,065	0,075	PN 04 3 7	2	0,069	0,018	PN 07 2 4	2	0,07	0,021
PN 02 1 8	2	0,066	0,066	PN 04 3 8	2	0,068	-0,023	PN 07 2 5	2	0,07	0,024
PN 02 2 2	2	0,068	0,051	PN 05 1 1	2	0,053	-0,16	PN 07 2 6	2	0,07	0,019
PN 02 2 3	2	0,067	0,068	PN 05 1 2	2	0,05	-0,176	PN 07 2 7	2	0,07	0,023
PN 02 2 4	2	0,067	0,06	PN 05 1 3	2	0,06	-0,106	PN 07 2 8	2	0,07	0,019
PN 02 2 5	2	0,06	0,091	PN 05 1 5	2	0,062	-0,064	PN 07 3 1	2	0,069	0,009
PN 02 2 6	2	0,063	0,073	PN 05 1 7	2	0,053	-0,158	PN 07 3 2	2	0,069	0,021
PN 02 2 7	2	0,065	0,069	PN 05 2 3	2	0,067	0,012	PN 07 3 3	2	0,07	0,024
PN 02 2 8	2	0,067	0,064	PN 05 2 4	2	0,059	-0,109	PN 07 3 4	2	0,069	0,027
PN 02 3 1	2	0,064	0,066	PN 05 2 7	2	0,056	-0,149	PN 07 3 5	2	0,07	0,021
PN 02 3 2	2	0,066	0,066	PN 05 2 8	2	0,053	-0,156	PN 07 3 6	2	0,07	0,013
PN 02 3 3	2	0,064	0,073	PN 05 3 4	2	0,066	-0,002	PN 07 3 7	2	0,069	0,021
PN 02 3 4	2	0,068	0,062	PN 05 3 5	2	0,055	-0,144	PN 07 3 8	2	0,07	0,012
PN 02 3 5	2	0,062	0,069	PN 05 3 6	2	0,055	-0,124				
PN 02 3 6	2	0,065	0,061	PN 06 1 1	2	0,069	-0,014				
PN 02 3 7	2	0,066	0,062	PN 06 1 2	2	0,069	0,006				
PN 02 3 8	2	0,06	0,071	PN 06 1 3	2	0,069	0,018				
PN 03 1 1	2	0,067	-0,06	PN 06 1 4	2	0,065	0,084				

9. REFERÊNCIAS

-
- Afseth NK, Segtnan VH, Wold JP. Raman spectra of biological samples: A study of preprocessing methods. *Applied Spectroscopy*. [Article]. 2006 Dec; 60(12):1358-67.
- Armstrong BK, Kricger A. A Skin Cancer. *Dermatol Clin*. [Article]. 1995; 3:583-94.
- Armstrong BK, Kricger A, English DR. Sun exposure and skin cancer. *Australas. J. Dermatol* 1997;38(1):S1-S6.
- Bafounta ML, Beauchet A, Aegerter P, Saiag P. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. *Archives of Dermatology*. 2001;137(10):1343-50.
- Barnhill RL, Mihm Jr MC. The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Semin. Diagn. Pathol* 1993;10:47-75.
- Barry BW, Edwards HGM, Williams AC. Fourier-transform raman and infrared vibrational study of human skin - assignment of spectral bands. *Journal of Raman Spectroscopy* 1992;23(11):641-5.
- Bitar RA, Martinho HDS, Tierra-Criollo CJ, Ramalho LNZ, Netto MM, Martin AA. Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. [Article]. 2006;11(5):8.
- Blank IH. Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 1953;21(4):259-71.
- Bouwstra JA, Dubbelaar FER, Gooris GS, Weerheim AM, Ponc M. The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1999; 1419(2):127-36.
- Breslow A. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Annals of Surgery*. 1970;172(5):902-&.
- Cao A, Pandya AK, Serhatkulu GK, Weber RE, Dai H, Thakur JS, et al. A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence. *Journal of Raman Spectroscopy*. [Article]. 2007 Sep;38(9):1199-205.
- Capozzi V, Perna G, Gallone A, Biagi PF, Carmone P, Fratello A, et al. Raman and optical spectroscopy of eumelanin films. *Journal of Molecular Structure*. [Article]. 2005 Jun;744:717-21.
- Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA, Puppels GJ. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: Noninvasive determination of molecular concentration profiles. *Journal of Investigative Dermatology* 2001;116(3):434-42.
- Cassileth BR, Clark WH Jr, Lusk EJ, Frederick BE, Thompson CJ, Walsh WP. How well do physicians recognize melanoma and other problem lesions? *J Am Acad Dermatol*. 1986;14(4):555-60.
-

- Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, Lane SM, Ihara K, Huser T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophysical Journal*. [Article]. 2006 Jan;90(2):648-56.
- Chen SC, Bravata DM, Weil E, Olkin I. A comparison of dermatologists' and primary care physician accuracy in diagnosing melanoma: A systemic review. *Arch Dermatol* 2001;137:1627-34.
- Cheresh DA. Structure, function and biological properties of integrin $\alpha\beta 3$ on human melanoma cells. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1991, 10(1):3-10.
- Choi J, Choo J, Chung H, Gweon DG, Park J, Kim HJ, et al. Direct observation of spectral differences between normal and basal cell carcinoma (BCC) tissues using confocal Raman microscopy. *Biopolymers*. [Article]. 2005 Apr;77(5):264-72.
- Delhaye M, Dhamelincourt P. Raman microprobe and microscope with laser excitation. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1975; 3: 33–43.
- Edwards HGM, Williams AC, Barry BW. Potential applications of ft-raman spectroscopy for dermatological diagnostics. *Journal of Molecular Structure*. 1995 Mar;347:379-87.
- Elder DE, Montone KT, Sauter E and Herlyn M. *Am J Pathol* 1998;152, 1179-86.
- Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*. [Review]. 2006;131(8):875-85.
- Fendel S, Schrader B. Investigation of skin and skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. [Article]. 1998 Mar;360(5):609-13.
- Frushour BG, Koenig JL. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers*. 1975; 14(2):379-391.
- Gao XL, Butler IS, Kremer R. A near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy of epidermal keratinocytes: changes in the protein-DNA structure following malignant transformation. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. [Article]. 2005 Jan;61(1-2):27-35.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens – structure, function and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55: 1531-1546.
- Gniadecka M, Nielsen OF, Christensen DH, Wulf HC. Structure of Water, Proteins, and Lipids in Intact Human Skin, Hair, and Nail. *Journal of Investigative Dermatology* 1998; 110, 393-8.
- Gniadecka M, Nielsen OF, Wulf HC. Water content and structure in malignant and benign skin tumours. *Journal of Molecular Structure*. [Article]. 2003;661:405-10.

- Gniadecka M, Philipsen PA, Sigurdsson S, Wessel S, Nielsen OF, Christensen DH, et al. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: Structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. *Journal of Investigative Dermatology*. [Article]. 2004 Feb;122(2):443-9.
- Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma. *Arch. Dermatol* 2001;137, 1493-6.
- Green KJ, Jones JC. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *The FASEB Journal* 1996;10:871-81.
- Haluska FG, Hodi FS. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 1998;16:670-82.
- Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*. 2000 Feb;45(2):R1-R59.
- Harland CC, Kale SG, Jackson P, Mortimer PS, Bamber JC. Differentiation of common benign pigmented skin lesions from melanoma by high-resolution ultrasound. *British Journal of Dermatology*. 2000 Aug;143(2):281-9.
- Harris ED, Faulkner CS, Wood S. Collagenase in carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972; 48: 1247-1253.
- Harris ED, Krane SM. Collagenases: second of three parts. *N. Engl. J. Med.* 1974; 290: 605-609.
- Huang ZW, Lui H, Chen XK, Alajlan A, McLean DI, Zeng HS. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *Journal of Biomedical Optics*. [Article]. 2004 Nov-Dec;9(6):1198-205.
- Huang ZW, Lui H, McLean DI, Korbelik M, Zeng HS. Raman spectroscopy in combination with background near-infrared autofluorescence enhances the in vivo assessment of malignant tissues. *Photochemistry and Photobiology*. [Article]. 2005 Sep-Oct;81(5):1219-26.
- Huang ZW, Zeng HS, Hamzavi I, Alajlan A, Tan E, McLean DI, et al. Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation. *Journal of Biomedical Optics*. [Article]. 2006 May-Jun;11(3):6.
- Imokawa G, Akasaki S, Hattori M, Yoshizuka N. Selective Recovery of Deranged Water-Holding Properties by Stratum Corneum Lipids *Journal of Investigative Dermatology* 1986;87:758-61.
- Jemal A, Devesa SS, Hartge P and Tucker MA. Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001;93:678-83.
-

Jhappan C, Frances PN, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 2003; 22, 3099-12.

Junqueira JC, Carneiro J. *Histologia Básica*, 10^a ed. Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro-RJ, 2004.

Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: Diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol* 2001;45: 260-76.

Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncology*. 2002; 3(3):159-65.

Kline NJ, Treado PJ. Raman Chemical Imaging of Breast Tissue. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1998;28(2-3):119-24.

Kunapareddy N, Freyer JP, Mourant JR. Raman spectroscopic characterization of necrotic cell death. *Journal of Biomedical Optics*. 2008; 13, 054002.

Lever WF, Schaumburg-Lever G. *Histopatologia da pele* - São Paulo: Manole, 1991.

Lieber CA, Majumder SK, Billheimer D, Ellis DL, Mahadevan-Jansen A. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *Journal of Biomedical Optics* 2008; 13, 024013.

Liu CH, Das BB, Glassman WLS, Tang GC, Yoo KM, Zhu HR, et al. Raman, fluorescence, and time-resolved light-scattering as optical diagnostic-techniques to separate diseased and normal biomedical media. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 1992;16(2):187-209.

Lyng FM, Faoláinb EO, Conroyc J, Meadeb AD, Kniefb P, Duffyd B, Huntere MB, Byrnee JM, Kelehane P, Byrneb HJ. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. *Experimental and Molecular Pathology* 2007; 82(2):121-9.

Mackie RM. Eur. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *J. Cancer* 1998, 34(3), S3-S6.

Mackie RM. Malignant melanoma: Clinical variants and prognostic indicators. *Clin Exp Dermatol* 2000;25: 471-5.

Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin. Exp. Dermatol*. 2000; 25:459-63.

Mendelsohn R, Flach CR, Moore DJ, Ze. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. [Review]. 2006 Jul;1758(7):923-33.

Messenger AG, Elliott K, Temple A, Randall VA. Expression of Basement Membrane Proteins and Interstitial Collagens in Dermal Papillae of Human Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 1991;96:93-7.

-
- Meyer LE, Lademann J. Application of laser spectroscopic methods for in vivo diagnostics in dermatology. *Laser Physics Letters*. [Article]. 2007;4(10):754-60.
- Mirjam GN, Roel QJ. Schaapveld and Arnoud Sonnenberg. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biology* 1999;18(1):5-17.
- Miura T, Thomas GJ. Structure and dynamics of interstrand guanine association in quadruplex telomeric DNA. *Biochemistry*. 1995;34(29):9645-54.
- Mizuno A, Kitajima H, Kawauchi K, Muraishi S, Ozaki Y. Near-infrared fourier-transform raman-spectroscopic study of human brain-tissues and tumors. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1994 Jan;25(1):25-9.
- Morton CA and MacKie RM. Clinical accuracy of the diagnosis of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1998 138 283-7.
- Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MHA, Puppels GJ. Discriminating Basal Cell Carcinoma from its Surrounding Tissue by Raman Spectroscopy. *Journal of Investigative Dermatology*. 2002; 119: 64–69.
- Osada M, Gniadecka M, Wulf HC. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic analysis of proteins, water and lipids in intact normal stratum corneum and psoriasis scales. *Experimental Dermatology*. [Article]. 2004 Jun;13(6):391-5.
- Pappas D, Smith BW, Winefordner JD. Raman spectroscopy in bioanalysis. *Talanta*. [Article]. 2000;51(1):131-44.
- Pavone L, Curatolo P, Rizzo R, Micali G, Incorpora G, Garg BP, et al. Epidermal nevus syndrome: a neurologic variant with hemimegalencephaly, gyral malformations, mental retardation, seizures, and facial hemihypertrophy. *Neurology* 1991; 41: 266-71.
- Perna G, Gallone A, Capozzi V, Biagi PF, Fratello A, Guida G, Zanna P, Argenzio E, Cicero R. Optical Spectra of Melanin Films Extracted from *Rana esculenta* L. 2005, T118:89.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type 1 collagen matrix. *J. Cell Biol.* 1997; 137: 1445-1457.
- Pimentel GC, McClellan AL. Hydrogen Bonding. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1971; 22:347-85.
- Prichard RS, Hill ADK, Skehan SJ, O'Higgins NJ. Positron emission tomography for staging and management of malignant melanoma. *British Journal of Surgery*. 2002;89(4):389-96.
-

Reedy MV, Faraco CD, Erickson CA. Specification and migration of melanoblasts at the vagal level and in hyperpigmented Silkie chickens. *Dev. Dyn.*, 1998; 213(4), 476-85.

Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J. Clin.* 2000; 50:215-36.

Rogers M. Epidermal nevi and the epidermal nevus syndromes: a review of 233 cases. *Pediat Dermatol* 1992; 9: 342-4.

Roméro-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP; Robert Ballotti R. Ultraviolet B Radiation Acts through the Nitric Oxide and cGMP Signal Transduction Pathway to Stimulate Melanogenesis in Human Melanocytes. *JBC On Line*. 1996; 271(45): 28052-28056.

Rosasco GJ, Etz ES, Cassatt WA. The Analysis of Discrete Fine Particles by Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 1975, 29(5):396-404.

Ross MH. *Histologia: texto e Atlas*. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ; com ilustrações de Lydia V. Kibiul; tradução supervisionada pelo Prof. Gerson Cotta-Pereira. 2ª ed. – São Paulo: Panamericana, 1993.

Sala O. *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*; São Paulo; 1996.

Sigurdsson S, Philipsen PA, Hansen LK, Larsen J, Gniadecka M, Wulf HC. Detection of skin cancer by classification of Raman spectra. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2004;51(10):1784-93.

Shen AG, Ye Y, Zhang JW, Wang XH, Hu JM, Xie W, et al. Screening of gastric carcinoma cells in the human malignant gastric mucosa by confocal Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 2005;37(2):225-31.

Short MA, Lui H, McLean D, Zeng HS, Alajlan A, Chen XK, et al. Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* 2006;11(3):9.

Slater DN. Doubt and uncertainty in the diagnosis of melanoma. *Histopathology*. 2000;37(5):469-72.

Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss* 2004;126:141-57.

Tfayli A, Piot O, Durlach A, Bernard P, Manfait M. Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR micro spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. [Article]. 2005;1724(3):262-9.

Tu AT. Peptide backbone conformation and microenvironment of protein side chains. *Advances in infrared and Raman spectroscopy*. 1986;13:47-112.

- Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ, Johnson TM. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br. J. Cancer.* 2000; 82: 657-665.
- Wertz PW, Downing DT. Glycolipids in mammalian epidermis: structure and function in the water barrier. *Science*, 1982;217(4566):1261-2.
- Williams AC, Edwards HGM, Barry BW. Fourier-transform raman-spectroscopy - a novel application for examining human stratum-corneum. *International Journal of Pharmaceutics.* 1992;81(2-3):R11-R4.
- Williams AC, Edwards HGM, Barry BW. Raman-spectra of human keratotic biopolymers - skin, callus, hair and nail. *Journal of Raman Spectroscopy.* 1994;25(1):95-8.
- Yaar M, Gilchrist BA. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clin. Exp. Dermatol.* 2001; 26, 583-91.
- Zhang GJ, Moore DJ, Mendelsohn R, Flach CR, Ty. Vibrational microspectroscopy and imaging of molecular composition and structure during human corneocyte maturation. *Journal of Investigative Dermatology* 2006;126(5):1088-94.
- Zhang GJ, Moore DJ, Flach CR, Mendelsohn RA. Vibrational microscopy and imaging of skin: from single cells to intact tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* [Article]. 2007;387(5):1591-9.
- Zhao J, Harvey L, McLean DI, Zeng H. Real-time raman spectroscopy for non-invasive skin cancer detection - preliminary results. *Engineering in Medicine and Biology Society 2008. EMBS 2008. 30th Annual International Conference of the IEEE.* 2008;1(3107-3109)
- L. Chung, D. Dinakarandian, N. Yoshida, J. Lauer-Fields, G. Fields, R. Visse, and H. Nagase, "Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis," *EMBO J.* 23, 3020–3030_2004_.
-

Abstract

Introduction: Pigmented skin lesions evaluation for primary melanoma early diagnosis is based on macro and microscopical analysis by means of pre-established standard histopathology morphological models. However, diagnostic sensitivity and specificity depend on the specialists experiences. Facing this problem, studies concerning about the diagnostic methods automation are being discussed. Optical Biopsy is a experimental technique, which main advantage is that biological samples biochemical characteristics are extracted in a reproducible way, whose interpretation will depend on mathematical algorithms developed exclusively for this purpose. Raman spectroscopy is one of Optical Biopsy techniques, known to be highly compatible for biological systems studies. Raman spectroscopy has been used in the last 10 years in the evaluation of neoplastic lesions to promote diagnosis. **Objective:** To evaluate the feasibility of pre-processing algorithms for Micro-Raman spectra of normal skin epidermis and cutaneous melanoma classification. **Methods:** Seven samples of normal skin and six samples of cutaneous melanoma in native were sectioned using a cryostat with 16 μm thick section per sample and distributed on CaF_2 slides for Micro-Raman spectral acquisition. A Micro-Raman spectrometer was built with a excitation laser @780 nm, optical circuit composed by lenses, filters, mirrors, optical inverted microscope, and a CCD detector. It was collected 168 spectra of normal skin and 150 of cutaneous melanoma. The classification of the Normal Skin and Melanoma subgroups was performed using Principal Components Analysis and Cluster Analysis, and the diagnostic classification was performed applying Principal Components Analysis and Linear Discriminant Analysis. **Results:** Vibrational modes assignment was referred to the Raman spectral region from 1200 to 1800 cm^{-1} . Especially at 1260, 1300, 1380, 1440, 1550, 1650 cm^{-1} , the vibrational modes were attributed to nucleic acids, Amide III and lipids, aromatic ring C=C breathing bands of melanin, symmetric CH stretch of lipids and proteins and C=O stretching of proteins and lipids from C=C. The spectral classification and cell allocation was possible for the two groups. For normal skin it was possible find the spectral feature for: corneal layer, keratinocytes, melanocytes and collagen; for melanoma, spectral features were attributed to acral melanoma (keratin), melanoma with high melanocytic pigmentation, hemosiderin pigmentation, inflammatory, necrotic and fibrous tissues. Diagnostic classification was possible with sensitivity between 39.1 % and 100 % and specificity between 54.8 % to 100 %, depending on the subgroups confronted. **Conclusion:** Spectra aquisition, pre-processing and classification algorithms mehod were viable for histological types diagnosis of cutaneous melanoma.
