INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# Diagnóstico de lesões da tireóide pela espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

**FELIPE GUIMARÃES ALBERO**

**Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais.**

**Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**SÃO PAULO**
**2009**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

# DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA TIREÓIDE PELA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR

**FELIPE GUIMARÃES ALBERO**

**Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais.**

**Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**SÃO PAULO**
**2009**

# *Dedicatória*

Aos meus pais **Martin** e **Maria Regina**, e ao meu irmão **Mauricio**, pela base sólida que me deram, por todo Amor, incentivo, paciência, carinho e compreensão nestes anos todos, sem os quais não seria possível a concretização de mais este sonho.

# *Agradecimentos especiais*

Ao doce e sublime **Deus**, pelo Dom da Vida e ao Seu Amor, sempre sedutor e acolhedor.

À **Profa. Dra. Denise Maria Zezell**, minha grande tutora e auxiliadora em todos os momentos, principalmente nas horas de decisões importantes e trabalhos paralelos ao Projeto; que me fizeram crescer profissionalmente além do que imaginava.

Ao **Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara**, pela sua sabedoria, disposição , paciência, apoio e valiosíssimas discussões que forneceram muitas idéias em todos os momentos da realização deste trabalho.

À amiga **Profa. Dra. Patricia da Ana**, inseparável, prestativa, muito disposta, por todos os momentos juntos na alegria e no desespero de experimentos que não se ajustavam aos nossos desejos.

# *Agradecimentos*

Ao **Dr. Orlando Parise Jr.** pelas discussões e apoio desde minha iniciação científica, assim como pela disponibiização das amostras analisadas neste trabalho.

À **Profa. Dra. Sonia L. Baldochi**, pelas agradáveis contribuições no seminário de área.

À **Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**, pelo excelente convívio e bom humor incomparável.

Ao **Prof. Anderson Z. de Freitas**, por todas as discussões do decorrer deste e de tantos outros trabalhos.

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)** e ao **Centro de *Lasers* e Aplicações (CLA),** especialmente na pessoa do **Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Jr.**, por permitir a utilização de suas dependências e equipamentos.

Àos **Hospital Sírio Libanês** à antiga equipe do Laboratório de Patologia pela disposição das amostras e seus diagnósticos histopatológicos para análise neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Anderson S. L. Gomes** e a todos os colegas do Laboratório de Optoeletrônica e Fotônica da Universidade Federal do Recife por todo apoio técnico indispensável para a realização de inúmeros projetos juntos.

Ao técnico **Valdir** do CLA-IPEN, por todo o apoio.

Aos colegas da pós-graduação do CLA-IPEN **Cacau, Carol, Claudinha, Ilka, Juca, Marcus, Marcelo, Moisés, Quinto, Renato, Strefezza, Thiago e Vivi** pelas discussões e bons momentos compartilhados.

Aos colegas do **Laboratório de Radicais Livres e Bioluminescência do Instituto de Química da USP** por todas as explicações e pela receptividade.

Aos secretários do CLA-IPEN **Sueli** e **Sr. Tito**, por toda a orientação e simpatia nestes anos.

À amiga **Andrea Malavazzi** pelo carinho de sempre.

Ao **Prof. Dr. Luciano Bachmann**, pelo auxílio nas primeiras análises dos espectros.

À **Profa. Dra. Maria Claudia França da Cunha Felinto** pela amizade, confiança e parcerias.

Aos meus amigos **Elen Gonçalves do Santos**, **Sérgio Brossi Botta** (**Maninho**), **Karina Corleto de Oliveira**, **Edilson Fiel Martins** por todos os bons momentos e pelo companheirismo a toda hora.

Aos funcionários da CPG-IPEN **Ilze, Verinha, Rose, Ana** e **Fernando** pela ajuda fundamental principalmente para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários da segurança do IPEN pela amizade e compreensão nas altas horas em que ficava executando experimentos, principalmente ao Sr Luiz, Rubens e Ornedo.

À **Suzanne Marques** pelo Amor e Carinho destes anos que passamos juntos e que possui a Paciência, um dom de poucos.

Ao **Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda**, meu ídolo, tutor e amigo de muitas coisas na minha Vida (tanto profissional e acadêmica) e sem esta pessoa maravilhosa não estaria no IPEN e nem seria Físico Médico.

À **Cristiane e Famíla Cupertino** pela amizade, carinho e orações. Mesmo estando muito longe, os corações estão unidos.

Ao meu amigo **Pe. Toninho Maria**, pela compreessão e paciência das minhas ausências e sempre estar do meu lado quando mais preciso.

Ao **CNPq** (Processo 135161/2007-0), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao **CNPq**, pelo financiamento parcial deste trabalho com o programa **Institutos do Milênio** (Processo 420177/2005-1).

Ao **CEPOF-FAPESP (Centro de Óptica e Fotônica),** processos CEPID 98/14270-8 e 05/51689-2, pela aquisição do FTIR.

Ao CNPq, projeto **Nanofóton** (Processo 555170/2005-5).

Ao CNPq, projeto **INFO** (Processo 573916/2008-0).

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*Quando meu espírito se entregou ao estudo da sabedoria e à observação das coisas que se passam sobre a terra – porque nem de dia, nem de noite os olhos dos homens encontram repouso; verifiquei, em toda a obra de Deus, que o homem nada pode descobrir do que se faz debaixo do sol. Ele se fatiga a investigar, mas não encontra e, se mesmo um sábio pensasse ter alcançado, isso não aconteceria.*

*(Eclesiastes 8,16-17)*

**DIAGNÓSTICO DE LESÕES DA TIREÓIDE PELA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR**

**Felipe Guimarães Albero**

**RESUMO**

Os nódulos de tireóide constituem patologia comum, com uma incidência entre 4-7% na população brasileira. Embora a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seja um método com boa sensibilidade, a discriminação entre lesões benignas e neoplasias malignas não é possível em todos os casos, permitindo a incidência de diagnósticos falsos-positivos, o que conduz a tireoideotectomia pelo risco de carcinoma. O escopo deste estudo foi verificar se a espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) pode contribuir no diagnóstico diferencial entre neoplasias malignas e benignas de tecidos e aspirados. Amostras de PAAF, homogenatos e tecidos de nódulos de tireóide com o diagnóstico histopatológico foram obtidos e preparados para análise espectroscópica por FTIR. As punções e homogenatos foram medidas por μ-FTIR (entre 950 – 1750 $cm^{-1}$, com resolução de 4 $cm^{-1}$ e 120 varreduras). As amostras de tecido foram analisadas diretamente pela técnica de ATR-FTIR, com resolução de 2 $cm^{-1}$, 60 varreduras, região entre 950 – 1750 $cm^{-1}$.. Todos os espectros foram corrigidos pela linha base e normalizados pela área sob a banda das amidas (1550-1640 $cm^{-1}$) de modo a minimizar as variações de homogeneidade das amostras. Os espectros foram então convertidos em segundas derivadas usando-se o filtro de Savitzk-Golay com 13 pontos na janela. A variância de Ward e distância euclidiana foram usadas para se processar a análise de *clusters*. As amostras de PAAF revelaram um complexo padrão espectral. Todas as amostras mostraram alguns aglomerados de células ou grande concentração de hormônios, tendo representação em algumas bandas em 1545 e 1655 $cm^{-1}$. Foram também encontradas bandas em torno de 1409, 1412, 1414, 1578 and 1579 $cm^{-1}$, indicando a possível presença de açúcares, DNA e ácido cítrico de produtos metabólitos. Neste estudo, foi obtida uma excelente separação entre bócio adenomatoso e neoplasias malignas para as amostras de tecido, com 100% de sensibilidade em determinado cluster, mas 67% no geral e 50% de especificidade. Nos homogenatos e aspirados este valor foi menor (76,2% de sensibilidade e 52,6% de especificidade) porque incluiu outros tipos de lesões. Para uma maior diferenciação das amostras de PAAF de padrão folicular, um maior número de

amostras se faz necessário. Os resultados deste estudo sugerem que a espectroscopia FTIR pode ser útil na diferenciação de carcinomas da tiróide em amostras de tecidos.

# THYROID LESIONS DIAGNOSIS BY FOURIER TRANSFORMED INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY (FTIR)

**Felipe Guimarães Albero**

## ABSTRACT

Thyroid nodules are a common disorder, with 4-7% of incidence in the Brazilian population. Although the fine needle aspiration (FNA) is an accurate method for thyroid tumors diagnosis, the discrimination between benign and malignant neoplasm is currently not possible in some cases with high incidence of false negative diagnosis, leading to a surgical intervention due to the risk of carcinomas. The aim of this study was to verify if the Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR) can contribute to the diagnosis of thyroid carcinomas and goiters, using samples of tissue and aspirates. Samples of FNA, homogenates and tissues of thyroid nodules with histopathological diagnosis were obtained and prepared for FTIR spectroscopy analysis. The FNA and homogenates samples were measured by μ-FTIR (between 950 – 1750 $cm^{-1}$), at a nominal resolution of 4 $cm^{-1}$ and 120 scans). Tissue samples were analized directly by ATR-FTIR technique, at a resolution 2 $cm^{-1}$, with 60 scans in the same region. All spectra were corrected by the baseline and normalized by amides area (1550-1640 $cm^{-1}$) in order to minimize variations of sample homogeneity. Then, spectra were converted into second derivatives using the Savitzk-Golay algorithm with a 13 points window. The Ward's minimum variance algorithm and Euclidean distances among the points were used for cluster analysis. Some FNA samples showed complex spectral pattern. All samples showed some cell pellets and large amount of hormone, represented by the bands of 1545 and 1655 $cm^{-1}$. Bands in 1409, 1412, 1414, 1578 and 1579 $cm^{-1}$ were also found, indicating possible presence of sugar, DNA, citric acid or metabolic products. In this study, it was obtained an excellent separation between goiter and malign lesion for the samples of tissues, with 100% of specificity in specific cluster and 67% sensibility and 50 of specificity. In homogenate and FNA samples this sensibility and specificity were lower, because among these samples, it were included many types of thyroid lesions. To obtain a more precise diagnosis for FNA of follicular thyroid the sample size should be increased. The results of this study suggest that FTIR spectroscopy may be useful for discriminate thyroid carcinomas from goiters in tissue samples.

## SUMÁRIO

**Página**


**1. INTRODUÇÃO** ..... 15
**2. OBJETIVOS** ..... 18
**3. REVISÃO DA LITERATURA** ..... 20
3.1. A glândula tireóide ..... 20
3.2. Patologias benignas que afetam a glândula tireóide ..... 24
3.2.1. Doença de Graves ..... 25
3.2.2. Bócio nodular tóxico ..... 25
3.2.3. Bócio Adenomatoso ..... 25
3.2.4. Tireoidite ..... 26
3.3. Patologias malignas da tireóide ..... 26
3.3.1. Carcinoma papilífero ..... 28
3.3.2. Carcinoma folicular ..... 29
3.3.3. Carcinoma anaplásico ..... 30
3.3.4. Carcinoma medular ..... 30
3.3.5. Linfomas ..... 31
3.3.6. Outras patologias malignas ..... 31
3.4. Diagnóstico das patologias da tireóide ..... 32
3.4.1. Avaliação laboratorial ..... 32
3.4.2. Ultrassonografia ..... 32
3.4.3. Punção aspirativa por agulha fina ..... 34
3.4.4. Outros métodos diagnósticos ..... 34
3.5. Diagnóstico por espectroscopia óptica ou molecular ..... 35
3.5.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ..... 37
3.5.4. Análise estatística multivariada para espectros ..... 43
4. MATERIAL E MÉTODOS ..... 47
***4.1. Obtenção das amostras*** ..... 47
***4.2. Preparo das amostras para espectroscopia FTIR*** ..... 47
4.2.1. Preparo dos tecidos ..... 49
4.2.2. Preparo dos homogenatos ..... 49
4.2.3. Preparo dos aspirados de punções ..... 49
**4.3. Métodos de caracterização espectroscópica por FTIR** ..... 49
4.3.1. Obtenção dos espectros de FTIR dos tecidos ..... 50
4.3.2. Caracterização dos homogenatos e aspirados ..... 52
4.4. Metodologia de análise estatística dos espectros ..... 54
4.4.1. Filtro de Savitsky-Golay ..... 55

4.4.2. Métodos Aglomerativos ..... 58
4.4.2.1. Métodos de ligação (single linkage, complete linkage, average linkage, median linkage) ..... 58
4.4.2.2. Métodos de centróide ..... 60
4.4.2.3. Métodos de soma de erros quadráticos ou variância (método de *Ward*) ..... 61
4.4.2.4. Medidas de similaridade ..... 62
4.4.2.5. Análise de Componentes Principais (PCA) e *Loading Plot* ..... 63
5. RESULTADOS ..... 67
5.1. Análise espectral e estatística por Componentes Principais (PCA) ..... 67
5.2. Análise estatística multivariada ..... 73
5.2.1. Análise dos espectros dos tecidos ..... 74
5.2.1.1. *Loading plot* ..... 75
5.2.1.2. Tabela de significância estatística para os espectros dos tecidos ..... 78
5.2.1.3. Gráficos de dispersão dos espectros dos tecidos ..... 78
5.2.1.4. Clusters depois do PCA de tecidos ..... 81
5.2.2. Análise dos espectros dos homogenatos ..... 82
5.2.2.1. *Loading plot* ..... 83
5.2.2.2. Tabela de significância estatística para homogenatos ..... 85
5.2.2.3. Gráficos de dispersão para homogenatos ..... 86
5.2.2.4. Dendrogramas depois do PCA ..... 88
**5.2.3 – Análise dos aspirados das punções** ..... 89
5.2.3.1. *Loading plot* dos aspirados ..... 92
5.2.3.2. Tabela de significância estatística dos aspirados ..... 94
5.2.3.3. Gráficos de dispersão dos aspirados ..... 95
5.2.3.4. Clusters depois do PCA ..... 97
6. DISCUSSÃO ..... 99
7. CONCLUSÕES ..... 106
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 110

# *Introdução*

# 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias ocupam o segundo lugar no ranking das causas de morte no Brasil de acordo com o Ministério da Saúde, apresentando maior incidência na população do sexo feminino. O câncer de tireóide, neoplasia endócrina mais comum, corresponde a 1,3% de todos os casos de câncer, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde (INCA/MS), sendo responsável por 6,4% de todos os cânceres computados de cabeça e pescoço[1]. O diagnóstico e o tratamento precoce destas neoplasias, associado ao melhor monitoramento e tratamento das condições tireoideanas benignas, propiciou um significante declínio na mortalidade por câncer de tireóide no Brasil ao longo dos últimos 20 anos, de forma que, em 2005, a taxa de mortalidade para o sexo masculino foi de 0,22 para cada 100.000 habitantes, enquanto que para o sexo feminino foi de 0,42 para cada 100.000 habitantes[2].

As neoplasias tireoideanas são divididas basicamente em diferenciadas e pouco diferenciadas[3]. Dentre as diferenciadas, destacam-se o carcinoma papilífero (70 – 80% dos casos), o carcinoma folicular (15 – 20% dos casos) e o carcinoma das células de Hürtle[4]. Dentre as neoplasias pouco diferenciadas, encontram-se os carcinomas medulares (5 – 8% dos casos) e os anaplásicos (1 – 3% dos casos)[5].

A detecção de nódulos benignos, malignos e das metástases cervicais se faz primariamente pelo exame de ultrassonografia, o qual, por sua inespecificidade, requer exames complementares para caracterização do nódulo quanto à sua natureza[6], embora apresente maior sensibilidade e especificidade do que a punção aspirativa por agulha fina (P.A.A.F.) no diagnóstico de bócio colóide adenomatoso[7]. Desta maneira, o exame de punção aspirativa por agulha fina (P.A.A.F.), direcionada por ultrassonografia, é realizada como técnica diagnóstica padrão[8], apresentando elevada sensibilidade e especificidade para diagnóstico de tumores. Contudo, esta técnica apresenta resultados inconclusivos para algumas patologias, tais como o nódulo hiperplásico, o carcinoma folicular e adenoma folicular, tendo como um valor preditivo positivo em mais de 90% para o carcinoma anaplásico, 80% para o carcinoma medular, 58% para o carcinoma

papilífero, 66% para o linfoma e somente 20% para o carcinoma folicular e carcinoma de células de Hürtle. Assim, esta técnica apresenta cerca de 86% de sensibilidade e 74% para os diagnósticos gerais das patologias da tireóide[9].

Outras técnicas como complemento diagnóstico, porém de raro emprego são a cintilografia, a tomografia computadorizada helicoidal (TC), a ressonância magnética nuclear (MRI) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET)[10]. Estas são empregadas principalmente nos casos de tumores altamente invasivos, principalmente com o comprometimento do mediastino, não permitindo a diferenciação, contudo, de lesões benignas de malignas. Mais recentemente, a ultrassonografia com doppler colorido passou a ser amplamante empregada como método diagnóstico prévio à P.A.A.F. devido à possibilidade de caracterização do padrão de vascularização dos nódulos tireóideos[11], considerando que a proliferação celular está relacionada a um aumento da sua vascularização[12,14].

Embora seja considerada o método diagnóstico padrão para todas as patologias malignas que acometem a glândula tireóide, a P.A.A.F. ainda apresenta um grande número de limitações, principalmente nos casos de tumores de pequeno tamanho e associados com inflamações ou degenerações no tecido adjacente[13], além da dificuldade de diferenciação entre carcinoma folicular e bócios[14].

Considerando que as lesões, malignas ou benignas, apresentam diferentes características químicas em suas células, tecidos e fluidos, as alterações bioquímicas podem ser eficientemente evidenciadas por espectroscopia[15]. Assim, as análises por espectroscopia no infravermelho (FTIR) [16,17] , associadas às análises espectrais e de estatística multivariada[18,19] passaram a ser investigadas para aprimorar o diagnóstico de casos considerados inconclusivos ao exame por P.A.A.F., com o objetivo de diminuir principalmente os índices de *falso-positivos*. Contudo, embora tenham sido obtidos resultados promissores, há ainda a necessidade de submeter os dados a outros tipos de tratamentos estatísticos que possam diferenciar com eficiência os diferentes tipos de lesões, o que aumentaria a especificidade e a sensibilidade da espectroscopia no infravermelho e confirmaria, assim, seu potencial como complemento diagnóstico.

# *Objetivos*

# 2. OBJETIVOS

Este estudo objetivou:

1 – Caracterizar espectros de FTIR, pela técnica de ATR, de amostras de nódulos da tireóide;

2 – Caracterizar espectros de FTIR de amostras de punções de biópsias aspirativas por agulha fina e homogenatos;

3 – Verificar a eficácia da espectroscopia FTIR como potencial método diagnóstico por meio da análise estatística espectral multivariada.

# *Revisão da Literatura*

# 3. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo procurou-se contextuar e descrever, em uma primeira parte, a glândula tireóide, apontando as principais patologias associadas, assim como revisar a literatura com relação aos métodos diagnósticos para tal. A segunda parte contextualiza os novos processos que estão revolucionando a pesquisa e o meio da saúde aplicados ao diagnóstico do câncer, com ênfase em métodos que empregam a análise estatística multivariada e se utilizam de técnicas ópticas.

## *3.1. A glândula tireóide*

A tiróide é uma das maiores glândulas do corpo. Essa glândula é responsável pela produção dos hormônios T3 (tri-iodotironina) e T4 (tiroxina), os quais regulam o metabolismo do corpo, e calcitonina, importante na homeostase do cálcio[20].

Trata-se de uma glândula de tom vermelho acastanhado e altamente vascularizada, situando-se na parte inferior do pescoço, entre a quinta vértebra cervical e primeira vértebra torácica, encerrada num compartimento fascial formado por uma bainha pré-traqueal que fixa a glândula à traqueia e laringe através do ligamento crico-tireóideo[21]. É constituída por dois lobos, um direito e um esquerdo unidos no plano mediano por uma banda de tecido glandular - o istmo. Os lobos são aproximadamente cônicos, os seus ápices divergem lateralmente até ao nível das linhas oblíquas nas lâminas das cartilagens tireóideas, estando as suas bases ao nível da quarta ou quinta cartilagem traqueal. Cada lobo mede aproximadamente 5 cm de comprimento e cerca de 2 a 3 cm na sua maior extensão transversa ântero-posterior. A sua face póstero - medial está presa ao lado da cartilagem cricóidea por um ligamento tireo-hióideo lateral. A face lateral (superficial) é convexa e coberta pelo músculo esterno-tiroideo, cuja inserção na linha oblíqua da cartilagem tireóide impede a extremidade superior da glândula de se estender sobre o músculo tireo-hióideo.

Mais anteriormente estão o músculo esterno-tiródeo e o ventre

superior do omo-hiódeo sobreposto inferiormente pela margem anterior do músculo esternocleidomastoideo. A face medial está adaptada à laringe e traquéia fazendo contato, na sua extermidade superior com o músculo constritor inferior da faringe, com a parte posterior do músculo cricotireóideo, que a separa da parte posterior da lâmina da cartilagem tiróide e do lado da cartilagem cricóidea. No seu caminho para o ligamento cricotireóideo, o nervo laringeo externo é medial ao pólo superior da glândula. A face póstero-lateral está próxima da bainha carotídea, recobrindo a artéria carótida comum. A fina margem exterior, próximo do ramo anterior da artéria tireóidea superior, inclina-se para baixo medialmente. A margem posterior arredondada está relacionada, abaixo, com a artéria tireóidea inferior e a sua anastomose com o ramo posterior da artéria tiróide superior[22].

O istmo, que une as partes inferiores dos lóbulos, mede aproximadamente 1,25 cm transversal e verticalmente e geralmente está anterior à segunda e terceira cartilagem traqueal, embora esta configuração possa variar. A fáscia pré-traqueal separa o istmo dos músculos esterno-tiróideos; mais superficialmente estão os músculos esterno-hiódeos, as veias jugulares anteriores, fáscia e pele. As artérias tireóideas superiores anastomosam-se ao longo da sua margem superior, na margem inferior as veias tireóideas deixam a glândula[22]. Ocasionalmente o istmo está ausente.

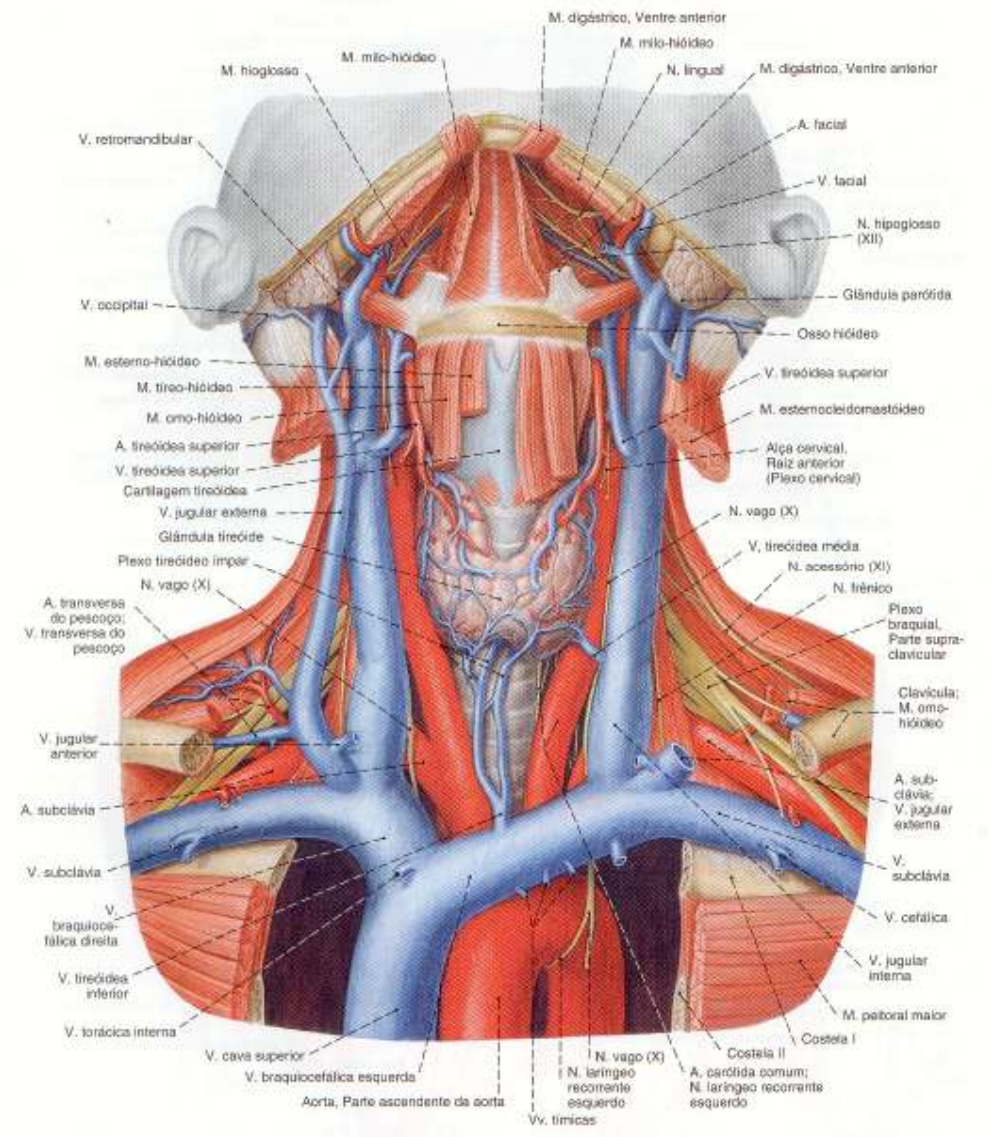



**Figura 1 -** Disposição anatômica da cabeça e pescoço, evidenciando a glândula tireóide e as estruturas adjacentes (retirado de http://echotalk.blogspot.com)[23].

Pesando cerca de 25 gramas, esta glândula pode apresentar diferentes configurações em função do sexo, idade e estado de nutrição do indivíduo. Para ter-se uma idéia, basta recordar que a tiróide aumenta de dimensões nas mulheres durante a amamentação e a gravidez[21].

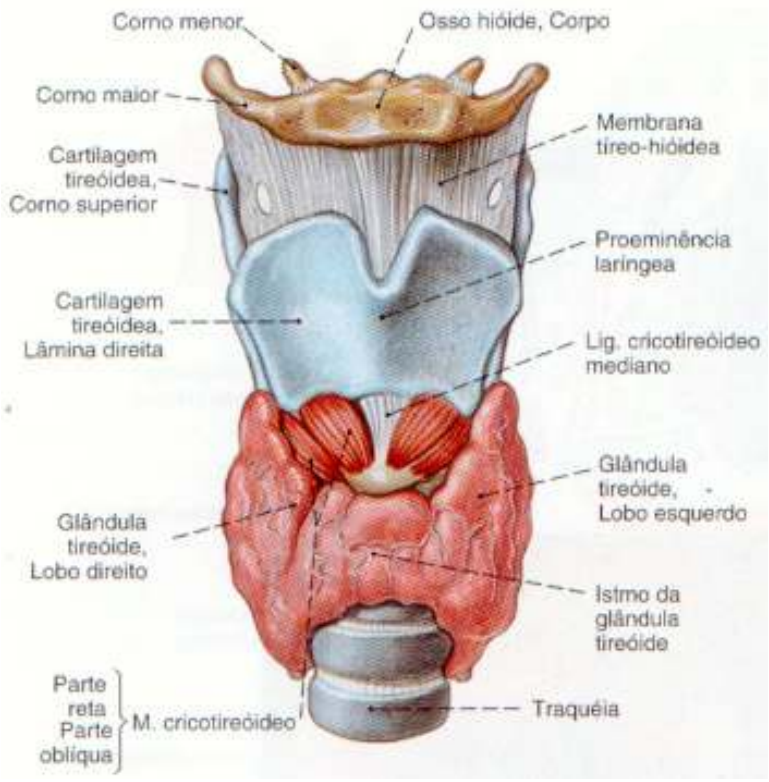



**Figura 2 -** Perfil anatômico da glândula tireóide (retirado de www.endo.com.br)[24].

As artérias que irrigam a glândula são as tireóideas superior e inferior e, algumas vezes, uma artéria tireóidea ínfima proveniente do tronco braquiocefálico ou do arco da aorta[22]. As artérias são notavelmente grandes, com frequentes anastomoses sobre a glândula e dentro dela. As veias formam um plexo na sua superfície e na frente da traquéia; deste plexo originam-se as veias tireóideas superior, média e inferior, sendo que as duas primeiras terminam na veia jugular interna, e a inferior termina no tronco braquiocefálico esquerdo. Um denso plexo capilar sanguíneo circunda os folículos, entre o seu epitélio e o endotélio dos capilares linfáticos, que também circunda a maior parte da circunferência dos folículos. Vasos linfáticos correm no tecido conectivo interlobar, frequentemente em torno das artérias, comunicando-se com uma rede capsular. Estes vasos podem conter material colóide e terminam nos ductos torácico e canal linfático direito. Os nervos responsáveis pela enervação da tiróide são derivados dos gânglios simpáticos cervicais superior, médio e inferior[22].

Histologicamente a tireóide apresenta uma estrutura com grandes folículos, formados por círculos celulares de tamanho variado e com células de altura também variável dependendo de seu grau de atividade (basal ou aumentado)[20]. No interior destes folículos são formados e armazenados os hormônios T3 e T4. No tecido interfolicular encontram-se vasos e células parafoliculares ou células C, responsáveis pela secreção do hormônio calcitonina.

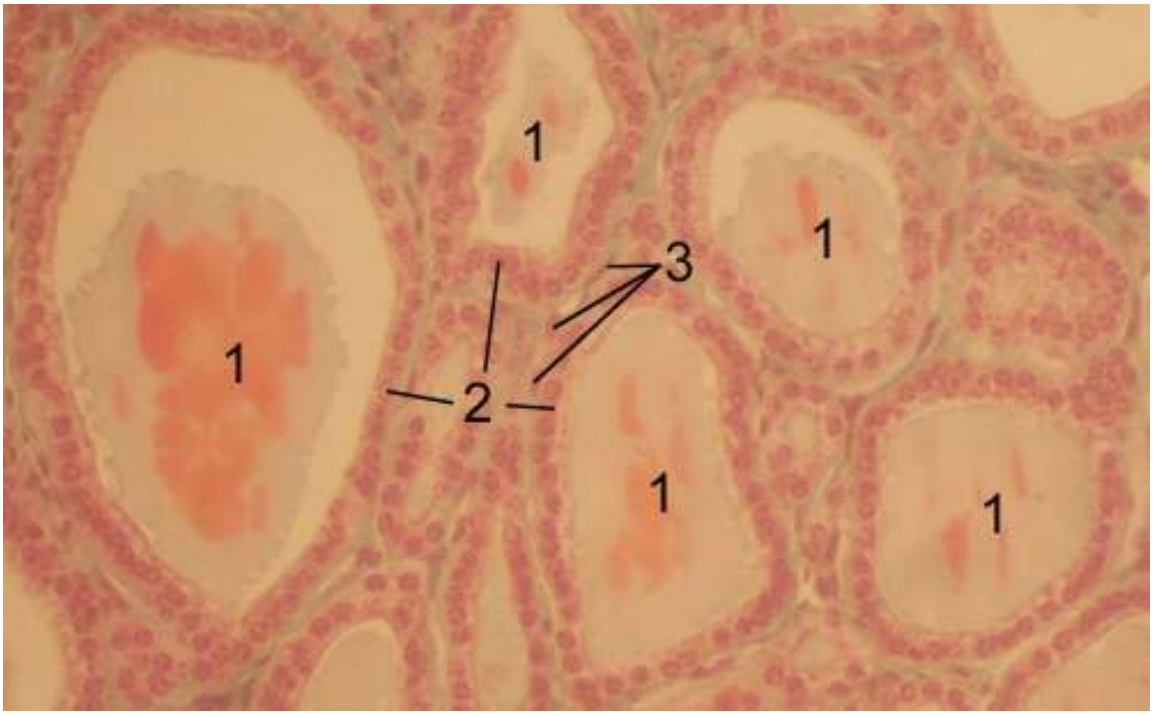



**Figura 3:** Corte histológico do tecido tireoidiano, onde podem ser evidenciadas as seguintes estruturas: 1 – folículos; 2 – células epiteliais foliculares; 3 - células endoteliais (retirado de www.ufrgs.br)[25].

## *3.2. Patologias benignas que afetam a glândula tireóide*

Dentre as principais lesões benignas que afetam a tireóide, pode-se destacar a tireiodite de Hashimoto, a doença de Graves e o bócio ademato so[21]. As desordens associadas à tireóide apresentam-se na forma multinodular ou nódulos solitários na glândula[26]. Em sua maior parte, os nódulos de tireóide são detectados pela técnica de ultrassonografia a partir de 2 mm de diâmetro.

Nos casos de exame clínico (pelo método da palpação), em 5 à 20% da população considerada fisiologicamente normal são constatados nódulos que medem aproximadamente 1 cm [1 26].

### 3.2.1. Doença de Graves

Também denominada de bócio difuso tóxico, trata-se de uma doença auto-imune de etiologia não esclarecida, a qual apresenta, como sinais clínicos, hipertiroidismo, bócio, oftalmopatia e, ocasionalmente, dermopatia infiltrativa ou mixedema pré-tibial[21].

O diagnóstico clínico é confirmado pela redução do hormônio TSH, associado a um valor elevado de tiroxina livre (T4 livre). No doente com hipertiroidismo e bócio difuso, os sinais de oftalmopatia e dermopatia são suficientes para confirmar o diagnóstico. Exames como a cintilografia podem também ser efetuados para confirmar a presença de bócio difuso, distinguindo esta doença da tireotoxicose causada por tiroidite auto-imune destrutiva não dolorosa[27].

### 3.2.2. Bócio nodular tóxico

Trata-se de uma doença em que um ou mais nódulos da tireóide produzem uma quantidade excessiva de hormônios tireoidianos e não se encontram sob controle do hormônio estimulante da tireóide. Os sintomas são os mesmos do hipertireoidismo, com a diferença de que a pessoa não apresenta globos oculares projetados como os que se observam na doença de Graves[21]. Os fatores de risco são: ser mulher e ter mais de 60 anos de idade. Assim, a pessoa em idade avançada pode apresentar uma capacidade menor de tolerar os efeitos do hipertiroidismo no coração[2].

### 3.2.3. Bócio Adenomatoso

Trata-se de uma patologia benigna da tireóide, caracterizado por

adenomas encapsulados e padrão macrofolicular[21]. O bócio adenomatoso é uma doença da tireóide altamente endêmica que afeta o órgão por inteiro, tendo-se uma característica multinodular.

### 3.2.4. Tireoidite

Trata-se de uma inflamação da glândula, a qual tem, como sinais subclínicos, hipertireoidismo temporário seguido freqüentemente por um hipotireoidismo temporário ou por nenhuma alteração da função tireoidiana. Os três tipos de tireoidite são a tireoidite de Hashimoto, a tireoidite granulomatosa subaguda e a tireoidite linfocítica silenciosa[26].

A tireoidite de Hashimoto, também denominada tireoidite auto-imune, é a causada pela produção de anticorpos anti-TPO, os quais atacam a glândula tireóide. Trata-se da causa mais comum de hipotireoidismo, promovendo uma aumento do volume da glândula e a formação de nódulos.

A tireoidite granulomatosa subaguda, também chamada de tireoidite de células gigantes ou de De Quervain, é provavelmente causada por infecção viral, causando dor na glândula, febre baixa e hipertireoidismo seguido por hipotireoidismo temporário.

A tireoidite linfocítica silenciosa ocorre mais freqüentemente em mulheres, tipicamente logo após o parto, e faz com que a tireóide aumente de tamanho [20,21,26].

## *3.3. Patologias malignas da tireóide*

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), os tumores malignos da tireóide são subdivididos em específicos da tireóide, isto é, os que se originam apenas desta glândula, e os tumores comumente encontrados em outros órgãos, mas que possuem características particulares quando encontrados na tireóide**.** Dentre o primeiro subgrupo,

destacam-se os carcinomas folicular, papilífero e medular, enquanto que, do segundo subgrupo, podem ser citados os linfomas e alguns tipos de sarcomas. Na Tabela 1, segundo a OMS, encontra-se a classificação dos carcinomas da tireóide.

De todos os tumores da tireóide, 98% dos casos são abrangidos pelo carcinoma papilífero (CP), carcinoma folicular (CF), carcinoma anaplásico (CA) e carcinoma medular (CM). Os três primeiros originam-se das células epiteliais foliculares da tireóide e o último, o medular, das células C (parafoliculares) da tireóide. Os 2% restantes estão nas variantes patológicas como os adenomas, linfomas e microcarcinomas[3].

A etiologia do câncer de tireóide é desconhecida, havendo um acometimento maior em mulheres do que em homens em uma proporção de até 3:1[2]. As variações climáticas, ambientais e alimentares influenciam no surgimento da patologia, bem como a exposição à radiação. Como exemplo, os carcinomas foliculares mostram-se mais densos em regiões onde há a deficiência de iodo nas dietas alimentares[28] e também os carcinomas papilíferos aumentaram signifitivamente nos arredores de Chernobyl depois do desastre nuclear (cerca de 10% nos 15 anos seguintes desde 1986), em particular nas crianças[29]. Há ainda influências de diferenciações moleculares como no DNA, CD97, E-caderina, atividade da telomerase, genes passíveis de mutação como no 5q21, 10q23.3, pTen e radicais livres que podem causar estresse oxidativo protéico[30,31].

**Tabela 1:** Classificação histológica dos carcinomas de tireóide segundo a Organização Mundial da Saúde[32].

| *Classificação histológica* | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | Tumores epiteliais | | |
| 1.1 | Benignos | | |
| 1.1.1 | Adenoma folicular | | 8330/0 |
| 1.1.2 | Outros | | |
| 1.2 | Malignos | | |
| 1.2.1 | Carcinoma folicular | Minimamente invasivo (encapsulado)<br>Muito invasivo<br>Tipo células oxifílicas<br>Célula variante | 8330/3 |
| 1.2.2 | Carcinoma papilífero | Microcarcinoma papilífero<br>Variante encapsulada<br>Variante folicular<br>Variante esclerosada difusa<br>Tipo células oxifílicas | |
| 1.2.3 | Carcinoma medular (Células C) | Carcinoma folicular-medular | |
| 1.2.4 | Carcinoma indiferenciado (anaplásico) | | 8020/3 |
| 1.2.5 | Outros | | |
| 2 | Tumores não-epiteliais | | |
| 3 | Linfomas malignos | | |
| 4 | Tumores anaplásicos | | |
| 5 | Tumores secundários | | |
| 6 | Tumores não classificados | | |
| 7 | Lesões semelhantes a tumores | | |

Nos tópicos a seguir, será dado um breve resumo sobre as principais neoplasias que acometem a glândula tireóide.

### 3.3.1. Carcinoma papilífero

Trata-se de uma neoplasia epitelial maligna primária da tireóide de crescimento muito lento, derivada das células foliculares[32]. De todos os tumores tireoideanos, é o que apresenta maior incidência, ocorrendo em até 10% dos portadores de nódulo tireóideo único[33]. É cerca de 3 vezes mais comum em mulheres do que em homens, com maior incidência entre a terceira e quarta décadas de vida[32].

Clinicamente, apresenta-se como um nódulo palpável, de

consistência firme ou cística, às vezes acompanhado por nódulos cervicais metastáticos[9].

Histologicamente, o carcinoma papilífero é caracterizado pela formação de estruturas papilares dotadas de eixo conjuntivo revestido por células foliculares neoplásicas com características nucleares específicas, cromatina clara, pseudo-inclusões e fendas nucleares[31]. Pode ser encapsulado, isto é, circundado por uma cápsula de colágeno, com vascularização venosa no interior e no exterior da cápsula[3]. Quando comparado ao carcinoma folicular, o carcinoma papilífero possui mais variações no citoplasma das células. Tais células oncocíticas (células eosinófilas ou de Hürtle, que também acomentem o padrão folicular) apresentam um grande aumento no número de mitocôndrias ou, em casos mais raros, apresentam aumento dos vacúolos[34]. Os núcleos destas células podem ser hipercromáticos, com estruturas condensadas de cromatina.

Devido a estas variações, o diagnóstico histopatológico não depende apenas das variações celulares, mas também da estrutura papilar e do crescimento do infiltrado. Estas estruturas são de difícil detecção em tumores com alto número de célular devido a sua semelhança com os artefatos técnicos dos adenomas microfoliculares [4] .

### 3.3.2. Carcinoma folicular

É o segundo tumor mais incidente na tireóide e mais frequete em regiões com carência de iodo, tendo maior incidência na quinta década de vida[28]. Tem pior prognóstico quando comparado ao carcinoma papilífero[34].

Clinicamente, evidencia-se um nódulo único, que pode ser bem delimitado ou infiltrativo; porém, em até 20% dos casos patológicos o diagnóstico é feito a partir do encontro de uma metástase. Há tendência a metástases por via hematogênica, principalmente para ossos, pulmões e fígado. Quando há invasão microscópica da cápsula ou vasos, metástases à distância são encontradas em cerca de metade dos casos[36].

Histologicamente, o carcinoma folicular reproduz o padrão folicular da tireóide. As características encontradas no núcleo das células não permitem o

diagnóstico deste tipo de lesão, mas sim está baseado na demonstração histopatológica do crescimento do infiltrado[3]. Para evidenciar este tumor, deve ser identificado o infiltrado nos vasos venosos externos à cápsula do tumor, além de ser observado um infiltrado através da cápsula para o parênquima ao redor do tumor[37]. Contudo, nem sempre pode ser evidenciadas tais invasões capsular e vascular, critérios que definem o carcinoma folicular, o que muitas vezes impossibilita a distinção entre carcinoma e adenoma folicular[4].

### 3.3.3. Carcinoma anaplásico

Também denominado carcinoma indiferenciado da tireóide, deriva-se do epitélio folicular tireoideano, apresentando-se como a forma mais agressiva das neoplasias tireoideanas, com prognóstico de 6 meses de sobrevida após sua detecção clínica[21]. Com prevalência maior em pacientes do sexo feminino, atinge faixas etárias geralmente acima dos 60 anos de idade, geralmente portadoras de bócio multinodular de longa duração. Trata-se de uma neoplasia de crescimento muito rápido, apresentando metástases regionais e à distância e levando o paciente à disfonia, disfagia e dispnéia[5].

Histologicamente, é evidenciado pelo polimorfismo citológico, com células escamosas, gigantes e indiferenciadas. Células anaplásicas não expressam genes que são específicos para a tireóide, não produzem tireoglobulina, não captam iodo e não expressam receptores do TSH na sua membrana celular. Alguns tumores apresentam grandes áreas de necrose. Quando o quadro é de pequenas células, pode tratar-se na realidade de linfoma[4,7].

### 3.3.4. Carcinoma medular

Deriva-se das células parafoliculares, ou células C, as quais são secretoras do hormônio calcitonina. Assim, esta neoplasia tem a calcitonina como marcador tumoral extremamente sensível para diagnóstico e seguimento[4].

Trata-se de um tumor maligno raro, bastante agressivo, que

representa 3 a 10% de todos os tumores tireoidianos, cuja sobrevida em 10 anos ocorre em menos de 50% dos casos[3]. Clinicamente, apresenta-se como um ou mais nódulos cervicais, causando disfagia, rouquidão e dispnéia, além da "síndrome paraneoplásica", devida à alta secreção de hormônio pelo tumor, gerando sintomas de rubor facial, diarréia, dor óssea e síndrome de Cushing[35]. A principal via de disseminação do carcinoma medular é linfática, sendo que, em fases mais avançadas da doença, outros sítios comuns de metástases são mediastino, gânglios do hilo pulmonar, pulmões, fígado e ossos[35].

Histologicamente, o carcinoma medular é composto por ninhos sólidos e infiltrado de células poligonais, arredondadas ou fusiformes. Depósitos amilóides no interior do estroma são evidenciados em aproximadamente 50% dos tumores. Há diferentes subtipos histológicos descritos, incluindo-se padrões papilíferos, de células gigantes, diferenciação escamosa ou clássico padrão carcinóideo [4,21].

### 3.3.5. Linfomas

Tratam-se de tumores incomuns, representando cerca de 0,6% a 5% das neoplasias relatadas de tireóide. Acomete proncipalmente mulheres idosas com histórico de tireoidite de Hashimoto. Clinicamente, apresenta-se como uma massa cervical localizada que causa sintomas de disfagia, dispnéia e ortopnéia.

Histopatologicamente, tais lesões podem caracterizar-se como linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin de grandes células, linfoma MALT de baixo grau, linfoma de células B de baixo grau com diferenciação plasmocítica, linfoma de Burkitt e linfoma gama delta[36].

### 3.3.6. Outras patologias malignas

As outras neoplasias que podem acometer a glândula tireóide são os sarcomas e os carcinomas metastáticos para a tireóide, isto é, aqueles que se originam em outros locais do organismo. Os carcinomas mais freqüentes são

aqueles que se originam nas mamas e nos rins, assim como os broncogênicos e os melanomas[4].

## *3.4. Diagnóstico das patologias da tireóide*

O diagnóstico das lesões da tireóide é efetuado, primeiramente, a partir da história clínica e da avaliação clínica do paciente. Para tal, é efetuado o exame detalhado do pescoço e a pesquisa dos sinais e sintomas de diminuição ou aumento de funcionamento da tiróide, o que inclui a avaliação laboratorial e imagenológica da glândula. Com o aumento da sensibilidade das técnicas atuais, é possível o diagnóstico precoce, garantindo a prevenção do surgimento de futuras lesões, o tratamento das mesmas e, nos casos mais severos, a sobrevida do paciente.

### 3.4.1. Avaliação laboratorial

A detecção inicial de vários tipos de lesões que acometem a tireóide e que, por sua vez, alteram sua produção hormonal, pode se dar por dosagem sérica dos hormônios T3 livre, T4 livre e TSH. A dosagem de tais hormônios evidencia o hipertireoidismo clínico (T3 e T4 livres elevados e baixo TSH), o hipertireoidismo subclínico (T3 e T4 livres normais com TSH baixo), o hipotireoidismo clínico (T4 e T4 livre baixos e TSH elevado) e o hipotireoidismo subclínico (T4 e T4 livre normais com TSH discretamente elevado).

A detecção de tireoglobulinas e anticorpos antitireoideanos (anticorpo anti-tireoglobulina e anticorpo anti-tireoperoxidase) evidencia a presença de tireoidites[30,26].

### 3.4.2. Ultrassonografia

Trata-se do método mais empregado para imageamento da tireóide,

apresentando as vantagens de ser um método rápido, barato, não-invasivo, de fácil acesso e que não necessita de exposição à radiação ionizante. Por este método, pode-se determinar o volume da tireóide e o tamanho dos nódulos encontrados, assim como sua localização. Características como presença de microcalcificações, hipoecogenicidade e contornos irregulares aumentam o risco de malignidade de uma lesão. Dessa forma, a ultrassonografia pode identificar as lesões nodulares com maior potencial de malignidade, predizendo a necessidade de exame de P.A.A.F.[12].

As características mais importantes que devem ser avaliadas em um exame de ultrassonografia são a ecogenicidade (medida da quantidade de colóide ou da quantidade de células), a presença de calcificações (hiperecóicas ou ecorrefringentes causadas por depósitos de cálcio), a presença de halos hipoecogênicos (correspondentes às cápsulas dos nódulos) e a ecoestrutura (presença de cistos, sólidos hiperecóicos, sólidos isoecóicos, sólidos hipoecóicos e mistos)[6].

Embora a presença de uma ou mais características possa nortear a diferenciação entre lesões malignas e benignas da tireóide pelo exame de ultrassonografia, não existe um padrão que possa ser específico de um determinado tipo de lesão, sendo que a única evidência significativa da malignidade de um nódulo é a presença de crescimento invasivo nas estruturas adjacentes e a presença de metástases nos linfonodos cervicais [4,26].

A velocidade e a direção do fluxo sanguíneo nas lesões de tireóide são investigadas pela ultrassonografia com Doppler colorido há mais de 10 anos[4], baseando-se na consideração que nódulos com fluxo predominantemente periférico apresentam maior probabilidade de benignidade e nódulos com fluxo predominantemente central apresentam maior probabilidade de malignidade[12]. Contudo, ainda não há estudos que evidenciam um padrão típico de malignidade por este método, o que muitas vezes ainda requer o exame de P.A.A.F. como método diagnóstico complementar[4,6].

### 3.4.3. Punção aspirativa por agulha fina

A P.A.A.F. tornou-se o melhor método em termos de custo e acurácia para diagnóstico pré-operatório de neoplasia papilífera, medular e anaplásica de tireóide, porém ainda é de pouca ajuda quando se trata de diferenciar lesões foliculares (hiperplasias, adenomas e carcinomas).

Os exames de P.A.A.F. são avaliados utilizando-se a seguinte classificação citológica[37]:

- **Grau I (benigno):** caracterizado pela presença de agrupamentos de células foliculares, cromatina uniformemente distribuída acompanhada de colóide (sugestiva de bócio colóide adenomatoso); encontro de linfócitos acompanhado de células foliculares benignas ou células de Hürthle (compatível com tiroidite crônica autoimune);

- **Grau II (indeterminado):** grande quantidade de células em arranjo sólido ou folicular, cromatina regularmente distribuída, nucléolos por vezes proeminentes, colóide escasso ou ausente (encontrado em nódulos adenomatosos e nas neoplasias foliculares);

- **Grau III (suspeito):** células em arranjo sólido ou folicular, variação do volume nuclear, cromatina irregularmente distribuída, nucléolos proeminentes e colóide escasso ou ausente (suspeito para neoplasia maligna de tireóide);

- **Grau IV (maligno):** citologia compatível com carcinoma papilífero (mais freqüente), carcinoma medular e carcinoma anaplásico.

### 3.4.4. Outros métodos diagnósticos

Outros métodos que podem ser empregados para complementar o diagnóstico de lesões da tireóide são:

- **Radiografia cervical:** realizada em pacientes com bócio de grande volume

ou multinodular para verificar desvio ou restrição do lúmen da traquéia;

- **Tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear:** utilizando-se o contraste por um sal de iodeto, fornecem a visualização tridimensional da tireóide e são empregadas para verificar o envolvimento de outros locais por metástases, tais como mediastino e esterno.

- **Cintilografia:** o sinal típico de malignidade é a presença de nódulos frios (hipocaptantes). Nódulos hipercaptantes, também chamados de nódulos "quentes", de regra, são benignos e podem corresponder a adenoma folicular ou bócio colóide adenomatoso.

## *3.5. Diagnóstico por espectroscopia óptica ou molecular*

Nos últimos anos, a espectroscopia tem se destacado como uma das maiores ferramentas para aplicações biomédicas, quando progressos clínicos significativos foram obtidos na caracterização de tecidos, possibilitando sua diferenciação. Este fato é de fundamental importância principalmente no diagnóstico de patologias, as quais muitas vezes não podem ser diferenciadas pelos métodos diagnósticos tradicionais.

As técnicas espectroscópicas vibracionais são relativamente simples, com alta reprodutibilidade, não-destrutíveis e necessitam de pouca quantidade de tecido para ser analisado, além requerer pouco ou nenhum preparo de amostra[38].

Gazi e colaboradores[39] analisaram lâminas histológicas preparadas em parafina com o Método de Gleason de biópsias de câncer de próstata e aplicaram a análise multivariada de análise de discriminantes lineares (LDA, do inglês Linear Discriminant Analysis), no qual esta permite uma predição de classificação diagnóstica e a redução da dimensão matricial dos dados, sendo que os grupos formados foram divididos em dois parâmetros de discriminantes (função 1 x função 2) para melhor separação entre os grupos patológicos. Os dados foram normalizados pela intensidade do pico da amida I (1650 $cm^{-1}$) com a linha base feita entre 980 $cm^{-1}$ e 1720 $cm^{-1}$. Com o Método de Gleason a

sensibilidade é de 71% e a especificidade de 67%. Construindo-se o método de FTIR-LDA o primeiro parâmetro foi de 85%, enquanto a especificidade baixou para 63%; permitindo um melhor diagnóstico para as metástases de câncer de próstata.

Utilizando-se os mesmos procedimentos de normalização, Gazi e colaboradores[40], em 2009, analisaram a influência de lipídeos saturados na metástase em cultura de células de câncer de próstata, conseguindo analisar lipídeos em células sem prévio preparo laboratorial, valendo-se da análise univariada de modelo linear geral com dois parâmetros de análise de variância, fazendo-se depois mapas hiperespectrais das células e verificando-se a distribuição química dos constituintes celulares como o da ligação C-D, lipídeos e fosfatos. Os dados depois de tratados foram submetidos à estatística não-paramétrica de teste-t com 95% de confiança.

Kazarian e Chan[38] utilizaram a técnica de imageamento hiperespectral por ATR-FTIR da distribuição de fármacos em tecido da aorta com placa de arteriosclerose, sendo possível a diferenciação entre as proteínas, placas e a água do estrato córneo. Análise estatística multivariada foi utilizada a técnica de PCA nas imagens para reduzir os erros intrínsecos do sistema FTIR e como conseqüente suavização da imagem.

Os trabalhos efetuados com outros tumores motivaram, também, o emprego da espectroscopia para diagnóstico das patologias que acometem a tireóide. Um estudo de aspirados por imagem hiperespectral por μ-FTIR verificou a presença de colágeno tipo I, tireoglobulina e algumas bandas de proteínas desconhecidas. Porém, não foi apresentada uma estatística que possa levar a um diagnóstico conclusivo[18]. Em outro trabalho, foi realizada a análise de 89 aspirados de nódulos de tireóide, quando se concluíu que o DNA e outros produtos metabólicos desconhecidos são primordiais na determinação diagnóstica por FTIR, conseguindo separação através da estatística multivariada com sensibilidade de 85,0% para os tumores e 97,7% para os não-tumores. Entretanto, não foi relacionada a quantificação de DNA com os espectros infravermelhos, pois sabe-se que o câncer possui altos índices de radicais livres que podem oxidar o DNA, ocasionando a mudança de intensidade de sua banda

no espectro. Assim, não foram analisadas quais são estes produtos metabólicos; além da sensibilidade ser ainda baixa para a diferenciação de neoplasias foliculares[19].

### 3.5.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho (IR) é uma técnica que pode ser utilizada como sonda óptica de análise molecular com a finalidade de diagnosticar tecidos doentes[41]. A espectroscopia FTIR é uma variação da espectroscopia IR, a qual propicia algumas vantagens, tais como maior rapidez, alta reprodutibilidade e alta razão de sinal/ruído. Desta maneira, pode constituir-se em uma análise não destrutiva[16,17].

Para funcionamento, utiliza-se de um feixe infravermelho que atravessa a amostra e detecta, assim, seus grupos funcionais expressos em vibrações moleculares, os quais refletem características químicas e bioquímicas da substância analisada.

A absorção de radiação infravermelha está restrita a espécies moleculares que têm diferenças de energia pequenas entre vários estados vibracionais e rotacionais. Para absorver radiação infravermelha, uma molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como conseqüência do movimento vibracional ou rotacional. Apenas nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos, sendo possível determinar bandas de absorção associadas aos principais constituintes moleculares da amostra em estudo.

As vibrações angulares podem ainda ser classificadas como no plano ou fora do plano. Os diferentes tipos de vibração são mostrados na figura a seguir.

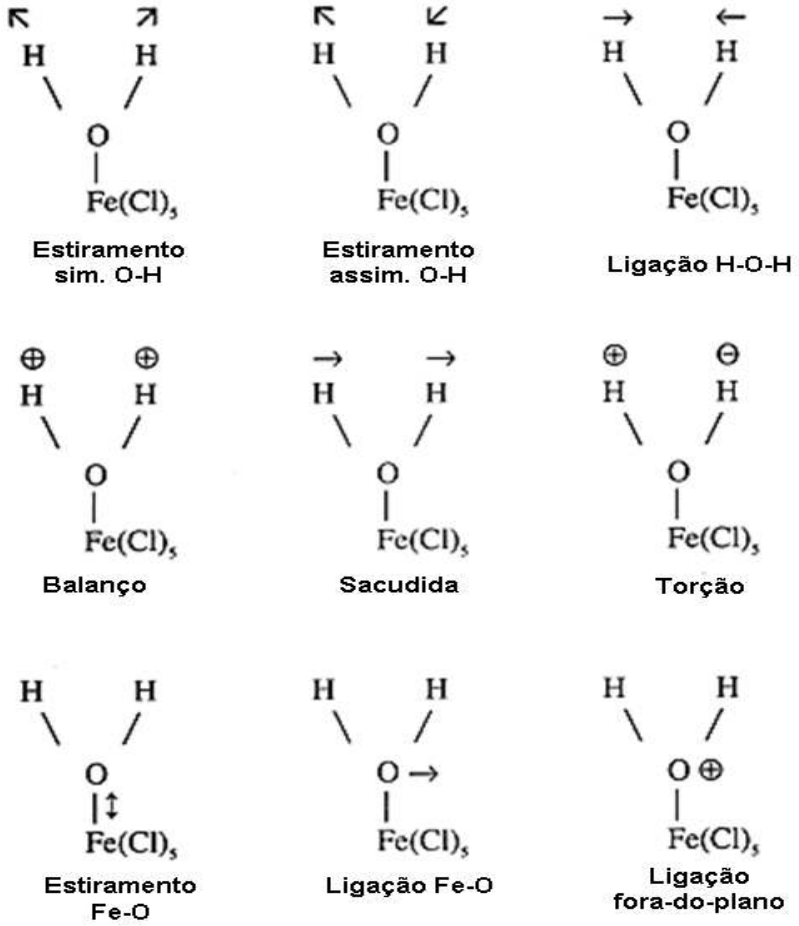



**Figura 4:** Alguns tipos de vibrações moleculares que podem ser observadas em uma análise espectroscópica.

Um tratamento aproximado das vibrações de estiramento é viável à base de um modelo mecânico composto de duas massas ligadas por uma mola. A freqüência $\nu_0$, freqüência natural do oscilador mecânico, depende da constante de força da mola e da massa do corpo a que está unida. Ela depende da energia aplicada no sistema.

A base de qualquer espectrômetro FTIR é o interferômetro de Michelson (Figura 5). Nesse sistema, a radiação de uma fonte monocromática hipotética é dividida em dois feixes, cada um correspondendo idealmente a 50% do original, no "beamsplitter" (divisor de feixe). Um dos feixes (A) segue em direção ao espelho de posição fixa no qual reflete de volta para o divisor de feixe, onde parte deste feixe reflete de volta para a fonte e parte vai para o detector. O outro feixe (B) parte do divisor de feixe em direção ao espelho móvel. O espelho

móvel também reflete o feixe B, parte de volta para a fonte e parte para o detector. Se a posição do espelho móvel é tal que o feixe B percorre a mesma distância que o feixe A antes de chegar ao detector (δ=nλ, onde n=0,1,2,...), então os dois feixes estão em fase defasada, somando-se a um ao outro (interferência destrutiva) e, neste caso, não há o sinal no detector. Por outro lado, se a posição do espelho móvel for tal que o caminho do feixe B seja diferente daquele do feixe A por (n+1)λ/2, então os dois feixes estarão 90° fora de fase, cancelando um ao outro. A energia que chega ao detector, nesse caso, será mínima[42].

Portanto, à medida que o espelho móvel percorre determinada distância, um interferograma, como o mostrado na figura 5, é formado. A intensidade da radiação que chega ao detector, I(δ), varia como uma função cosseno do retardo óptico δ:

$$I(\delta) = B(\nu)\cos(2\pi\delta/\lambda) \qquad \text{[Equação 1]}$$

$$I(\delta) = B(\nu)\cos(2\pi\nu\delta) \qquad \text{[Equação 2]}$$

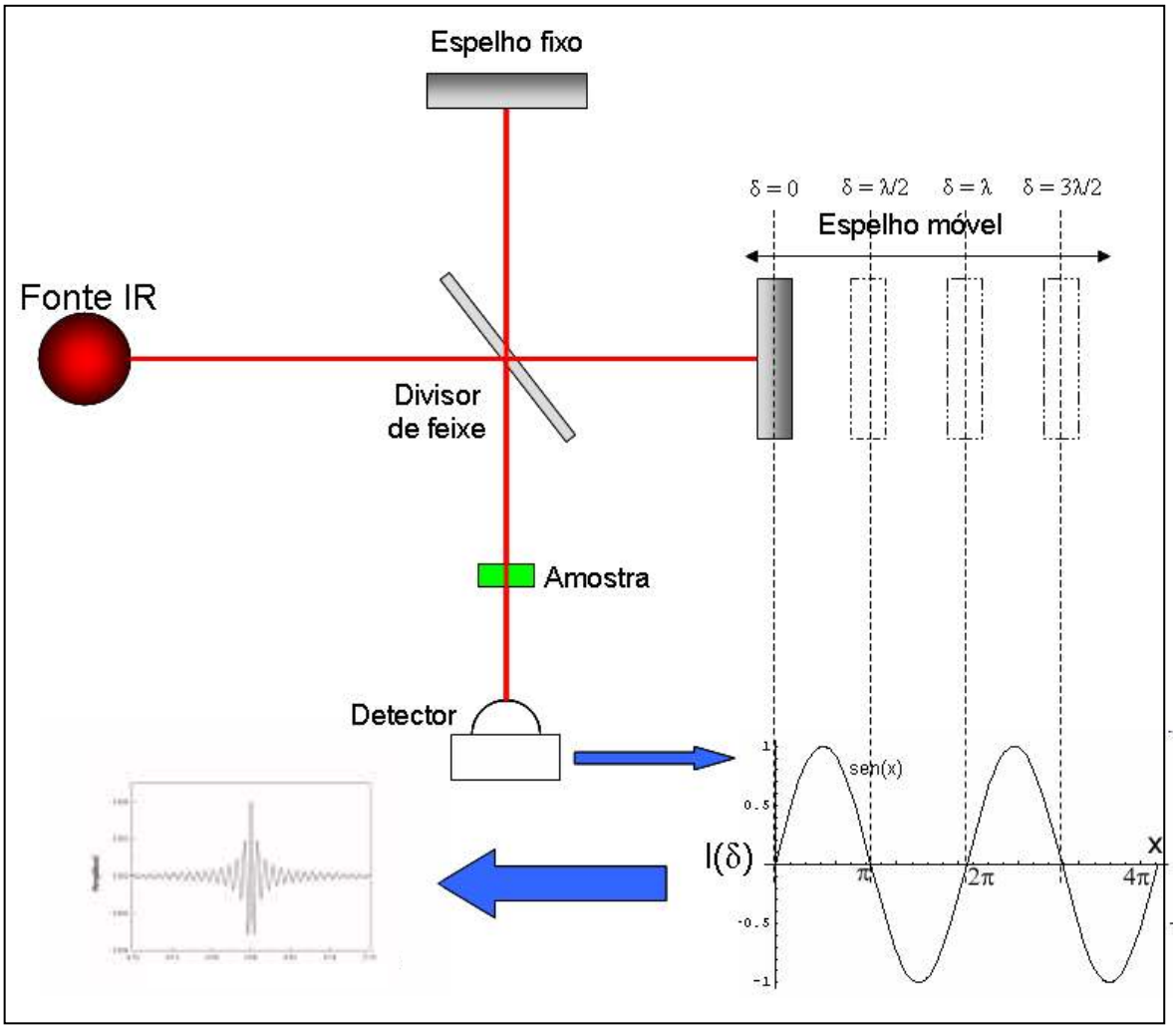



**Figura 5:** Diagrama de blocos mostrando os principais componentes de um espectrômetro FTIR.

Um interferograma típico para um tecido tireoidiano de uma fonte de infravermelho é mostrado na Figura 6. Nota-se que quando δ=0, as ondas estão em fase e à medida que o espelho se move, a partir de δ, em ambas as direções, I(δ) varia de acordo com as contribuições das várias freqüências que podem estar em fase ou fora de fase.

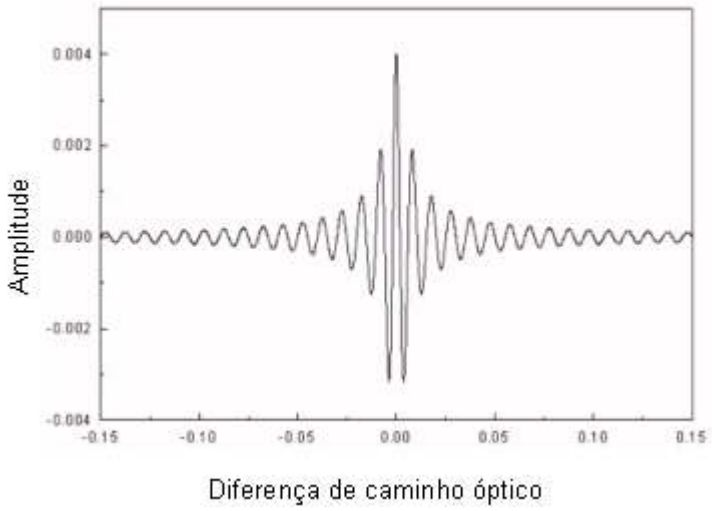



**Figura 6:** Interferograma de uma fonte de infravermelho para o tecido tireideano.

Apesar de o interferograma conter toda a informação fornecida pelo espectrômetro sob um dado conjunto de condições, a forma com que essa informação se apresenta de forma que se possa ser usada diretamente. Essa informação é convertida em espectro, relacionando-se as intensidades com as respectivas freqüências, através da transformada de Fourier. A relação entre o interferograma e o espectro é dada pela equação:

$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta)\cos(2\pi\nu\delta)d\delta \qquad \text{[Equação 3]}$$

onde B($\nu$) é a intensidade do espectro em função da freqüência.

O interferograma é formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e freqüências que chegam ao interferômetro e possui todas as informações espectrais da amostra.

As regiões mais utilizadas estão no infravermelho próximo (14000 – 4000 cm-1) e no infravermelho médio (4000 – 500 cm-1). Este último é mais utilizado

pela maior riqueza em diferenciações de patologias[43], sendo de vital importância a presença de alguns grupos funcionais como a amida I (~1650 cm-1, vibração C=O), amida II (~1548 cm-1, vibração NH), proteínas, peptídeos, lipídios e DNA[44], conforme a Figura 7.

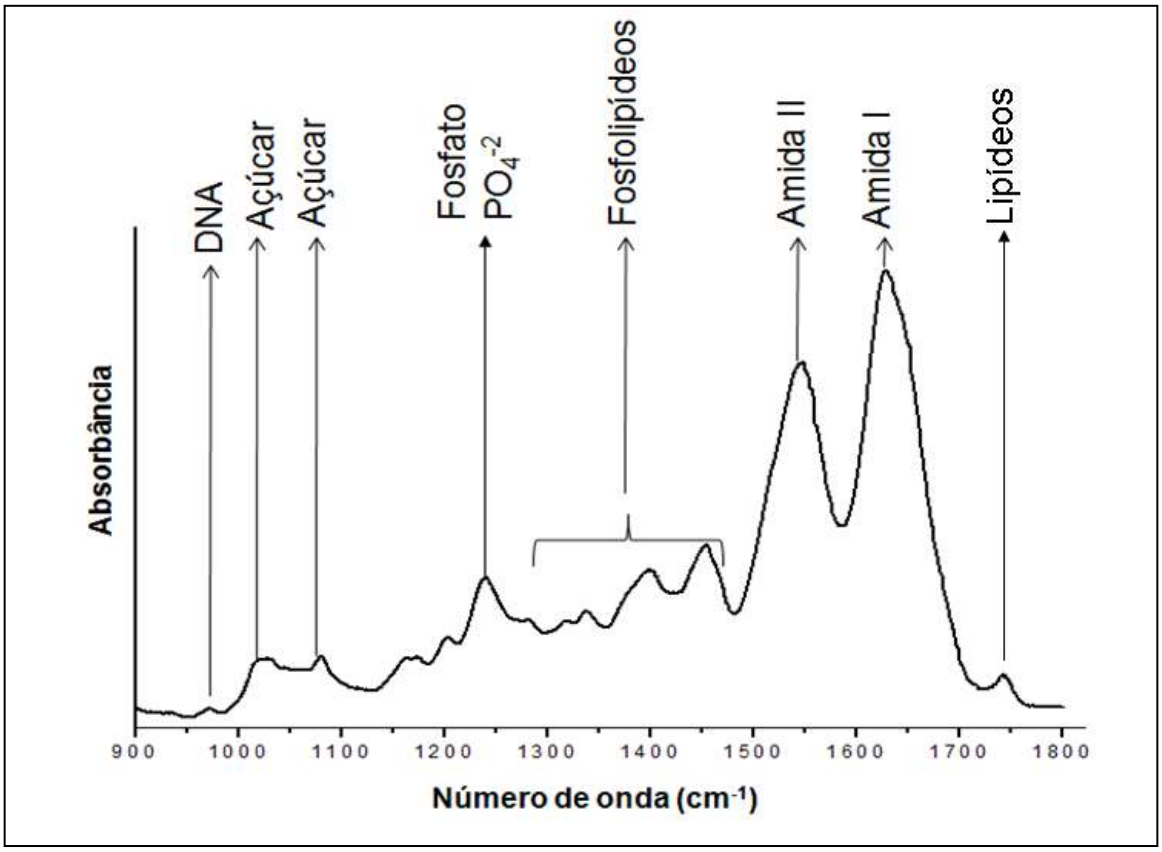



**Figura 7:** Espectro característico do tecido de nódulos de tireóide mostrando os principais grupos moleculares.

### 3.5.2. Espécimes biológicos e o problema da subjetividade

Há influências significantes na obtenção de dados para medidas independentes de amostras biológicas no tocante à reprodutibilidade e na repetitividade. Considera-se diferentes níveis de reprodutibilidade o limite e a discriminação do poder diagnóstico da técnica FTIR em questão. As características espectrais de células, tecidos e fluidos corporais possuem sinergia e um número de fatores, como do ciclo celular, das condições de crescimento, amostragem, preparação destas amostras, bem como o controle de parâmetros em que se possa estabelecer condições padrão em diferentes laboratórios.

Na técnica de μ-FTIR, em cada área analisada de um único tecido biológico, como o tireoidiano, observam-se diferentes espectros que variam suavemente em algumas regiões ao longo do número de onda que podem influenciar no diagnóstico final. Deste modo, o método a ser estabelecido da escolha de qual espectro utilizar-se, levou-se em conta a intensidade do sinal de modo que seja suficientemente intenso porém sem ser a ponto de se atingir a saturação do sinal, originando uma perda da relação sinal/ruído. E que a presença de irregularidades ao longo do espectro possa também ser escolhida como fator de qualidade, já que esta mesma significa espalhamento da radiação infravermelha. Como não existe um consenso na literatura sobre a utilização dos métodos estatísticos para diagnósticos, um tratamento que pode ser útil é a análise de redes neurais aplicadas à imagens hiperespectrais. Obtendo-se diferentes mapas químicos de diferentes regiões da lâmina do microscópio, pode-se inferir através desta análise estatística multivariada uma espécie de média ponderada sobre o diagnóstico, pois a análise de um pool de espectros de um mesmo tecido minimiza as suavidades inerentes da natureza do tecido biológico (aumenta-se a significância estatística, minimizando o erro tipo I)[45,46].

### 3.5.4. Análise estatística multivariada para espectros

A análise de agrupamentos é o processo de separar um conjunto de dados em componentes que refletem padrões consistentes de comportamento, particionando um banco de dados de forma que cada partição ou grupo seja similar de acordo com algum critério utilizado ou métrica. Uma vez que os padrões tenham sido estabelecidos, estes podem ser utilizados para esmiuçar os dados em subconjuntos mais compreensíveis e também podem prover subgrupos de uma população para futuras análises[47].

A maioria dos métodos de análise de estatística multivariada requer uma medida de similaridade entre os elementos a serem agrupados, normalmente expressa como uma função distância ou métrica. A distância euclidiana é a distância geométrica no espaço multidimensional, bem como há vários outros modos de determinar a distância entre variáveis.

O método hierárquico de cluster consiste em uma série de sucessivos agrupamentos ou sucessivas divisões de elementos, onde os elementos são agregados ou desagregados. Os métodos hierárquicos são subdivididos em métodos aglomerativos e divisivos. Os grupos, nos métodos hierárquicos, são geralmente representados por um diagrama bi-dimensional chamado de dendrograma ou diagrama de árvore. Neste diagrama, cada ramo representa um elemento, enquanto a raiz da árvore representa o agrupamento de todos os elementos.

Através do dendrograma e do conhecimento prévio sobre a estrutura dos dados, deve-se determinar uma distância de corte para definir quais serão os grupos formados. Essa decisão é subjetiva, e deve ser feita de acordo o objetivo da análise e o número de grupos desejados[48].

Na análise estatística, os dados indicam espécimes ou tecidos biológicos que possuem alta complexidade molecular. Assim, para a discriminação entre diferentes tipos de amostras biológicas (por exemplo tipos básicos de tecidos de mamíferos como epitelial, conectivo, muscular e nervoso); a análise requer uma avaliação completa e comparação entre as similaridades e dissimilaridades entres os espectros[44].

Portanto, a análise estatística multivariada precisa se precedida de sinais de alta fidedignidade e da mais ampla região espectral possível. Sendo assim, os padrões de análise estatística mais utilizados na área biomédica são: análise de fatores, cluster hierárquico, análise de componentes principais (PCA – Principal Component Analysis), análise de discriminante linear e redes neurais[45].

A Tabela 2 mostra um resumo dos principais métodos de classificação em análise estatítica multivariada.

**Tabela 2:** Principais métodos de classificação em análise estatítica multivariada.

| **Métodos com 1 única variável** | **Métodos com 2 ou mais variáveis** |
|---|---|
| Cluster hierárquico | Redes neurais artificiais<br>-MLPs, RBFs, SVMs |
| Análise de componentes principais (PCA) | Análise de Discriminantes<br>-LDA, PLS-DA, CVA, DFA |
| Análise de componentes independentes | Análise de Regressão<br>-MLR, PCR, PLS |
| Redes neurais de Kohonen | Algoritmos evolucionários<br>-GA, GP (GC), EA, EP |
| | Árvores de regressão<br>-CART, Random Forests |
| | Programação lógica indutiva |

# *Material e Métodos*

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho faz parte de uma colaboração entre o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP), por meio da Profa. Dra. Denise Maria Zezell, o Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), por meio do Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara, e o Hospital Sírio Libanês, por meio do Prof. Dr. Orlando Parise Júnior.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sírio Libanês (nº HSL 2007/17 – Apêndice A), segundo as diretrizes e normas regulamentadas envolvendo seres humanos.

## *4.1. Obtenção das amostras*

Foram obtidas amostras de tecidos tireoideanos e amostras de aspirados (decorrentes de exames de punção aspirativa por agulha fina – PAAF) provenientes de tireoidectomias de pacientes sob tratamento no Hospital Sírio Libanês, São Paulo - SP.

Após a remoção cirúrgica das amostras de tecidos, as mesmas foram armazenadas em tubos criogênicos *Nalgene* e mantidas congeladas em freezer a -80ºC. Cada amostra encontrava-se devidamente identificada, sendo associada a um diagnóstico histopatológico fornecido por patologista do Hospital Sírio Libanês.

## *4.2. Preparo das amostras para espectroscopia FTIR*

Todas as amostras foram numeradas de acordo com o número do prontuário do paciente, facilitando o acesso aos exames do mesmo, como o exame patológico, idade, sexo e raça. Assim, estas foram distribuídas em três grupos, da seguinte forma:

- **TECIDOS:** tecidos provenientes de nódulos tireoideanos;
- **HOMOGENATOS:** preparados em laboratório visando a padronização de massa/volume, o que propiciaria a homogeneidade do filme e, com isso, facilitaria a análise espectroscópica;
- **ASPIRADOS:** amostras provenientes de exame efetuado pelo médico cirurgião por meio da punção aspirativa por agulha fina (P.A.A.F.).

Para a realização deste estudo, as amostras obtidas foram separadas de acordo com o seu diagnóstico histopatológico, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3:** Número de amostras estudadas e distribuição das patologias encontradas.

| Patologia/Amostra | Tecidos | Homogenatos | Aspirados | Abreviaturas |
|---|---|---|---|---|
| **Carcinoma Papilífero** | 4 | 13 | 11 | CAPAP |
| **Adenoma Folicular** | 1 | 2 | 2 | ADFOL |
| **Bócio adenomatoso** | 6 | 19 | 13 | BCO |
| **Bócio de Graves** | 1 | 2 | 1 | BCOG |
| **Tireoidite de Hashimoto** | 3 | 5 | 2 | TSH |
| **TOTAL** | **15** | **41** | **29** | |

### 4.2.1. Preparo dos tecidos

As amostras que foram analisadas sob a forma de tecidos foram descongeladas em banho-maria por 30 minutos, no interior dos próprios tubos *Nalgene*, antes das análises espectroscópicas, não recebendo qualquer tipo de processamento para este tipo de análise. Imediatamente após a espectroscopia, as amostras retornaram ao freezer a -80ºC.

### 4.2.2. Preparo dos homogenatos

O preparo destas amostras foi realizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica do IQ-USP.

Para tal, as amostras de tecido foram maceradas em água tipo Mili-Q, na proporção de 1mg/mL, com o auxílio de um misturador tipo Potter, seguido de centrifugação a 1800 rpm por 30 minutos. As amostras de suspensão celular assim obtidas foram armazenadas em freezer a -80ºC para posterior análise espectroscópica.

### 4.2.3. Preparo dos aspirados de punções

O preparo das amostras obtidas sob a forma de aspirados foi também realizado no Laboratório de Bioquímica do IQ-USP. As amostras de aspirados foram submetidas à centrifugação a 1800 rpm por 30 minutos, sendo separada, de cada amostra, somente a parte sobrenadante. Os pellets que formaram para algumas amostras foram acondicionados em tubos eppendorf, nomeados com o mesmo nome da amostra de origem e estocadas à -80º C em uma embalagem à parte. As amostras de suspensão celular assim obtida foram armazenadas em freezer a -80º C para posterior análise espectroscópica.

## 4.3. Métodos de caracterização espectroscópica por FTIR

A caracterização espectroscópica das amostras assim preparadas foi efetuada empregando-se espectrômetro de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), modelo 6700, marca ThermoNicolet, acoplado a microscópio para medidas de micro-FTIR Nicolet, modelo Continuum-XL, no Centro de Lasers e Aplicações do IPEN – CNEN/ SP (CEPID/FAPESP nº 05/51689-2).

**Figura 8:** Sistema de FTIR utilizado neste estudo, evidenciando o microscópio acoplado (μ-FTIR).

### 4.3.1. Obtenção dos espectros de FTIR dos tecidos

As amostras sob a forma de tecidos foram caracterizadas empregando-se a técnica de ATR (*Atenuated Total Reflection*), a qual consiste em um cristal de diamante transparente ao infravermelho de 300 - 30000 $cm^{-1}$ (Figura 9).

**Figura 9:** Acessório ART-FTIR, podendo-se observar a região central (disco) de posicionamento da amostra e o sensor de pressão (seta) para fixação da amostra no cristal de diamante.

Para a espectroscopia, as amostras de tecidos de nódulos foram cuidadosamente retiradas dos tubos *Nalgene* com auxílio de pinças e depositadas uma a uma sob o cristal de diamante do ATR-FTIR. Durante as medidas, foram empregadas as seguintes configurações no espectrômetro: 120 *scans*, resolução de 2 $cm^{-1}$, velocidade de 0,69 cm/s, região espectral analisada entre 650–4000 $cm^{-1}$, tendo em vista que nesta região são esperadas as maiores modificações espectroscópicas decorrentes das alterações nos tecidos. O tratamento dos espectros obtidos será detalhadamente descrito no item 4.4.

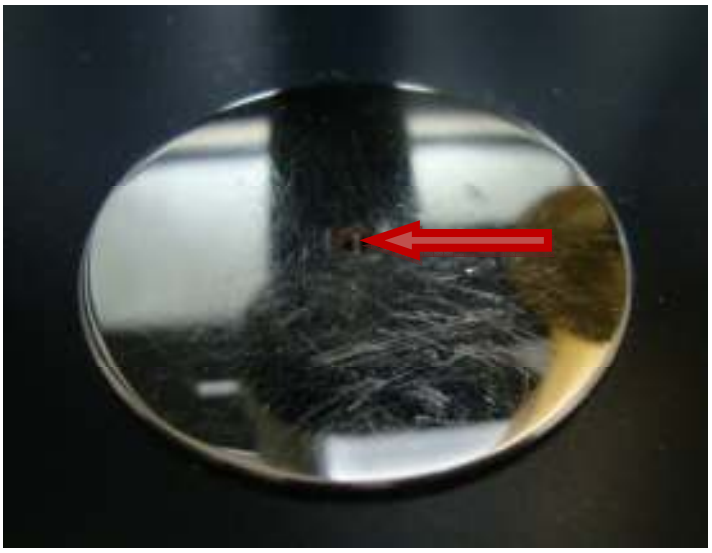


**Figura 10:** Disco de inox onde o cristal de diamante de ATR está embutido (seta). Pode-se observar uma região retangular que é a área de análise deste acessório, onde deve ser posicionada a amostra.

### 4.3.2. Caracterização dos homogenatos e aspirados

As amostras sob a forma de homogenatos e aspirados foram caracterizadas empregando-se a técnica de μ-FTIR. Esta técnica é útil por permitir medidas de várias amostras em um espaço reduzido, além do volume necessário ser da ordem de 1μL. Outra vantagem desta técnica é que o acessório de transmissão oferece uma relação sinal/ruído alta, permitindo a análise precisa dos constituintes das amostras, além de não apresentar deslocamento no espectro (*shift*), o que permite a comparação entre os tecidos biológicos sem perda da reprodutibilidade e melhor manipulação dos dados no tratamento estatístico[41].

Antes do início das análises, faz-se necessária a refrigeração do detector do microscópio (MCT/A) com nitrogênio líquido por 30 minutos. Em seguida, fez-se a calibração do sistema FTIR (tomada de *background* realizada a cada 60 minutos) e realizou-se o alinhamento óptico do microscópio até a obtenção de máximo sinal no detector. Assim, com a lâmina colocada na platina do microscópio, mediu-se o espectro de fundo, denominado de *background*, com a presença da janela de seleneto de zinco (ZnSe) sem a amostra (Figura 11).

**Figura 11:** Detalhe do sistema de μ-FTIR, podendo se observar o eixo de transmissão das duas objetivas.

Para a realização das medidas, uma alíquota de 2μL de cada suspensão celular foi colocada em uma janela de ZnSe transparente ao infravermelho e secas em dessecador por duas horas de tal forma que fosse obtido um filme de amostra com diâmetro aproximado de 1 mm. A homogeneidade desta película fina foi verificada pelo microscópio óptico do próprio μ-FTIR. Durante a caracterização, o espectrômetro foi ajustado com a seguinte configuração: 60 *scans*, resolução de 4 $cm^{-1}$, região espectral entre 650 - 4000 $cm^{-1}$.

**Figura 12:** Detalhe da janela de seleneto de zinco (transparente no infravermelho) com um filme de amostra de homogenato depositado sobre a mesma, o que possibilitou a análise espectroscópica pela técnica de μ-FTIR.

## *4.4. Metodologia de análise estatística dos espectros*

A necessidade de classificar elementos em grupos por suas características está presente em várias áreas do conhecimento, como nas ciências biológicas, ciências sociais e comportamentais, ciências da terra, medicina, informática, entre outras. Tendo em vista a dificuldade de se examinar todas as combinações de grupos possíveis em um grande volume de dados, desenvolveram-se diversas técnicas capazes de auxiliar na formação dos agrupamentos.

Assim, o agrupamento, ou *clustering*, difere das metodologias de classificação previamente discutidas como a análise discriminante múltipla e a análise canônica. A classificação é pertinente a um número conhecido de grupos e seu objetivo operacional é classificar novas observações a um destes grupos. A análise de *Cluster* é uma técnica primitiva uma vez que nenhum pressuposto é assumido no que tange ao número de grupos ou a sua estruturação, precisando-se sempre de um referencial ao final de sua execução. O agrupamento é realizado a partir de similaridades ou distâncias entre seus componentes (dissimilaridades). Os únicos pré-requisitos são medidas de similaridade ou dados

sob os quais possam ser calculadas estas similaridades.

Para se proceder a análise estatística multivariada, primeiramente faz-se a utilização de derivadas dos espectros, método simples e muito utilizado na literatura no auxílio da diferenciação diagnóstica de tecidos biológicos. Assim, tem-se pontos de inflexão de picos próximos que resultam em máximos e mínimos na primeira derivada. São utilizadas mais fundamentalmente a primeira e segunda derivadas; sendo representadas pelas equações X e Y, respectivamente ($\Delta_i$ corresponde à distância temporal entre as medidas $x_i$ e $x_i$ - 1).

$$x_i^{'} \approx \frac{x_i - x_{i-1}}{\Delta_i} \qquad \text{[Equação 1]}$$

$$x_i^{''} \approx \frac{x_i^{'} - x_{i-1}^{'}}{\Delta_i} = \frac{2(x_i - x_{i-1} - x_i^{'}\Delta_i}{\Delta_i^2} \qquad \text{[Equação 2]}$$

O uso da derivação permite remover diferenças entre os espectros relacionados com a linha de base assim como melhorar a resolução. O maior problema da derivação consiste na amplificação do ruído associado ao sinal espectral, tendo-se que o conveniente é a separação em bandas estreitas do espectro obtido. Além disso, esta limitação pode ser reduzida se o cálculo das derivadas for conjugado com uma redução de ruído usando um filtro de suavização, como por exemplo, o filtro de *Savitsky-Golay*.

### 4.4.1. Filtro de Savitsky-Golay

Os filtros exponenciais e de média deslizante consideram aproximações lineares ao sinal. Contudo alguns sinais podem ser melhor modelados com aproximações quadráticas ou cúbicas. Por exemplo sinais que envolvem picos. Uma aproximação cúbica de um sinal x no ponto i é dada pela equação a seguir.

$$\dot{x}_i = c_0 + c_1 i + c_2 i^2 + c_3 i^3 \qquad \text{[Equação 3]}$$

O filtro de *Savitsky-Golay* é uma versão simplificada porque os coeficientes $c_j$ são tabelados. O filtro consiste na determinação de uma sequência de passos:

1. decidir a ordem do filtro
2. decidir o tamanho do filtro (dimensão da janela)
3. obter os coeficiente $c_j$ a partir dos valores tabelados e dividindo-os por uma constante (dependente da ordem e do tamanho da janela do filtro).

A Tabela 4 contém os coeficientes do filtro para tamanhos de janela até 9 pontos e até ordem 5. Notar que os coeficientes para ordem 2 e 3 são idênticos assim como os coeficientes para as ordem 4 e 5. Estes coeficientes divididos pela correspondente constante de normalizção devem ser usados na equação 1.

**Tabela 4:** Coeficientes do filtro linear Savitsky-Golay (cj) para serem usados na equação 1 (adaptado de Brereton[49], Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant, Wiley, New York, USA, 2003).

| Tamanho janela (j) | | 7 | 9 | 7 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|
| | Quadrático/ Cubico | | | Quarto/Quinto | |
| -4 | | | -21 | | 5 |
| -3 | | 2 | 4 | | -55 |
| -2 | 3 | | 9 | 30 | 0 |
| -1 | 2 | | 4 | 5 | 35 |
| 0 | 7 | | 9 | 31 | 79 |
| 1 | 2 | | 4 | 5 | 35 |
| 2 | -3 | | 9 | 30 | 0 |
| 3 | | -2 | 14 | 5 | -55 |
| 4 | | | -21 | | 5 |
| **Const. de Normalização** | **35** | **21** | **231** | **231** | **429** |

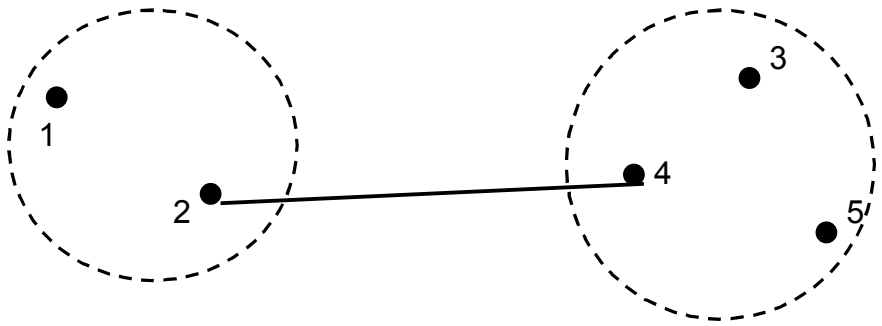
## 4.4.2. Métodos Aglomerativos

No método aglomerativo, cada elemento inicia-se representando um grupo, e a cada passo, um grupo ou elemento é ligado a outro de acordo com sua similaridade, até o último passo, onde é formado um grupo único com todos os elementos. Existe uma variedade de métodos aglomerativos, que são caracterizados de acordo com o critério utilizado para definir as distâncias entre grupos. Entretanto, a maioria dos métodos parecem ser formulações alternativas de três grandes conceitos de agrupamento aglomerativo[50].

### 4.4.2.1. Métodos de ligação (single linkage, complete linkage, average linkage, median linkage)

Ligação simples, ou vizinho mais próximo ("single linkage, nearest neighbor")

Baseia-se na menor distância entre quaisquer dois objetos dos dois grupos, o que equivale à distância entre os objetos mais próximos dos dois grupos:




Procedimento:

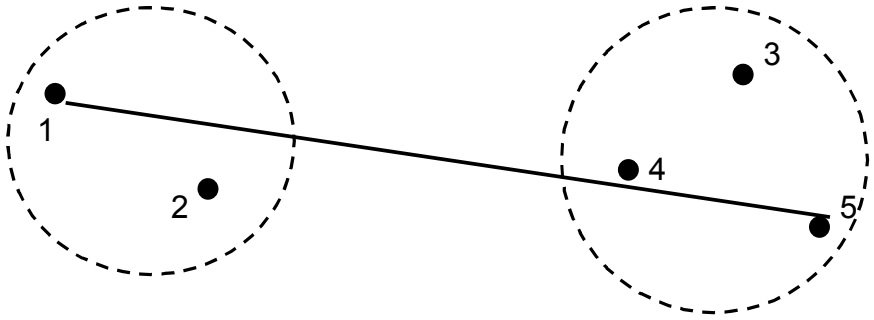
1) Percorrer a matriz de similaridade e detectar a menor distância $d_{ij}$; supondo que essa distância corresponda aos objetos *U* e *V*;
2) Juntar os dois objetos, formando o grupo (*UV*);
3) Atualizar a matriz de similaridade, com os novos objetos formados, tal que, para quaisquer dois novos objetos, *U* e *V*:

$$d_{UV} = \min\{d_{ij}\}$$ **i = 1, ..., $N_U$, j = 1, ..., $N_V$** **[Equação 4]**

4) Repetir os passos 1 a 3 acima, até que o número remanescente de grupos seja 1.

Ligação completa, ou vizinho mais distante ("complete linkage, farthest neighbor")

Baseia-se na maior distância entre quaisquer dois objetos dos dois grupos, o que equivale à distância entre os objetos mais distantes dos dois grupos:




Procedimento:

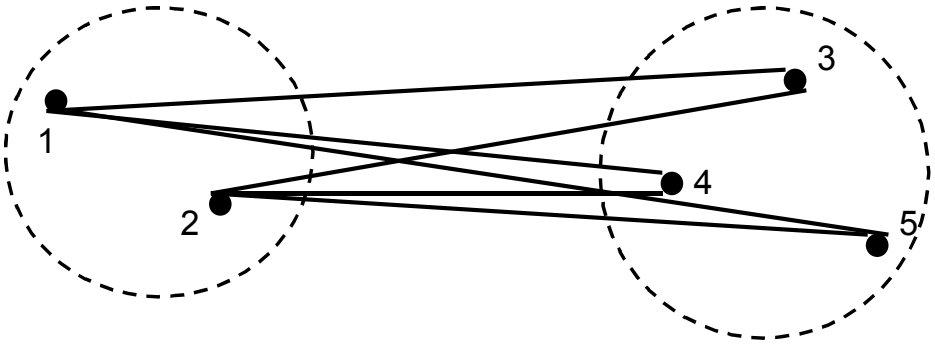
1) Percorrer a matriz de similaridade e detectar a menor distância $d_{ij}$; supondo que essa distância corresponda aos objetos *U* e *V*;
2) Juntar os dois objetos, formando o grupo (*UV*);
3) Atualizar a matriz de similaridade, com os novos objetos formados, tal que, para quaisquer dois novos objetos, *U* e *V*:

$$d_{UV} = \max\{d_{ij}\}$$ **i = 1, ..., $N_U$, j = 1, ..., $N_V$** **[Equação 5]**

4) Repetir os passos 1 a 3 acima, até que o número remanescente de grupos seja 1.

Ligação média ("average linkage")

Este método considera a distância entre objetos como sendo a média das distâncias entre pares de todos os componentes de cada objeto:




Procedimento:

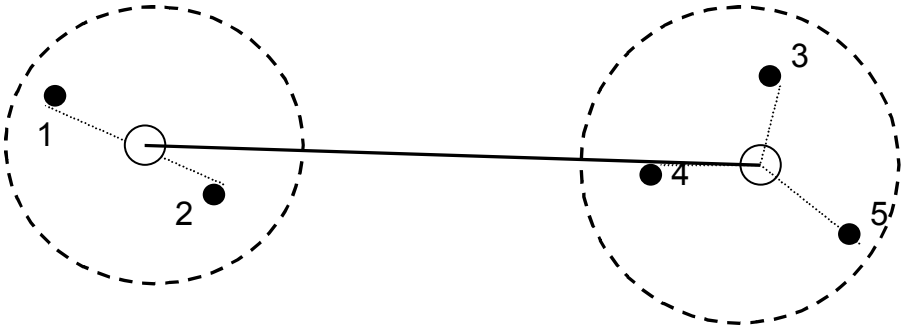
1) Percorrer a matriz de similaridade e detectar a menor distância $d_{ij}$; supondo que essa distância corresponda aos objetos *U* e *V*;
2) Juntar os dois objetos, formando o grupo (*UV*);
3) Atualizar a matriz de similaridade, com os novos objetos formados, tal que, para quaisquer dois novos objetos, *U* e *V*:

$$d_{UV} = \frac{\sum_{i=1}^{N_U}\sum_{j=1}^{N_V} d_{ij}}{N_U N_V} \qquad \textbf{[Equação 6]}$$

4) Repetir os passos 1 a 3 acima, até que o número remanescente de grupos seja 1.

#### 4.4.2.2. Métodos de centróide

Baseia-se nas distâncias entre valores médios dos objetos em cada grupo (centróides). A cada combinação de dois grupos, um novo grupo é formado e seu centróide é calculado novamente.




Procedimento:

1) Percorrer a matriz de similaridade e detectar a menor distância $d_{ij}$; supondo que essa distância corresponda aos objetos *U* e *V*;
2) Juntar os dois objetos, formando o grupo (*UV*);
3) Atualizar a matriz de similaridade, com os novos objetos formados, tal que, para quaisquer dois novos objetos, *U* e *V*, $d_{UV}$ é a distância entre as médias das coordenadas dos objetos contidos em *U* e *V*.
4) Repetir os passos 1 a 3 acima, até que o número remanescente de grupos seja 1.

### 4.4.2.3. Métodos de soma de erros quadráticos ou variância (método de *Ward*)

Neste método, os grupos são formados minimizando-se os quadrados dos desvios dos componentes de cada grupo, em relação ao valor médio de cada grupo (centróide do grupo). Define-se, para um grupo *k, $ESS_k$* como:

$$ESS_K = \sum_{j=1}^{N_k} \left(\mathbf{X}_j - \overline{\mathbf{X}}\right)^T \left(\mathbf{X}_j - \overline{\mathbf{X}}\right) \qquad \text{[Equação 7]}$$

em que $N_k$ é o número de componentes do grupo *k*, $X_j$ é um vetor de observações (dados multivariados) contido no grupo *k* e $\overline{\mathbf{X}}$ é o centróide do grupo *k*. Assim, o total da soma dos quadrados dos desvios dos grupos é:

$$ESS = \sum_{J=1}^{k} ESS_j \qquad \text{[Equação 8]}$$

O processo de agrupamento inicia-se com *n* grupos (igual ao número de observações). A cada passo do processo todos os pares de grupos, *i*, *j*, são considerados e é selecionado para compor o novo grupo o par que representar o menor incremento em *ESS*. Ou seja, por este método, a matriz de similaridade é composta pelos valores de *ESS* correspondentes a cada par *i, j.*
Os métodos aglomerativos possuem a complexidade de tempo da ordem de *O*(*n*2 log *n*) e a complexidade de espaço da ordem de *O*(*n*2 ) , onde *n* é o número de elementos (JAIN, 1999).

De modo geral, os métodos aglomerativos utilizam os passos de um algoritmo padrão.

#### 4.4.2.4. Medidas de similaridade

A maioria dos métodos de análise de *cluster* requer uma medida de similaridade entre os elementos a serem agrupados, normalmente expressa como uma função distância ou métrica. Seja *M* um conjunto, uma métrica em *M* é uma função d: M´M Â , tal que para quaisquer x, y, z Î *M,* tenhamos:

1. $d_{xy} > 0$ – para todo x=y
2. $d_{xy} = 0$ – x=y
3. $d_{xy} = d_{yx}$
4. $d_{xy} \leq d_{xy} + d_{zy}$

Assim, a equação geral, denominada de “Distância de Minkowski” é:

$$D_{ij} = \left[ \sum_{k=1}^{p} \left( \left| X_{ik} - X_{jk} \right| \right)^n \right]^{1/n} \qquad \text{[Equação 9]}$$

Sendo que, para n=2, obtém-se a “Distância Euclidiana”:

$$D_{ij} = \left[ \sum_{k=1}^{p} (\left| X_{ik} - X_{jk} \right|)^2 \right]^{1/2} \qquad \text{[Equação 10]}$$

E, quando n=1, obtém-se a “Distância de Manhattan”:

$$D_{ij} = \sum_{k=1}^{p} \left| X_{ik} - X_{jk} \right| \qquad \text{[Equação 11]}$$

Também há a “Distância Estatística” ou “Distância de Mahalanobis”:

$$D_{ij} = (X_i - X_K)^T \sum {}^{-1} (X_i - X_K) \qquad \text{[Equação 12]}$$

,onde X é vetor *px1* das variáveis e Σ é a matriz de covariância (pxp)

### 4.**4.2.5. Análise de Componentes Principais (PCA) e *Loading Plot***

O principal objetivo da análise de componentes principais (PCA) é reduzir a dimensão do número de observações. A maneira mais simples de redução de dimensão é fazer com que o elemento observado se torne um vetor e os outros elementos podem ser descartados por não serem observados. Apesar deste procedimento não ser muito razoável, pode-se distinguir o poder de discriminação através de pesos aos vetores, onde consiste em se obterem os pesos Wkj, k e j variando de 1 a p, para o seguinte sistema de equações:

Equação 13:

$$e_1 = w_{11}y_1 + w_{12}y_2 + \ldots + w_{1p}y_p$$

$$e_2 = w_{21}y_1 + w_{22}y_2 + \ldots + w_{2p}y_p$$
$$\ldots \quad \ldots \quad \ldots \quad \ldots \quad \ldots$$
$$e_p = w_{p1}y_1 + w_{p2}y_2 + \ldots + w_{pp}y_p$$

Sendo $\underline{e}$ um vetor associado (o fator PCA ou PC) a pesos que podem reunir informações expressas em porcentagem que dependem de um autovalor $\lambda$ e um autovetor $w_{xy}$.

Assim, tem-se o gráfico de *Loading plot* expresso em unidades de número de onda dependente de um vetor que é representado pelo PC ou *factor loading plot*.

Os espectros obtidos de todas as amostras foram normalizados pela área das bandas das amidas I e II (1490 – 1710 $cm^{-1}$), sendo cada um corrigido com linha de base em um programa com rotina desenvolvida no Laboratório de Biofotônica do CLA – IPEN – CNEN/ SP, em ambiente MatLab 2007b®. Em seguida a região do espectro normalizada foi processada por uma segunda derivada utilizando o algoritmo de Savitz-Golay com 13 pontos na janela. Estatisticamente, executou-se a análise de componentes principais (PCA), bem como os gráficos *Loading plot* até o 4º PC. Posteriormente, fez-se a análise de *clusters* a partir dos dados reduzidos de PCA, usando o Método de *Ward* com distância Euclidiana, que utiliza uma análise de variância mínima. Nestas análises usou-se o *software* MiniTab 15.1®.

Para as regiões de análise, foi obedecida a seguinte ordem:

- Primeiramente processou-se três regiões (900 – 1800 $cm^{-1}$; 2840 – 2885 $cm^{-1}$; 2900 – 2990 $cm^{-1}$);
- Execução do *loading plot*;
- Trabalho efetuado na banda de 950 – 1750 $cm^{-1}$;
- Depois de obtidos os *clusters*, a identidade de cada um foi verificada de acordo com o tipo histológico definido entre lesões benignas e neoplasias, baseado no diagnóstico anátomo-patológico.

Na análise estatística, as amostras foram divididas em dois grupos: o primeiro fez-se a comparação com os gráficos de dispersão entre somente carcinomas e bócios adenomatosos e o segundo faz a comparação com clusters obtidos de dados de PCA entre todas as amostras do trabalho.

# Resultados

# 5. RESULTADOS

## *5.1. Análise espectral e estatística por Componentes Principais (PCA)*

Na Figura 13 pode-se verificar que os espectros pertencentes a amostras de tecido de bócio são bem semelhantes em toda a extensão espectral estudada. Para o carcinoma papilífero, adenoma folicular e adenoma microfolicular há uma diferença sutil por volta de 1550cm$^{-1}$, 1450cm$^{-1}$ e 1050 cm$^{-1}$. Para a tireoidite de Hashimoto, há diferença nestes mesmos picos, mais os picos de 1401 cm$^{-1}$ (estiramento $CH_3$ de proteínas) e 1056 cm$^{-1}$ (uma das regiões do DNA). Já para a doença de Graves, observa-se uma diferença entre a região de 1400 – 1550 cm$^{-1}$ (amida II principalmente).

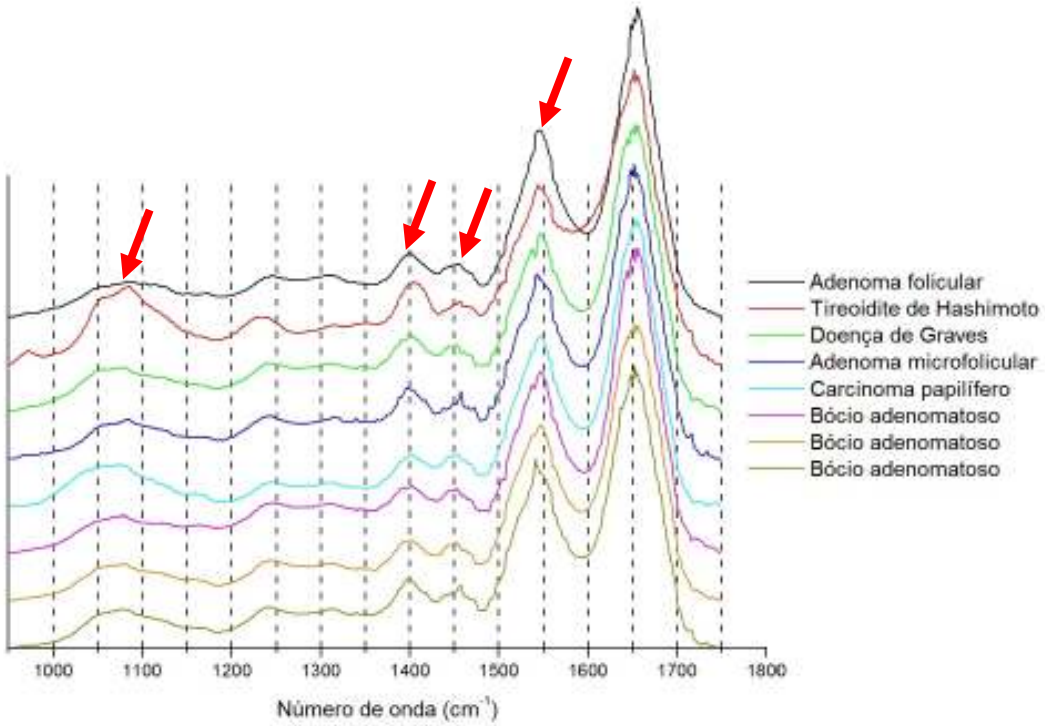



**Figura 13:** Intervalo correspondente à região espectral entre 1000 – 1750cm$^{-1}$, o qual evidencia as diferenças significativas entre os espectros das patologias associadas à tireóide analisadas neste trabalho.

Analisando as outras regiões espectrais evidenciadas na Figura 14B, não foi possível encontrar um padrão semelhante aos bócios, evidenciando certa semelhança quando se compara o adenoma folicular, tireoidite de Hashimoto e adenoma microfolicular. Porém, a banda na região entre 2840 – 2885 $cm^{-1}$ (Figura 14 A) representa as vibrações moleculares dos lipídeos e não se conhece relação entre esta e as lesões malignas de tireóide. Já na região B da Figura 14 há certa semelhança entre os espectros, visto que esta banda representa o estiramento C-H (2930 $cm^{-1}$). Em vista disto, realizaram-se dois testes de PCA: um com as três regiões espectrais e outro com somente a região compreendida entre 950 - 1750$cm^{-1}$. Assim, verifica-se que as retiradas destes intervalos espectrais melhoraram os resultados mantendo-se a significância estatística, visto que também a média acumulada não mudou na análise de PCA, conforme pode ser visualizado nas tabelas a seguir.

Nestas tabelas estão descritas as estatísticas PCA referentes às regiões evidenciadas nas figuras anteriores para as amostras de tecido. Em ambas as tabelas, nota-se que o autovalor apresenta-se elevado para PC1, reunindo uma grande quantidade de informações dos espectros. Já na Tabela 6, como foi efetuada a retirada de outras duas bandas, mantendo-se somente a região entre 900 – 1750 cm-1, pode-se notar que o autovalor permanece alto para PC1, significando que a maior parte das informações reunidas anteriormente na Tabela 5 estão presentes nesta região. Verifica-se que até o PC2 a média acumulada apresenta o mesmo valor, o que evidencia que não houve perda de informação.

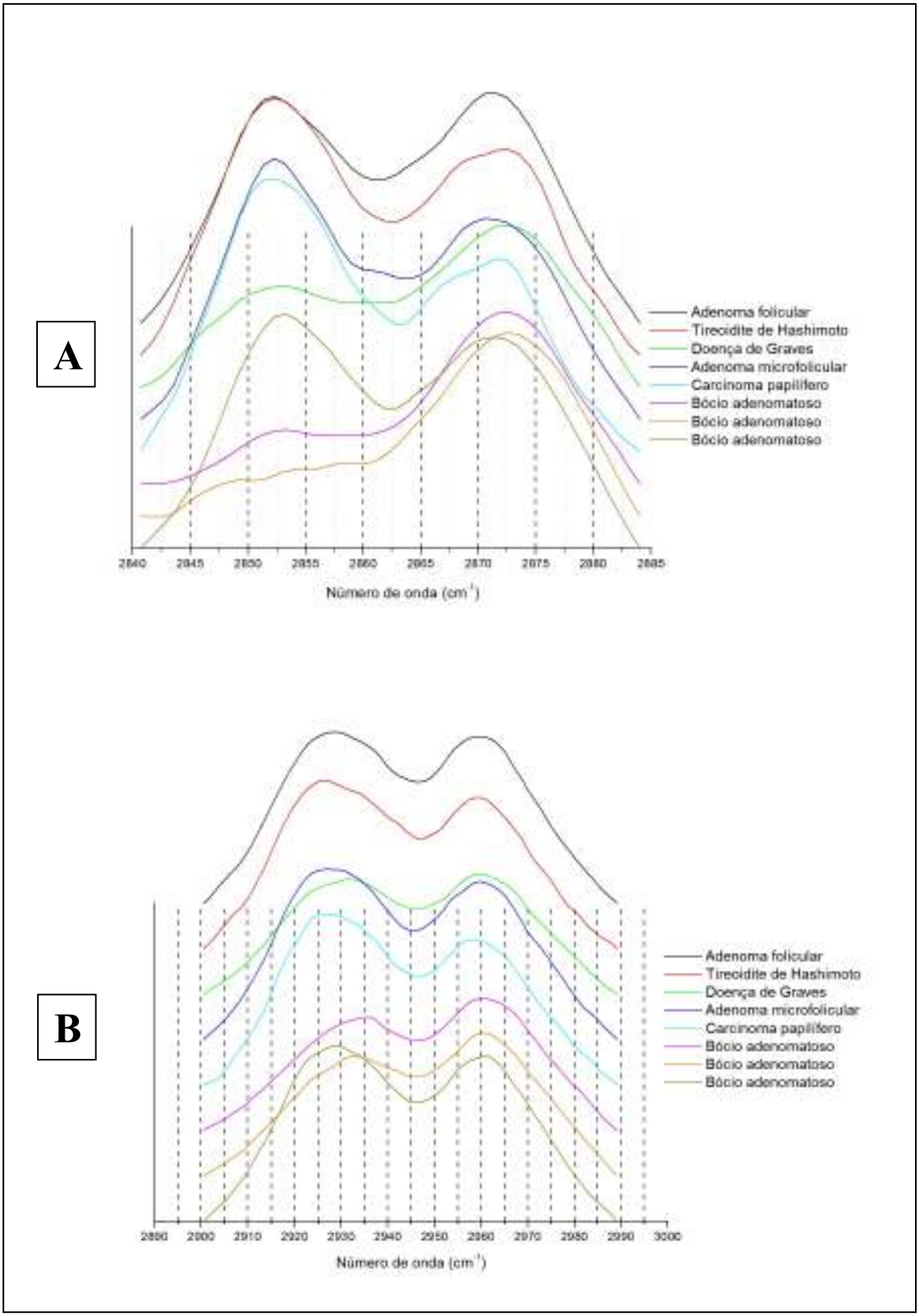



**Figura 14:** Em A, tem-se a visualização das diferenças entre os espectros dos diversos tecidos na região que representa a vibração dos lipídeos. Em B, do estiramento de C-H.

**Tabela 5:** Estatística PCA referente à **Figura 13** para todas as bandas.

| Bócio x Tumor | Autovalor | Variabilidade | Acumulada |
|---|---|---|---|
| PC1 | 37,340 | 98,3 | 98,3 |
| PC2 | 0,416 | 1,1 | 99,4 |
| PC3 | 0,099 | 0,3 | 99,6 |
| PC4 | 0,057 | 0,2 | 99,8 |

**Tabela 6:** Estatística PCA referente à Figura 14 de 900 à 1800 $cm^{-1}$.

| Bócio x Tumor | Autovalor | Variabilidade | Acumulada |
|---|---|---|---|
| PC1 | 31,424 | 98,2 | 98,2 |
| PC2 | 0,373 | 1,2 | 99,4 |
| PC3 | 0,101 | 0,3 | 99,7 |
| PC4 | 0,041 | 0,1 | 99,8 |

Visando uma análise mais minuciosa, a Tabela 7 descreve os modos vibracionais mais relevantes entre comparações das patologias deste trabalho.

**Tabela 7:** Modos vibracionais que relacionam características das patologias da tireóide estudadas neste trabalho[45,46,51].

| Pico ($cm^{-1}$) | Classificação | Patologia associada |
|---|---|---|
| 2960 | $\nu_{as}(CH_3)$ | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero<br>Adenoma Folicular |
| 2930 | estiramento C-H | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 2874 | $\nu_s(CH_3)$ de lipídeos | Carcinoma papilífero<br>Adenoma Folicular |
| 2853 | $\nu_s(CH_2)$ de lipídeos | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero<br>Adenoma Folicular |
| 1719 | C=O | Bócio adenomatoso |
| 1650 | Amida I, C=O | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1644 | Amida I | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1562 | Amida I | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1545 | Amida II (δN-H, *v*C-N) | Bócio adenomatoso |
| 1537 | Estiramento C=N, C=C | Bócio adenomatoso |
| 1517 | Amida II | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1504 | Vibração do CH, anéis fenólicos | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1467 | Colesterol – banda metil | Bócio adenomatoso |
| 1458 | $\delta_{ass}CH_3$ do colágeno | Bócio adenomatoso |
| 1451 | Grupos metil de proteínas | Bócio adenomatoso |
| 1419 | $\nu_s(COO^-)$ - polissacarídeos | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1401 | Estiramento simétrico do $CH_3$ de proteínas | Bócio adenomatoso<br>Adenoma Folicular |
| 1395 | Estiramento simétrico do $CH_3$ de aas | Bócio adenomatoso<br>Adenoma Folicular |
| 1390 | Partícula de carbono | Bócio adenomatoso |
| 1371 | Estiramento C-O, deformação do N-H, deformação C-H | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero<br>Adenoma Folicular |
| 1358 | Estiramento C-O, deformação do N-H, | Bócio adenomatoso<br>Adenoma Folicular |

| | | |
|---|---|---|
| | deformação C-H | Adenoma Folicular |
| 1340 | Colágeno e $CH_2$ wagging | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 133 | $CH_2$ wagging | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1310 | Amida III | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1284 | Amida III | Bócio adenomatoso<br>Adenoma Folicular |
| 1272 | $CH_{\alpha'}$ rocking | Bócio adenomatoso<br>Adenoma Folicular |
| 1240-1245 | Fosfato I – $PO_2^-$ assimétrico | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero<br>Adenoma Folicular |
| 1239 | Fosfato I– $PO_2^-$ assimétrico | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero<br>Adenoma Folicular |
| 1161 | tirosina | Carcinoma papilífero |
| 1162 | Resíduos de aas | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero<br>Adenoma Folicular |
| 1155 | v(C-C) | Bócio adenomatoso |
| 1122 | v(C-O) de carboidratos | Bócio adenomatoso |
| 1094 | Fosfato II – $PO_2^-$ assimétrico | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1099 | Fosfato II – $PO_2^-$ assimétrico | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1098 | Fosfato II – $PO_2^-$ assimétrico | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1079 | $v_s(PO_2^-)$ | Bócio adenomatoso |
| 1055 | Componentes de membrana | Bócio adenomatoso<br>Carcinoma papilífero |
| 1056 | Estiramento da desoxirribose | Bócio adenomatoso |
| 985 | polissacarídeos | Bócio adenomatoso |
| 971 | Ácidos nucléicos | Bócio adenomatoso |
| 966 | C-O da desoxirribose | Bócio adenomatoso |

## *5.2. Análise estatística multivariada*

Nesta etapa, foi selecionado o melhor método estatístico encontrado para um diagnóstico seguro. Contudo, os resultados apresentados somam uma pequena contribuição no que tange a análise estatística multivariada, possibilitando outras formas de análise e até podendo melhorar futuramente a sensibilidade e especificidade da técnica.

A Figura 15 mostra um dendrograma em que não foi efetuada a análise estatística integral, mas sim efetuada com os espectros somente normalizados, sem derivadas e filtros de suavização. Os agrupamentos não parecem apresentar uma organização diagnóstica, indicando que o método de análise precisa ser refinado no que diz respeito à seleção das bandas infravermelho. Tal refinamento deve evidenciar uma maior diferenciação entre bócio adenomatoso, carcinomas e outras patologias associadas à tireóide.

Em relação aos métodos multivariados testados, os *loading plot*s esclarecem qual será a contribuição de cada região pela escolha simultânea do componente principal. O tratamento estatístico foi efetuado até o componente principal de ordem 3, o qual reúne no mínimo 85% da informação total dos espectros infravermelho obtidos.

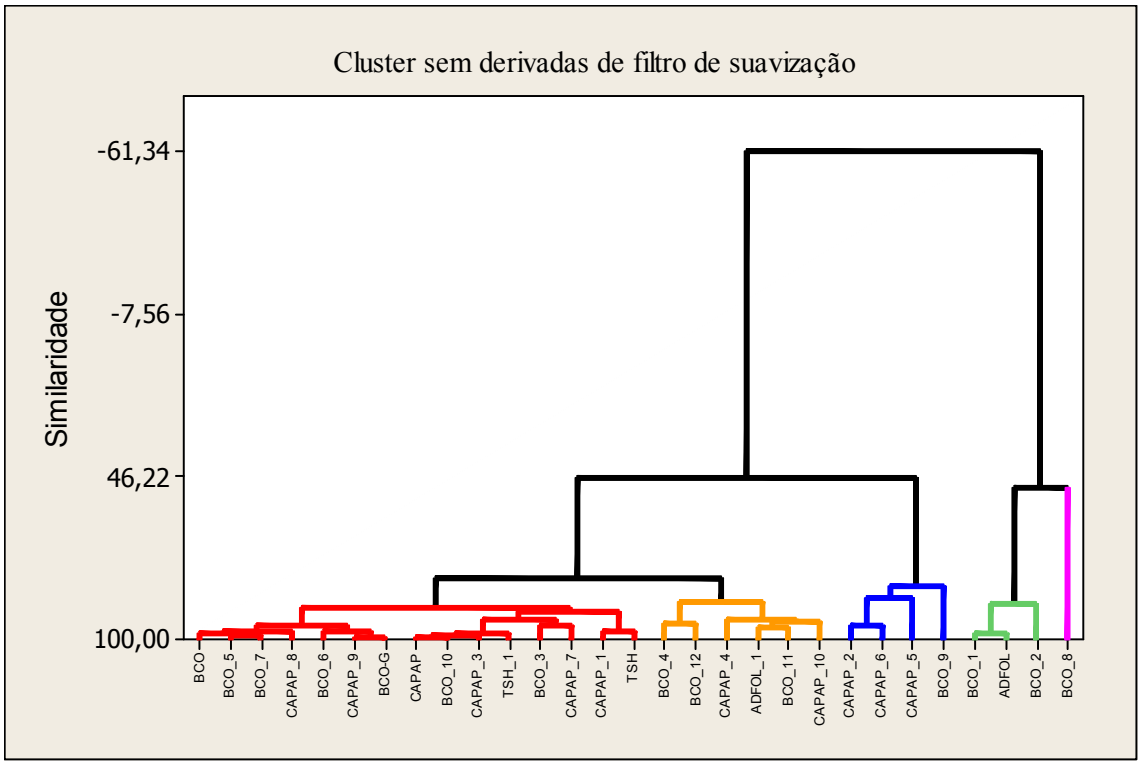



**Figura 15:** Dendrograma efetuado sem prévio tratamento dos espectros dos tecidos, onde não há evidências de diferenciação diagnóstica.

### 5.2.1. Análise dos espectros dos tecidos

A **Figura 16** mostra as médias de 3 espectros para cada patologia associada na análise de FTIR. Pode-se verificar que o espectro do carcinoma papilífero possui uma maior intensidade para a amida II e na região dos polissacarídeos, 1150-1350 $cm^{-1}$. Nota-se também que o adenoma folicular possui uma maior intensidade em 1450 $cm^{-1}$ e em 1400 $cm^{-1}$ maior, podendo ser diferenciada dos demais nesta região. A banda de 1000 - 1100$cm^{-1}$ denota-se uma diferença para o carcinoma papilífero pela intensiade mais alta que os outros espectros e o bócio adenomatoso possui um pico não definido próximo à região de 1100 $cm^{-1}$.

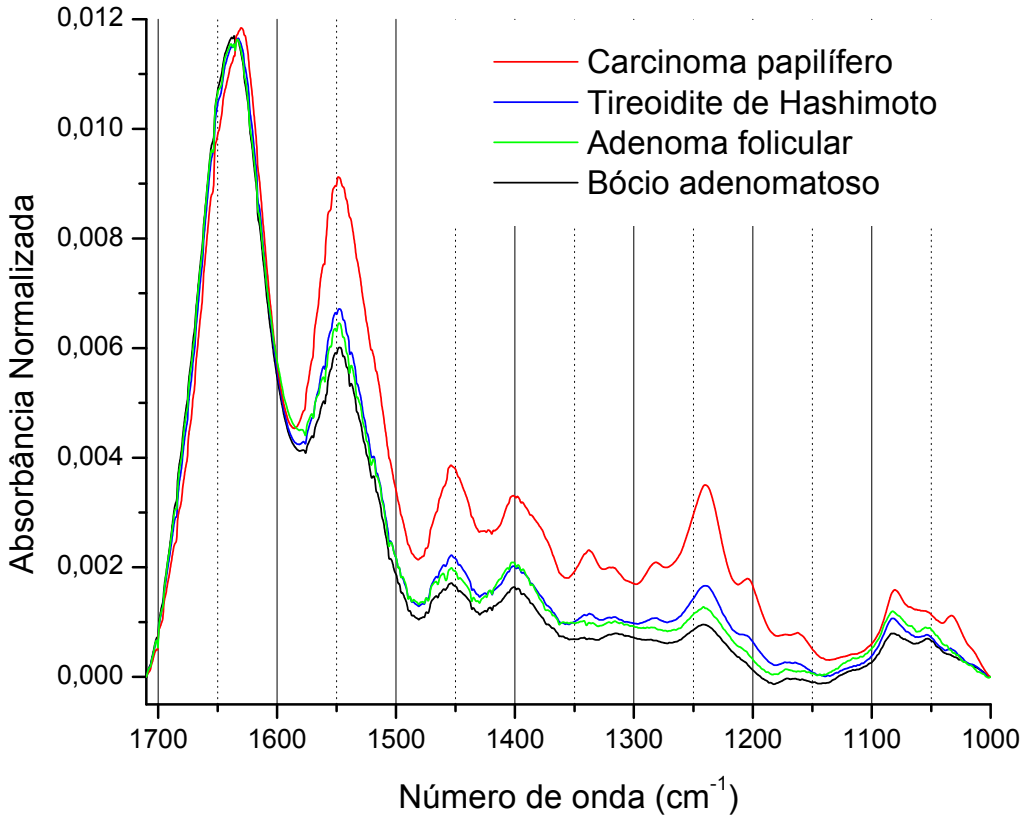



**Figura 16:** Perfil espectral da média de 3 espectros dos tecidos correspondentes a cada patologia associada à tireóide.

### 5.2.1.1. *Loading plot*

As Figuras 17 à 20 apresentam os *Loading Plots*, os quais mostram em termos crescentes de componentes principais a parcela em que os dados possuem maior contribuição estatística, isto é, quanto maior for o número de componentes principais, menor a contribuição em dados para o sistema. Também se verifica por este método gráfico os planos fatoriais, que indicam a importância de cada variável no estudo, de acordo com as escolhas dos intervalos para a análise de *clusters*.

Na **Figura 17** há a presença de muitos ruídos associados ao componente principal 2. Ainda assim, observa-se que a maioria dos dados está

muito próxima do eixo das abcissas, denotando-se a falta de informação perante a apresentação destes dados. Tal gráfico possui realmente uma única informação confiável, em que o pico 1240 $cm^{-1}$ (fosfato) evidencia-se como diferente por apresentar inversão do sinal em relação aos PCs 1 e 2.

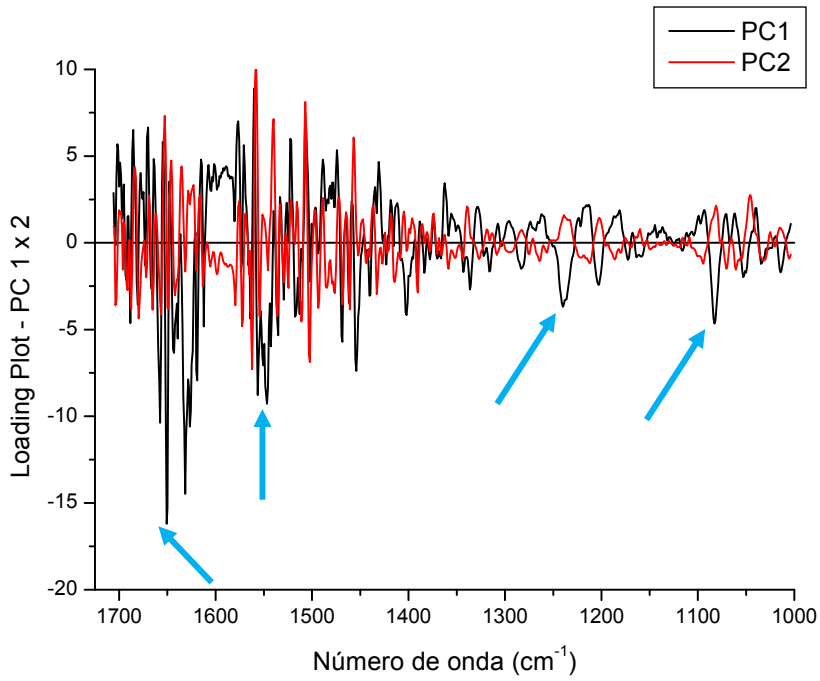



**Figura 17:** *Loading plot* para os componentes principais 1 e 2, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda. Note a inversão de sinal nas regiões correspondentes à vibração de fosfato I e II (1087 $cm^{-1}$ e 1240 $cm^{-1}$, respectivamente).

Na Figura 18, visualizam-se variações em torno de 1750 $cm^{-1}$, 1550 $cm^{-1}$, 1240 $cm^{-1}$ (fosfato) e o intervalo de 1150 – 1100 $cm^{-1}$, correspondente à região do DNA, mais especificamente os polissacarídeos[52] (setas).

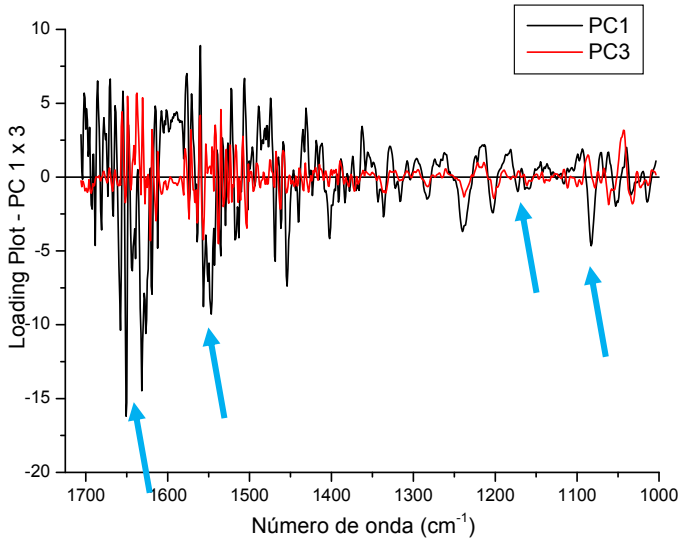



**Figura 18:** *Loading plot* para os componentes principais 1 e 3, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

Contudo, a **Figura 19**, mostrada a seguir, não indica boas regiões para análise devido ao fato de apresentar muitas irregularidades, principalmente nas regiões das amidas I e II (1540 a 1650 $cm^{-1}$).

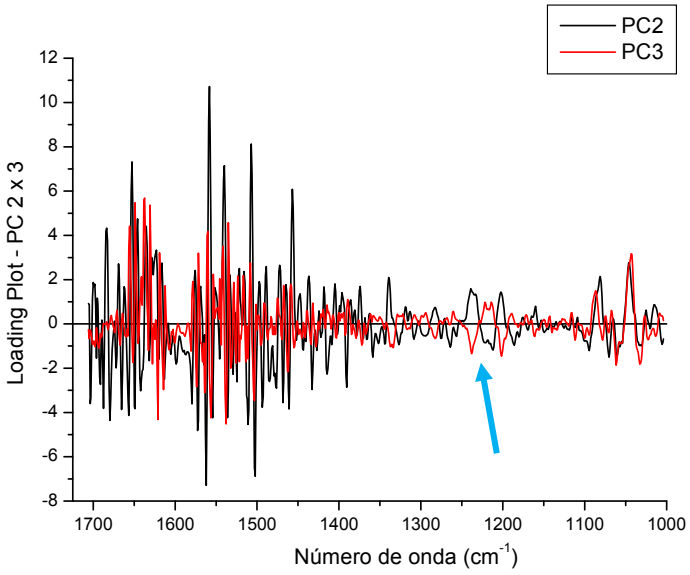



**Figura 19:** L*oading plot* para os componentes principais 2 e 3, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

### 5.2.1.2. Tabela de significância estatística para os espectros dos tecidos

De acordo com a Tabela 8, cada autovalor corresponde a uma significância estatística associada a um autovetor. Este condiz um parâmetro que reúne informações que expressam certa porcentagem da variabilidade total das informações dos espectros reunidos.

**Tabela 8:** Estatística PCA para os espectros dos tecidos. Destacam-se os valores das médias acumuladas.

| Bócio x Tumor | Autovalor | Variabilidade (%) | Acumulada |
|---|---|---|---|
| PC1 | 8,7295 | 58,2 | 58,2 |
| PC2 | 3,2691 | 21,8 | 80,0 |
| PC3 | 1,2049 | 8,00 | 88,0 |
| PC4 | 0,6507 | 4,30 | 92,4 |
| PC5 | 0,4242 | 2,80 | 95,2 |
| PC6 | 0,2096 | 1,40 | 96,6 |

Para se construir os gráficos de dispersão utilizaram-se os valores de PCA até o número 3, onde se reúne 88% da informação contida nos espectros. Ressalta-se ainda que estes gráficos foram trabalhados para os carcinomas e bócios adenomatosos, de modo que, se houvesse uma separação, seria primeiramente por este modo mais simplificado.

### 5.2.1.3. Gráficos de dispersão dos espectros dos tecidos

Os gráficos de dispersão são úteis para se distinguir qual amostra está mais próxima da outra, podendo auxiliar na interpretação e visualização do dendrograma produzido a partir destes dados de PCA.

Pode-se verificar graficamente que as informações se baseiam nos casos de diferenciação entre os bócios adenomatosos e o carcinoma papilífero. Porém, devido a existência da grande heterogeneidade entre componentes

teciduais da glândula tiróide, nota-se que a análise de dispersão não foi sensível o bastante para separar algumas lesões malignas das lesões do tipo bócio, como visto nas Figuras a seguir.

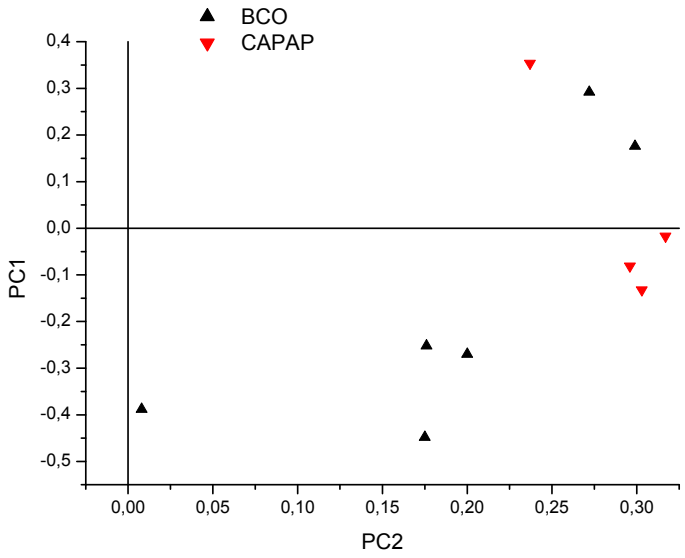



**Figura 20:** Análise de PCA (PCA 1 x PCA 2) relacionando lesões malignas (em vermelho) e bócio (em preto). Não foi observada diferenciação por este método.

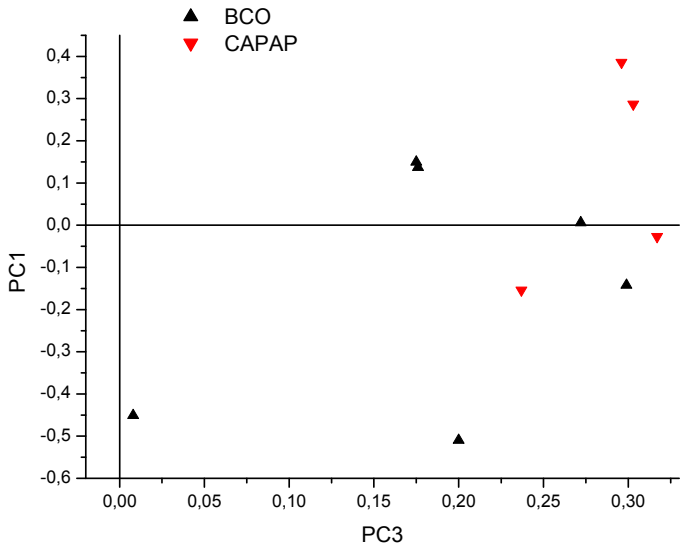



**Figura 21:** Análise de PCA (PCA 1 x PCA 3) relacionando lesões malignas (em vermelho) e bócio (em preto). Não foi observada diferenciação por este método.

Em relação à **Figura 22**, houve certa separação das amostras de tecido mais no 3º Quadrante e os casos de carcinomas estão tendendo ao centro do gráfico. Porém também não foi suficiente o bastante para se estabelecer um método diagnóstico.

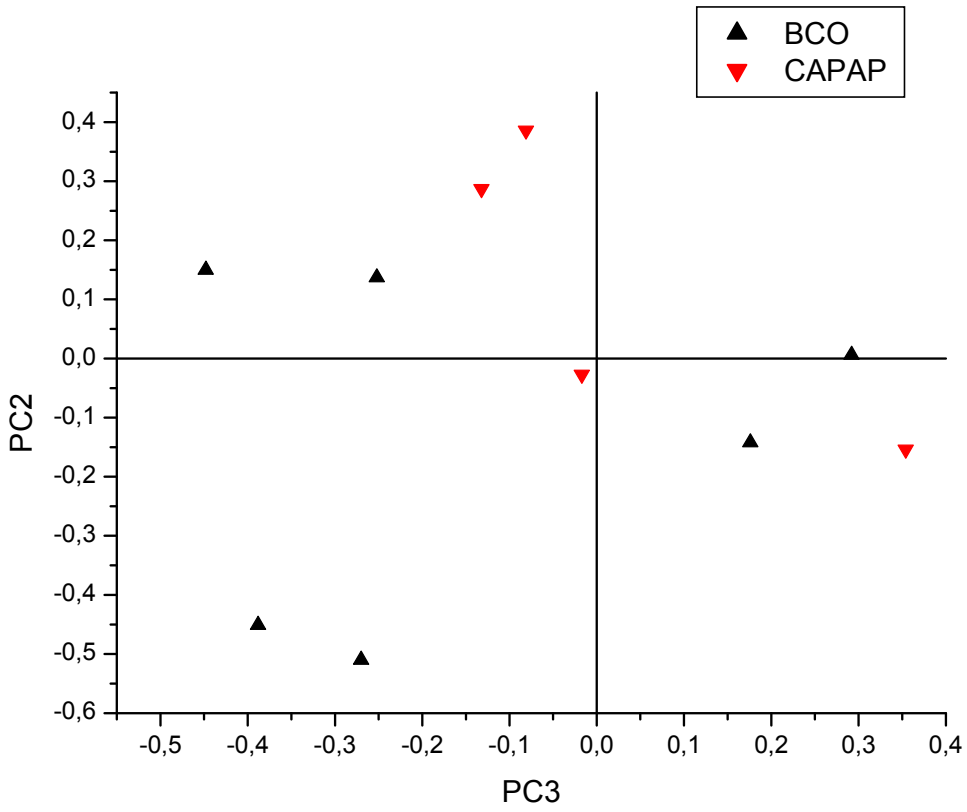



**Figura 22:** Análise de PCA (PCA 2 x PCA 3) relacionando lesões malignas (em vermelho) e bócio (em preto). Não foi observada diferenciação por este método.

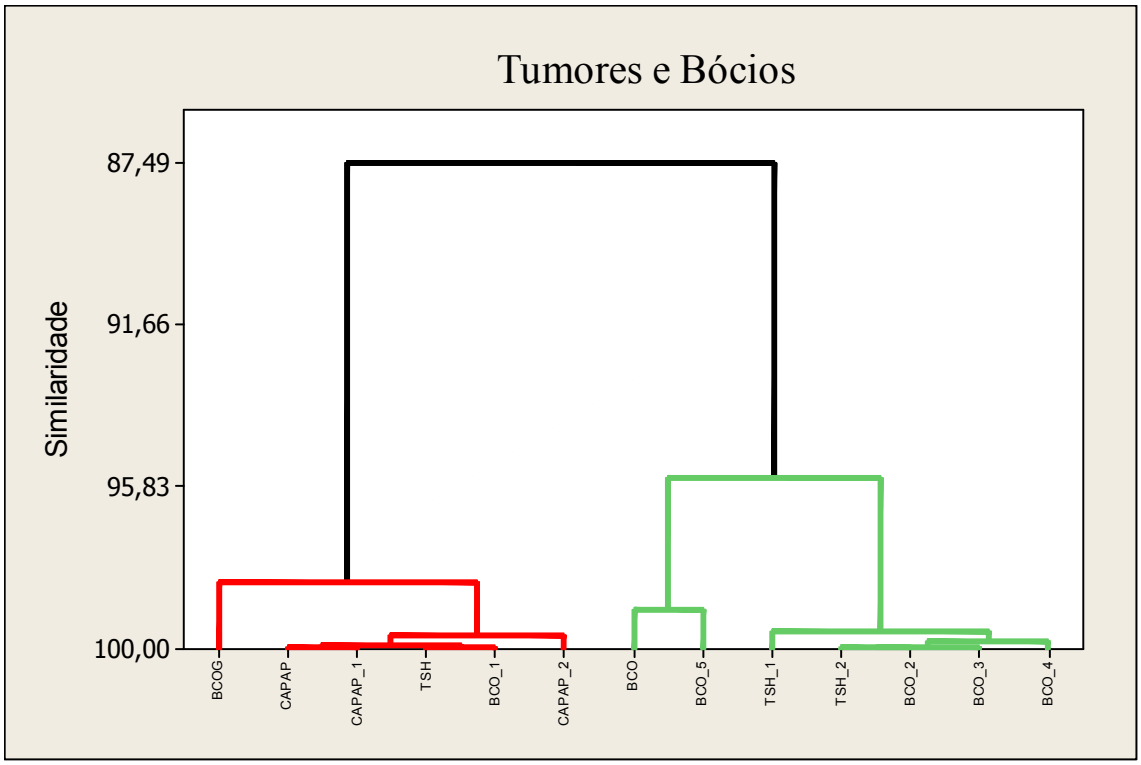



**Figura 23:** Dendrograma mostrando a relação de tumores e bócios pelo método de Ward e distância euclidiana.

A Figura 23 representa o dendrograma obtido com os dados dos espectros de 13 amostras de tecido (3 carcinomas papilíferos e 10 bócios adenomatosos). Foi possível separar com 100% de sensibilidade os casos de lesões benignas de lesões malignas e com 50% de especificidade para as lesões malignas. Logicamente, para este caso tem-se somente 3 tumores, sendo que o "CAPAP" ficou pareado com o "CAPAP_1" e, este grupo de cluster está diferenciado e ligado pelo cluster do "CAPAP_2". Nota-se também que a Doença de Graves (BCOG) está bem separada das demais amostras, comprovando que o método diferenciou bem entre os grupos benignos.

#### 5.2.1.4. Clusters depois do PCA de tecidos

Na Figura a seguir, o dendrograma mostra uma divisão dos bócios do restante do grupo, estabelcendo-se para este grupo uma sensibilidade de 100% . Também houve uma separação para as tireoidites de Hashimoto (%%%) dos demais grupos da esquerda. Já para o cluster verde não houve divisões entre

as amostras de BCO, CAPAP_1 e TSH_2. No cluster vermelho tem-se um agrupamento somente dos grupos malignos.

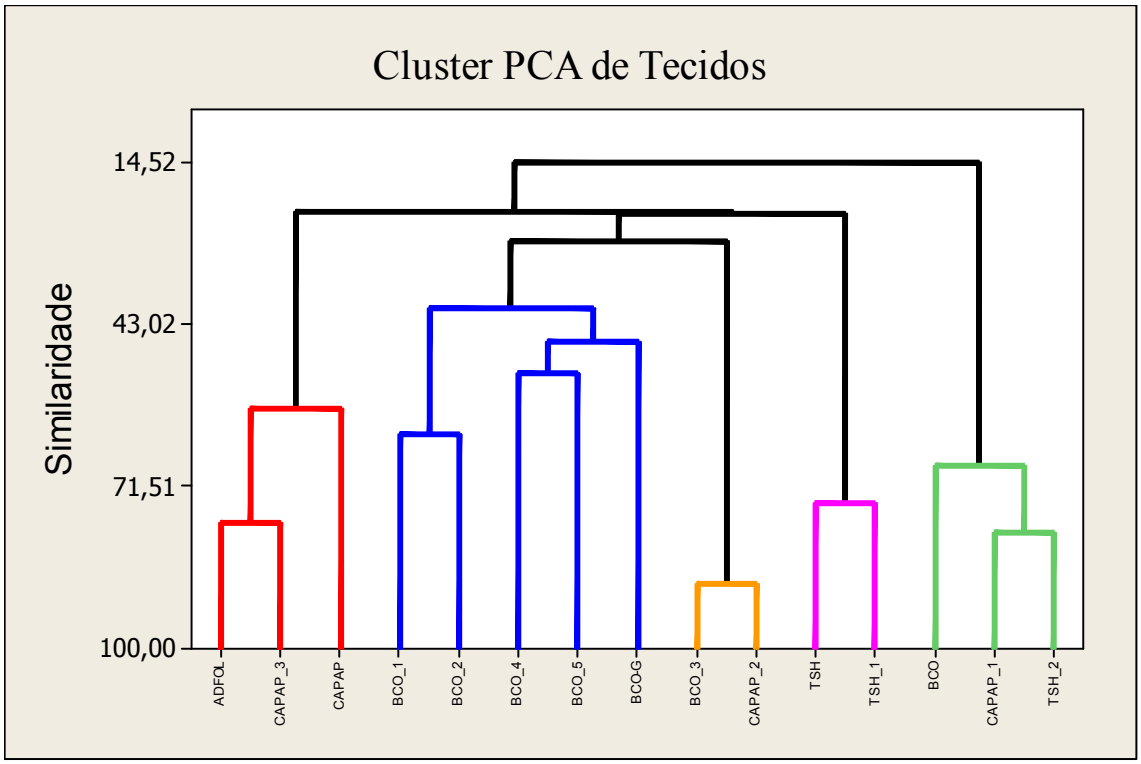



**Figura 24:** Dendrograma mostrando a relação de tumores e bócios pelo método de Ward e distância euclidiana.

### 5.2.2. Análise dos espectros dos homogenatos

Pode-se verificar que o espectro do carcinoma papilífero possui um aspecto muito semelhante dos demais. Observa-se uma maior intensidade para a região de 1240 cm-1 (fosfato) e que a curva acompanha de certo modo a tireoidite de Hashimoto (TSH), contanto que se pode ver pela figura a seguir, no dendrograma, que um carcinoma papilífero acompanha 1 bócio e 2 tireoidites de Hashimoto.

Na região dos polissacarídeos, 1150-1350 $cm^{-1}$ nota-se também que aTSH possui uma maior intensidade em 1450 $cm^{-1}$ e em 1400 maior, podendo ser diferenciada dos demais nesta região. A banda de 1450 $cm^{-1}$ denota-se uma diferença para o carcinoma papilífero pela intensiade mais alta que os outros espectros.

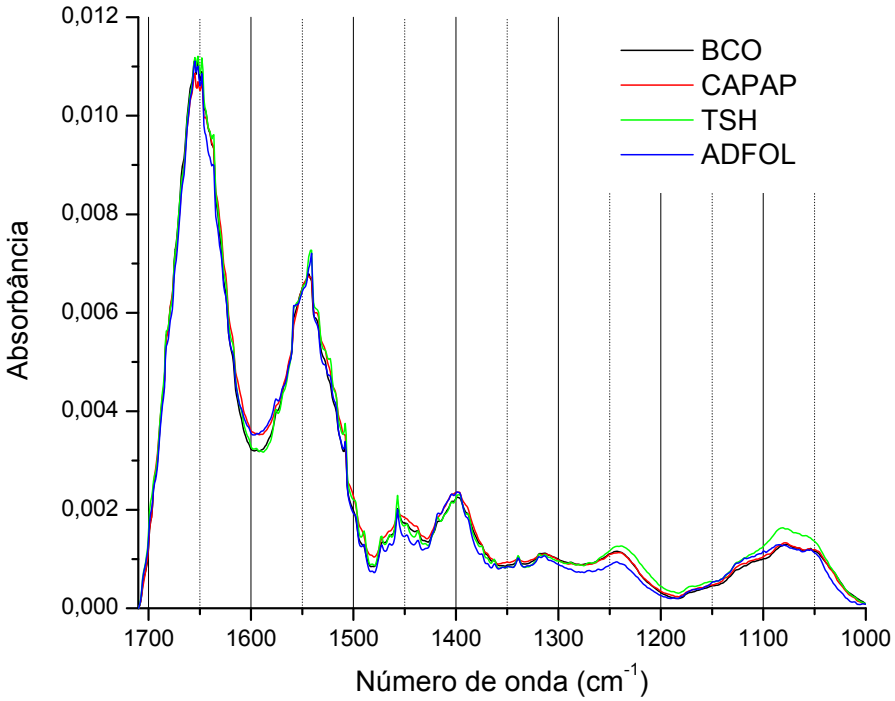



**Figura 25:** Perfil espectral da média de 3 espectros dos homogenatos de cada patologia associada à tireóide.

### 5.2.2.1. *Loading plot*

Nas Figuras 26 a 28 tem-se a disposição dos *Loading Plots*, nos quais mostram em termos crescentes de componentes principais a parcela em que os dados possuem maior contribuição estatística, isto é, quanto maior for o número do componente principal, menor a contribuição em dados para o sistema. Também se verifica por este método gráfico os planos fatoriais, mostrando a importância de cada variável no estudo de acordo com as escolhas dos intervalos para a análise de *clusters*.

Na **Figura 26** houve uma alta representação do componente principal 1 que levou em detrimento do PC 2. Este não se consegue diferenciar as regiões das bandas por estar com o valores bem próximo do eixo das abcissas.

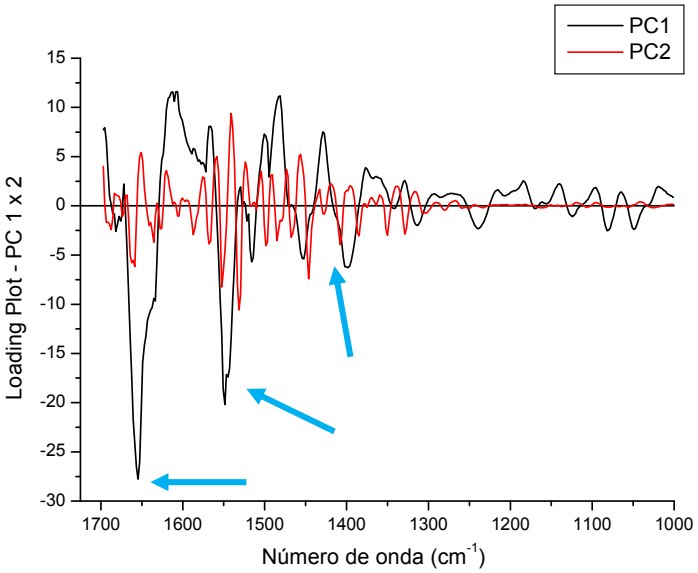



**Figura 26:** *Loading plo*t para os componentes principais 1 e 2, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

Na **Figura 27** houve certa diferenciação nos espectros em 1650 cm-1 e 1559cm-1, amida I e II, respectivamente. Porém, ao longo do restante do espectro não se verifica uma diferenciação entre as curvas de PC 1 e 2.

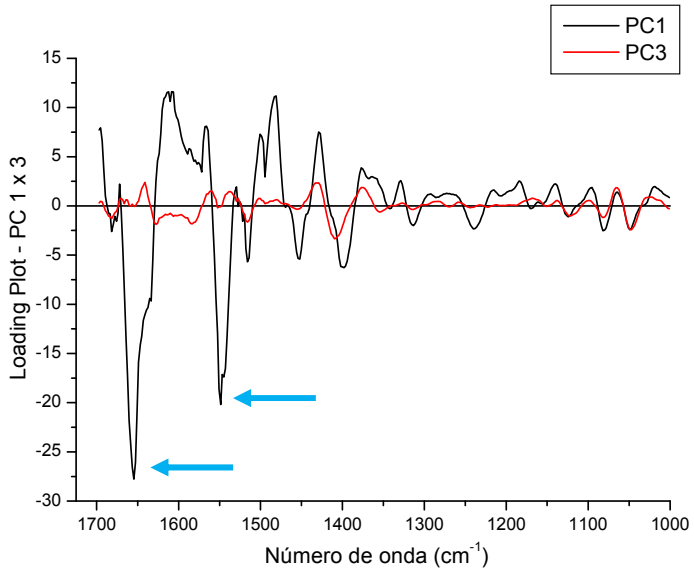



**Figura 27:** *Loading plot* para os componentes principais 1 e 3, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

Na **Figura 28** tem-se o *loading plot* para os componentes principais 1 e 3. Houve bastante significância estatística neste caso, pois os picos 1650 $cm^{-1}$, 1559 $cm^{-1}$, 1420 $cm^{-1}$, 1660 $cm^{-1}$ apresentaram seus correspondentes negativos para o componente principal 2.

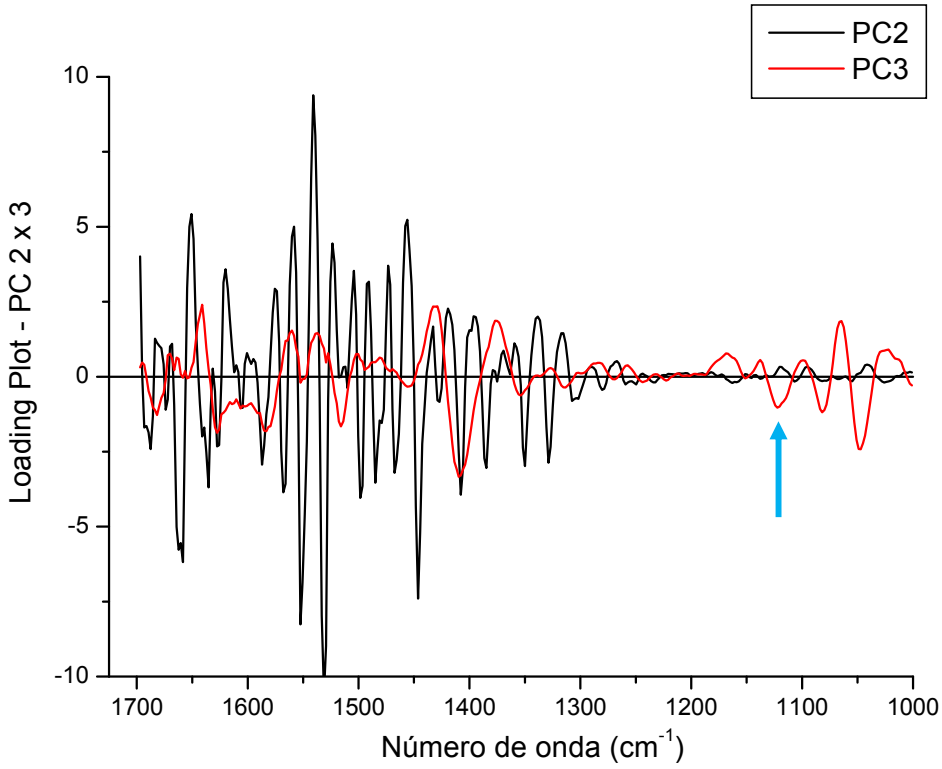



**Figura 28:** *Loading plot* para os componentes principais 2 e 3, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

### 5.2.2.2. Tabela de significância estatística para homogenatos

De acordo com o que pode ser observado na tabela a seguir, a o PC1 reúne muitas informações a respeito dos dados espectrais, refletindo em uma maior similaridade entre os mesmos de todas as amostras.

**Tabela 9:** Estatística PCA. Destacam-se os valores das médias acumuladas.

| Bócio x Tumor | Autovalor | Variabilidade | Acumulada |
|---|---|---|---|
| PC1 | 33,888 | 82,70 | 82,70 |
| PC2 | 4,623 | 11,30 | 93,90 |
| PC3 | 0,923 | 2,30 | 96,20 |
| PC4 | 0,619 | 1,50 | 97,70 |
| PC5 | 0,249 | 0,60 | 98,30 |
| PC6 | 0,144 | 0,40 | 98,60 |

### 5.2.2.3. Gráficos de dispersão para homogenatos

Na Figura 29 a separação entre as amostras não foi eficaz por se agruparem muito em torno do componente principal 2, entre 0,15 e 0,17.

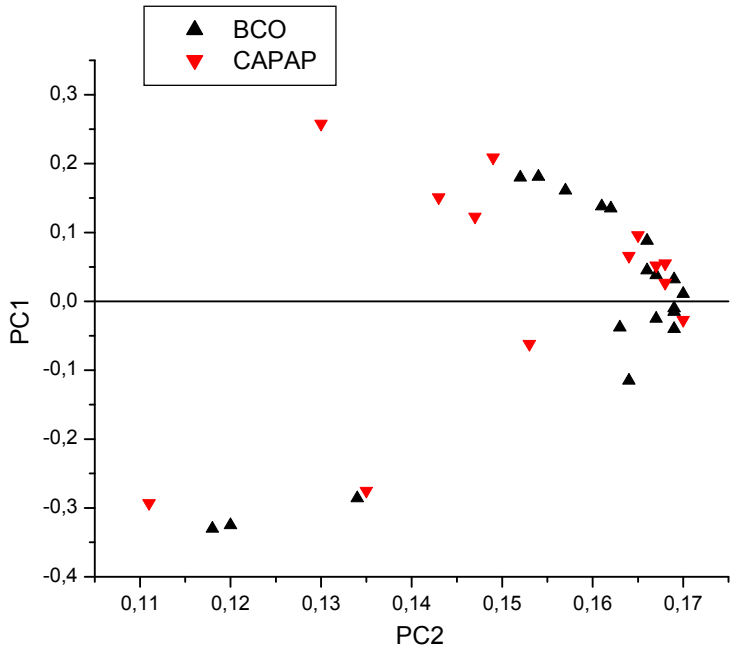



**Figura 29:** Gráficos de análise de PCA relacionando Tumor e Bócio. Os pontos vermelhos indicam os tumores e os pretos, os bócios.

Já a ocorrência da separação na Figura 30 seguiu uma tendência a separar no lado positivo para o componente principal 1 os carcinomas papilíferos,

porém com uma dispersão muitos grande entres os mesmos.

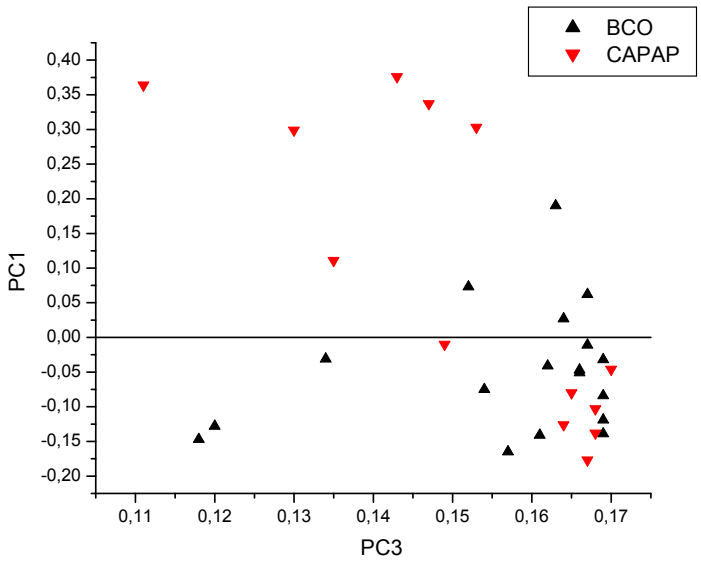



**Figura 30:** Gráficos de análise de PCA relacionando Tumor e Bócio. Os pontos vermelhos indicam os tumores e os pretos, os bócios.

A Figura 31 retrata uma melhor separação entre os grupos de bócios e carcinomas , prevalecendo uma separação entre 9 bócios e 6 carcinomas no 2º Quadrante e 6 bócios para 1 carcinoma no 3º Quadrante.

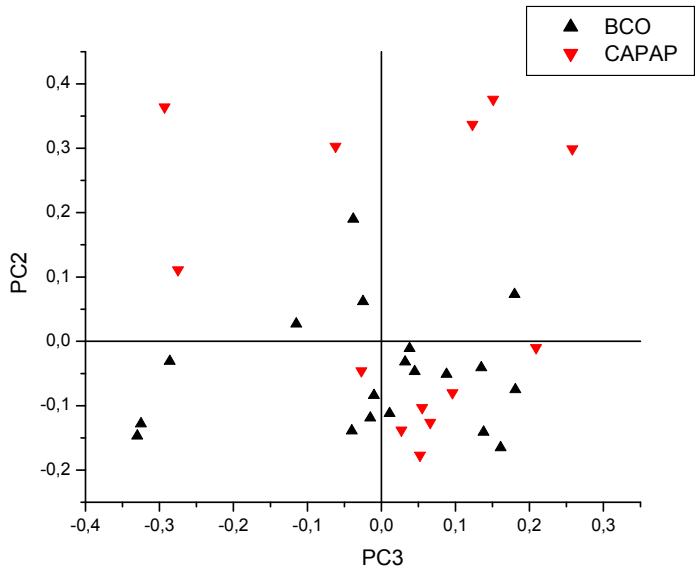



**Figura 31:** Gráficos de análise de PCA relacionando Tumor e Bócio. Os pontos vermelhos indicam os tumores e os pretos, os bócios.

### 5.2.2.4. Dendrogramas depois do PCA

Na Figura 32 temos a separação entres os grupos de bócios dos grupos de carcinomas definido pelo cluster vermelho, exceto por 2 carcinomas. O cluster verde pode ser interpretado como um subgrupo de classificação de bócios, porém com uma redução de 77% para 62,5% em sensibilidade. Já no cluster azul não atingiu a separação das amostras (circulado em vermelho).

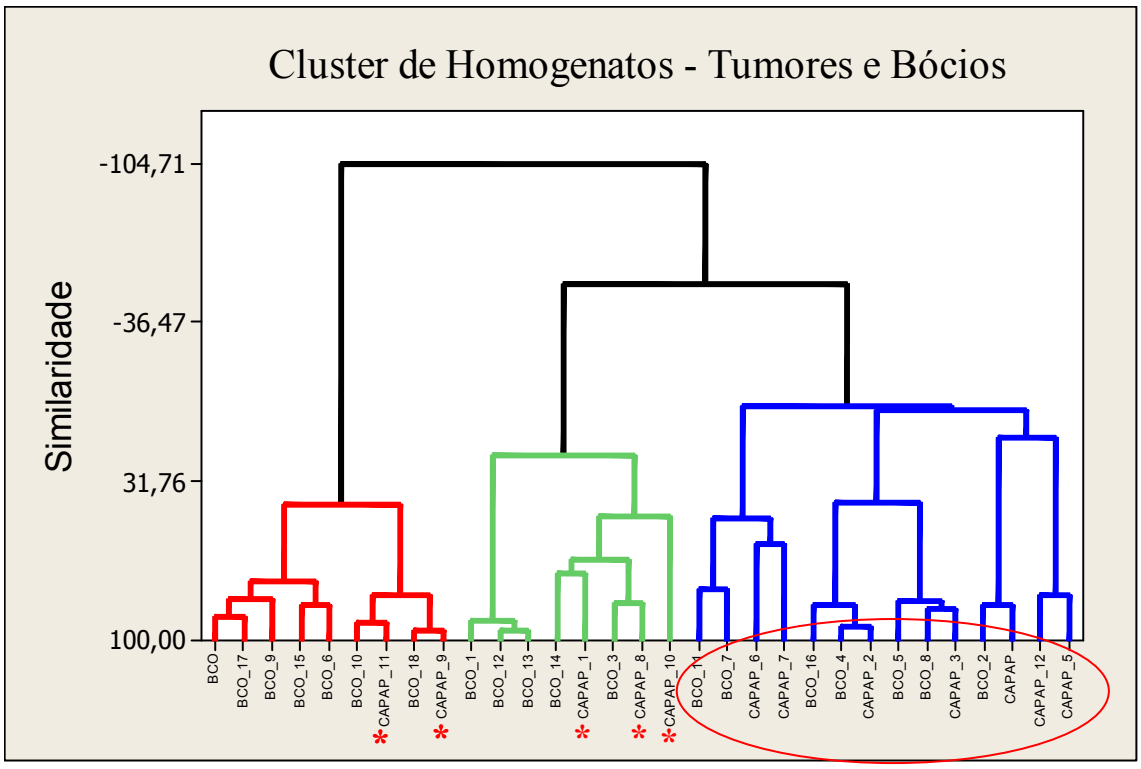



**Figura 32:** Dendrograma mostrando a relação de tumores e bócios pelo método de Ward e distância euclidiana.

Na Figura 33 mostra o dendrogrma onde nos clusters azul e roxo podem ser analisados em conjunto, obtendo-se um número de 16 casos benignos para 5 malignos. Temos que o cluster amarelo separou-se dos demais (os clusters verde, rosa e vermelho), mostrando uma efetiva discrimanação. A especificidade do conjunto foi de 76% e a sensibilidade de 50%.

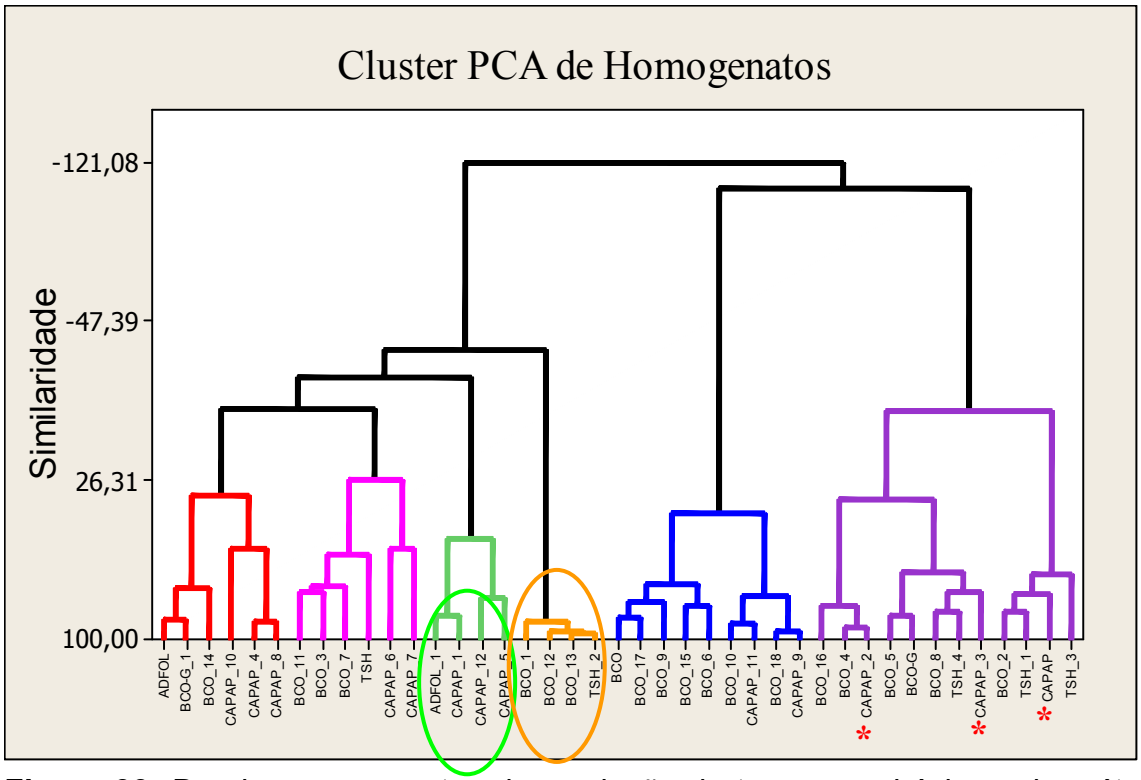



**Figura 33:** Dendrograma mostrando a relação de tumores e bócios pelo método de Ward e distância euclidiana.

### 5.2.3 – Análise dos aspirados das punções

Nesta sessão descrevemos alguns interferentes que foram encontrados no decorrer das análises para as punções. Sendo que primeiramente levou-se em conta a homogeneidade da película formada e depois se procedeu com as medidas experimentais. A Figura 33 mostra-se como deve ficar um biofilme onde existe certa homogeneidade. Depois de pipetada a gota na lâmina, seja ela homogenato ou aspirado, cria-se um biofilme em cima da janela para a anáise. Somente para os aspirados, formaram-se em algumas amostras cristais que dificultaram ou impediram de adquirir um espectro com boa reprodutibilidade (Figura 34).

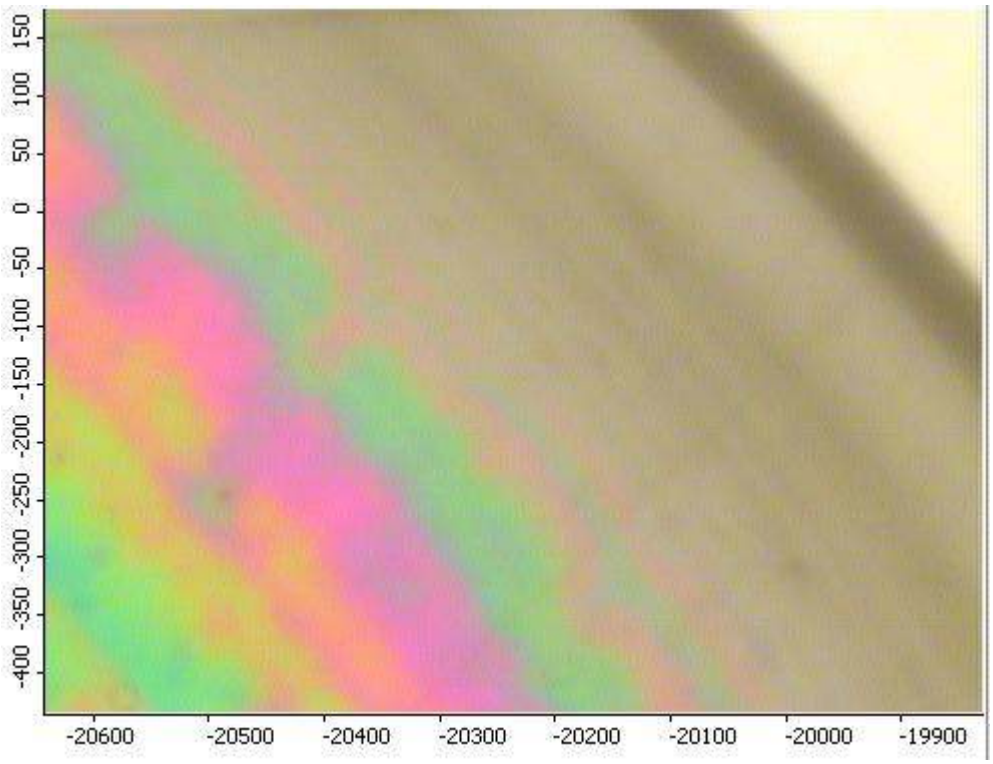



**Figura 34:** Biofilme apropriado para se executar as medidas experimentais.

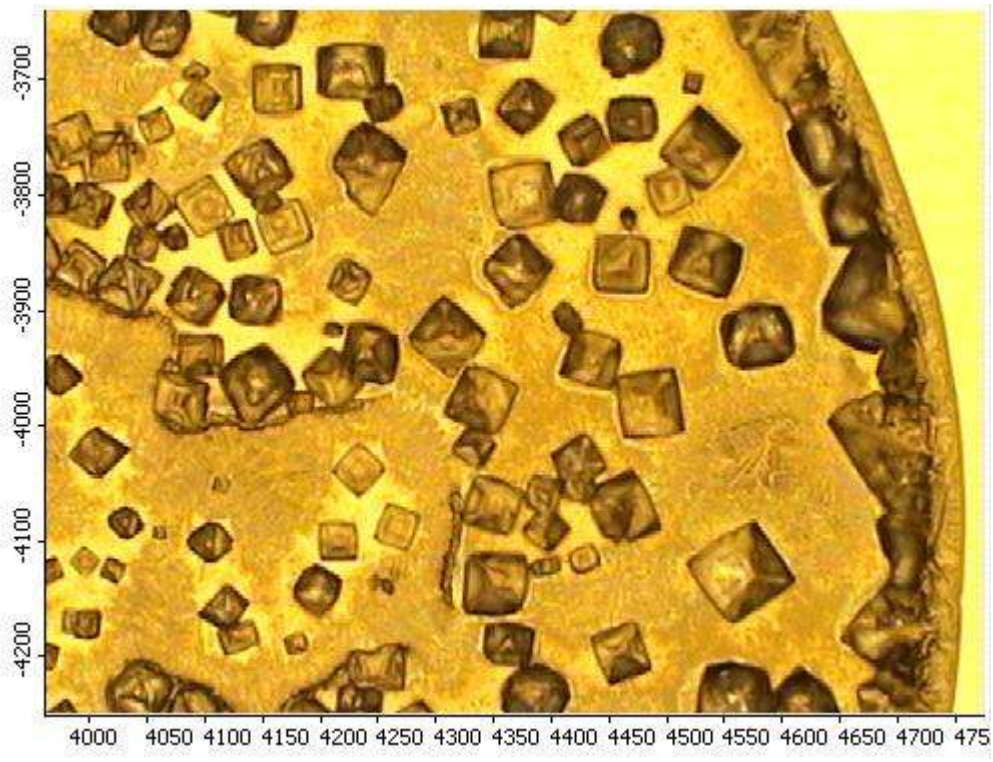



**Figura 35:** Biofilme onde se formou os cristais, inviabilizando as medidas espectrais. Mostra-se a borda da gota e o centro.

Na Figura 36, pode-se verificar que o espectro do carcinoma papilífero possui uma maior intensidade para a amida II e na região dos fosfolipídeos, 1250-1450 $cm^{-1}$. Nota-se também que o adenoma folicular possui uma menor intensidade em 1100 $cm^{-1}$ e em 1400 maior que o bócio, podendo ser diferenciada dos demais nesta região.

É interessante notar a presença de estreitos picos na região das amidas para o carcinoma papilífero, podendo indicar a parença de aminoácidos livres que surgiram devido a maior oxidação de proteínas associadas ao câncer [2, 3, 4]. A banda de 1000 - 1100$cm^{-1}$ denota-se uma diferença para o carcinoma papilífero pela intensidade mais alta que os outros espectros e o bócio adenomatoso possui um pico não definido próximo à região de 1100 $cm^{-1}$.

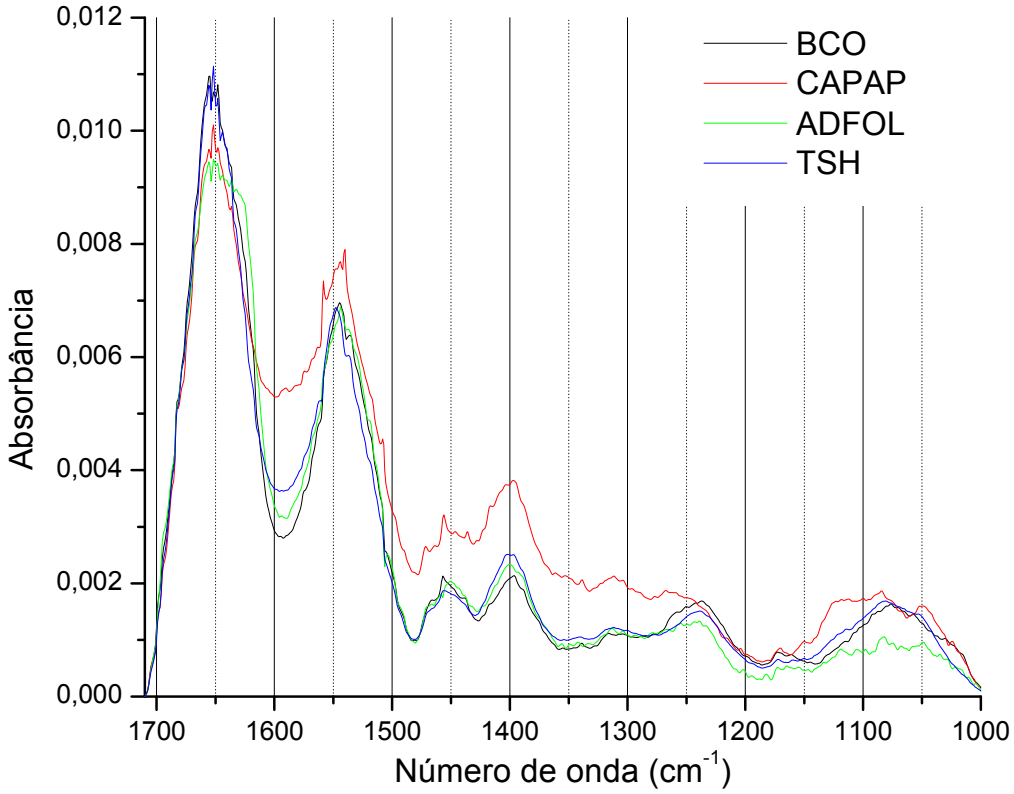



**Figura 36:** Perfil espectral da média de 3 espectros de cada patologia associada à tireóide.

### 5.2.3.1. *Loading plot* dos aspirados

Nas Figuras a seguir tem-se a disposição dos *Loading Plots*, nos quais mostram em termos crescentes de componentes principais a parcela em que os dados possuem maior contribuição estatística, isto é, quanto maior for o número do componente principal, menor a contribuição em dados para o sistema. Também se verifica por este método gráfico os planos fatoriais, mostrando a importância de cada variável no estudo de acordo com as escolhas dos intervalos para a análise de *clusters*.

Como no caso anterior dos homogenatos, os gráficos estão com uma relação sinal/ruído maior que os tecidos. A Figura 38 é o gráfico que melhor representa a diferença entre as patologias da tireóide, verificando-se que os picos negativos do componente principal 1 podem formar elos com os picos positivos do componente principal 2

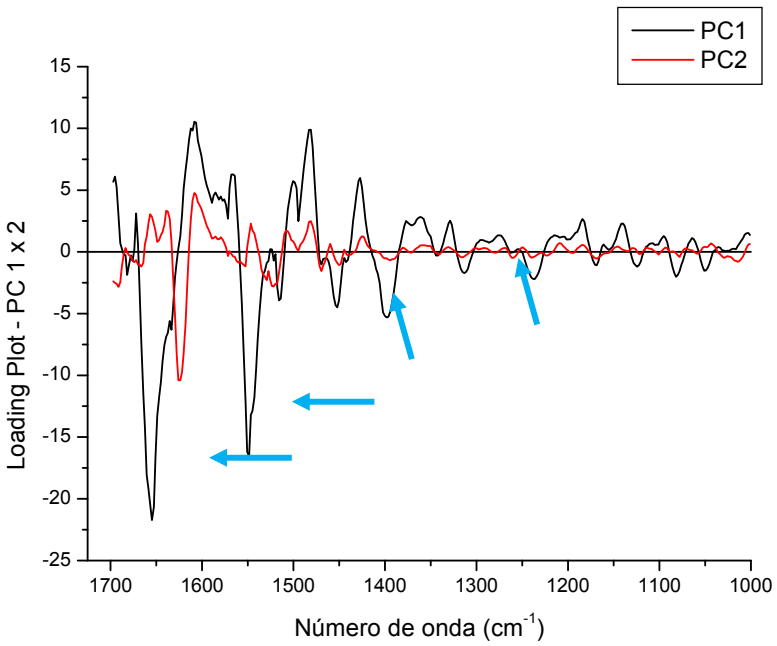



**Figura 37:** *Loading plot* para os componentes principais 1 e 2, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

A Figura 37 não se mostrou satisfatória para a diferenciação por apresentar picos dos PCs 1 e 2 menos intensos e a ausência de regiões que na Figura 37 é presente.

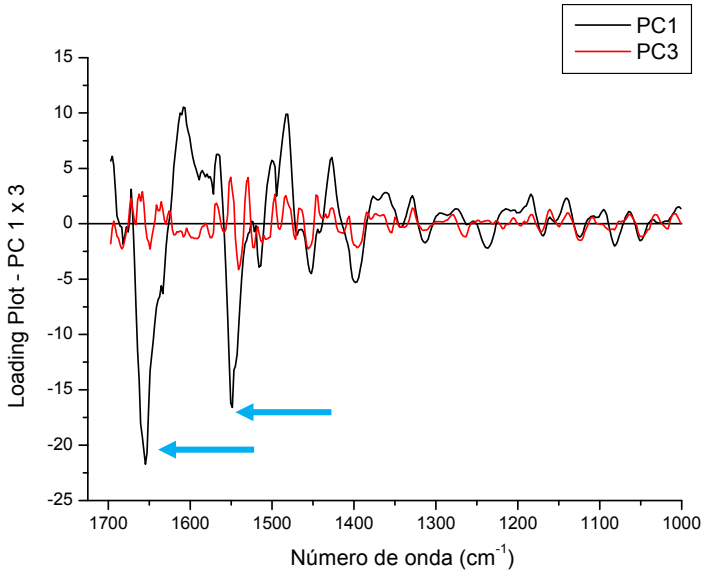



**Figura 38:** *Loading plot* para os componentes principais 1 e 3, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

A Figura 38 mostra os componentes principais 2 e 3. Este gráfico não foi eficaz na separação entre os espectros pelo fato do PC2 apresentar muitos ruídos, além de não existir paridade com o PC1.

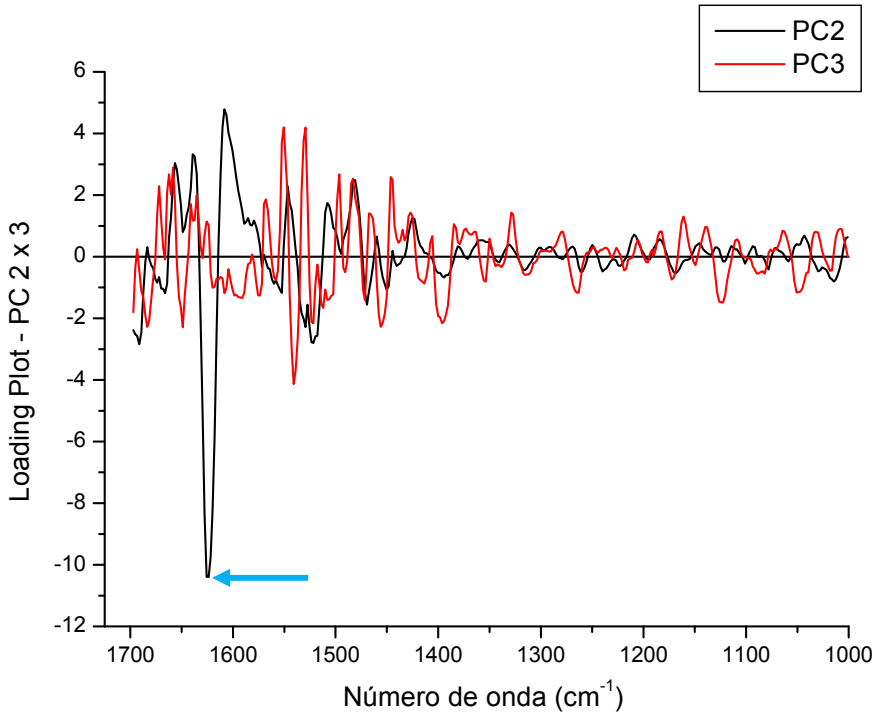



**Figura 39:** *Loading plot* para os componentes principais 2 e 3, mostrando o comportamento da variância estatística em relação ao número de onda.

### 5.2.3.2. Tabela de significância estatística dos aspirados

De acordo com a tabela a seguir, pode-se inferir que o valor é menor que para os homogenatos, tendo-se uma maior diferenciação entre os dados, sendo que é alcançada média acumulada com mais de 90% no PC4.

**Tabela 10:** Estatística PCA. Destacam-se os valores das médias acumuladas.

| Bócio x Tumor | Autovalor | Variabilidade | Acumulada |
|---|---|---|---|
| PC1 | 21,762 | 75,00 | 75,00 |
| PC2 | 2,577 | 8,90 | 83,90 |
| PC3 | 1,271 | 4,40 | 88,30 |
| PC4 | 0,971 | 3,30 | 91,70 |
| PC5 | 0,513 | 1,80 | 93,40 |
| PC6 | 0,359 | 1,20 | 94,70 |

### 5.2.3.3. Gráficos de dispersão dos aspirados

Segundo a Figura a seguir, o gráfico de dispersão não foi eficaz na sua discriminação para carcinomas e bócios, agrupando os dados em torno de 0,20.

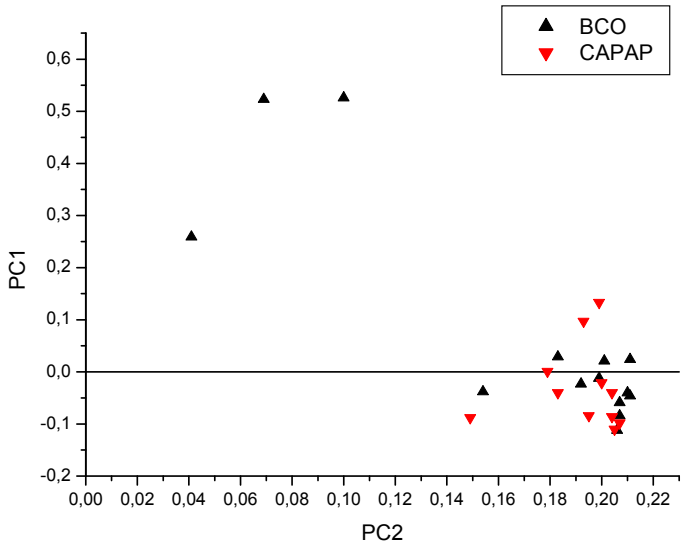



**Figura 40:** Gráficos de análise de PCA relacionando Tumor e Bócio. Os pontos vermelhos indicam os tumores e os pretos, os bócios.

Segundo a Figura 40 o gráfco de dispersão também apresentou dados ao redor de um número de variância do PC3, em torno de 0,20. Sendo que os três pontos à esquerda se mantiveram como na Figura 39.

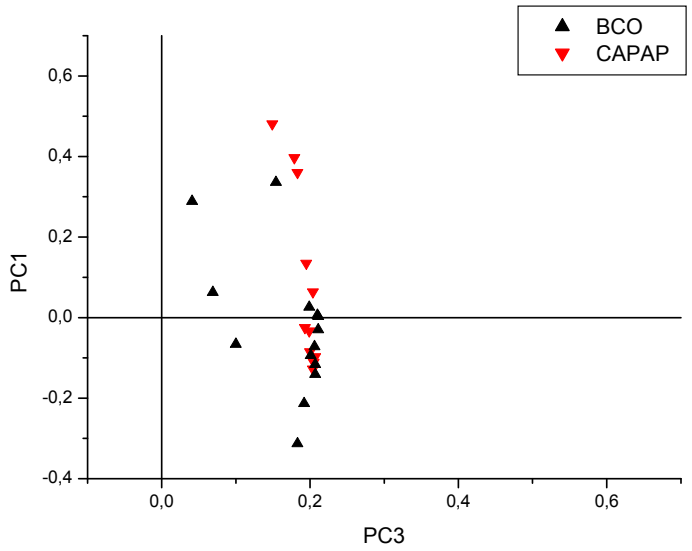



**Figura 41:** Gráficos de análise de PCA relacionando Tumor e Bócio. Os pontos vermelhos indicam os tumores e os pretos, os bócios.

Na Figura 41 temos uma separação para o 2°Quadrante onde se ocorreu diferenciação de 4 bócios e 2 carcinomas.

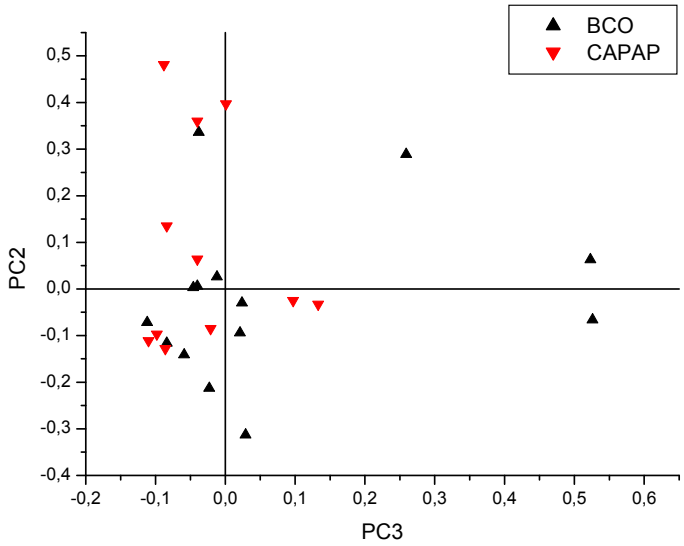



**Figura 42:** Gráficos de análise de PCA relacionando Tumor e Bócio. Os pontos vermelhos indicam os tumores e os pretos, os bócios.

### 5.2.3.4. Clusters depois do PCA

A Figura a seguir representa o dendrograma para as punções dividido em 5 clusters. Temos no cluster rosa a inserção de duas amostras de carcinomas na parte onde os bócios estão bem diferenciados, fazendo com que o método esteja com a sensibilidade para bócio em 77%. No cluster azul tem-se a prevalência de carcinomas, porém com 2 amostras de bócios, fazendo com que a especificidade para carcinomas esteja em 75%. Pode-se verificar no cluster verde que houve um agrupamento de um bócio com um adenoma folicular. Em relação aos outros clusters, não houve diferrenciação no vermelho e no amarelo os ramos dos carcinomas separaram-se dos demais bócio e tireoidite.

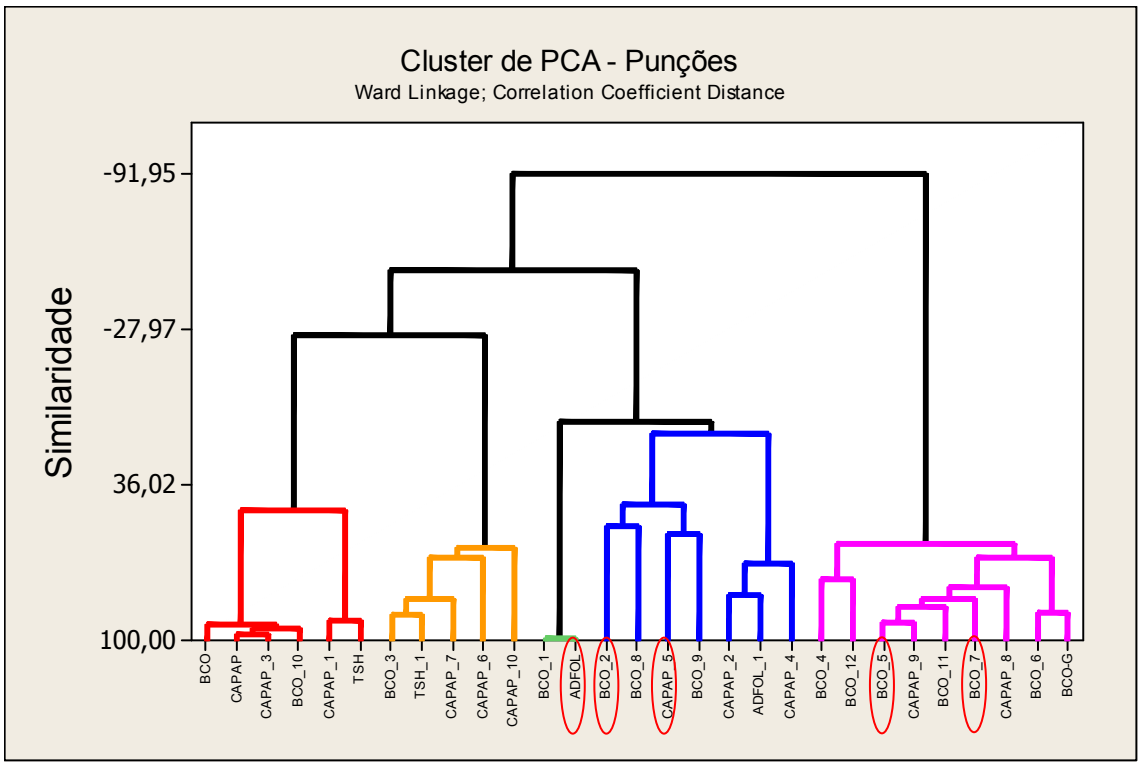



**Figura 43** - Dendrograma mostrando a relação de tumores e bócios pelo método de Ward e distância euclidiana.

# *Discussão*

# 6. DISCUSSÃO

Embora os métodos existentes propiciem o diagnóstico muitas vezes preciso das mais comuns patologias que acometem o tecido tireoideano, há ainda a necessidade do desenvolvimento de métodos não invasivos que sejam eficazes para diagnosticar e diferenciar principalmente os tumores malignos provenientes deste tecido. Dentre os métodos tradicionais, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) apresenta-se como um método com alta sensibilidade para detecção de neoplasias quando comparada aos métodos de imagem por ultrassonografia. Contudo, dependendo da região biopsiada, há ainda dificuldades na interpretação dos resultados obtidos, principalmente na diferenciação entre carcinoma folicular e bócio, o que muitas vezes gera diagnósticos falso-positivos (o que pode até levar a tireoidectomia total do paciente sem necessidade) ou falso-negativos, o que, de maneira pior, pode fazer com que a neoplasia evolua sem o conhecimento prévio do profissional e paciente[53,54,26].

Assim, considerando os estudos promissores que reportam o potencial da espectroscopia para diagnóstico de diversas neoplasias que se desenvolvem nos tecidos mamários, próstata, pele, etc, esta técnica tem sido estudada para detecção de tumores de origem tireoideana tendo-se em vista seu alto poder de identificação e diferenciação de diferentes estruturas, tais como culturas celulares, fluidos, tecidos e moléculas de diferentes conformações como proteínas, lipídeos, DNA, etc. Contudo, mesmo apresentando resultados promissores, há ainda a necessidade de se conhecer as características espectroscópicas dos diferentes tipos de patologias, isto é, lesões malignas e benignas, além de se desenvolver um método estatístico em que se possam diferenciar, principalmente os tecidos provenientes das punções (aspirados) com alta especificidade e sensibilidade, o que evitaria uma intervenção cirúrgica desnecessária[55,56,57,15].

No início da apresentação dos resultados deste trabalho para a análise das bandas foi efetuada a seleção de modo que se obtivesse a mesma variância estatística para todos os tipos amostras. As regiões de 2840 a 2885 $cm^{-1}$ e 2900 a 2990 $cm^{-1}$ foram excluídas porque no primeiro intervalo está

representada a vibração do grupo C-H; que está presente em todos os componentes orgânicos.

Na diferenciação da neoplasia maligna, a intensidade ou alargamento desta banda é pouco comentada na literatura e mesmo inexistente, para alguns casos de carcinomas. Já para a segunda banda (2900 a 2990 $cm^{-1}$), correspondente ao grupo $C\text{-}H_3$ e/ou $C\text{-}H_2$, que representa o grupo de lipídeos e a diferenciação desta região para o carcinoma de tireóide não foi evidenciada na análise de PCA (de acordo com as tabelas XXX). Esta banda não foi relatada na literatura, confirmando que não acrescenta informações relevantes para a diferenciação diagnóstica. Entretando, em trabahos da literatura, foi eficaz na diferenciação de carcinomas de próstata[15 5].

A Figura 14 apresenta um exemplo de dendrograma obtido sem preparo estatístico, inviabilizando a diferenciação diagnóstica. Porém, observando-se atentamente amostra por amostra, verifica-se que existem grupos de bócios e carcinomas apresentam tendência de separação diagnóstica, mas devido à presença de ruídos, a eficiência do método diminui e a falta de derivada contribui para que se tenha uma maior dispersão dos dados com dependência do número de onda.

Os *LP's* representam a variância de um componente principal ao longo do número de onda, onde visualiza-se em torno do valor do eixo das abcissas (eixo de ordenação) a discrepância entre os dados e a região que reúne mais informações essenciais por PC executado[58,59 6, 7]. É interessante notar que os LP's podem fornecer dados substanciais, como a variabilidade dos dados que foram retirados durante os experimentos. Os valores tabelados dos autovalores e as médias acumuladas em porcentagem correspondentes aos 3 tipos de amostras do componente principal 1 estão a seguir:

- Tecidos: 58,2 (autovalor: 8,7295)
- Homogenatos: 82,70 (autovalor: 33,888)
- Aspirados: 75 (autovalor: 21,762)

Verifica-se que para os tecidos os autovalores são pequenos, sendo que grande parte dos dados estão nos próximos PCs, mostrando que seus dados estão mais dispersos do que no caso dos homogenatos e punção. Isto se deve em parte porque as amostras de homogenatos foram preparadas em laboratório e transformadas em solução com uma concentração de massa/volume previamente estabelecida, facilitando a medida experimental. Há também a possibilidade de que a técnica nesse cálculo utilizada seja a técnica ATR, que difere em 3 ordens de grandeza a mais em intensidade que no modo de transmissão para o μ-FTIR. Isto torna estes espectros mais intensos e consequentemente mais definidos, auxiliando na diferenciação diagnóstica de modo a melhorar o método estatístico. Em vista disto, 88% das informações estão até o PC3. Segundo a tabela 6, os homogenatos e punções começam este valor já começa no PC1.

Nos homogenatos houve uma maior significância estatística pelo PC1 que este apresenta o maior valor, podendo neste tipo de amostra ser mais diferenciado pelos gráficos de dispersão que nos gráficos de tecidos e aspirados (Figuras 28 a 30) observa-se uma tendência de agrupamento em torno de 0,15 e 0,17 como comentados no capítulo de Resultados. Inicialmente, os homogenatos foram preparados para simular os aspirados das punções, visto que houve o controle de massa/volume e o solvente usado foi a água MiliQ.

Bioquimicamente, o tecido tireoidiano é muito heterogêneo e pode apresentar diferentes concentrações de hormônios T3 e T4, além de outras variações nos componentes moleculares, como o nível sérico do hormônio TSH, alterações no DNA, peroxidação lipídica e protéica induzida por destruição à partir do estresse oxidativo presente principalmente na células neoplásicas que liberam agentes carcinogênicos, além do que como o carcinoma da tireóide ou outras lesões em sua maioria a ocorrência é da forma multinodular[60,61,62,63].

Por esta razão, os processos inerentes à lesões malignas podem refletir qualitativamente no modo em que o espectro IR irá ser coletado. Assim sendo, temos que os homogenatos possuem uma parte de tecido tireoidiano que foi cortado, macerado, centrifugado e sua parte líquida foi analisada por μ-FTIR, isto é, analisou-se por IR uma “média química” do tecido. Tomando-se como um

exemplo fictício, mas muito comum, um caso de bócio em que a punção revelou incerteza diagnóstica pelo fato de apresentar características papilíferas (com seus núcleos alongados), mas também de traços foliculares (núcleos corados e foliculares), resta ao cirurgião a decisão da tireoidectomia pela evolução clínica do paciente. A punção traz somente uma parte, uma representação deste pool espectral (mesmo colhida no nódulo), que pode significar que há um carcinoma desenvolvendo-se no órgão, mas no momento foram aspiradas somente células sadias. A análise de homogenatos engloba todas estas características em uma única amostra, justificando o fato de ter sido calculado um autovalor de 33,888 (o maior de todos), significando que os dados espectrais dos homogenatos entre si estão muitos semelhantes.

No caso das punções, verifica-se um autovalor menor (21,762) que corresponde à mesma alíquota que um laboratório de patologia e de análises bioquímicas teve acesso. Porém para os bócios, o dendrograma das punções (Figura 42) mostra a classificação errônea de 2 carcinomas para 9 casos classificados corretamente como bócio, o que significa 78% de sensibilidade para verdadeiro-positivos. Já a PAAF apresentou 68% de diferenciação diagnóstica entre bócio e neoplasias em geral, inclusos o carcinoma folicular.

No que diz respeito à metodologia da preparação das amostras, quando se pipetava a solução tanto de homogenatos quanto de aspirados, nas janelas ópticas, usava-se um leve vácuo (< 2 atm), ocasionando a formação de um filme muito fino e homogêneo, com deposição do material celular ao redor do círculo formado pela gota já seca. Para os homogenatos não houve problemas no preparo e medidas, como descrito anteriormente à respeito da água e da concentração. Para os aspirados, somente em algumas amostras, houve a formação de cristais em toda a extensão da gota, mais concentrada nas bordas destas. Infelizmente para estas amostras não se obteve espectros de qualidade que pudessem entrar no cálculo da análise estatística multivariada. O procedimento adotado para a correção foi a diluição, fazendo-se soluções em uma curva 10 e 100 vezes mais e menos concentradas, respectivamente. Porém, para concentrações muito baixas o μ-FTIR apresentava sinal da ordem do ruído e, quando acima da concentração original, formavam-se os cristais. A tentativa de

filtragem em membrana PES para cromatografia não evitou o aparecimento dos cristais. A formação destes cristais pode ser devido ao cloreto de sódio contido na solução salina estéril a 0,9% na hora do exame ou pela presença de hormônios que podem apresentar maior concentração dado que a punção foi efetuada *in vivo*. Uma técnica que poderia solucionar este problema seria a micro espectroscopia por energia dispersiva (μ-EDS), que pode dar informações à respeito da estrutura dos cristais e sua composição por um mapa químico elementar. Caso fosse confirmado que são cristais de cloreto de sódio, o procedimento será de substituir o solvente durante a execução da lavagem da seringa de punção, no momento do exame de PAAF.

No “Cluster PCA de Tecidos” (Figura 23), caso uma nova amostra em que o diagnóstico não é conhecido seja efetuada a medida espectral (desde que processada da mesma forma que o banco de dados amostral) no cluster azul, podemos afirmar com 100% de certeza (ou sensibilidade) que se trata de um bócio adenomatoso. Logicamente, é muito ousada a afirmativa, porém ela é real e os dados cofluem a este caminho. Para podermos ter esta certeza o método deve ser aprimorado e levado a exaustão, elevando a sensibilidade pelo correspondente aumento no número de amostras analisadas (com seus respectivos diagnósticos efetuados por uma equipe de patologia).

No mesmo dendrograma (Figura 23), o cluster vermelho apresenta uma divisão no mínimo curiosa: a inclusão de 1 adenoma com 2 carcinomas papilíferos. No cluster rosa a separação de 2 tireoidites de Hashimoto. Como neste projeto o estudo foi focado mais de forma qualitativa, não se obteve dados de idade, sexo, etnia e presença de outras patologias. Além disto, não se possui dados bioquímicos das amostras, como quantificação hormonal, hemogramas, medidas de estresse oxidativo, estudos com DNA e outras análises que poderiam fornecer outras informações pertinentes úteis para a análise multivariada, o que torna o método ainda mais prático e com uma menor distância das aplicações médicas[6465].

A mesma afirmação aplica-se ao Dendrograma de “Cluster PCA de Homogenatos” (Figura 32), houve a separação do grupo das lesões malignas

(cluster verde) das lesões benignas (cluster amarelo).

Analisando somente os espectros processados (sem análise multivariada), notou-se que a banda de 968 $cm^{-1}$ estava presente em somente algumas amostras. Esta banda representa a vibração dos aminoácidos de dupla hélice no DNA. Fisiologicamente, para os carcinomas esta banda pode estar suprimida, devido à presença de radicais livres que as células neoplásicas liberam, podendo oxidar o DNA. A relação entre as amidas I e II é maior nos bócios que nos tumores. Talvez o fato que as amidas são inibidores de agentes carcinogênicos, pode indicar certa deficiência de amidas nas neoplasias malignas da tireóide, que são derivadas de vitaminas do complexo B e niacinas[66].

Pelo apresentado, o diagnóstico do carcinoma de tireóide ainda foi inconclusivo para certas patologias, principalmente se for de origem folicular. Porém, na análise de tecidos, o estudo revelou ser de grande diferenciação diagnóstica, conseguindo o diagnóstico entre bócios e demais lesões malignas com 100% de sensibilidade. Fazendo-se o uso de uma fibra óptica transparente ao infravermelho e com o diâmetro pequeno suficiente para passar através do orifício da agulha da punção, poderia obter-se um sinal de qualidade e a leitura on-line das informações espectrais no banco de dados, dando como resultado final a entrada classificatória em um cluster (que poderia ser dos bócios e somente bócios). O procedimento auxiliaria em um diagnóstico médico seguro tanto para o médico quanto para o paciente.

O trabalho espera contribuir de modo significativo para que se minimize o número de cirurgias da tireóide e consequentemente o aumento da qualidade de vida da população brasileira.

# Conclusões

# 7. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste estudo:

1- Foi possível caracterizar amostras de lesões de tireóide pela técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier. Foram observadas bandas relativas à presença de fosfato I e II, amidas I, II e II, polissacarídeos, entre outras bandas vibracionais, em diferentes concentrações na dependência do tipo de amostra e de patologia.

2- A análise estatística multivariada para as amostras de tecido nodular tireoideano propiciou uma sensibilidade de 67% e especificidade de 50%, embora tenham sido obtidos *clusters* com 100% de separação para as amostras de bócio adenomatoso.

3- A análise estatística multivariada para as amostras de homogenatos preparados de tecidos nodulares tireoideanos propiciou uma sensibilidade de 76,2% e especificidade de 52,6%.

4- A análise estatística multivariada para as amostras de aspirados de punções nodulares tireoideanas propiciou uma sensibilidade de 77,7% e especificidade de 47,4%.

# *Apêndice*

# 8. APÊNDICES

**APÊNDICE A –** Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sírio Libanês

Hospital Sírio Libanês
INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 20 de agosto de 2008.

*Ilmo. Dr. Orlando Parise Junior*
Pesquisador Responsável

Registro CEPesq: **HSL2007/17**

Pesquisa: Identificação de neoplasia por espectroscopia de absorção em punções biópsias aspirativas de agulha fina na tireóide.

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio Libanês analisou e **APROVOU o protocolo de pesquisa Nº HSL2007/17** em **20 de agosto de 2008**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a ser assinado pelo paciente, de acordo com a Resolução CNS 196/96, complementadas pela Resolução 251/97 do Ministério da Saúde.

De acordo com o cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEPesq), deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo.

**Prof. Dr. Álvaro Sadek Sarkis**
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - CEPesq
Hospital Sírio Libanês

# *Referências*

# 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2187>. Acesso em: 01 out.2009.

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

[3] GIMM, O. Thyroid cancer. ***Cancer Lett***., v.163, n.2, p.143-56, 2001.

[4] SHERMAN, S.I. Thyroid carcinoma. ***Lancet.***, v. 361, n. 9356, p. 501-11, 2003.

[5] CARVALHO, G.A.; GRAF, H. Carcinoma indiferenciado de tireóide. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metab***., v. 49, n. 5, p. 719-724, 2005.

6 RAGO, T.; VITTI, P. Role of thyroid ultrasound in the diagnostic evaluation of thyroid nodules. ***Best. Pract. Res. Clin. Endoctrinol. Metab.***, v. 22, n. 6, p. 913-928, 2008

[7] WATTERS, D.A.; AHUJA, A.T.; EVANS, R.M.; CHICK, W.; KING, W.W.; METREWELI, C. et al. Role of ultrasound in the management of thyroid nodules. ***Am. J. Surg***., v. 164, p. 654-657, 1992.

[8] HANDA, U.; GARG, S.; MOHAN, H.; *et al.* Role of fine needle aspiration cytology in diagnosis and -management of thyroid lesions: A study on 434 patients. ***J Cytology***, v. 25, n. 1, p. 13-17, 2008.

[9] AKHTAR, M.; ALI, M. A; *et al.* Fine-Needle Aspiration Biopsy of Papillary Thyroid-Carcinoma - Cytologic, Histologic, and Ultrastructural Correlations. ***Diag. Cytopathology****,* v.7, n.4, p.373-379, 1991.

[10]SCHLUMBERGER, M. J.; TORLANTANO, M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. ***Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.***, v.14, n.4, p.601-613, 2000.

[11]FRATES, M.C.; BENSON, C.B.; DOUBILET, P.M.; CIBAS, E.S.; MARQUESE, E. Can color Doppler sonography aid in the prediction of malignancy of thyroid nodules? ***J. Ultrasound Med.***, v. 22, n. 2, p. 127-31, 2003.

[12] CAMARGO, R.Y.; TOMIMORI, E.K. Usefulness of ultrasound in the diagnosis and management of well-differentiated thyroid carcinoma. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metabol***., v. 51, n. 5, p. 783-92, 2007.

[13] LIOE, T.F.; ELLIOTT, H.; ALLEN, D.C.; SPENCE, R.A.J. A 3-year audit of thyroid fine needle aspirates. ***Cytopathology***, v. 9, n.3, p. 188-92, 1998.

[14]MIZUKAMI, Y.; MICHIGISHI, A.; NONOMURA, M.; NOGUCHI, H.; NAKAMURA, S. Thyroid carcinoma: clinical, pathologic correlations. ***Crit. Rev. Oncol. Hematol.***, v. 18, n. 2, p. 67-102, 1995.

[15] MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.;REHMAN, I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. ***Appl. Spectroscopy Rev.***, v. 43, p. 134–179, 2008.

[16] ZENG, X.T.; XU, Y.Z.; ZHANG, Y.Q.; XU, Z.; ZHANG, Y.F.; WU, J.G.; ZHOU, X.S.; LING, X.F. FTIR spectroscopic explorations of freshly resected thyroid malignant tissues. ***Spectrosc. Spectral Analysis***, v. 27, n. 12, p. 2422-2426, 2007.

[17] SKOMYAKOV, I.V.; TOLSTOROZHEV, G.B.; BUTRA, V.A. Infrared absorption spectra of human malignant tumor tissues. ***J Appl. Spectroscopy***, v. 75, n. 3, p. 420-425, 2008.

[18] SCHULTZ, C.P.; LIU, K.Z.; SALAMON, E.A.; RIESE, K.T. MANTSCH, H.H. Application of FT–IR microspectroscopy in diagnosing thyroid neoplasms. ***J. Mol. Struc.***, v. 480–481, p. 369–377, 1999.

[19]LIU, K.Z.; SCHULTZ, C.P.; SALAMON, E.A.; MAN, A.; MANTSCH, H.H. Infrared spectroscopic diagnosis of thyroid tumors. ***J. Mol. Struc***., v. 661-662, p. 397–404, 2003.

[20]JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.U. ***Histologia Básica***, 9ª. ed., Rio de Janeiro, R.J.: Guanabara Koogan, 1999.

[21]BRAVERMANN, L.E. Diseases of the thyroid, 2nd ed., Totowa, New Jersey: Humana Press, 2003.

[22] SOBOTTA. J. Atlas de anatomia humana. 22ª. ed., São Paulo, S.P.: Guanabara-Koogan, 2006.

[23] Echotalk. Disponível em:<http://echotalk.blogspot.com/2008_09_01_archive.html>. Acesso em: 01 out.2009.

[24]Endo. Disponível em:<http://www.endo.com.br/imgdin/tireoide_main.jpg> Acesso em: 01 out.2009.

[25]ProPesq - UFRGS. Disponível em: < http://www.ufrgs.br/propesq/livro2/jose/fig/jm2.htm>. Acesso em: 01 out.2009.

[26] MEIER, C.A. Thyroid nodules: pathogenesis, diagnosis and treatment. ***Best*** Pract. Res. Clin. ***Endocrinol. Metabol***., v.14, n.4, p.559-575, 2000.

[27] NEVES, C.; ALVES, M.; DELGADO, J.L.; MEDINA, J.L. Doença de Graves. ***Arq. Med***., v. 22, n. 4/5, p. 137-46, 2008.

[28] DUARTE, G.C. **A*valiação ultra-sonográfica da tireóide, excreção urinária de iodo em escolares de 6 a 14 anos e grau de iodação do sal, em diferentes regiões do estado de São Paulo.*** 2007. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

[29] WILLIAMS, D. Twenty years' experience with post-Chernobyl thyroid cancer. ***Best Pract Res Clin Endocrinol Metab***., v. 22, n. 6, p. 1061-73, 2008.

[30] GRIFFITH, O.L.; CHIU, C.G.*, et al.* Biomarker panel diagnosis of thyroid cancer: a critical review. ***Expert Rev. Anticancer Therapy***, v. 8, n. 9, p. 1399-1413, 2008.

[31] ALDRED, M.A.; HUANG*, Y. et al.* Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. ***J. Clin. Oncol.,*** v. 22, n. 17, p. 3531-9, 2004.

[32]HEDINGER, C. (1998): ***Histological typing of thyroid tumours.*** Heidelberg, New York: Springer, 1998.

[33] BISI, H.; FERNANDES, V.S.; ROSALINDA, Y.; CAMARGO, A.; LONGATTO FILHO, A.; RUGGERI, G.B.; et al. Neoplasin and non-neoplasic thyroid lesions in surgical material: historical review of five decades in Sao Paulo, Brazil. ***Tumori***, v. 81, n. 1, p. 63 – 66, 1995.

[34] ZEDENIUS, J.; AUER, G.; BACKDAHL, M.; et al. Follicular tumors of the thyroid gland: diagnosis, clinical aspects and nuclear DNA analysis. World J. Surg., v. 16, p. 589-94, 1992.

[35] MAGALHÃES, P.K.R.; CASTRO, M.; ELIAS, L.L.K.; MACIEL, L.M.Z. Carcinoma Medular de Tireóide: da Definição às Bases Moleculares. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metab.***, v. 47, n. 5, p. 515 – 528, 2003.

[36] AZAMBUJA, E.; AZEVEDO, S.J.; MOREIRA, R.; CASTRO, R.C.L. Linfoma Não-Hodgkin em Tireóide: Relato de Caso. ***Arq. Bras. Endocrinol. Metab***., v. 48, n. 3, p. 414-418, 2004.

[37] TOMIMORI, E.K.; CAMARGO, R.Y. A.; BISI, H.; MEDEIROS-NETO, G. Combined ultrasonographic and cytological studies in the diagnosis of thyroid

nodules. ***Biochimie***, v. 81, p.447-452, 1999.

[38] KAZARIAN, S.G.; VAN DER WEERD, J. Simultaneous FTIR spectroscopic imaging and visible photography to monitor tablet dissolution and drug release. ***Pharmaceutical Research***, v. 25, n. 4, p. 853-860, 2008.

[39] GAZI, E.; BAKER, M.; DWYER, J.; LOCKYER, N.P.; GARDNER, P.; SHANKS, J.H.; REEVE, R.S.; HART, C.A.; CLARKE, N.W.; BROWN, M.D. A correlation of FTIR spectra derived from prostate cancer biopsies with Gleason grade and tumour stage. ***European Urology***, v. 50, n. 4, p. 750-761, 2006.

[40] GAZI, E.; HARVEY, T.J.; BROWN, M.D.; LOCKYER, N.P.; GARDNER, P.; CLARKE, N.W. A FTIR microspectroscopic study of the uptake and metabolism of isotopically labelled fatty acids by metastatic prostate cancer. ***Vibrational Spectroscopy***, v. 50, n. 1, p. 99-105, 2009

[41] Skoog, D. A. e D. M. West. **Principles of instrumental analysis**. New York,: Holt. 1971. x, 710 p. p.

[42] Alves, O. Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier: Feliz combinação de velhos conhecimentos de óptica, matemática e informática.: Laboratório de Química do Estado Sólido - LQES.

[43] Petrich, W. Mid-infrared and Raman spectroscopy for medical diagnostics. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.36, n.2-3, p.181-237. 2001.

[44] Beekes, M., P. Lasch*, et al.* Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**, v.123, n.4, AUG 31, p.305-319. 2007.

[45] NAUMANN, D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.36, n.2-3, p.239-298. 2001.

[46] MOVASAGHI, Z., S. REHMAN*, et al.* Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.43, n.2, p.134-179. 2008.

[47] Shaw, P. J. A. **Multivariate statistics for the environmental sciences**. London New York: Arnold ;

[48] Eaton, M. L. **Multivariate statistics : a vector space approach**. New York: Wiley. 1983. xvi, 512 p. p. (Wiley series in probability and mathematical statistics. Probability and mathematical statistics,)

[49] BRERETON, R.G. Chemometrics : data analysis for the laboratory and chemical plant. New York: J. Wiley, 2002.

[50] HÈARDLE, W.; HLÂAVKA, Z.; SPRINGERLINK (ONLINE SERVICE). Multivariate statistics. exercises and solutions. acesso Springer Science+Business Media, LLC. 2007.

[51] PETRICH, W. Mid-infrared and Raman spectroscopy for medical diagnostics. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.36, n.2-3, p.181-237. 2001.

[52] LIU, K. Z., C. P. SCHULTZ*, et al.* Infrared spectroscopic diagnosis of thyroid tumors. **Journal of Molecular Structure**, v.661, DEC 16, p.397-404. 2003.

[53] BIERSACK, H.J.; GRÜNWALD, F.; SPRINGERLINK (ONLINE SERVICE). Thyroid Cancer. acesso Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005.

[54] RAGO, T.; VITTI, P. Role of thyroid ultrasound in the diagnostic evaluation of thyroid nodules. ***Best Pract Res Clin End.Metab***, v. 22, n. 6, p. 913-928, 2008.

[55] ELLIS, D.I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. ***Analyst***, v. 131, n. 8, p. 875-885, 2006.

[56] LASCH, P.; BEEKES, M.; SCHMITT, J.; NAUMANN, D. Detection of preclinical scrapie from serum by infrared spectroscopy and chemometrics. ***Anal. Bioanal. Chem.***, v. 387, n. 5, p. 1791-1800, 2007.

[57] NAUMANN, D.; KNEIPP, J.; KIRSCHNER, C.; THI, N.A.N.; LASCH, P. FT-IR microspectroscopy of cells and tissues. In: Inst. Phys. Conf. Ser., 2000. ***Proceedings.***, p. 61-62.

[58] EATON, M.L. ***Multivariate statistics : a vector space approach***. New York: Wiley, 1983.

[59] SHAW, P.J.A. ***Multivariate statistics for the environmental sciences***. London New York: Arnold ; Distributed in the U.S. by Oxford University Press, 2003.

[60] VARELA, P.; TAPIA, G.; FERNANDEZ, V.; VIDELA, L.A. The role of thyroid hormone calorigenesis in the redox regulation of gene expression. ***Biol. Res.***, v. 39, n. 4, p. 611-617, 2006.

[61] FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; VARELA, P.; ROMANQUE, P.; CARTIER-UGARTE, D.; VIDELA, L.A. Thyroid hormone-induced oxidative stress in rodents and humans: A comparative view and relation to redox regulation of gene expression. ***Comp. Biochem. Phys. C.***, v. 142, n. 3-4, p. 231-239, 2006.

[62] TAPIA, G.; FERNANDEZ, V.; PINO, C.; ARDILES, R.; VIDELA, L.A. The acute-phase response of the liver in relation to thyroid hormone-induced redox signaling. ***Free Radical Bio. Med.***, v. 40, n. 9, p. 1628-1635, 2006.

[63] TAPIA, G.; CORNEJO, P.; FERNANDEZ, V.; VIDELA, L.A. Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. ***Toxicol. Lett.***, v. 106, n. 2-3, p. 209-214, 1999.

[64] TAPIA, G.; CORNEJO, P.; FERNANDEZ, V.; VIDELA, L.A. Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. ***Toxicol. Lett.***, v. 106, n. 2-3, p. 209-214, 1999.

[65] FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; VARELA, P.; VIDELA, L.A. Redox regulation of thyroid hormone-induced Kupffer cell-dependent I kappa B-alpha phosphorylation in relation to inducible nitric oxide synthase expression. ***Free Radical Res.***, v. 39, n. 4, p. 411-418, 2005.

[66] VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. ***Chemico-Biological Interactions***, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.