

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

RICARDO PINTO AGUIAR

**USO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
BIOQUÍMICA DE TECIDOS NORMAIS E TUMORAIS DO CÉREBRO HUMANO
VISANDO DIAGNÓSTICO**

TESE DE DOUTORADO

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, 18/12/2020

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

**USO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
BIOQUÍMICA DE TECIDOS NORMAIS E TUMORAIS DO CÉREBRO HUMANO
VISANDO DIAGNÓSTICO**

RICARDO PINTO AGUIAR

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Engenharia
Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos
18/12/2020

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

RICARDO PINTO AGUIAR

USO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE TECIDOS NORMAIS E TUMORAIS DO CÉREBRO HUMANO VISANDO DIAGNÓSTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.
Orientador
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Alderico Rodrigues de Paula Júnior (externo)
Instituto de Aeronáutica e Espaço

Prof. Dr. Pedro Luiz de Brito (externo)
Hospital GACC São José dos Campos

Prof. Dr. Egberto Munin (interno)
Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Adriana Barrinha F. Moretti (interno)
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro
(Suplente)
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci
(Suplente)
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

São José dos Campos
18/12/2020

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

RICARDO PINTO AGUIAR

Ficha Catalográfica

A282u Aguiar, Ricardo Pinto

Uso da espectroscopia Raman para avaliação da composição bioquímica de tecidos normais e tumorais do cérebro humano visando diagnóstico. – 2020.

100 f.: il.; 30 cm

Orientador: Landulfo Silveira Júnior.

Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2020.

Bibliografia: f. 90-98.

1. Espectroscopia Raman; 2. Tumores do cérebro. 3. Análise bioquímica; diagnóstico. 4. análise discriminante; mínimos quadrados parciais. 5. PLS. I. Título.

CDD 610.28

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade, sabedoria e entendimento.

À minha mãe e esposa pelo apoio nesta etapa tão importante na minha carreira.

Em especial, ao Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr. pela orientação, parceria e dedicação em ensinar a importância do Raman para o diagnóstico bioquímico.

A todos os professores do programa de Engenharia Biomédica da UAM.

Ao professor Dr. Renato Amaro Zângaro pela dedicação em estabelecer um programa cada vez mais forte.

Ao neurocirurgião Dr. Edgar Teixeira Falcão pela parceria na obtenção das amostras cerebrais tumorais.

Ao professor patologista Dr. Carlos Augusto Pasqualucci pela parceria na obtenção das amostras cerebrais normais.

L. Silveira Jr. agradece à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela aquisição do espectrômetro Raman dispersivo (Processo 2009/01788-5). R. P. Aguiar agradece à CAPES pela bolsa de Doutorado.

RESUMO

Devido à sua agressividade e muitas vezes diagnóstico tardio, os tumores de cérebro podem levar à morte em curto espaço de tempo. Técnicas ópticas como a espectroscopia Raman, aliadas a um modelo bioquímico espectral, podem fazer a diferenciação bioquímica do tecido normal cerebral em relação ao neoplásico e promover o diagnóstico. Neste trabalho, amostras de tecidos tumorais (glioblastoma, meningioma, meduloblastoma, schwannoma) e de tecidos normais (cerebelo, meninge, lobos frontal, temporal, occipital, parietal) foram obtidas de cirurgias excisionais intracranianas e de autópsias em cadáveres, respectivamente. Os espectros Raman foram obtidos de fragmentos desses tecidos *in vitro*, utilizando um espectrômetro Raman dispersivo (830 nm de excitação, 350 mW de potência, 50 s de acumulação para a coleta de cada espectro). No total foram obtidos 263 espectros desses fragmentos (65 de cerebelo, 69 de meninge, 20 de lobo frontal, 20 de lobo temporal, 20 de lobo occipital, 20 de lobo parietal, 28 de glioblastoma multiforme, 74 de meningioma, 19 de meduloblastoma, 8 de schwannoma). Foram também obtidos espectros Raman de componentes bioquímicos basais: ácido esteárico, ácido linoleico, ácido oleico, beta-caroteno, colágeno, colesterol, DNA, esfingomielina, fenilalanina, fosfatidilcolina, trioleína, prolina, RNA, fosfatidiletanolamina, glicose bem como sangue total (obtido de voluntário sadio), sendo os espectros utilizados em um modelo espectral baseado em ajuste por mínimos quadrados (*least squares fitting* - LSqF) para determinar a “concentração bioquímica relativa” (coeficiente de ajuste do modelo LSqF) de cada elemento bioquímico em cada espectro de tecido cerebral. Entre os 16 elementos bioquímicos, 11 apresentaram picos em posições relativas aos picos do tecido cerebral e concentrações relativas positivas: colágeno, colesterol, ácido linolênico, beta-caroteno, DNA, esfingomielina, fenilalanina, fosfatidilcolina, trioleína, glicose e sangue. O teste ANOVA ($p < 0,05$) foi utilizado para indicar a significância estatística entre as concentrações bioquímicas em cada grupo de tecido normal e tumoral. Visando classificar os tecidos em normal e tumoral, foi proposto um modelo de classificação utilizando a análise de discriminação linear (LDA), aplicada nas concentrações bioquímicas mais significativas, e utilizando a regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least squares* - PLS) aplicada a todos os pontos dos espectros. As técnicas de discriminação obtiveram acerto na classificação de 93,3% a 99,3%, para cerebelo e meninge respectivamente. A sensibilidade e especificidade obtidas no diagnóstico Raman pela LDA foram entre 96,4% e 91,0% para cerebelo e tumores e entre 98,7% e 100% para meninge e meningioma. Os resultados obtidos mostraram que a técnica Raman é uma ferramenta promissora na diferenciação de concentrações bioquímicas presentes em tecidos cerebrais, tanto normais quanto tumorais, e que os grupos patológicos podem ser discriminados utilizando o modelo bioquímico e técnicas de discriminação aplicadas aos espectros Raman.

Palavras-chave: espectroscopia Raman; tumores do cérebro; análise bioquímica; diagnóstico; análise discriminante; mínimos quadrados parciais; PLS.

ABSTRACT

Due to their aggressiveness and often late diagnosis, brain tumors can lead to death in a short time. Optical techniques such as Raman spectroscopy, combined with a spectral biochemical model, can biochemically differentiate normal brain tissue from neoplastic tissue and promote diagnosis. In this work, samples of tumor tissues (glioblastoma, meningioma, medulloblastoma, schwannoma) and normal tissues (cerebellum, meninges, frontal, temporal, occipital, parietal lobes) were obtained from excision intracranial surgeries and autopsies on cadavers, respectively. Raman spectra were obtained from fragments of these tissues *in vitro*, using a dispersive Raman spectrometer (830 nm excitation, 350 mW power, 50 s accumulation for the collection of each spectrum). In total, 263 spectra of these fragments were obtained (65 from cerebellum, 69 from meninges 20 from frontal lobe, 20 from temporal lobe, 20 from occipital lobe, 20 from parietal lobe, 28 from glioblastoma multiforme, 74 from meningioma, 19 from medulloblastoma, 8 from schwannoma). Raman spectra of basal biochemical components were also obtained: stearic acid, linoleic acid, oleic acid, beta-carotene, collagen, cholesterol, DNA, sphingomyelin, phenylalanine, phosphatidylcholine, triolein, proline, RNA, phosphatidylethanolamine, glucose as well as whole blood (obtained from a healthy volunteer), with the spectra being used in a spectral model based on least squares fitting (LSqF) to determine the “relative biochemical concentration” (adjustment coefficient of the LSqF model) of each biochemical element in each brain tissue spectrum. Among the 16 biochemical elements, 11 showed peaks in positions relative to peaks in brain tissue and relative positive concentrations: collagen, cholesterol, linolenic acid, beta-carotene, DNA, sphingomyelin, phenylalanine, phosphatidylcholine, triolein, glucose and blood. The ANOVA test ($p < 0.05$) was used to indicate the statistical significance between the biochemical concentrations in each group of normal and tumor tissue. Aiming to classify tissues into normal and tumor, a classification model was proposed using linear discrimination analysis (LDA), applied at the most significant biochemical concentrations, and using partial least squares (PLS) regression applied to all the points of the spectra. The discrimination techniques were successful in the classification of 93.3% to 99.3%, for cerebellum and meninges, respectively. The sensitivity and specificity obtained in the Raman diagnosis by LDA were between 96.4% and 91.0% for cerebellum and tumors and between 98.7% and 100% for meninges and meningioma. The results obtained showed that the Raman technique is a promising tool in the differentiation of biochemical concentrations present in brain tissues, both normal and tumor, and that pathological groups can be discriminated using the biochemical model and discrimination techniques applied to Raman spectra.

Keywords: Raman spectroscopy; brain tumors; biochemical analysis; diagnosis; discriminant analysis; partial least squares; PLS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Objetivo geral	15
1.2. Objetivos específicos	15
1.3. Hipótese	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Cérebro	17
2.2. Incidência das neoplasias cerebrais	19
2.3. Tipos de tumores cerebrais	21
2.3.1. Glioblastoma multiforme	21
2.3.2. Meduloblastoma	22
2.3.3. Schwannoma	22
2.3.4. Meningioma	23
2.4. Métodos tradicionais de diagnóstico de tumores cerebrais e análise de tecidos biológicos	23
2.5. Constituição bioquímica de tecidos cerebrais incluindo tumor	25
2.6. Espectroscopia Raman em tecidos biológicos	26
2.7. Espectroscopia Raman aplicada ao diagnóstico de tecidos neoplásicos	29
2.8. Espectroscopia Raman aplicada ao diagnóstico de tecidos cerebrais	30
2.9. Discriminação e diagnóstico espectral	33
2.9.1. Método de quantificação dos constituintes bioquímicos	33
2.9.2. Métodos de discriminação	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Obtenção das amostras normais e tumorais do cérebro	36
3.2. Obtenção dos componentes bioquímicos utilizados no modelo	37
3.3. Coleta dos espectros Raman	38
3.3.1. Calibração do espectrômetro em comprimento de onda (deslocamento Raman)	39
3.3.2. Pré-processamento dos espectros	39
3.3.3. Modelo bioquímico	41
3.3.4. Testes estatísticos	41
3.3.5. Modelos de discriminação	42
4. RESULTADOS	45
4.1. Espectros Raman de glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e cerebelo normal	45

4.2. Espectros Raman de meningioma e meninge normal	49
4.3. Espectros Raman dos lobos cerebrais	50
4.4. Constituintes bioquímicos basais e modelo de quantificação	51
4.5. Discriminação de tecidos cerebrais normais e tumorais	63
4.5.1. Discriminação dos dados espectrais das concentrações do cerebelo, meninge e tumores por LDA	63
4.5.2. Discriminação utilizando espectros do cerebelo, meninge, glioblastoma, meningioma, schwannoma e meduloblastoma por PLS-DA	64
5. DISCUSSÃO	67
5.1. Comparações dos resultados espectrais com outros trabalhos	67
5.2. Comparações do modelo bioquímico utilizado com outros trabalhos	69
5.3. Resultados de discriminação comparados a outros estudos	78
5.4. Possibilidade da técnica Raman no futuro diagnóstico	83
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	98
Parecer consubstanciado do CEP	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hemisférios cerebrais	17
Figura 2: Localização anatômica do cerebelo	18
Figura 3: Localização das meninges	19
Figura 4: Tipos de espalhamento de luz por uma molécula a partir do decaimento de um estado excitado virtual	27
Figura 5: Espectro Raman de colesterol indicando bandas vibracionais típicas	28
Figura 6: Diagrama esquemático e foto do sistema Raman dispersivo (micro e macro Raman) utilizado na coleta dos dados espectrais	39
Figura 7: Exemplo de espectro Raman antes e depois da remoção da linha de base devido à fluorescência de fundo por polinômio de ordem 7	40
Figura 8: Espectros Raman de cerebelo e tumores	46
Figura 9: Espectros Raman de meninge e meningioma	49
Figura 10: Espectros Raman dos lobos cerebrais	50
Figura 11: Espectros Raman dos componentes bioquímicos mais relevantes na constituição do tecido cerebral	52
Figura 12: Média e desvio padrão das concentrações relativas de cada elemento bioquímico presente nos tecidos cerebrais do cerebelo e tumores estimadas pelo modelo bioquímico e valor de p .	57
Figura 13: Média e desvio padrão das concentrações relativas de cada elemento bioquímico presente nos tecidos cerebrais da meninge e meningioma estimadas pelo modelo bioquímico e o valor de p .	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma	20
Tabela 2: Incidência de novos casos de câncer do SNC por região	20
Tabela 3: Tipos de tecidos cerebrais, número de fragmentos e número de espectros em cada fragmento de tecido	37
Tabela 4: Posição dos picos e tentativa de atribuição das bandas Raman dos tecidos cerebrais normais e patológicos, com referências à literatura recente	47
Tabela 5: Nível de significância do teste ANOVA entre as médias das concentrações dos tecidos cerebrais do cerebelo e tumores	62
Tabela 6: Nível de significância do teste t não pareado entre os tecidos cerebrais da meninge e meningioma	62
Tabela 7: Resultados na discriminação de tecidos cerebrais normais do (cerebelo e meninge) e tumorais (glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma) e (meningioma) por LDA aplicada às concentrações dos constituintes bioquímicos.	64
Tabela 8: Precisão na discriminação de tecidos cerebrais normais (cerebelo e meninge) e tumorais, (glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma e meningioma) por PLS	65
Tabela 9: Precisão na discriminação por PLS-DA de tecidos cerebrais normais (cerebelo e meninge) e tumorais (glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma e meningioma) sem agrupamento entre os tumores.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucléico
Laser	amplificação de luz por emissão estimulada de radiação
C	carbono
CCD	<i>charge coupled device</i>
GBM	glioblastoma multiforme
H	hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LSqF	<i>least squares fitting</i>
LDA	<i>linear discriminant analysis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
O	oxigênio
PLS	<i>partial least squares</i>
RM	ressonância magnética
SNC	sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a incidência de câncer tem aumentado significativamente devido a fatores genéticos, sedentarismo, fumo, bebida e falta de acesso à saúde. Muito dos pacientes acometidos com tumores cerebrais chegam às unidades de saúde já demonstrando os sintomas decorrentes do câncer. Para tumores em desenvolvimento no cerebelo, um dos sintomas clássicos é a perda dos movimentos dos membros superiores e inferiores. Quando esses pacientes são deslocados até os serviços de bioimagem para aquisição de imagens em tomografia computadorizada e ressonância magnética, e o diagnóstico não confirma tumor, os pacientes retornam à vida normal. Porém, quando o tumor cerebral é descoberto em diagnóstico tardio, é necessária uma intervenção rápida, seja cirúrgica ou com tratamentos de radioterapia e quimioterapia.

No momento da cirurgia cerebral deve ser realizada a preservação da margem cirúrgica com o máximo de cuidado para que na retirada do tumor o tecido sadio seja preservado. A radioterapia em doses elevadas aumenta o risco de aparecimento do câncer em outras regiões anatômicas e a quimioterapia desenvolve efeitos desagradáveis como alopecia e náuseas.

A técnica de espectroscopia Raman se destaca como uma ferramenta que possibilita diagnóstico do tecido tumoral cerebral não só *in vitro* mas também *in vivo*. Diversos trabalhos citam que a técnica de espectroscopia Raman com a utilização de um cabo de fibras ópticas é capaz de fornecer informações químicas da massa tumoral e do tecido à sua borda *in vivo*, dado que o laser pode ser direcionado para o ponto tecidual desejado, contribuindo para a fixação de margem mais segura para a retirada do tumor na cirurgia (BANERJEE *et al.*, 2015; JONG *et al.*, 2006; KOLJENOVIC *et al.*, 2002; KRAFT *et al.*, 2006; MOVASAGHI *et al.*, 2007). Estudos realizados demonstraram que a técnica Raman tem alta sensibilidade em diferenciar tecido cerebral normal do tumor mediante as concentrações dos componentes bioquímicos devido as características obtidas de vibrações moleculares desses elementos no tecido (AGUIAR *et al.*, 2013; DAKOVIC *et al.*, 2013; KOLJENOVIC *et al.*, 2005; KRAFFT *et al.*, 2005).

Com os espectros obtidos neste trabalho foi verificado que existem diferenças bioquímicas entre o tecido sadio e o tumor do cérebro. Foi implementado um modelo bioquímico baseado em ajuste por mínimos quadrados (*least squares fitting* – LSqF) com dados espectrais

obtidos de tecidos cerebrais normais e tumorais e de elementos bioquímicos mais predominantes, com o objetivo de quantificar a contribuição de cada elemento bioquímico aos espectros (concentração bioquímica relativa, que é o coeficiente de ajuste do LSqF). Os elementos bioquímicos escolhidos foram os que apresentaram maior predominância no tecido cerebral baseado em LSqF.

Nesta pesquisa, foi aplicado o teste ANOVA e teste *t* não pareado nos dados da concentração bioquímica relativa obtida, objetivando detectar quais elementos bioquímicos utilizados foram mais significativos para diagnosticar o tipo de tecido. A discriminação dos tecidos baseada na concentração bioquímica foi realizada pela análise discriminante linear (*linear discriminant analysis* – LDA) e a discriminação utilizando todos os espectros dos tecidos foi baseada na regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least squares* – PLS).

A tese é apresentada em 6 capítulos, sendo que no capítulo 1 são apresentadas as limitações dos métodos utilizados atualmente para o tratamento do câncer e estudos que utilizaram a técnica Raman. Em seguida é apresentado que a concentração bioquímica no tecido cerebral normal para o tumoral muda de acordo com a doença. No capítulo 2 é apresentada uma descrição sobre o cérebro, panorama sobre tipos de tumores e a incidência, métodos tradicionais de diagnóstico do câncer, constituição bioquímica do tecido cerebral, detalhando a técnica de espectroscopia Raman e utilização dos espectros Raman para discriminação e diagnóstico espectral. No capítulo 3 é apresentada a metodologia da pesquisa, dividida em 3 partes. Na primeira parte é apresentada a obtenção das amostras normais e tumorais. Na segunda é apresentada a obtenção dos elementos bioquímicos. Na terceira é descrita a coleta dos espectros Raman. O capítulo 4 é dedicado aos resultados obtidos, que estão divididos em 5 partes. Nas primeira, segunda e terceira partes são apresentados os espectros obtidos do cerebelo, glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma, meninge, meningioma e lobos temporal, frontal, occipital e parietal. Na quarta parte são apresentados os constituintes bioquímicos e o modelo bioquímico baseado em LSqF para estimar as concentrações destes constituintes nos tecidos normais e tumorais. Na quinta parte é apresentada a discriminação dos tipos de tecido cerebrais normais e tumorais utilizando as concentrações bioquímicas pela LDA e utilizando todos os pontos dos espectros obtidos das amostras pela regressão PLS. O capítulo 5 é dedicado à discussão, dividido em 4 partes. Nas primeira, segunda e terceira partes é realizada a comparação

dos resultados dos espectros, modelo bioquímico e discriminação com outros trabalhos da literatura. Na última parte são apresentadas as possibilidades da instrumentação Raman em estudos *in vitro* e *in vivo*. Por fim, o capítulo 6 é dedicado à conclusão, onde são apresentadas as principais conclusões deste estudo.

1.1. Objetivo geral

Este trabalho tem o objetivo de utilizar a espectroscopia Raman associada a um modelo de análise espectral como um método para obter prováveis diferenças bioquímicas e criar um modelo de classificação baseado em análise discriminante utilizando as diferenças espectrais e bioquímicas entre os tecidos cerebrais normais e tumorais do cérebro humano, espectros estes obtidos de fragmentos de tecidos *in vitro*.

1.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Identificar as diferenças espectrais mais importantes que diferenciem os tecidos normais e tumorais do cérebro;
- Desenvolver um modelo bioquímico baseado em ajuste de mínimos quadrados (*least square fitting* – LSqF) aplicado aos espectros Raman do tecido cerebral, com o objetivo de quantificar a contribuição (concentração relativa) de cada elemento bioquímico aos espectros;
- Aplicar o teste ANOVA e teste *t* não pareado nas concentrações obtidas em cada grupo normal e tumoral para determinar quais elementos bioquímicos apresentam diferenças estatisticamente significativas para realizar as discriminações;
- Realizar a discriminação espectral dos tecidos normais e tumorais do cérebro a partir das concentrações bioquímicas dos tecidos normais e tumorais, pela análise discriminante linear (LDA), e a partir dos espectros totais, através da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

1.3. Hipótese

A hipótese levantada nesta Tese é de que a mudança na composição bioquímica do tecido em função do tipo de doença neoplásica cerebral pode ser identificada pela espectroscopia Raman, e que um modelo bioquímico aplicado aos espectros Raman dos tecidos e de constituintes bioquímicos puros determine a contribuição espectral (concentração relativa) de cada composto bioquímico no espectro Raman. Estas concentrações relativas de cada grupo podem ser utilizadas para classificar os tecidos normais e tumorais por análise discriminante LDA, e os espectros Raman totais obtidos das amostras cerebrais normais e tumorais podem classificar os tecidos por PLS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cérebro

O cérebro exhibe formato ovóide e compõe-se de uma cobertura externa de substância cinzenta denominada de córtex e de substância branca interna. A substância branca é constituída por células da glia e seu nome origina-se da presença de grande quantidade de material esbranquiçado chamado de mielina. Por sua vez, a substância cinzenta é formada sobretudo por corpos celulares dos neurônios e células da glia (MENESES, 2015).

Os hemisférios cerebrais constituem a maior parte do encéfalo e cada hemisfério apresenta um lobo frontal, um lobo parietal, um lobo occipital e um lobo temporal. Cada um desses lobos têm funções específicas, como funções associativas, movimentos e emoções (frontal), sensações táteis (parietal), audição (temporal) e visão (occipital) (MARTINEZ, 2014). Os hemisférios direito e esquerdo (Figura 1) são incompletamente separados pela fissura longitudinal.

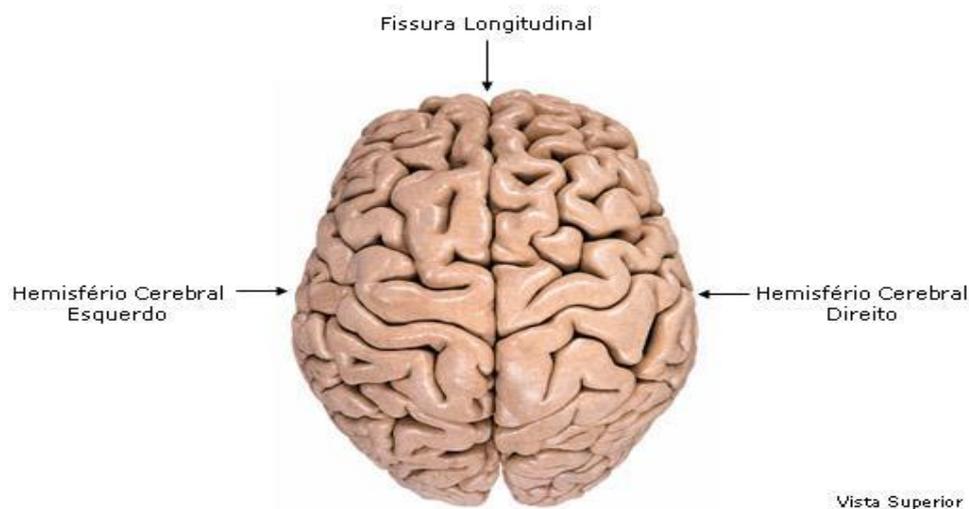


Figura 1: Hemisférios cerebrais.

Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/neurologia/telencefalo.htm>

O cerebelo é uma porção do sistema nervoso central que exerce um papel muito importante no controle da postura e dos movimentos voluntários, influencia inconscientemente a

contração uniforme dos músculos voluntários e coordena cuidadosamente suas ações (SNELL, 2013). O cerebelo situa-se na calota craniana posterior (Figura 2).

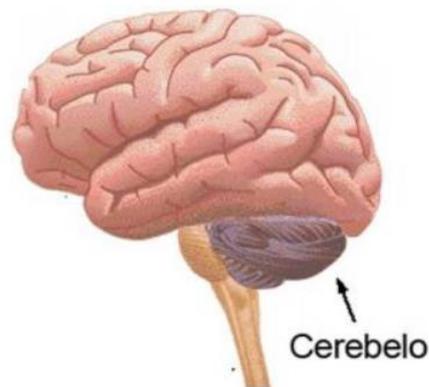


Figura 2: Localização anatômica do cerebelo.

Fonte: <https://morfofisiologianeurolocomotora.wordpress.com/2014/10/>

O sistema nervoso central (SNC) é revestido de membranas chamadas de meninges, formadas por tecido conjuntivo. A principal função das meninges é proteger o tecido nervoso, determinando espaços com importância anatomoclínica (MENESES, 2015).

A pia-máter é uma membrana muito fina e translúcida que recobre diretamente o tecido nervoso. A pia-máter e a aracnóide são as meninges mais delicadas. A aracnóide é a meninge intermediária localizada internamente à dura-máter, que é a mais externa e se relaciona com o crânio (Figura 3) (MENESES, 2015).

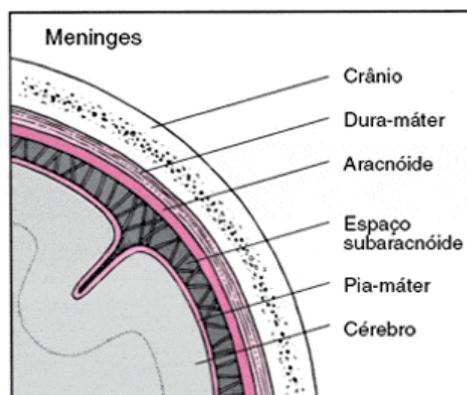


Figura 3: Localização das meninges.

Fonte: Adaptado de <https://www.msmanuals.com/pt/casa/les%C3%B5es-e-envenenamentos/traumatismos-cranianos/hematomas-intracranianos>

2.2. Incidência das neoplasias cerebrais

De todos os tumores malignos detectados no mundo, cerca de 1,8% correspondem ao câncer do SNC. O câncer do SNC é um tumor com incidência mais frequente em homens, com o risco estimado de 4,2/100 mil e entre as mulheres, com o risco estimado de 3,6/100 mil. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), espera-se 5.870 novos casos de câncer do SNC em homens e 5.230 em mulheres no Brasil para cada ano do triênio 2020-2022, como representado pela Tabela 1. A incidência de novos casos por região é apresentada na Tabela 2 (INCA, 2020).

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização primária	Homens		Mulheres		
	Casos novos	Percentual	Localização primária	Casos novos	Percentual
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Cólon e reto	20.540	9,1%	Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%

Cavidade oral	11.200	5,0%	Glândula tireóide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Ovário	6.650	3,0%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central (SNC)	5.230	2,3%
Sistema nervoso central (SNC)	5.870	2,8%	Leucemias	4.890	2,5%

Fonte: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>

Tabela 2: Incidência de novos casos de câncer do SNC por região geográfica.

Posição	Homens		Posição	Mulheres	
	Região geográfica	Incidência		Região geográfica	Incidência
7°	Norte	(3,20/100 mil)	6°	Sul	(7,64/100 mil)
7°	Centro-Oeste	(6,05/100 mil)	8°	Norte	(3,03/100 mil)
8°	Sul	(8,63/100 mil)	9°	Centro-Oeste	(4,95/100 mil)
9°	Nordeste	(4,72/100 mil)	9°	Nordeste	(4,25/100 mil)
12°	Sudeste	(5,59/100 mil)	11°	Sudeste	(4,69/100 mil)

Fonte: <https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>

2.3. Tipos de tumores cerebrais

Os tumores abaixo descritos têm uma relevância no acometimento do SNC, por esse motivo foram escolhidos dentre os demais. O glioblastoma é um tumor agressivo do SNC com prevalência de 40% a 60% em comparação aos outros tumores (OHGAKI, 2009). Já o meduloblastoma é um tumor maligno, mais comum na infância e raro na fase adulta, representando 20% dos tumores (PINTO, 2012). Os schwannomas são os principais tumores dos nervos periféricos tendo sua origem nas células de Schwan, representam 8% a 10% dos tumores

intracranianos (BERTOLUCCI, 2014). Os meningiomas são os tumores mais frequentes em adultos a partir dos 35 anos e representam 20% a 35% dos tumores do SNC (OHGAKI, 2009).

2.3.1. Glioblastoma multiforme

Os gliomas são os tumores mais frequentes no SNC, com 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC (OHGAKI, 2009). O glioblastoma multiforme (GBM) é responsável por mais da metade dos gliomas malignos e estão associados à alta morbidade e mortalidade. Apesar dos tratamentos utilizados atualmente como ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, a sobrevida média é muito curta, em torno de 15 meses ou menos (ALIFIERES, 2015).

O GBM pode causar em pacientes sintomas como dores de cabeça, déficits neurológicos, comprometimento cognitivos atribuídos a aumento da pressão intracraniana, infiltração tumoral, comprometimento vascular, tamanho e localização do tumor (KATRIB, 2019). Carlsson *et al.* (2014) citam que a ressonância magnética (RM) é o meio de imagem mais utilizado para diagnosticar GBM definindo os limites da lesão, incluindo tamanho, forma e localização.

Em uma ressecção agressiva total do GBM, a taxa de recorrência é superior a 90%, pacientes podem se beneficiar com outra ressecção tumoral obtendo melhores resultados funcionais e sobrevida de acordo com circunstâncias individuais baseadas em dados obtidos (MORSY, 2015).

Pacientes portadores de GBM não podem ser curados com os tratamentos atuais e sim terem sua vida prolongada. A radioterapia continuará sendo um dos principais tratamentos, utilizada com outras modalidades de tratamento como a quimioterapia. (BATASH, 2017).

2.3.2. Meduloblastoma

Trata-se de um tumor maligno localizado na vérnis cerebelar que cresce para dentro do quarto (IV) ventrículo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o meduloblastoma é classificado histologicamente em clássico (a mais comum), desmoplásico, extensa nodularidade, anaplásico e de células grandes (SOUZA, 2013). Constitui 20% dos tumores primários do SNC, é mais comum em crianças e 1/3 dos tumores ocorre na fossa

posterior. São mais raros nos adultos do sexo masculino, ocorrendo antes dos 40 anos de idade (PINTO, 2012).

Os sintomas mais comuns apresentados em portadores de meduloblastoma são: vômitos, letargia, cefaleia matinal, instabilidade postural e diplopia (ROWLAND, 2011). Esses tumores aparecem hipodensos na tomografia computadorizada, com hidrocefalia em 80% dos pacientes. Todavia, a RM pode fornecer melhores condições de aferir à extensão do tumor, em comparação a tomografia computadorizada (ROWLAND, 2011).

2.3.3. Schwannoma

É um tumor originário das células de Schwann com desenvolvimento geralmente unilateral (BERTOLUCCI, 2014). É mais comum nas raízes sensitivas, sendo a raiz vestibular do oitavo (VIII) nervo craniano a mais acometida, caracterizando-se como um tumor do ângulo ponto cerebelar com crescimento solitário, deslocando as fibras nervosas do nervo craniano (FILHO, 2011). Por se tratar de um tumor extra-axial, como os meningiomas, existe a possibilidade de exérese extensa com preservação anatômica (BERTOLUCCI, 2014). Tem como principais sintomas zumbido, vertigem e perda auditiva (FILHO, 2011).

2.3.4. Meningioma

Os meningiomas são tumores do SNC que aparecem ligados à dura-máter, originam-se de células meningoteliais aracnóides e são classificados em neoplasias extra-axiais intracranianas (GOLDBRUNNER, 2016). Representam 20% a 35% dos casos de todos dos tumores do SNC (OHGAKI, 2009).

O diagnóstico do paciente portador de meningioma é realizado através da RM com uso de contraste. Devido à capacidade de formar imagens de tecidos moles sem ausência de exposição à radiação, a RM também é utilizada a longo prazo para acompanhamento do tratamento (SALONER, 2010).

A cirurgia é a melhor opção para tratamento de meningiomas por causa da sua localização. O tratamento com radioterapia é aplicado para eliminação das células tumorais (GOLDBRUNNER, 2016).

Geralmente pacientes diagnosticados com meningioma relatam problemas físicos, comparados a uma população geral saudável (BENZ, 2018).

2.4. Métodos tradicionais de diagnóstico de tumores cerebrais e de análise em tecidos biológicos

Os avanços na radiologia vêm aumentando a habilidade de diagnosticar doenças neurológicas. Com a aplicação da tomografia computadorizada houve um avanço no diagnóstico de tumores do SNC. No caso de contraindicação ao exame de tomografia por causa do marca-passo, o contraste no exame poderá ser utilizado como alternativa de diagnóstico (SALONER, 2010). A desvantagem da tomografia decorre do uso de radiação ionizante. Atualmente, os fabricantes de equipamentos têm programado as máquinas para emitir menor dose de radiação em cada exame realizado para se cumprir o princípio ALARA (tão baixo quanto razoavelmente possível) e desenvolver uma otimização que engloba menor tempo, maior distância e maior blindagem (SALONER, 2010).

A RM pela facilidade de diagnóstico de tumores cerebrais também é um procedimento de escolha, com a diminuição do tempo de obtenção da imagem (CHEN, 2012).

A biópsia estereotáxica é uma técnica minimamente invasiva para obter amostras do tecido cerebral necessárias para o diagnóstico quando os tumores não podem ser tratados com cirurgia. A análise histopatológica utilizada para estudar as amostras obtidas é o padrão ouro no diagnóstico de tecidos tumorais (SACKHEIM, 2001).

A coloração H&E (hematoxilina-eosina) é a principal técnica de coloração para análise das células que compõem o tecido cerebral como neurônios e neuroglias na análise histopatológica. Esta técnica serve para diferenciar partes basófilas pela hematoxilina e partes eosinófilas pela eosina. Sua principal desvantagem é o tempo despendido no preparo das amostras (SACKHEIM, 2001).

A histoquímica é uma técnica histológica utilizada para detectar algum elemento químico presente em determinada amostra. São utilizados corantes que apresentam afinidade pelo componente a ser estudado. Usa-se, por exemplo, o corante Sudan que é utilizado para evidenciar lipídios (PINTO, 2017).

A imuno-histoquímica observa características moleculares de determinada doença nas células. São usados anticorpos que se ligam a proteínas específicas denominadas antígenos. Bastante utilizada na oncologia, esta técnica determina a linhagem tumoral das células. A fixação do espécime, a escolha dos anticorpos, e a interpretação das lâminas são extremamente importantes para detecção tumoral pela mencionada técnica.

Outra técnica utilizada é a hibridização *in situ*, que identifica sequências do material genético (DNA e RNA). Essa sequência é marcada por um composto radioativo que possibilita a visualização microscópica. A marcação dessa sequência é chamada de sonda de DNA. A hibridização é utilizada para o diagnóstico da presença de vírus (HPV e hepatite), tumores malignos do pulmão, intestino e linfomas.

Na utilização de qualquer uma das técnicas histológicas mencionadas o tecido é imerso em líquido fixador para preservar a amostra da autólise. Uma das etapas no processo histológico do tecido cerebral é a fixação em formol a 10%, utilizado para preservar a morfologia do tecido. O formol é amplamente usado devido ao seu baixo custo, mas não é a técnica que confere a melhor preservação da morfologia do tecido. A solução de Bouin apesar da manipulação trabalhosa e do custo superior ao do formol oferece melhor preservação da amostra.

Artefatos devido à fixação incorreta, coloração insuficiente, bolhas ou rompimentos durante o corte e sulcos durante o processo de microtomia, podem ocorrer durante o preparo do material investigado, levando à perda de todo o processo (MARZZOCO, 2015).

2.5. Constituição bioquímica de tecidos cerebrais incluindo tumor

A composição química presente no tecido cerebral estimula as funções corporais e mentais e a sua deficiência causa lesão cerebral como o Alzheimer. Componentes químicos estão presentes no tecido (intra e extracelular), fornecendo energia e desenvolvendo a manutenção do tecido (BERG, 2017).

A glicose é o único combustível utilizado pelo cérebro e sua entrada nas células é realizada a partir da circulação sanguínea por proteínas específicas transportadoras de glicose (GLUT). É importante a manutenção dos níveis de glicose no sangue por causa da quantidade

utilizada pelo cérebro de um adulto humano, que é de 120 g por dia, representando a maior parte dos 160 g diários demandados pelo organismo humano (BERG, 2017).

Os lipídios também fazem parte da constituição dos tecidos do SNC, a esfingomielina está presente na bainha de mielina envolvendo os axônios, o seu principal papel é de proteção das fibras neurais do SNC (PINTO, 2017).

O ácido linolênico é um ácido graxo poli-insaturado do grupo ômega 3 presente na membrana plasmática. Sua ingestão deve ser parte da dieta dos seres humanos. Este ácido realiza a síntese de outros ácidos graxos poli-insaturados, como é o caso do ácido araquidônico que desenvolve funções metabólicas no cérebro (BROW, 2018; PINTO, 2017).

O colesterol se distribui em todas as células do organismo, principalmente nas membranas das células do tecido nervoso (RODWELL, 2017). Constitui um dos principais componentes estruturais das membranas celulares atuando na sua permeabilidade. É insolúvel em meio aquoso, como o sangue e a linfa, sendo transportado por todo o corpo na forma de lipoproteínas (RODWELL, 2017).

A fosfatidilcolina é um dos fosfolipídios mais abundantes na membrana celular. É o fosfolipídio mais comum entre os mamíferos, sendo sintetizada no fígado pela enzima fosfatidiletanolamina metiltransferase a partir da fosfatidiletanolamina (BERG, 2017). Segundo Rodwell (2017), a colina é importante na transmissão nervosa.

As proteínas e aminoácidos são importantes para o cérebro, a fenilalanina é um aminoácido apolar constituído por cadeias orgânicas com caráter de hidrocarboneto que não interage com a água. Fica localizada em proteínas globulares e da membrana, sendo um aminoácido de alto valor biológico e essencial para o organismo.

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante nos tecidos moles e duros, e constitui mais de 25% da massa proteica do corpo. É uma fonte de proteína que fornece estrutura para os tecidos e células (RODWELL, 2017).

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é uma molécula que se encontra no núcleo das células de todos os seres vivos, carrega toda a informação genética através das bases nitrogenadas adenina, timina, citosina e guanina (SACKHEIM, 2001).

O sangue é constituído de plaquetas, plasma e células, como eritrócitos e leucócitos. Seu papel é manter a homeostase, desenvolver funções imunológicas e transportar oxigênio

(MARIA, 2014). No cérebro, o sangue supre o fornecimento de glicose, nutrientes e fornece 25% do oxigênio necessário ao seu funcionamento (HAJJAWI *et al.*, 2014).

Os componentes citados acima são importantes para a caracterização espectral do tecido cerebral porque os seus picos aparecem nos espectros Raman de todos os tecidos normais e tumorais utilizados no estudo, e portanto, foram usados no modelo bioquímico cerebral empregando-se a espectroscopia Raman.

2.6. Espectroscopia Raman em tecidos biológicos

Técnicas de espectroscopia óptica como fluorescência, reflectância difusa e Raman são utilizadas para aplicações biomédicas com o intuito de fornecer informações bioquímicas sobre a composição do tecido biológico em nível molecular (HANLON *et al.*, 2000; RAMANUJAMN, 2000). A espectroscopia Raman se diferencia das técnicas ópticas de fluorescência e reflectância difusa por proporcionar informações mais detalhadas sobre a composição química do tecido estudado (HANLON *et al.*, 2000).

A técnica Raman é útil na análise da composição química de materiais orgânicos e inorgânicos, pois fornece informação molecular decorrente da interação da radiação óptica incidente com os modos vibracionais das moléculas (HANLON *et al.*, 2000).

O espalhamento Raman depende de mudanças na polarizabilidade da molécula decorrente do processo de vibração molecular, polarização esta decorrente do efeito do campo elétrico da radiação incidente (no caso o laser), sendo a radiação espalhada composta pela componente elástica (espalhamento Rayleigh) e pela componente inelástica (espalhamento Raman), apresentando mudança de energia da radiação espalhada (deslocamento Raman) em função da energia vibracional das ligações moleculares.

A Figura 4 apresenta os tipos de espalhamento. No espalhamento Rayleigh, a radiação espalhada e o feixe incidente têm a mesma frequência. No espalhamento Stokes o fóton espalhado tem energia menor do que a incidente e no espalhamento anti-Stokes o fóton espalhado tem energia maior do que a incidente (FRANZEN *et al.*, 2015).

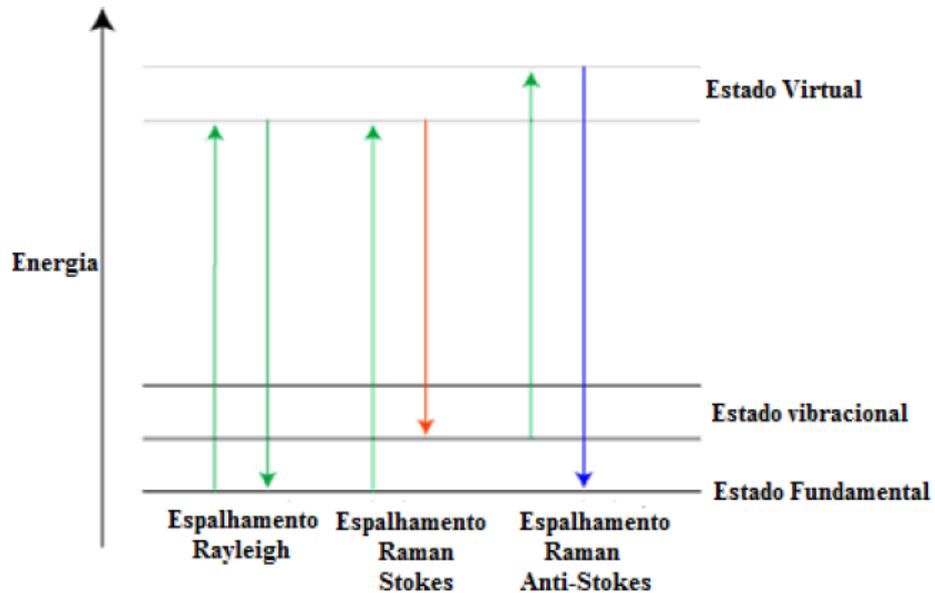


Figura 4: Tipos de espalhamento de luz por uma molécula a partir do decaimento de um estado excitado virtual.

Fonte: Sandeman *et al.*, 2015.

O efeito Raman foi verificado experimentalmente em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman. Raman propôs que existiriam mudanças na energia do fóton espalhado por moléculas que seria semelhante ao efeito observado por Compton a partir do espalhamento de raios-X por átomos e moléculas (RAMAN; KRISHNAN, 1928). Ao incidir uma luz monocromática (por exemplo a proveniente de uma fonte de laser) em uma molécula, a radiação espalhada tem comprimento de onda diferente do feixe incidente. A luz espalhada é coletada por um espectrômetro e exibida como um espectro no qual sua intensidade é plotada em função das frequências vibracionais da amostra. Cada espécie molecular tem seu próprio conjunto de vibrações moleculares. O espectro Raman de uma molécula em particular consiste de uma série de bandas com picos característicos. As frequências vibracionais Raman são medidas na forma de deslocamento Raman com unidade de número de onda (cm^{-1}) (HANLON *et al.*, 2000).

Como exemplo é mostrado na Figura 5 o espectro do colesterol, que possui bandas vibracionais moleculares únicos em 1440 cm^{-1} devido às vibrações de deformação metileno e metil (CH_2 e CH_3), e o pico 1670 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento $\text{C}=\text{C}$. Se uma amostra de tecido biológico contém colesterol e este se encontra em concentração suficiente para ser

detectado pela espectroscopia Raman, os picos da Figura 5 estarão presentes no espectro Raman deste tecido (HANLON *et al.*, 2000).

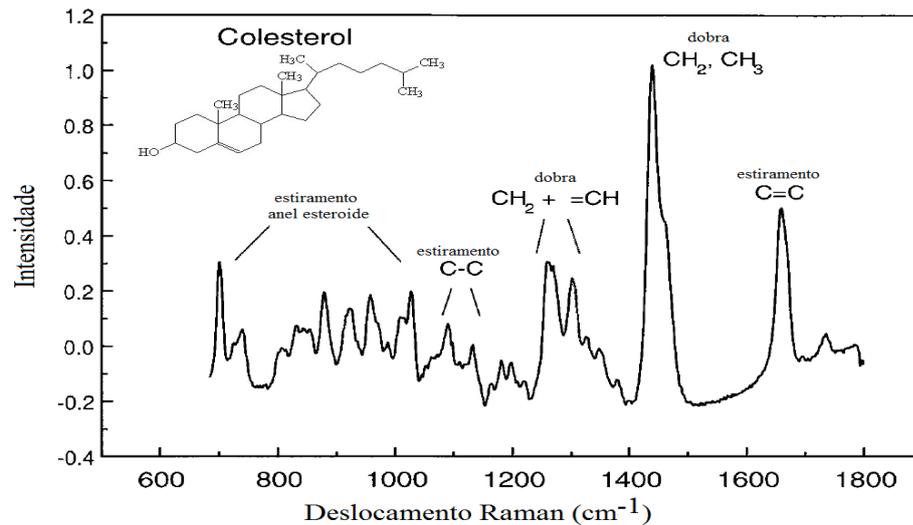


Figura 5: Espectro Raman de colesterol indicando bandas vibracionais típicas.

Fonte: Adaptado de Hanlon *et al.*, 2000.

Quando luz visível é usada para excitação, os tecidos biológicos podem exibir forte fluorescência que se originam da absorção da radiação incidente pelas transições eletrônicas dos átomos, e esta fluorescência sobrepõe-se ao espectro Raman do tecido. A geração da fluorescência diminui significativamente com a excitação em comprimentos de ondas mais longos (infravermelho próximo), devido ao fato de que os estados eletrônicos de maior energia que compreendem os estados onde se originam a fluorescência não são excitados pela baixa energia destes comprimentos de onda longos (HANLON *et al.*, 2000).

A maioria dos materiais incluindo tecidos biológicos, apresentam redução de emissão de fluorescência quando o comprimento de onda de excitação aumenta para a região do infravermelho próximo. Assim, a interferência da fluorescência no espectro Raman do tecido pode ser reduzida usando a excitação no infravermelho próximo (785, 830 ou 1064 nm, por exemplo, para citar comprimentos de onda de espectrômetros Raman comerciais).

2.7. Espectroscopia Raman aplicada ao diagnóstico de tecidos neoplásicos

As doenças que acometem tecidos e órgãos são acompanhadas por alterações químicas. Sendo assim, a espectroscopia Raman pode fornecer informações bioquímicas valiosas para o diagnóstico da doença. Como a luz pode ser entregue e coletada precisa e rapidamente através de fibras ópticas, que por sua vez podem ser incorporadas a cateteres, endoscópios, cânulas e agulhas, a espectroscopia Raman tem potencial para ser realizada *in vivo*, em tempo real (HANLON *et al.*, 2000).

A espectroscopia Raman é uma técnica óptica candidata a ser aplicada futuramente nos testes bioquímicos pelo seu grande poder de discriminação de tecidos normais em relação aos tumorais, e porque não requer nenhuma preparação para obter informações químicas, sendo seus resultados rápidos e seguros (HANLON *et al.*, 2000).

A técnica Raman possui como vantagem a rapidez no diagnóstico em comparação à análise histopatológica que é o padrão ouro no diagnóstico de tecidos tumorais. A análise histopatológica necessita de fases (já mencionadas) para o preparo da amostra, retardando o diagnóstico e fazendo com que pacientes que necessitam de diagnóstico com rapidez fiquem aguardando determinado tempo para o início do tratamento.

Os picos nos espectros Raman estão relacionados diretamente com a composição molecular do material e fornecem uma “impressão digital” dos tecidos (HANLON *et al.*, 2000). A espectroscopia Raman tem o potencial de avaliar o estado patológico da amostra pelas alterações bioquímicas decorrentes do processo neoplásico, auxiliando na avaliação de margens tumorais durante cirurgias de ressecção de tumor, poupando a retirada de margens extensas em áreas teciduais que podem ser consideradas histopatologicamente normais, e reduzindo o número de amostras a serem efetivamente avaliadas durante a cirurgia (STONE *et al.*, 2004).

Brennan *et al.* (1997) desenvolveram um modelo bioquímico para analisar os espectros de artérias coronárias humanas e quantificar colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios. Haka *et al.* (2002) analisaram a composição química de microcalcificações que ocorrem em lesões benignas e malignas da mama, com possibilidade de classificação das lesões utilizando esta informação bioquímica. Stone *et al.* (2007) utilizaram espectros dos constituintes bioquímicos dos tecidos da bexiga e próstata para determinar mudanças bioquímicas associadas ao processo de carcinogênese destes tecidos. Silveira *et al.* (2012) utilizaram espectros de compostos bioquímicos para formar um modelo bioquímico de discriminação e diagnóstico de patologias da

pele e verificaram que actina, colágeno, elastina e trioleína foram os bioquímicos mais importantes que representaram as características espectrais dos tecidos da pele. Estes trabalhos foram capazes de determinar as bases bioquímicas para as neoplasias mediante o modelo baseado em ajuste por mínimos quadrados LSqF, mostrando que a espectroscopia Raman pode ser utilizada para determinar a diferença bioquímica entre várias patologias.

2.8. Espectroscopia Raman aplicada ao diagnóstico de tecidos cerebrais

Diversos trabalhos utilizaram a espectroscopia Raman para fornecer informações bioquímicas presentes nos tecidos cerebrais normais em comparação aos tumorais *in vitro* e *in vivo*. O trabalho de revisão de Zhang *et al.* (2017) teve como parâmetro analisar a precisão da espectroscopia Raman na diferenciação de tumores cerebrais em relação ao tecido cerebral normal através de artigos pesquisados nas bases de dados Pubmed e Embase. Os critérios selecionados nos estudos foram estudos com tecidos humanos, utilização da espectroscopia Raman como ferramenta de diagnóstico para distinguir tecidos tumorais de normais, utilização da histopatologia como padrão ouro, fornecimento de dados detalhados para construção de uma tabela de contingência 2x2 para verdadeiro positivo, falso positivo, verdadeiro negativo e falso negativo e/ou sensibilidade e especificidade. Dentre os 112 artigos inicialmente selecionados 26 contemplavam os critérios escolhidos e foram revisados, dos 26 artigos restantes 12 eram irrelevantes e 8 tinham poucos detalhes para reconstruir a tabela. Destes, 6 artigos foram selecionados para avaliar a eficácia da espectroscopia Raman no diagnóstico cerebral, chegando à conclusão de que para o glioblastoma, a sensibilidade e especificidade da espectroscopia Raman foram de 0,96 e 0,99, respectivamente, e para o meningioma a sensibilidade e especificidade da técnica Raman foram de 0,98 e 1,00, respectivamente. Os autores concluíram que a espectroscopia Raman é uma técnica candidata para ser empregada na diferenciação de glioblastoma e meningioma em relação ao tecido normal do cérebro.

Bikmukhametova *et al.* (2020) utilizaram a técnica Raman para comparar amostras de gliomas e meningiomas em relação aos tecidos normais do cérebro através das diferenças espectrais observadas entre estes tecidos, chegando à conclusão de que os gliomas tem uma concentração de lipídios muito baixa e concentração protéica aumentada em comparação ao

tecido normal e que o meningioma tem concentrações significantes nas bandas com picos em 1300 cm^{-1} (lipídios), 1007 cm^{-1} (proteínas), 1080 cm^{-1} (DNA) e 1520 cm^{-1} (beta-caroteno).

Banerjee *et al.* (2015) utilizaram a espectroscopia Raman para investigar tecidos do glioblastoma de quatro pacientes diferentes e concluíram que, por serem do mesmo sítio anatômico, os tecidos trazem a mesma identidade espectral, mostrando assim a confiabilidade na repetibilidade das informações obtidas pela técnica Raman.

Kalkanis *et al.* (2014) distinguiram diferenças bioquímicas entre o glioblastoma multiforme, necrose e tecido cerebral normal parte cinza, relacionadas a lipídios e proteínas através do algoritmo da análise discriminante de Fischer (DFA), resultando em 99,6% de precisão na discriminação do glioblastoma em relação ao tecido normal do cérebro.

Aguiar *et al.* (2013) mostraram que a técnica Raman é capaz de diferenciar o câncer cerebral mediante análise de espectros de tecidos cerebrais normais (cerebelo e meninge) e tumorais (glioblastoma, meduloblastoma e meningioma). Os espectros foram classificados utilizando-se um modelo de discriminação baseado na distância Euclidiana, obtendo sensibilidade e especificidade de diagnóstico de 97,4% e 100%, respectivamente.

Dakovic *et al.* (2013) avaliaram características químicas em tecidos cerebrais de forma não invasiva utilizando a análise de componente independente (*independent component analysis* – ICA) dos espectros Raman, onde atribuíram a proteínas e lipídios as diferenças bioquímicas entre as partes branca e cinza do cérebro.

Leslie *et al.* (2012) avaliaram a capacidade da técnica Raman para diagnosticar amostras de tumores cerebrais pediátricos meduloblastoma e glioma em relação ao tecido cerebral normal, obtendo 96,7% de precisão na classificação dos tumores através da PCA. O glioma foi distinguido do tecido cerebral normal com 91,5% de sensibilidade e 97,8% de especificidade, chegando à conclusão de que a espectroscopia Raman pode distinguir com precisão neoplasias cerebrais pediátricas do tecido cerebral normal através das diferenças bioquímicas de cada tecido.

Koljenovic *et al.* (2005) utilizaram a técnica Raman para estudar a meninge normal (dura-máter) e o meningioma e encontraram grandes diferenças espectrais da meninge normal, com alto conteúdo de colágeno e em relação ao meningioma, com aumento do conteúdo lipídico. Realizaram a discriminação dos espectros Raman através da LDA, obtendo 100% de precisão na

classificação e permitindo identificar que os espectros Raman fornecem a distinção dos tecidos da meninge (durá-mater) em relação ao meningioma.

Alguns trabalhos foram descritos utilizando a espectroscopia Raman em tecido cerebral *in vivo*. Jermyn *et al.* (2015) utilizaram um espectrômetro Raman para detectar células residuais de glioblastoma, astrocitoma e oligodendroglioma *in vivo*, que permanecem após a cirurgia, concluindo que a técnica é capaz de classificar populações celulares de tecidos cerebrais em tempo real.

Desroches *et al.* (2015) avaliaram a capacidade de diagnóstico do sistema Raman para maximizar a área de remoção do tecido glioma *in vivo*, como também para distinguir necrose de tecido cerebral com glioma e tecido normal, observando alguns fatores como linearidade do sinal, potência do laser, relação sinal/ruído, impactos da fonte de luz na sala de cirurgia, para chegar aos parâmetros ideais para a aquisição dos dados *in vivo*.

2.9. Discriminação e diagnóstico espectral

Informações úteis obtidas através da técnica Raman podem ser extraídas por meio da análise estatística multivariada, permitindo aproveitar a maior quantidade de informações contida nos espectros. O modelo bioquímico baseado em LSqF também pode obter informações úteis referentes à concentração bioquímica de cada elemento bioquímico utilizado no modelo para cada espectro do tecido.

No modelo bioquímico, os componentes químicos dos tecidos estudados são determinados e utilizados para estimar as concentrações em função da sua presença nos espectros obtidos dos tecidos. Os dados obtidos da concentração de cada elemento bioquímico em cada tecido estudado no modelo bioquímico, também podem ser utilizados na discriminação multivariada.

2.9.1. Método de quantificação dos constituintes bioquímicos

O método de ajuste por mínimos quadrados (LSqF) é uma técnica que procura encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados tentando minimizar a soma dos quadrados das

diferenças entre o valor estimado e os dados observados, fornecendo a melhor estimativa. O método estima e minimiza os resíduos da soma dos quadrados da regressão linear, maximizando o ajuste do modelo aos dados observados. O modelo é linear nos parâmetros, significando que as variáveis apresentam uma relação linear entre si (STONE *et al.*, 2007). O modelo de regressão de mínimos quadrados linear do LSqF determina os coeficientes do ajuste; para obter o melhor ajuste é necessário utilizar um polinômio de primeiro grau porque o uso de polinômios de grau elevado pode causar grandes erros nos coeficientes. O modelo de regressão não linear é utilizado quando modelos não lineares são ajustados aos dados, sendo definidos como modelos que não tem dependência linear com seus parâmetros (MATHWORKS, 2020).

A expressão (1) é utilizada para promover o ajuste dos componentes bioquímicos com os espectros do tecido, minimizando a diferença entre os constituintes basais e os espectros de cada tecido.

$$\mathbf{X} = \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} \quad (1)$$

onde \mathbf{X} é o espectro (ou matriz dos espectros) do tecido, \mathbf{S} é a matriz dos espectros dos constituintes bioquímicos selecionados dos tecidos, e \mathbf{c} é a matriz dos coeficientes de ajuste dos mínimos quadrados (contribuição espectral ou concentração relativa) prevista pelo modelo espectral.

Para obter as estimativas dos coeficientes, o método dos mínimos quadrados linear minimiza a soma dos quadrados dos resíduos, onde os resíduos compreendem os quadrados da discrepância entre os dados (MATHWORKS, 2020). O resíduo para o *i*ésimo ponto de dados r_i é definido como a diferença entre o valor de resposta observado y_i e o valor de resposta ajustado \hat{y}_i , e é identificado como o erro associado aos dados, como mostrado na expressão (2):

$$r_i = y_i - \hat{y}_i \quad (2)$$

2.9.2. Métodos de discriminação

A análise discriminante linear (*linear discriminant analysis* – LDA) tem como objetivo separar os espectros de duas ou mais classes para classificação, através de um método de reconhecimento supervisionado. Esta análise de discriminação linear decide a qual das classes os espectros pertencem a partir de parâmetros baseados em distâncias. A LDA é muito empregada em conjunto de dados de pequenas dimensões (THARWAT, 2017). Para isso, as funções lineares discriminantes são utilizadas porque maximizam a variância entre as classes e minimizam a variância dentro da classe (FISHER, 1936).

Trabalhos foram realizados utilizando a LDA para discriminação de dados normais e tumores em oncologia (GAJJAR *et al.*, 2013, MEHTA *et al.*, 2018).

A regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least squares* – PLS) é uma ferramenta bastante utilizada quando existe um grande número de variáveis de entrada em comparação ao número de amostras, fornecendo resultados mais robustos. A construção de um modelo PLS requer um conjunto de amostras e valores das variáveis dependentes. Essa técnica é eficiente para redução de dimensão dos dados devido à supervisão do seu algoritmo (YAN, 2008).

A matriz \mathbf{X} contém as amostras e a matriz \mathbf{Y} contém os valores para predição. As variáveis latentes tanto em X como em Y são modeladas pela regressão PLS, para encontrar um espaço em \mathbf{X} que se adapte a modelagem de \mathbf{Y} . Os componentes principais são utilizados para os autovetores definirem um espaço em \mathbf{X} para modelar \mathbf{Y} . Segundo Lebart *et al.* (1995), o PLS é muito parecido com a análise dos componentes principais (PCA), em termos da sua capacidade para classificar dados ou na diferenciação de diferentes grupos.

O modelo PLS utiliza a matriz \mathbf{X} para estimar os fatores Y , e a matriz \mathbf{Y} para estimar os fatores X . A expressão (3) mostra como esses modelos são estimados:

$$\begin{aligned} X &= TP + E \\ Y &= UQ + F \end{aligned} \tag{3}$$

onde as colunas T e U são escores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} e P e Q são as cargas, as matrizes E e F são os erros associados à modelagem PLS de \mathbf{X} e \mathbf{Y} .

Trabalhos foram realizados com sucesso utilizando a regressão PLS na discriminação de dados de tecidos saudáveis e doentes (SCHLEUSENER *et al.*, 2015, SILVEIRA *et al.*, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras normais e tumorais do cérebro

O procedimento experimental descrito nesta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob Parecer No. 1.903.652 e CAAE No. 04193712.0.0000.5494 de 01/02/2017.

As amostras normais utilizadas foram fragmentos de cerebelo (14 fragmentos), meninge (14 fragmentos), lobos frontal (4 fragmentos), parietal (4 fragmentos), occipital (4 fragmentos) e temporal (4 fragmentos) de 10 mm cada, obtidos de cadáveres no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (São Paulo, SP, Brasil). Fragmentos de tumor de 10 mm foram colhidos após procedimento de neurocirurgias realizadas no Hospital São José (Ilhéus, BA, Brasil).

Os tumores avaliados neste estudo foram o glioblastoma multiforme (2 fragmentos), meduloblastoma (1 fragmento), meningioma (6 fragmentos) e schwannoma (1 fragmento). Os tumores foram determinados segundo análise histopatológica procedida de acordo com a classificação da OMS (LOUIS *et al.*, 2007).

Os fragmentos foram acondicionados em frascos criogênicos, congelados logo após a sua extração usando nitrogênio líquido e mantidos refrigerados em freezer a -80 °C até o momento do seu uso, sem qualquer tipo de fixação.

Quando da realização dos espectros, as amostras foram colocadas em temperatura ambiente e descongeladas com auxílio da solução de soro fisiológico a 0,9 %. Os espectros foram obtidos de partes das amostras. No total, foram obtidos 343 espectros, distribuídos de acordo com o número de fragmentos de tecidos, conforme Tabela 3.

Tabela 3: Tipos de tecidos cerebrais, número de fragmentos e número de espectros em cada fragmento de tecido.

Tecido	No. de fragmentos	No. de espectros
Cerebelo normal	14	65
Meninge normal	14	69
Lobo temporal normal	4	20
Lobo frontal normal	4	20
Lobo parietal normal	4	20
Lobo occipital normal	4	20
Glioblastoma multiforme	2	28
Schwannoma	1	8
Meduloblastoma	1	19
Meningioma	6	74
Total	54	343

3.2. Obtenção dos componentes bioquímicos utilizados no modelo

No modelo bioquímico baseado no método LSqF, foram utilizados 16 elementos bioquímicos basais, escolhidos a partir de sua predominância nos tecidos cerebrais (tanto normais quanto tumorais). Foram eles: ácido esteárico, ácido linoleico, ácido oleico, trioleína, esfingomiéline, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, colesterol, beta-caroteno, colágeno, fenilalanina, prolina, DNA, RNA, glicose e sangue. Foram realizados 5 espectros de cada elemento bioquímico e depois realizada a média espectral. As médias espectrais dos elementos bioquímicos e dos tecidos cerebrais normais e tumorais foram utilizadas no modelo bioquímico. Os compostos bioquímicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP), enquanto que o sangue foi obtido de humano sadio.

Os elementos basais mencionados apresentaram os espectros com picos nas mesmas posições dos tecidos cerebrais. Porém, ao aplicar o modelo bioquímico e determinar as concentrações relativas, 5 elementos apresentaram concentrações relativas negativas: ácido esteárico, ácido oleico, prolina, RNA e fosfatidiletanolamina. Assim, os 11 componentes bioquímicos utilizados no modelo foram: ácido linolênico, trioleína, esfingomiéline,

fosfatidilcolina, colesterol, beta-caroteno, colágeno, fenilalanina, DNA e glicose. O sangue também foi utilizado no modelo bioquímico, já que se apresenta em todos os tecidos humanos.

3.3. Coleta dos espectros Raman

Neste estudo foi utilizado um sistema Raman dispersivo com diagrama esquemático apresentado na Figura 6 (modelo Dimension P-1, Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA). O espectrômetro utiliza um laser de diodo com comprimento de onda em 830 nm (infravermelho próximo), obtendo-se na saída do sistema óptico cerca de 350 mW de potência.

A aquisição e o armazenamento dos espectros foi realizada por um microcomputador (modelo Microboard Iron I5, Microboard Ind. Com. Prod. Elétron. Ltda., Manaus, AM, com Windows 7), utilizando o software RamanSoft (versão 1.4, Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA), que controla o tempo de exposição do detector e o número de aquisições por amostra, bem como o armazenamento dos espectros para análise e interpretação. O elemento dispersor de luz integrado ao espectrômetro possui resolução de aproximadamente 4 cm^{-1} . A faixa espectral útil compreende de 400 a 1800 cm^{-1} . O sinal luminoso espalhado pela amostra foi detectado por uma câmera CCD de alta sensibilidade (*back thinned, deep-depletion*), com 1340 X 100 pixels e refrigerada por elemento termoelétrico (Peltier) ventilado, atingindo uma temperatura de trabalho de $-75 \text{ }^\circ\text{C}$.

A obtenção do espectro Raman da amostra foi efetuada por meio de um sistema de coleta sonda Raman (Raman *probe*, modelo Vector probe, Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA) acoplado ao laser e ao espectrômetro. O tempo de exposição para a obtenção dos espectros dos tecidos cerebrais foi de 20 s (10 leituras de 2 s cada). A coleta dos espectros Raman dos constituintes bioquímicos empregados no modelo foi realizada sem nenhum preparo especial ou diluição, com tempo de coleta entre 0.1 s e 2.0 s.

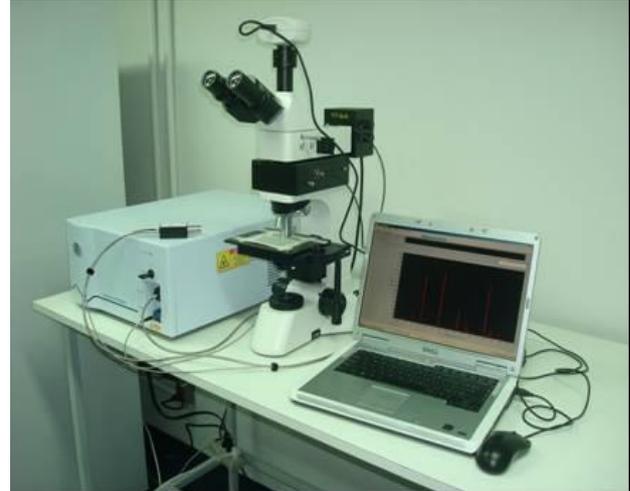
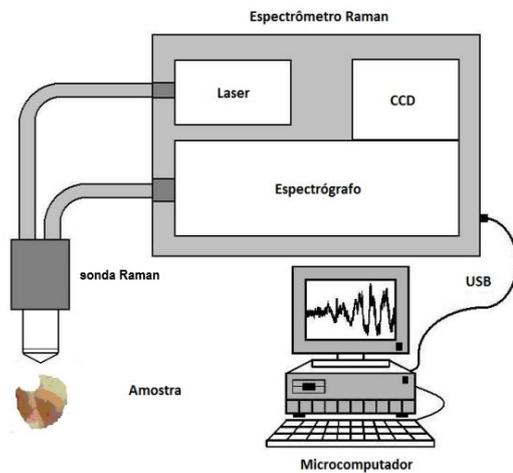


Figura 6: Diagrama esquemático e foto do sistema Raman dispersivo (micro e macro Raman) utilizado na coleta dos dados espectrais.

3.3.1. Calibração do espectrômetro em comprimento de onda (deslocamento Raman)

Devido à necessidade de conhecer a posição de cada banda de um espectro em termos da sua frequência (número de onda), a calibração do espectrômetro foi verificada no início da coleta de espectros em cada dia. A verificação da calibração em comprimento de onda dos espectros Raman foi feita avaliando a posição dos picos das 7 bandas principais do naftaleno ($C_{10}H_8$) no eixo das abscissas, pois esta substância tem bandas características intensas e bem espaçadas na região de $500-1700\text{ cm}^{-1}$, que é a região de interesse para a espectroscopia Raman quando usada para a análise de materiais biológicos. Por sua vez, a correção da resposta em intensidade do espectrômetro (resposta espectral) foi feita utilizando-se o arquivo fornecido pelo fabricante do equipamento.

3.3.2. Pré-processamento dos espectros

O pré-processamento dos espectros Raman envolveu inicialmente a retirada da emissão da fluorescência de fundo (componente espectral de baixa frequência) que representa a linha de base do espectro. A emissão fluorescente sem importância em termos de características

espectrais para o sinal Raman foi retirada por meio de um filtro passa-altas desenvolvido no software Matlab 7.04 (MathWorks Inc., Natick, MA, EUA). Para tal, uma interpolação polinomial foi aplicada em todos os pontos do espectro e então subtraída, evidenciando as bandas Raman de alta frequência. A ordem foi definida em função do perfil de fluorescência do espectro, sendo escolhida a ordem 7.

O resultado da aplicação do método polinomial de subtração da linha de base devido à fluorescência pode ser observado na Figura 7 com o espectro antes e depois do processamento. Nota-se que a linha de base é alterada, ficando o espectro com média igual a zero após o processamento.

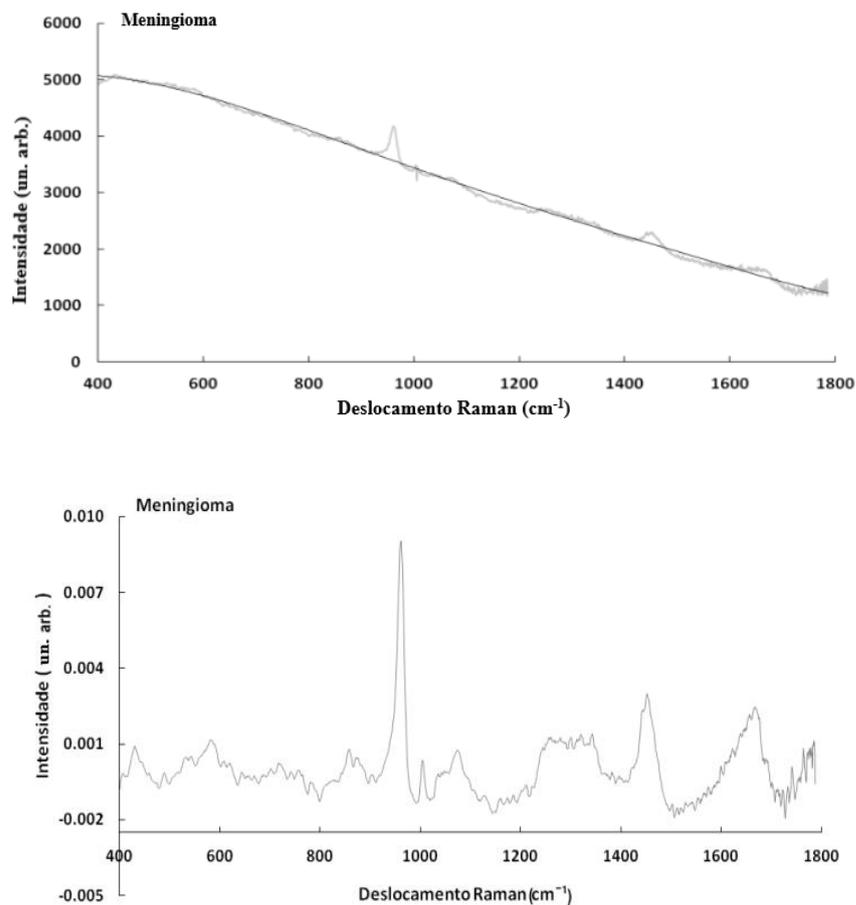


Figura 7: Exemplo de espectro Raman antes e depois da remoção da linha de base devido à fluorescência de fundo por polinômio de ordem 7.

Artefatos provenientes de raios cósmicos e que aparecem como picos de alta intensidade em um ou dois pixels foram removidos manualmente. Ruídos decorrentes de luz ambiente, sinais coletados de pixels com menor ou maior sensibilidade relativa e ruídos térmicos foram rejeitados quando da subtração da luz de fundo (*background*) coletado pelo espectrômetro na primeira aquisição espectral do dia.

Os espectros Raman médios dos grupos de tecidos normais e histopatológicos foram calculados e exibidos utilizando o software Excel 2003 (Microsoft Office 2003, Microsoft Corp., Redmont, Washington DC, EUA).

3.3.3. Modelo bioquímico

O modelo espectral baseado nos constituintes bioquímicos foi desenvolvido calculando a contribuição dos espectros dos componentes basais selecionados para cada tipo de espectro do tecido cerebral usando a informação bioquímica única (*fingerprint*).

O ajuste dos espectros normais e tumorais do cérebro com os espectros dos constituintes bioquímicos foi realizado usando-se o ajuste por mínimos quadrados linear (LSqF) no software Matlab de acordo com a expressão (1) citada no item 2.9.1 método de quantificação dos constituintes bioquímicos.

3.3.4. Testes estatísticos

A análise de variância (ANOVA) é um teste estatístico paramétrico que possui estimativa de parâmetros para determinar diferença entre as médias de uma determinada variável, e é estatisticamente poderosa para comparar as médias de dois ou mais grupos. A ANOVA é indicada para análises com um número de amostras superiores a 30, com 3 principais pressupostos que são: amostras independentes, homogeneidade das variâncias entre os grupos e resíduos que devem seguir uma distribuição normal. Devido à quantidade de variáveis obtidas, o teste ANOVA foi utilizado para comparar as médias das concentrações bioquímicas do cerebelo normal e tumores obtidos no modelo bioquímico, e assim determinar quais concentrações tem diferenças significativas e rejeitar a hipótese nula (H_0) com nível de significância de 5% ($p <$

0,05), em comparação do tecido cerebral normal em relação ao tumoral. O valor de p é uma medida de evidência sobre a hipótese nula (H_0), que significa que não existe diferença entre as médias comparadas e a hipótese alternativa (H_1) que rejeita a hipótese nula (H_0) e conclui que a diferença entre as médias é significativa (KAO, 2006).

Para significância das médias das concentrações da meninge e meningioma, o teste t de Student não pareado foi escolhido por serem duas amostras independentes, e o nível de significância para rejeitar a hipótese nula (H_0) foi também de 5% ($p < 0,05$) (KAO, 2006).

O resultado de significância obtido do teste ANOVA e do teste t não pareado foram usados para identificar quais constituintes bioquímicos têm maior diferença significativa entre os grupos normal e tumor ($p < 0,05$) para posterior classificação dos espectros em função da concentração relativa dos componentes bioquímicos pela análise discriminante LDA.

3.3.5. Modelos de discriminação

A análise discriminante (LDA) é um método de classificação das amostras em grupos de acordo com parâmetros de semelhança. A LDA foi utilizada para classificar as concentrações bioquímicas obtidas pelo modelo bioquímico baseado em LSqF para os tecidos normais do cerebelo e meninge e dos tumorais do glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e meningioma.

Para obter o modelo de classificação pela LDA foi utilizado o software para análise multivariada Chemoface[®], que é desenvolvido no ambiente Matlab, separando os dados espectrais das concentrações em grupos normais e tumorais de acordo com a concentração de colágeno, colesterol, ácido linolênico, beta-caroteno, DNA, esfingomielina, fenilalanina, fosfatidilcolina, trioleína, glicose e sangue. No software Chemoface[®], as variáveis dependentes (vetor y) foram formadas por classes representadas por números (de 1 até o número de classes escolhidas). No vetor x foram inseridas as variáveis independentes formadas pelos dados espectrais das concentrações obtidas para cada tecido normal e tumoral que foi classificado pela LDA. Em seguida foi selecionado o método de classificação LDA, e realizada a validação cruzada “leave one out” para prever o modelo, e depois foi realizada a calibração para obter o

modelo utilizando 5 variáveis latentes, em seguida é realizada a plotagem do gráfico para observar o desempenho do modelo na classificação.

Foi utilizado o software Chemoface[®] para obter o modelo de classificação por PLS dos tecidos normais do cérebro como cerebelo e meninge e tumorais como glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma e meningioma utilizando todos os pontos dos espectros obtidos. Esse método de discriminação apresenta a vantagem de utilizar o maior número de informações obtidas de cada amostra, diminuindo o valor de erros na análise, fazendo dele um excelente método em comparação a outros métodos matemáticos empregados.

Para obter o modelo de classificação por PLS no software Chemoface[®], as variáveis dependentes (vetor y) foram representadas por números correspondentes aos grupos normais e tumorais classificados, e no vetor x foram inseridas as variáveis independentes formadas pelos dados espectrais totais do cerebelo e tumor, meninge e meningioma, e todos os espectros dos tecidos juntos. Foi selecionado o método de regressão por PLS, que é calculado pelo algoritmo SIMPLS, foi realizada a validação cruzada “leave one out” para prever o modelo, para obtenção do modelo foi utilizada a calibração e selecionado 10 principais componentes, em seguida foi plotado o gráfico para obter os parâmetros de desempenho do modelo.

Os valores de sensibilidade e especificidade foram utilizados para determinar o desempenho dos modelos de classificação LDA e PLS em cada grupo.

A sensibilidade é definida pela expressão (4):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (4)$$

onde VP, referente à verdadeiro positivo, é o número de casos que obteve resposta positiva dentre os que possuem a doença, e FN é o número de casos falso-negativos (LOPES, 2014). O denominador da fração (VP+FN) corresponde ao total dos que apresentam a doença.

Definindo-se VN como a fração dos que obtiveram resposta negativa no teste dentre aqueles que não possuem a doença (verdadeiro negativo), e FP a quantidade de falso negativo, pode-se calcular a especificidade pela expressão (5) (LOPES, 2014):

$$\text{Especifici dade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (5)$$

4. RESULTADOS

4.1. Espectros Raman de glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e cerebelo normal

Foram obtidos espectros dos fragmentos do cerebelo normal, glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma, para comparação espectral como apresentado na Figura 8, os espectros da Figura 8 são deslocados no eixo y. As maiores diferenças entre o tecido cerebral normal e tumores aparecem nos picos situados em 400 a 1800 cm^{-1} , atribuídos a componentes bioquímicos do tecido cerebral como colesterol, lipídios/fosfolipídios e proteínas. Os picos em 421, 549, 703, 759, 853 cm^{-1} , atribuídos a colesterol, lipídios/fosfolipídios e proteína, são predominantes nos espectros dos tumores e cerebelo normal, e entre 1007 a 1661 cm^{-1} , tem-se as bandas atribuídas a lipídios/fosfolipídios, proteínas, ácido nucleico e hemoglobina (AGUIAR *et al.*, 2013; DAKOVIC *et al.*, 2013; KRAFFT *et al.*, 2005).

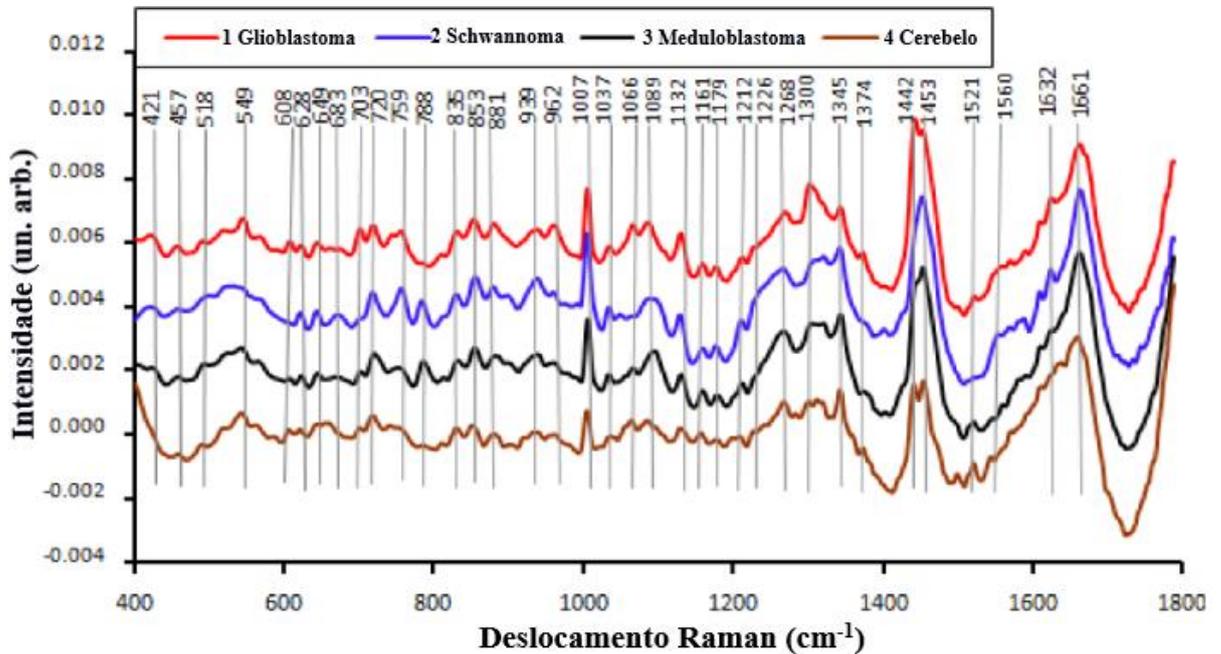


Figura 8: Espectros Raman do glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e cerebelo normal, mostrando a maior intensidade de lipídios no glioblastoma em relação ao meduloblastoma e schwannoma nas bandas com picos em 1300 cm^{-1} e 1442 cm^{-1} ; na banda com pico em 703 cm^{-1} , tanto o cerebelo normal quanto os tumores tiveram a mesma intensidade de colesterol; As bandas com picos em 549 cm^{-1} e 1521 cm^{-1} do cerebelo atribuídas a colesterol, beta-caroteno e colágeno, tem maior intensidade em relação ao schwannoma.

As bandas com os picos em 853 , 939 , 1007 e 1661 cm^{-1} são atribuídas a proteína. Os picos em 421 , 549 , 703 , 1132 e 1179 cm^{-1} são atribuídos ao colesterol. As bandas com picos em 788 , 835 , 1066 , 1089 , 1097 , 1300 e 1442 cm^{-1} são atribuídas aos lipídios (AGUIAR *et al.*, 2013; KRAFFT *et al.*, 2005). Os picos em 939 , 1161 , 1212 e 1345 cm^{-1} são atribuídos a proteínas, e se apresentam mais intensos nos tumores glioblastoma, schwannoma e meduloblastoma, em relação ao tecido normal do cerebelo. As bandas com os picos em 881 , 1268 , 1453 e 1661 cm^{-1} são atribuídas a fosfolipídios/lipídios e proteínas, o pico 881 cm^{-1} se mostrou com intensidade igual entre os tecidos e os picos 1268 , 1453 e 1661 cm^{-1} se mostraram com intensidades maiores em relação ao tecido normal.

O cerebelo normal e o tumor meduloblastoma apresentaram maior intensidade na banda de carotenóides com o pico em 1521 cm^{-1} em comparação aos tumores glioblastoma e schwannoma. O espectro do glioblastoma mostrou intensidade maior do que o schwannoma e meduloblastoma nas bandas com os picos em 703 , 1300 e 1442 cm^{-1} , atribuídas a colesterol e

lipídios/fosfolipídios. As bandas com os picos em 1007, 1453 e 1661 cm^{-1} , que são atribuídas a proteínas, mostraram mais intensidade no schwannoma em relação ao meduloblastoma.

Os picos Raman dos tecidos cerebrais são apresentados na Tabela 4 e as respectivas atribuições das bandas vibracionais destes picos foram obtidas através de referências bibliográficas citadas na referida Tabela.

Tabela 4: Posição dos picos e tentativa de atribuição das bandas Raman dos tecidos cerebrais normais e patológicos, com referências à literatura recente*.

Pico Raman (cm^{-1})	Atribuição*
421	Colesterol
457	Proteínas; colesterol
518	Fosfolipídios
549	Colesterol; estiramento ponte dissulfeto S-S (colágeno)
608	Colesterol
703	Estiramento do anel esterol – colesterol
720	Estiramento assimétrico do grupo colina $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de fosfolipídios (esfingomielina/fosfatidilcolina); lipídios, ácido graxo – HO;
746	Estiramento do anel esterol – colesterol
759	Fosfolipídios (etanolamina); hemoglobina; estiramento do anel esterol – colesterol
788	Lipídios – HO
835	Lipídios – CH_2 , HO
853	Estiramento C-C da prolina e deformação CCH do anel de tirosina (proteína); estiramento do anel esterol – colesterol; glicogênio
881	Hidroxiprolina e triptofano (colágeno); estiramento do anel esterol – colesterol; estiramento assimétrico do grupo colina $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de fosfolipídio (fosfatidilcolina); ácidos graxos insaturados
939	Estiramento C-C (amida III) – proteína
962	Estiramento do anel esterol - colesterol; dobramento CH_2 fora do plano – proteínas
1007	Estiramento C-C do anel aromático – fenilalanina/tirosina
1037	Deformação C-H no plano - fenilalanina/prolina – proteínas
1066	Lipídios – HO; ácidos graxos saturados; fosfolipídios (esfingomielina/fosfatidilcolina)
Pico Raman (cm^{-1})	Atribuição

1089	Fosfolipídios (fosfatidilcolina); ácidos graxos insaturados
1097	P–O–C and PO ₂ ⁻ grupos de fosfolipídios (principalmente fosfatidiletalonamina)
1132	Estiramento C–C de colesterol; ácido graxo saturado - HO; fosfolipídio (esfingomielina)
1161	Estiramento C–C e C–N – proteínas
1179	Estiramento C–C de colesterol; ácidos graxos – HO
1212	Amida III; estiramento C–C tirosina, fenilalanina, triptofano (proteína); células vermelhas do sangue (hemoglobina)
1226	Estiramento C–H – hemoglobina
1268	Deformação CH ₂ - lipídios (ácido graxo insaturado e fosfolipídios - fosfatidilcolina/fosfatidiletalonamina); alguma contribuição de C–N e estiramento N–H (amida III); timina e adenina
1300	Dobra CH ₂ e =CH – colesterol; deformação CH ₂ de ácidos graxos saturados/insaturados (forte para saturados); fosfolipídios (esfingomielina/fosfatidilcolina/fosfatidiletalonamina)
1318	Proteínas
1345	Dobra C–H – proteínas
1374	DNA/RNA; glicose
1442	Dobra CH ₂ e CH ₃ de lipídios: fosfolipídios (esfingomielina) e ácido graxo saturado e insaturado; colesterol
1453	Vibrações de grupos funcionais CH (CH ₂ e CH ₃) das cadeias laterais de aminoácidos – proteínas; fosfolipídios (esfingomielina)
1521	Carotenóides (C ₄₀ H ₅₆)
1558/1560	Hemoglobina
1632	Estiramento HOH - água; hemoglobina; ácido nucléico (DNA)
1661	Amida I (estiramento C=O esqueletal peptídico); estiramento C=C – lipídios (ácido graxo insaturado); contribuição do colesterol (1674 cm ⁻¹)

*AGUIAR *et al.* (2013); DAKOVIC *et al.* (2013); JERMYN *et al.* (2015); KALKANIS *et al.* (2014); KOLJENOVIC *et al.* (2002); KOLJENOVIC *et al.* (2005); KRAFFT *et al.* (2005); MEHTA *et al.* (2018); MOVASAGHI *et al.* (2007); RABAH *et al.* (2008); STONE *et al.* (2007).

4.2. Espectros Raman de meningioma e meninge normal

A Figura 9 apresenta os espectros do meningioma e meninge normal com deslocamento no eixo y. As bandas com picos em 720, 762, 1067, 1089, 1304 e 1453 cm^{-1} são atribuídas aos componentes bioquímicos do tecido da meninge: lipídios/fosfolipídios. As bandas com picos em 457, 549, 608, 703, 1132 e 1179 cm^{-1} são atribuídas a colesterol, ácidos graxos e esfingomielina.

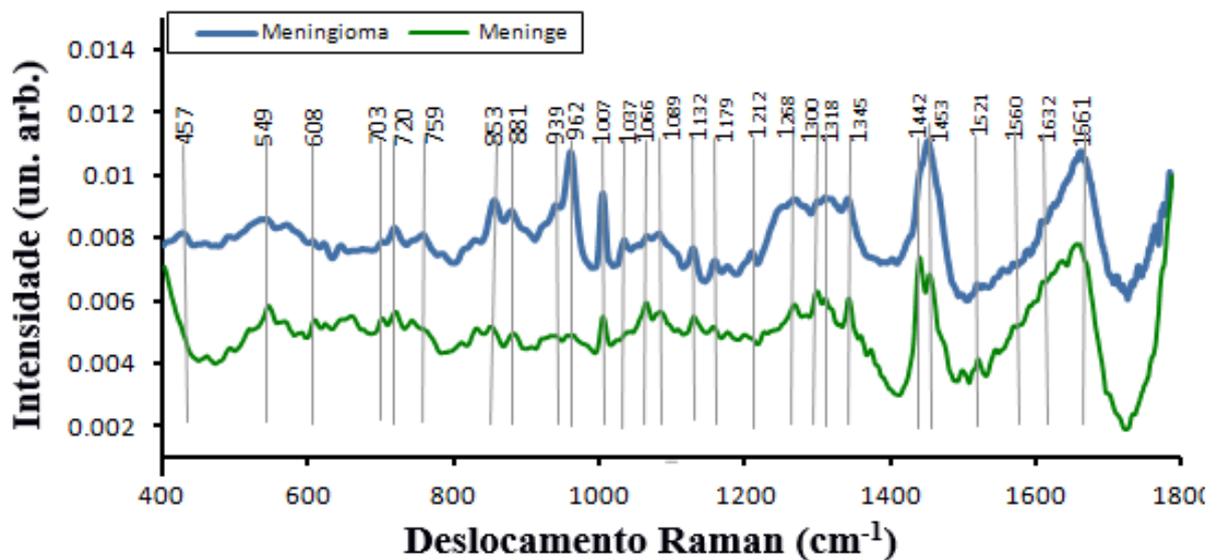


Figura 9: Espectros Raman do meningioma e meninge mostrando maior intensidade na banda 962 cm^{-1} atribuída a proteína e colesterol do meningioma em comparação a meninge normal.

Os picos Raman que contribuem para a diferença entre meningioma e meninge são 962, 1007 e 1453 cm^{-1} , atribuídos às proteínas. A diferença espectral da meninge normal em relação ao meningioma está relacionada com os picos em 549 e 1442 cm^{-1} , atribuídos ao colesterol. A banda com pico em 853 cm^{-1} atribuída à proteína e colesterol tem intensidade maior no meningioma em relação ao tecido normal da meninge.

4.3. Espectros Raman dos lobos cerebrais

A Figura 10 representa os espectros dos lobos frontal, occipital, parietal e temporal do tecido cerebral normal deslocados no eixo y, com a sua respectiva informação espectral entre 400 a 1800 cm^{-1} . As bandas com picos em 549, 720, 881, 1007, 1132, 1268, 1345 e 1442 cm^{-1} são atribuídos a colesterol, fosfolipídios/lipídios, colágeno e proteína. Como se referem a tecidos normais do cérebro, todas as bandas são idênticas em intensidade por serem originadas do mesmo tecido. Como o tecido cerebral é constituído de lipídios e proteínas, os lobos cerebrais foram utilizados para mostrar que a técnica Raman apresenta informações espectrais idênticas aos tecidos iguais de regiões diferentes. Esses tecidos não foram usados no modelo bioquímico baseado no método de ajuste por mínimos quadrados.

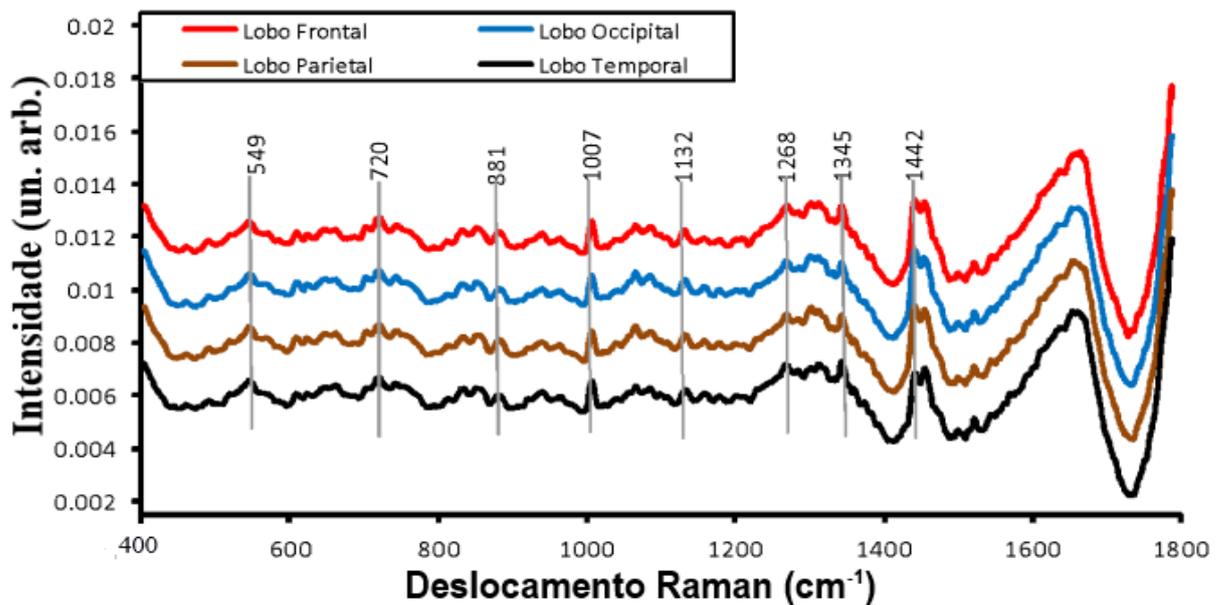


Figura 10: Espectros Raman dos lobos cerebrais, indicando que estes tecidos possuem a mesma intensidade relativa nas bandas atribuídas aos picos em 549, 720, 881, 1007, 1132, 1268, 1345 e 1441 cm^{-1} .

4.4. Constituintes bioquímicos basais e modelo de quantificação

A Figura 11 apresenta os espectros dos componentes moleculares utilizados no modelo bioquímico. Como citado, esses bioquímicos são os que se apresentam em maior concentração nos tecidos cerebrais e possuem picos Raman nas mesmas posições dos espectros dos tecidos.

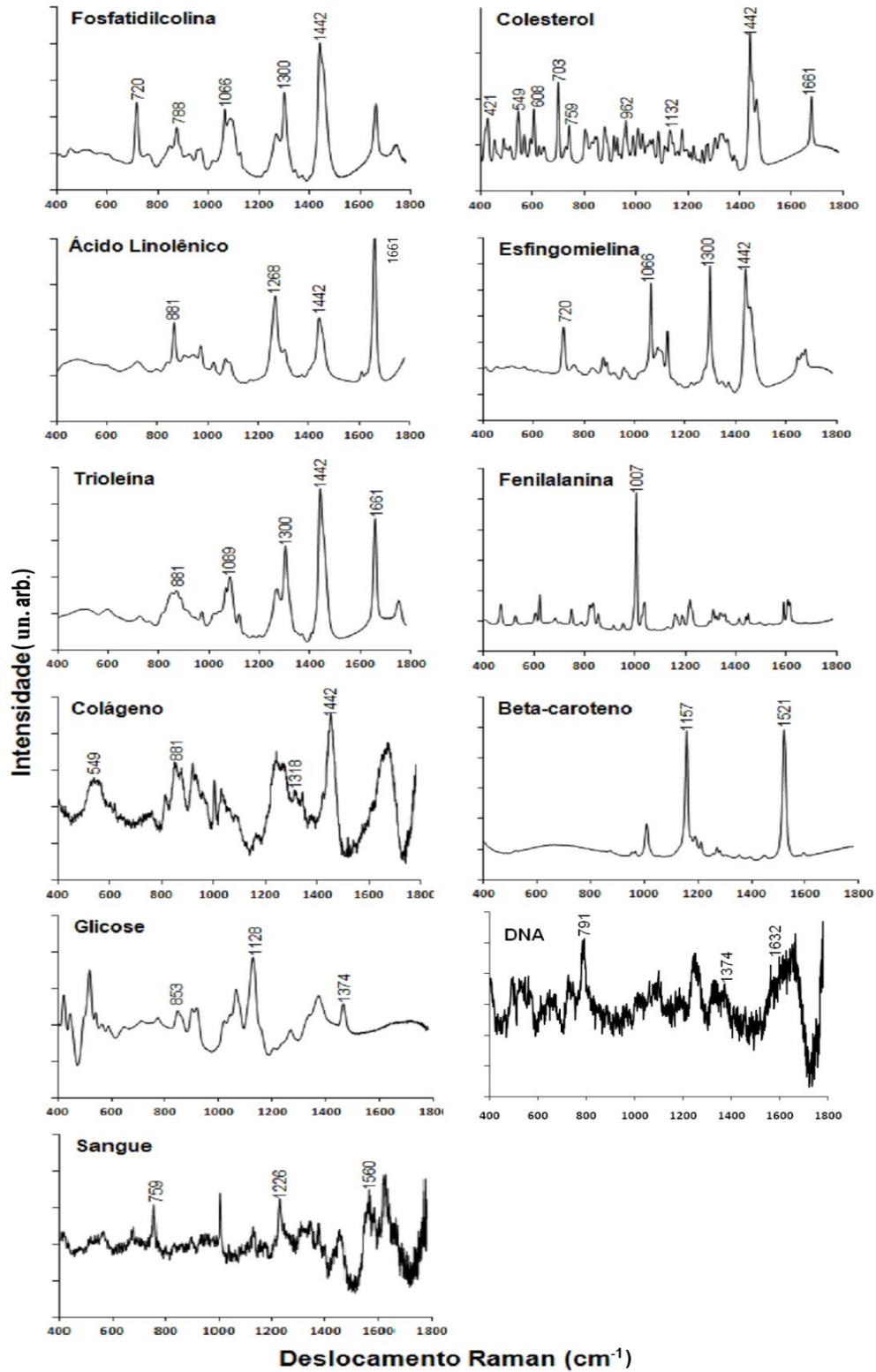


Figura 11: Espectros Raman dos componentes bioquímicos mais relevantes na constituição do tecido cerebral. Tempo de aquisição: 0,1 a 2,0 s. Comprimento de onda de excitação: 830 nm, com potência de saída de 350 mW.

Os constituintes bioquímicos utilizados no modelo são os que mostraram picos semelhantes de concentrações estimadas nos tecidos cerebrais normais e tumorais e os que apresentaram intensidades Raman positivas no modelo baseado no *least square fitting*.

As bandas com picos dos elementos bioquímicos da Figura 11 foram comparadas as bandas com picos dos tecidos cerebrais normais e tumorais das Figuras 8 e 9. Sugere-se que a fosfatidilcolina, com picos característicos em 720, 788, 1066, 1300 e 1442 cm^{-1} (Figura 11), corroboram na diferenciação normal/tumor. O pico 720 cm^{-1} apresentado em todos os espectros dos tumores e normal teve maior intensidade nos tumores em comparação ao cerebelo normal e na meninge e meningioma apresentam a mesma intensidade. O pico 788 cm^{-1} só apresenta intensidade alta no schwannoma e meduloblastoma em comparação ao glioblastoma e cerebelo normal. Com intensidade maior no glioblastoma, cerebelo normal e meduloblastoma, a banda com o pico em 1066 cm^{-1} não se apresenta no espectro do schwannoma e no da meninge tem intensidade maior que o meningioma. O pico 1300 cm^{-1} teve intensidade maior no espectro do glioblastoma em comparação a outros tumores e tecido normal. No espectro da meninge este pico também apresentou intensidade maior que o meningioma. O pico 1442 cm^{-1} teve intensidade maior no glioblastoma e cerebelo normal em comparação ao meduloblastoma e schwannoma, e a intensidade é maior no espectro da meninge normal que no do meningioma.

A quantidade de colesterol no glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma e cerebelo normal, determinada pela intensidade dos picos apresentados na Figura 11, corroborou com os picos mostrados na Figura 8 em 421, 549, 608, 703, 759, 962, 1442 e 1661 cm^{-1} . Em algumas bandas com picos em 549, 608, 703 e 962 cm^{-1} apresentados na Figura 8, o glioblastoma se mostrou com quantidade de colesterol mais intensa do que o schwannoma e meduloblastoma. O schwannoma se mostrou com bandas mais intensas de colesterol do que o meduloblastoma com os picos 421 e 759 cm^{-1} e o meduloblastoma demonstrou mais intensidade na banda com pico em 1442 cm^{-1} . O cerebelo normal apresentou intensidade de colesterol nas bandas com picos em 549 e 1661 cm^{-1} maior do que o schwannoma e meduloblastoma. A Figura 11 também corroborou com os picos mostrados na Figura 9 em que a meninge normal apresentou no seu espectro nas bandas com picos em 549, 608, 703 e 1442 cm^{-1} , com maior intensidade de colesterol do que o meningioma. O meningioma apresentou bandas com picos em 759 e 962 cm^{-1} com maior intensidade de colesterol que a meninge.

Sugere-se que o ácido linolênico, característico pelas bandas com picos em 881, 1268, 1442 e 1661 cm^{-1} , se mostrou presente tanto no cerebelo e tumores como na meninge e tumor, com diferenças na sua intensidade. A banda com pico em 881 cm^{-1} teve intensidade igual no glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma e cerebelo, porém o meningioma se apresenta com intensidade maior que a meninge. O pico 1268 cm^{-1} teve intensidade maior no meduloblastoma em relação ao schwannoma, glioblastoma e cerebelo normal. Nos espectros da meninge e meningioma a banda com pico em 1268 cm^{-1} teve maior intensidade na meninge. A banda com pico em 1442 cm^{-1} teve intensidade maior no espectro do glioblastoma, seguido schwannoma, meduloblastoma e cerebelo normal. A meninge se mostrou com intensidade maior do pico 1442 cm^{-1} em relação ao meningioma. A banda com pico em 1661 cm^{-1} teve maior intensidade no meduloblastoma, seguido do schwannoma, glioblastoma e cerebelo normal. A meninge apresentou intensidade do pico 1661 cm^{-1} maior do que o meningioma.

Sugere-se que a esfingomiéline, característica pelas bandas com picos em 720, 1066, 1300 e 1442 cm^{-1} , se apresentam nos espectros dos tumores e cerebelo como da meninge e meningioma com diferenças. O pico 720 cm^{-1} se apresentou com intensidades maiores iguais entre o schwannoma e meduloblastoma em comparação as intensidades menores iguais do glioblastoma e cerebelo normal; no meningioma e meninge se mostrou com a mesma intensidade. O pico 1066 cm^{-1} não apareceu no schwannoma, mas teve intensidade maior no glioblastoma e cerebelo normal seguido do meduloblastoma. Na meninge e meningioma, o pico 1066 cm^{-1} se apresentou mais intenso na meninge normal. O pico em 1300 cm^{-1} teve intensidade maior no glioblastoma seguido de meduloblastoma e schwannoma com menor intensidade no cerebelo. No espectro da meninge o pico em 1300 cm^{-1} se mostrou mais intenso que o meningioma. O pico em 1442 cm^{-1} apresentou maior intensidade no espectro do glioblastoma seguido de cerebelo normal, meduloblastoma e schwannoma.

Sugere-se que a trioléina, característica das bandas com picos em 881, 1089, 1300, 1442 e 1661 cm^{-1} , apresentou diferenças do tecido normal em relação ao tumoral. Esses picos se apresentaram nos espectros do cerebelo normal, glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma, meninge normal e meningioma. No cerebelo e tumores (glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma), a intensidade do pico 881 cm^{-1} foi igual; o pico 1089 cm^{-1} se apresentou com intensidade maior no schwannoma e meduloblastoma em relação ao glioblastoma e cerebelo

normal, e os picos 1300, 1442 e 1661 cm^{-1} se mostraram maiores no glioblastoma em relação ao tecido normal e nos tumores schwannoma e meduloblastoma. No tecido da meninge, os picos 1089, 1330 e 1442 cm^{-1} se mostraram mais intensos em comparação ao meningioma, e o pico 1661 cm^{-1} se apresentou mais intenso no meningioma em comparação a meninge.

A fenilalanina, é representada pela banda com o pico em 1007 cm^{-1} fazendo-se presente nos espectros do glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma, cerebelo, meningioma e meninge. Esta componente espectral apresenta-se mais intensa no schwannoma em comparação ao glioblastoma, meduloblastoma e cerebelo normal, bem como no meningioma em comparação a meninge normal.

O colágeno, que apresenta bandas com picos em 549, 881, 1318 e 1453 cm^{-1} , se mostrou com intensidade maior nos espectros do glioblastoma e cerebelo normal em relação aos outros tumores e no meningioma em relação à meninge normal.

O beta-caroteno, representado pela contribuição principal da banda com pico em 1521 cm^{-1} , se apresentou com maior intensidade no espectro do cerebelo normal em relação aos tumores e na meninge em relação ao meningioma.

As bandas com picos em 853 e 1374 cm^{-1} , atribuídas à glicose, tem maior intensidade no schwannoma em comparação ao meduloblastoma, glioblastoma e cerebelo normal no pico 853 cm^{-1} , e tem maior intensidade no glioblastoma em comparação ao meduloblastoma, schwannoma e cerebelo normal no pico 1374 cm^{-1} . No meningioma, a banda com pico em 853 cm^{-1} é mais intensa no meningioma em comparação a meninge.

As bandas com picos em 1374 e 1632 cm^{-1} presentes no espectro do DNA também se apresentaram no espectro dos tumores e tecido normal. A banda com pico em 1374 cm^{-1} tem maior intensidade no cerebelo normal em comparação ao glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma, e a banda com pico em 1632 cm^{-1} tem maior intensidade no schwannoma seguido do glioblastoma, cerebelo normal e meduloblastoma. A banda com pico em 1632 cm^{-1} tem maior intensidade na meninge normal em relação ao meningioma.

O sangue (hemoglobina), com bandas de picos em 759, 1226 e 1560 cm^{-1} , se apresentaram com maior intensidade no espectro do schwannoma em relação ao glioblastoma, meduloblastoma e cerebelo normal. No espectro da meninge, os picos 759 e 1560 cm^{-1} se apresentaram com mais intensidade do que o meningioma.

Para que o modelo fosse utilizado para estimar a concentração bioquímica, foram utilizados os espectros individuais obtidos dos tecidos cerebrais, normais e tumorais e os espectros de cada um dos elementos bioquímicos, e por divisão matricial no software Matlab, obteve-se a concentração relativa, chegando-se ao resultado dos 11 bioquímicos mais relevantes para utilização no modelo realizado, pois alguns apresentaram com concentração negativa.

As Figuras 12 e 13 apresentam as intensidades médias e o desvio padrão dos elementos bioquímicos para cada tecido seja normal ou neoplásico e o nível de significância entre as médias das concentrações dos elementos bioquímicos utilizados, que foi de $p < 0,05$ obtidos no teste ANOVA.

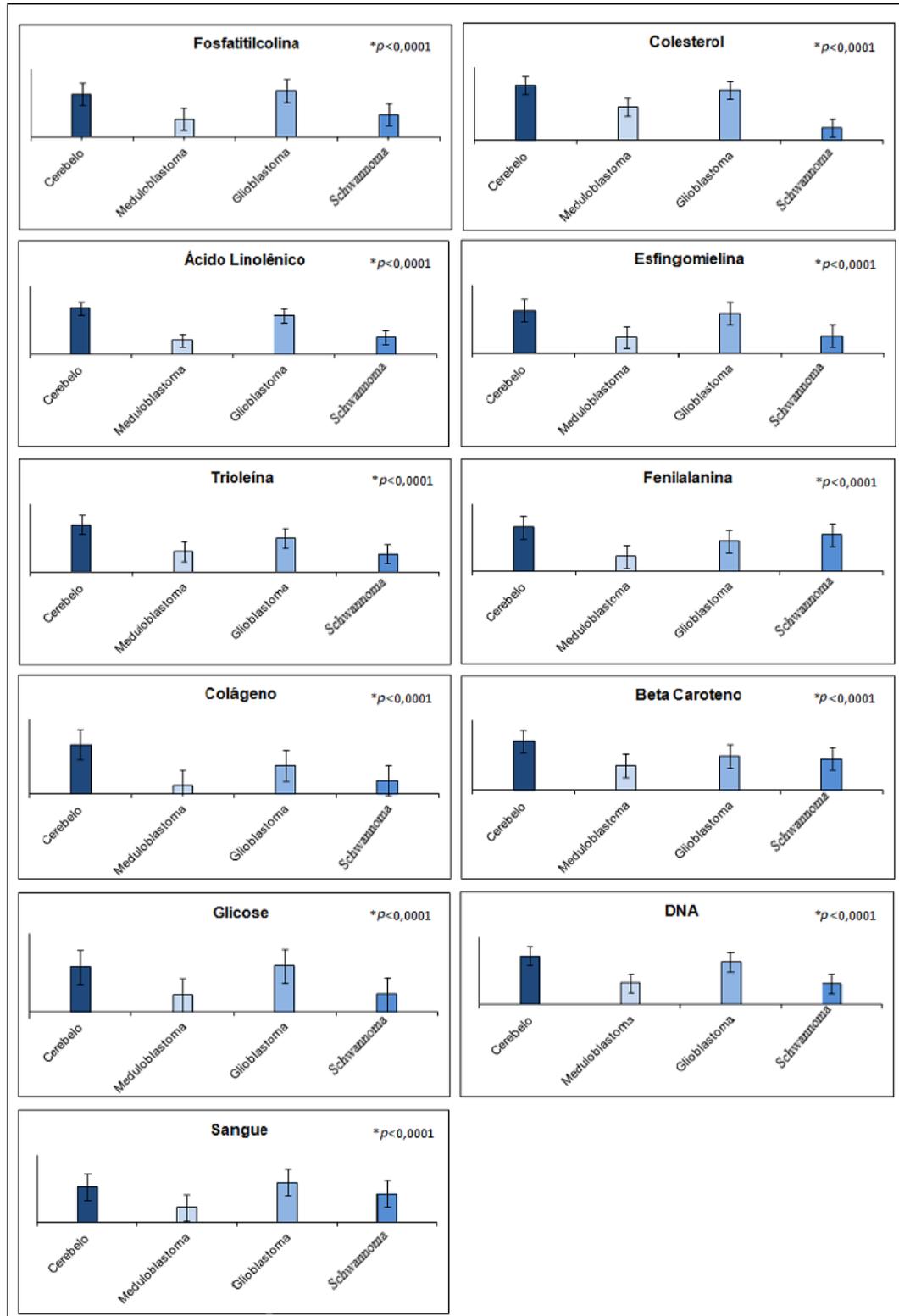


Figura 12: Média e desvio padrão das concentrações relativas de cada elemento bioquímico presente nos tecidos cerebrais do cerebello e tumores estimadas pelo modelo bioquímico e valor de p .

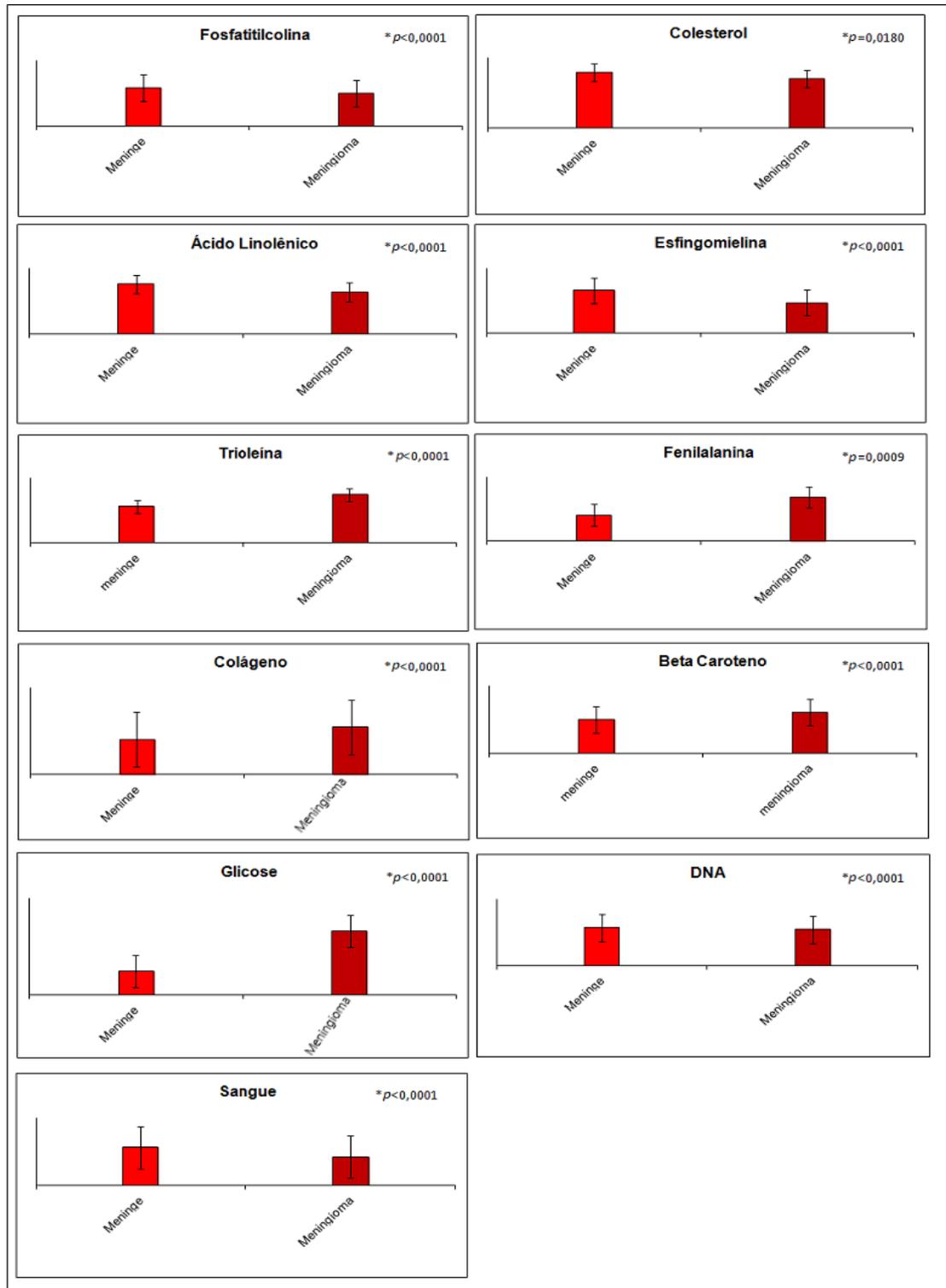


Figura 13: Média e desvio padrão das concentrações relativas de cada elemento bioquímico presente nos tecidos cerebrais da meninge e meningioma estimadas pelo modelo bioquímico e o valor de p .

As concentrações bioquímicas obtidas através do modelo empregado mostradas nas Figuras 12 e 13 foram comparadas as bandas com picos existentes nos espectros dos tecidos cerebrais normais e tumorais das Figuras 8 e 9.

Como visto na Figura 12, a concentração de fosfatidilcolina se apresentou com maior intensidade no cerebelo normal e glioblastoma devido ao aumento dos picos em 1066 e 1442 cm^{-1} comparado aos outros tumores. O schwannoma tem maior concentração de fosfatidilcolina em relação ao meduloblastoma devido ao pico em 1442 cm^{-1} que é intenso. Na Figura 13, a concentração de fosfatidilcolina da meninge em comparação ao meningioma se mostrou um pouco maior devido os picos 1066, 1300 e 1442 cm^{-1} . A concentração de colesterol é maior no glioblastoma em relação ao meduloblastoma e schwannoma visto pelo aumento das bandas com picos em 549, 608, 703 e 962 cm^{-1} . A concentração do colesterol no meduloblastoma foi maior devido à intensidade do pico em 1442 cm^{-1} . O cerebelo normal apresentou concentração corroborando pela maior intensidade de colesterol no meduloblastoma e schwannoma devido às bandas com picos em 549 e 1661 cm^{-1} . A meninge normal apresentou concentração de colesterol um pouco maior que o meningioma nas bandas com picos em 549, 608, 703 e 1442 cm^{-1} e o meningioma apresentou maior intensidade em comparação a meninge nas bandas com picos em 759 e 962 cm^{-1} .

A concentração de ácido linolênico (Figura 12) se mostrou com intensidade maior no cerebelo normal em relação aos tumores, sendo que as bandas com picos em 1268, 1442 e 1661 cm^{-1} tiveram intensidades maiores nos tumores em relação à meninge normal. Esse aumento de concentração do cerebelo normal em relação ao glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma pode ser devido à banda com pico em 881 cm^{-1} , que se mostrou com intensidade maior em todos os tecidos. A concentração de ácido linolênico da meninge comparada ao meningioma apresentada na Figura 13 mostra que a meninge tem maior concentração do que o meningioma devido o aumento da intensidade dos picos em 1268, 1442 e 1661 cm^{-1} .

A esfingomielina apresentou concentração maior no cerebelo normal e glioblastoma em comparação com os tumores meduloblastoma e schwannoma devido às bandas com picos em 1066 e 1442 cm^{-1} . A concentração de esfingomielina na meninge em comparação ao meningioma foi maior pela intensidade das bandas com picos em 1066 e 1300 cm^{-1} .

A trioleína apresentou concentração maior no cerebelo normal em relação ao glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma. Essa diferença de concentração se deu pela intensidade do pico 881 cm^{-1} . A concentração no glioblastoma se mostrou maior que nos outros tumores devido à intensidade das bandas com picos em 1300 e 1442 cm^{-1} . A concentração de trioleína do meduloblastoma e schwannoma se mostraram iguais devido às bandas com picos em 881 , 1300 , 1442 e 1661 cm^{-1} , que apresentaram a mesma intensidade. O meningioma apresentou concentração maior de trioleína do que a meninge normal devido aumento de intensidade nas bandas com picos em 881 , 1089 e 1661 cm^{-1} .

As concentrações de fenilalanina apresentaram maior intensidade no schwannoma em relação ao glioblastoma e meduloblastoma, essa diferença de concentração se dá pela intensidade da banda com pico em 1007 cm^{-1} . A intensidade de concentração do cerebelo normal maior do que o schwannoma não confere visualmente na intensidade do pico em 1007 cm^{-1} , o erro de concentração pode ter ocorrido pelo fato da fenilalanina estar presente em outros picos do cerebelo normal como o 939 e 1037 cm^{-1} . A concentração de fenilalanina no meningioma foi superior à da meninge devido à intensidade da banda com pico em 1007 cm^{-1} .

A concentração de colágeno se mostrou mais intensa no cerebelo normal seguido do glioblastoma devido o aumento de intensidade das bandas com picos em 549 , 881 e 1453 cm^{-1} . O meningioma apresentou concentração de colágeno maior do que a meninge normal devido ao aumento da banda com pico em 1453 cm^{-1} .

A concentração de beta-caroteno foi maior no cerebelo normal em comparação ao glioblastoma, schwannoma e meduloblastoma devido ao aumento da banda com pico em 1521 cm^{-1} . O meningioma apresentou concentração maior do que a meninge sendo que no espectro do meningioma a banda com pico em 1521 cm^{-1} se apresentou com maior intensidade na meninge normal. Essa concentração de beta-caroteno maior obtida no meningioma através do modelo bioquímico utilizado pode estar relacionada com a vibração molecular do elemento bioquímico em outros picos do meningioma como a banda com pico em 1453 e 1661 cm^{-1} .

O resultado obtido pelo modelo bioquímico na concentração de glicose mostrou a intensidade maior no cerebelo normal e glioblastoma seguidos de schwannoma e meduloblastoma. A banda com pico em 853 cm^{-1} se apresentou com maior intensidade no glioblastoma, schwannoma e meduloblastoma em relação ao cerebelo normal. Na concentração

de glicose na meninge e meningioma, o meningioma se apresentou com mais intensidade do que a meninge, isso aconteceu pelo aumento obtido na banda com pico 853 cm^{-1} que é maior no meningioma em relação à meninge.

A concentração de DNA se apresentou com leve aumento no cerebelo normal em relação ao glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma; isso ocorreu devido à intensidade da banda com pico em 1374 cm^{-1} . A concentração de DNA da meninge em relação ao meningioma também demonstrou um pequeno aumento em relação ao meningioma, e essa diferença se deu pela intensidade da banda 1632 cm^{-1} que se apresentou com maior intensidade na meninge normal em relação ao meningioma.

A concentração de sangue apresentou maior intensidade no glioblastoma em relação ao cerebelo normal, schwannoma e meduloblastoma. Pela intensidade dos picos, como exemplo a banda com pico em 759 cm^{-1} , a mesma apresentou uma intensidade maior no schwannoma seguido do glioblastoma, meduloblastoma e cerebelo. Essa diferença mostra mais uma vez que existe concentração de sangue em outros picos do glioblastoma e cerebelo normal. A concentração de sangue na meninge mostrou maior intensidade em relação ao meningioma devido aos picos 759 e 1560 cm^{-1} , que se apresentaram com maior intensidade do que o meningioma.

Foram realizados os testes ANOVA e teste t não pareado após obter a concentração para identificar quais elementos bioquímicos possuíam concentrações com diferenças estatisticamente significativa nas médias para posterior realização da discriminação entre os grupos de tecidos.

As comparações estatísticas através do teste ANOVA entre cada concentração bioquímica obtida em que o valor de $p = 0,05$ são mostrados na Tabela 5. O resultado do teste ANOVA no cerebelo e tumores demonstrou que as diferenças nas concentrações relativas dos constituintes bioquímicos foram extremamente significativas para todos os bioquímicos ($p < 0.0001$).

Foi aplicado o teste t não pareado entre as médias das concentrações dos tecidos da meninge e meningioma, como é mostrado na Tabela 6. O resultado do teste t aplicado às concentrações bioquímicas da meninge e meningioma indicou diferenças significativas para todos os bioquímicos ($p < 0.05$).

Tabela 5: Valores de p retornados pela ANOVA, teste aplicado a um nível de significância $p < 0,05$, para a comparação entre as médias das concentrações dos tecidos cerebrais do cerebelo e tumores.

Elemento bioquímico	Nível de significância*
Ácido linolênico	$p < 0.0001$
Beta Caroteno	$p < 0.0001$
Colágeno	$p < 0.0001$
Colesterol	$p < 0.0001$
DNA	$p < 0.0001$
Esfingomielina	$p < 0.0001$
Fenilalanina	$p < 0.0001$
Fosfatidilcolina	$p < 0.0001$
Glicose	$p < 0.0001$
Sangue	$p < 0.0001$
Trioleína	$p < 0.0001$

Tabela 6: Valores de p retornados pelo teste t não pareado, aplicado a um nível de significância $p < 0,05$, para a comparação entre os tecidos cerebrais da meninge e meningioma.

Elemento bioquímico	Nível de significância*
Ácido linolênico	$p < 0.0001$
Beta Caroteno	$p < 0.0001$
Colágeno	$p < 0.0001$
Colesterol	$p = 0.0180$
DNA	$p < 0.0001$
Esfingomielina	$p < 0.0001$
Fenilalanina	$p = 0.0009$
Fosfatidilcolina	$p < 0.0001$
Glicose	$p < 0.0001$
Sangue	$p < 0.0001$
Trioleína	$p < 0.0001$

4.5. Discriminação de tecidos cerebrais normais e tumorais

Os espectros dos tecidos e das concentrações bioquímicas normais e tumorais do cérebro foram classificados em normal e tumor mediante as técnicas de discriminação LDA e a PLS. Os dados das concentrações dos componentes bioquímicos obtidos no modelo bioquímico foram

classificados em tecidos normais e tumorais pela LDA e o PLS foi utilizado para classificar os espectros dos tecidos em grupos de tecidos cerebrais normais e tumorais.

4.5.1. Discriminação dos dados espectrais das concentrações do cerebelo, meninge e tumores por LDA

A discriminação dos espectros dos tecidos do cerebelo e meninge em grupos normais e tumorais foi realizada utilizando a análise de discriminação LDA separando os dados espectrais de acordo com a concentração de colágeno, colesterol, ácido linolênico, beta-caroteno, DNA, esfingomielina, fenilalanina, fosfatidilcolina, trioleína, glicose e sangue (hemoglobina).

A discriminação dos espectros dos tecidos em grupos normais e tumorais via LDA utilizando as concentrações relativas dos constituintes bioquímicos constantes nas Figuras 12 e 13, classificou os espectros do cerebelo normal e tumor (glioblastoma, schwannoma e meduloblastoma) com precisão de 93,3% (Tabela 7). Os espectros da meninge normal e tumor (meningioma) foram classificados pela LDA com precisão de 99,3% (Tabela 7).

Os valores de sensibilidade e especificidade foram determinados a partir dos resultados obtidos pela discriminação através da LDA das concentrações bioquímicas e são mostrados na Tabela 7. O resultado da sensibilidade e especificidade da classificação via LDA para o cerebelo normal e tumoral foi de 96,4% e 91,0%, respectivamente; para a meninge e meningioma, o resultado da sensibilidade e especificidade da LDA foi de 98,7% e 100%, respectivamente.

Tabela 7: Resultados na discriminação de tecidos cerebrais normais do (cerebelo e meninge) e tumorais (glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma) e (meningioma) por LDA aplicada às concentrações dos constituintes bioquímicos.

Diagnóstico Histopatológico	Diagnóstico Raman via LDA			
	Cerebelo		Meninge	
	Normal	Tumor	Normal	Tumor
Cerebelo Normal	59	6	–	–
Cerebelo Tumor	2	53	–	–
Precisão	93,3%			
Sensibilidade	96,4%			

Especificidade			91,0%	
Meninge Normal	-	-	69	0
Meninge Tumor	-	-	1	73
Precisão				99,3%
Sensibilidade				98,7%
Especificidade				100%

4.5.2. Discriminação utilizando espectros do cerebelo, meninge, glioblastoma, meningioma, schwannoma e meduloblastoma por PLS-DA

A classificação via discriminação PLS-DA utilizou todos os pontos do espectro dos tecidos normais (cerebelo e meninge) e tecidos tumorais (glioblastoma, schwannoma meduloblastoma e meningioma). O modelo PLS-DA forneceu precisão de 97,5% de acertos na classificação dos dados espectrais do cerebelo normal e tumores (glioblastoma, schwannoma e meduloblastoma), com 98,2% de sensibilidade e 96,6% de especificidade (Tabela 8). Os dados espectrais da meninge normal e tumor (meningioma) mostraram 99,3% de precisão na classificação, com sensibilidade de 98,7% e especificidade de 100%. Na classificação via discriminação PLS-DA entre normal e tumor de todos os espectros juntos (normal – cerebelo e meninge, tumor – glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e meningioma) o acerto na classificação foi de 94,1%.

Tabela 8: Precisão na discriminação de tecidos cerebrais normais (cerebelo e meninge) e tumorais (glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma e meningioma) por PLS.

Diagnóstico Histopatológico	Diagnóstico Raman via PLS			
	Cerebelo		Meninge	
	Normal	Tumor	Normal	Tumor
Cerebelo Normal	63	2	-	-
Cerebelo Tumor	1	54	-	-
Precisão		97,5%		-
Sensibilidade		98,2%		

Especificidade	96,9%			
Meninge Normal	-	-	69	0
Meninge Tumor	-	-	1	73
Precisão	-		99,3%	
Sensibilidade	98,7%			
Especificidade	100%			
	Normal (Cerebelo + Meninge)		Tumor (Cerebelo + Meninge)	
Normal	123		3	
Tumor	12		115	
Precisão	94,1%			

A classificação dos espectros nos grupos individuais (normal – cerebelo e meninge, glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e meningioma) mostrou precisão de 85,0% (Tabela 9). Houve erro na discriminação do schwannoma; a pequena quantidade de amostras causou o agrupamento destes no glioblastoma e meningioma, o mesmo aconteceu com o meduloblastoma, os espectros se agruparam no tecido normal. Esse agrupamento pode ter ocorrido devido à semelhança espectral com o normal.

Tabela 9: Precisão na discriminação por PLS-DA de tecidos cerebrais normais (cerebelo e meninge) e tumorais (glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma e meningioma) sem agrupamento entre os tumores.

Diagnóstico Histopatológico	Diagnóstico Raman via PLS				
	Normal	Glioblastoma	Meduloblastoma	Schwannoma	Meningioma
Normal	128	0	4	0	2
Glioblastoma	1	23	0	0	4
Meduloblastoma	13	0	6	0	0
Schwannoma	0	2	0	0	6
Meningioma	2	4	0	0	68

Precisão

85,5%

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a técnica de espectroscopia Raman foi empregada para obter a concentração relativa de constituintes bioquímicos presentes em tecido cerebral, normal e tumoral do cerebelo e da meninge através da proposição de um modelo bioquímico. Os resultados demonstraram que os espectros Raman possuem picos referentes aos constituintes bioquímicos presentes nos tecidos e que tais bioquímicos apresentam concentrações diferentes nos tecidos normais e tumorais.

5.1. Comparações dos resultados espectrais com outros trabalhos

Banerjee *et al.* (2015) exploraram a eficácia da espectroscopia Raman no diagnóstico do glioblastoma multiforme em amostras de 4 pacientes diferentes, obtendo o resultado de que os espectros Raman dos 4 glioblastomas são semelhantes. Esse achado corrobora este trabalho no que se refere aos espectros mostrados dos lobos cerebrais frontal, parietal, occipital e temporal, informando que a espectroscopia Raman é uma técnica fiel aos achados bioquímicos, discriminando de forma adequada e oferecendo, assim, o diagnóstico do câncer.

Dakovic *et al.* (2013) corroboram com os resultados espectrais obtidos neste estudo através das bandas 421, 549, 703, 1089, 1132, 1179, 1268, 1300, 1442, 1661 cm^{-1} que revelam intensidade maior nos tumores de colesterol, lipídios/fosfolipídios e proteínas em relação ao tecido normal do cerebelo, relatando também que a técnica empregada tem grande sensibilidade em detectar vibrações moleculares de lipídios e proteínas.

Diem *et al.* (2013) relatam que as bandas lipídicas mais intensas encontradas em tecido cerebral são 701 cm^{-1} (colesterol) e lipídios 1063, 1268, 1439 e 1657 cm^{-1} .

Aguiar *et al.* (2013) citam que as bandas 549, 703, 1089, 1132, 1179, 1268, 1300 e 1661 cm^{-1} são atribuídas a colesterol e lipídios, sendo que a banda 549 cm^{-1} é formada por vibração molecular de colágeno e colesterol e que as intensidades dos picos de lipídios e proteínas de tumores cerebrais em toda faixa espectral são de intensidades diferentes do tecido normal. Os resultados obtidos pelos autores acima citados corroboram com os achados nesta tese nos espectros do glioblastoma e meduloblastoma, com a presença de dois picos na região espectral

de 549 e 703 cm^{-1} que evidenciam aumento significativo de bandas da molécula de colesterol no tecido do glioblastoma.

Krafft *et al.* (2005) relatam que durante a transformação do tecido cerebral normal em tumoral, tanto a composição como a concentração de lipídios mudam, portanto a análise de lipídios pode ser usada como um parâmetro diagnóstico para distinguir os tecidos normais dos tumores e que a espectroscopia Raman tem sido utilizada para detectar essas alterações mesmo em condições intra-operatórias.

O resultados de Aguiar *et al.* (2013), Banerjee *et al.* (2015) Dakovic *et al.* (2013), Diem *et al.* (2013) e Krafft *et al.* (2005) corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, já que os dados espectrais obtidos revelam alta intensidade na concentração de lipídios/fosfolipídios e proteínas em tumores e tecidos normais do cérebro.

Aguiar *et al.* (2013), Aydin *et al.* (2009), Zhou *et al.* (2012) citaram em seus trabalhos que a banda 1007 cm^{-1} é atribuída à fenilalanina, corroborando os resultados obtidos nesta tese. A banda com pico em 1007 cm^{-1} é característica na vibração do aminoácido fenilalanina das proteínas e frequentemente essas bandas estão presentes em espectros Raman de material biológico contendo proteínas. A banda espectral 1007 cm^{-1} é maior nos tumores glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma em relação ao cerebelo normal. Kalkanis *et al.* (2014) informam que a média espectral dos tecidos cerebrais normais e glioblastoma multiforme estudados tem picos e bandas maiores de lipídios, proteína e colesterol. Informam também que os espectros do tecido normal do cérebro são constituídos de lipídios e colesterol principalmente nas bandas 1300 e 1442 cm^{-1} . No tecido do glioblastoma multiforme encontram picos de proteína nas bandas 1003 e 1659 cm^{-1} , corroborando os achados espectrais deste trabalho, nas bandas com picos em 962 e 1700 cm^{-1} . Gajjar *et al.* (2013) informam que a atribuição de picos de proteínas e lipídios está associada à progressão do tumor. A alteração nos picos de colesterol e fenilalanina foram evidentes em glioma de grau IV e tumores metastáticos. Neste trabalho a banda com pico em 962 cm^{-1} evidencia a diferença de colesterol na média espectral do meningioma em relação à média espectral da meninge normal, chegando à conclusão de que existe diferença lipídica do tecido do meningioma para o tecido normal da meninge. Beljebbar *et al.* (2010) aplicaram células C6 do glioblastoma no cérebro de rato e após sua expansão, realizaram tomadas espectrais do tecido tanto *in vivo* como *in vitro*. Na análise espectral os picos atribuídos foram: 1004 cm^{-1} como

vibração de fenilalanina/proteínas, 1269 e 1661 cm^{-1} com atribuição de amida I e III, e fosfolipídios com bandas características na região espectral de 1065, 1089 e 1269 cm^{-1} . Foi relatado que a banda 961 cm^{-1} tem grande quantidade de colesterol. Esses resultados corroboram os resultados espectrais dos achados deste trabalho de tese, principalmente na banda com pico em 962 cm^{-1} encontrada nas medias espectrais do cerebelo normal, glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e meningioma, mostrando que o colesterol é parte integrante do tecido cerebral humano.

5.2. Comparações do modelo bioquímico utilizado com outros trabalhos

O uso do ajuste de espectros dos tecidos com o dos compostos puros e predominantes encontrados em tecidos cerebrais, normais e tumorais (modelo bioquímico) revelou quais componentes contribuíram para a discriminação espectral.

Alguns autores utilizaram modelos espectrais para estimar a bioquímica de tecidos biológicos, como Stone *et al.* (2007) que utilizaram a espectroscopia Raman de infravermelho médio, para estudar patologias urológicas, com o intuito de investigar alterações bioquímicas do tecido com câncer para compreender as mudanças bioquímicas no tecido, com a utilização de um modelo bioquímico semelhante ao realizado neste trabalho em que os espectros dos tecidos foram ajustados aos espectros dos constituintes bioquímicos, para obtenção das concentrações bioquímicas. Os autores chegaram ao resultado de que o modelo evidenciou diferenças do tecido normal da próstata para o tumoral nas concentrações bioquímicas de actina, colágeno I e III, colina, trioleína, ácido oleico, DNA e colesterol. O resultado obtido da concentração de colágeno neste trabalho se mostrou mais intensa no cerebelo normal seguido do glioblastoma visto pelo aumento de intensidade das bandas com picos em 549, 881 e 1453 cm^{-1} . O meningioma apresentou concentração de colágeno maior do que a meninge normal devido ao aumento da banda com pico em 1453 cm^{-1} . O resultado obtido da concentração de DNA neste trabalho demonstrou que o cerebelo normal tem pouca diferença de concentração em relação ao glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma e que a diferença de concentração do DNA da meninge em relação ao meningioma também tem uma diferença bem pequena no aumento da concentração.

Lyng *et al.* (2007) utilizaram a média dos espectros bioquímicos mais predominantes no tecido cervical, como colágeno, adenina, guanina, citosina, timina, ácido nucleico, glicose e fosfatidilcolina para então, mediante análise dos espectros obtidos do tecido cervical normal, carcinoma invasivo e não invasivo, sobrepor os espectros e detectar as bandas com picos positivos dos elementos bioquímicos nos espectros dos tecidos estudados. Constataram a contribuição espectral bioquímica obtida das bandas espectrais, demonstrando a habilidade da espectroscopia em evidenciar picos de compostos bioquímicos presentes no tecido com maior ou menor intensidade. Fizeram a análise estatística através dos componentes principais mais importantes e aplicaram a LDA, sendo que de 498 espectros, 492 foram classificados corretamente dos 6 espectros classificados de forma incorreta, 2 das amostras normais foram atribuídos a carcinoma invasivo e os outros 4 eram carcinomas invasivos. Isso mostrou que a espectroscopia Raman pode estimar a bioquímica contida nos espectros dos tecidos estudados, mesmo que a diferença de concentração dos bioquímicos seja bem pequena na comparação do tecido normal para o doente. Este trabalho indicou que 11 dos 16 compostos bioquímicos utilizados no modelo ajuste por mínimos quadrados possuíam coeficientes de ajuste positivos, sugerindo concentrações positivas, pois são compostos que possuem picos nas mesmas posições dos tecidos cerebrais normais e tumorais.

Como Lyng *et al.* (2007) também foram utilizadas neste trabalho os espectros dos compostos bioquímicos mais predominantes do tecido cerebral normal para realizar a sobreposição das médias obtidas das amostras do cerebelo, glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma, meninge e meningioma para detectar em quais bandas espectrais os compostos bioquímicos se apresentam com maior intensidade e assim ajudar na escolha dos bioquímicos mais predominantes no tecido cerebral normal, já que o aumento ou diminuição desses bioquímicos se dá pelo crescimento do tumor no tecido. Fazendo essa sobreposição de espectros foi identificado que a glicose tem picos positivos e que a sua utilização no modelo bioquímico é importante. Neste trabalho foi observado que a concentração de glicose tem maior intensidade no cerebelo normal e glioblastoma seguidos de schwannoma e meduloblastoma. A banda com pico em 853 cm^{-1} se apresentou com maior intensidade no glioblastoma, schwannoma e meduloblastoma em relação ao cerebelo normal. No meninge e meningioma, a concentração de glicose se apresentou com mais intensidade no meningioma do que a meninge, isso aconteceu

pelo aumento obtido na banda com pico 853 cm^{-1} que é maior no meningioma em relação à meninge.

Silveira *et al.* (2012) utilizaram amostras de tecidos normais e malignos da pele. Aplicaram um modelo bioquímico para diferenciar alterações de componentes bioquímicos nesses tecidos. Coletaram espectros de compostos bioquímicos como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos mais predominantes na pele humana e utilizaram o método de ajuste de mínimos quadrados (LSqF) para estimar a contribuição desses compostos para os espectros Raman dos tecidos da pele. O modelo foi aplicado sobre os espectros Raman dos compostos e espectros Raman dos tecidos levando em consideração que a contribuição espectral dos compostos bioquímicos para os espectros dos tecidos muda de acordo com a doença. Concluíram que a actina, colágeno, elastina e trioleína foram os bioquímicos mais importantes por causa das características no tecido da pele. A discriminação foi realizada pela distância Euclidiana nos dados das concentrações obtidas pelo modelo bioquímico com acertos de 91% a 93%. Mesmo não sendo de cérebro, os resultados encontrados por Silveira *et al.* (2012) corroboram com o trabalho ora apresentado. A classificação das concentrações relativas obtidas pelo modelo bioquímico neste trabalho foi realizada utilizando a análise discriminantes linear e a classificação dos espectros obtidos das amostras normais e tumorais do cérebro humano foi realizada por PLS.

Dentre os 16 compostos bioquímicos utilizados no modelo bioquímico baseado no ajuste de mínimos quadrados (LSqF) deste trabalho, 11 se mostraram com concentrações positivas nos tecidos normais e tumorais do cérebro, o que ficou constatado na análise da intensidade positiva dos coeficientes de ajuste desses elementos. O colágeno, colesterol, ácido linolênico, beta-caroteno, DNA, esfingomielina, fenilalanina, fosfatidilcolina, trioleína, glicose e sangue (hemoglobina) tiveram os picos intensos e positivos, por isso foram utilizados. Todas as concentrações obtidas pela contribuição desses compostos bioquímicos aos espectros dos tecidos cerebrais foram importantes para mostrar que existem diferenças nas concentrações do tecido normal do cérebro em relação ao tumoral.

Silveira *et al.* (2012) realizaram o teste ANOVA com $p < 0,05$ para detectar entre os compostos bioquímicos os mais significantes, este trabalho também realizou o mesmo teste para detectar o nível de significância entre as médias das concentrações, o resultado foi $p < 0,0001$, considerado extremamente significativo. O teste t não pareado também foi realizado neste

estudo, nas médias das concentrações da meninge e meningioma com resultados de $p < 0,0001$ a $p < 0,0180$, considerados extremamente significativos.

Nygren *et al.* (1996) sabendo que existe uma grande quantidade de colesterol no tecido cerebral, realizaram o estudo com tecido normal *post-mortem* e tecidos de glioma obtidos por meio de biopsias estereotáxicas. Os resultados encontrados confirmam uma concentração significativa de colesterol na concentração ($p < 0,001$). Para comparação foram realizadas as extrações químicas dos lipídios contidos nos tecidos do cérebro e do glioblastoma obtidos, como do sangue que foi colhido no momento da extração do tumor. Concluíram, mediante a comparação dos tecidos estudados, que o éster de colesterol contido no tumor e nas áreas circundantes veio do sangue e que a concentração tem um aumento significativo devido ao aumento de células no tumor, fazendo com que o colesterol seja consumido pelas células do tumor em crescimento desordenado. Por fim, relatam que existe uma alta concentração de ácido linolênico dentro do tumor glioblastoma. Os resultados de Nygren *et al.* corroboram com este trabalho, pois identificaram que existe alta concentração de colesterol e ácido linolênico em tecido cerebral normal e glioma. No modelo bioquímico aqui apresentado, foram utilizados os componentes bioquímicos colesterol e ácido linolênico, justamente devido à sua alta concentração. Essa alta concentração, relatada na plotagem das médias obtidas do modelo bioquímico, corrobora os resultados neste trabalho. Dentre os tumores desenvolvidos no cerebelo, o que apresentou maior concentração de colesterol foi o glioblastoma, seguido do meduloblastoma e schwannoma. O ácido linolênico também se apresentou com maior concentração no glioblastoma multiforme de grau IV seguido pelo schwannoma e meduloblastoma. No teste ANOVA, o valor de $p < 0,0001$ foi obtido para a concentração de colesterol e ácido linolênico do glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma.

Kast *et al.* (2014) relataram em seu estudo que a espectroscopia Raman é ideal para aplicações neurocirúrgicas, porque é uma técnica não destrutiva que não é afetada pela concentração de água e pode mapear uma boa região do tecido. Relataram que a aplicação da técnica demonstra com qualidade a informação molecular em regiões do cérebro normal, necrose, glioma infiltrante e glioblastoma e asseguram que os picos dos constituintes bioquímicos comparados com as imagens de hematoxilina e eosina identificam as regiões normais do tecido. Os picos mapeados foram 1003, 1313, 1431, 1585 e 1659 cm^{-1} , identificando

limites da matéria cinzenta e branca, necrose, glioblastoma, tumor infiltrante, determinando a concentração de lipídios, proteínas, ácido nucleico e hemoglobina, e concluindo que a técnica utilizada no estudo pode ser adaptada para mapeamento de tecido de margens dos tumores *in vivo* e de maneira não destrutiva. Os passos no futuro da espectroscopia Raman indicam o seu uso *in vivo*, como citado pelos autores acima; entretanto, estudos precisam ser mais intensificados para o uso definitivo da técnica para identificar com precisão margens cirúrgicas. Neste trabalho *in vitro* foi mencionado que existem mudanças nas concentrações dos tecidos normais do cérebro em relação ao tumoral, essas mudanças existentes e já comprovadas podem servir para outros estudos *in vivo*. Kohler *et al.* (2009) realizaram o estudo pela técnica Raman para detectar lipídios e água em gliomas. Fizeram a extração de lipídios de tecido cerebral humano e de porco, como também de glioma humano. Essa extração foi estudada com espectroscopias de massa e Raman. Os resultados mostraram que o tecido cerebral humano e de porco apresentam concentração similar de água e lipídios. Bandas Raman indicaram elevada taxa de fosfatidilcolina e colesterol no extrato lipídico do glioma. Estes achados de Kohler *et al.* corroboram com a concentração obtida no modelo bioquímico adotado nesta tese sendo que, como dito anteriormente, o glioblastoma seja na análise da média dos espectros, seja nos resultados obtidos da concentração pelo modelo bioquímico, se mostrou com alto nível de colesterol e fosfatidilcolina em relação aos outros tumores estudados, a concentração de fosfatidilcolina se mostrou intensa devido ao aumento das bandas com picos em 1066 e 1442 cm^{-1} , que são característicos da vibração molecular de fosfatidilcolina. O cerebelo normal também evidenciou aumento de colesterol, sendo o nível de concentração obtido maior que outros tumores, como o glioblastoma, meduloblastoma e o schwannoma, devido ao aumento das bandas com picos em 549 e 1661 cm^{-1} .

Silveira *et al.* (2014) utilizaram a técnica Raman para detectar alterações bioquímicas de fragmentos do câncer de próstata em comparação a fragmentos do tecido prostático benigno *in vitro*. No referido estudo, foram obtidos um total de 163 espectros. O modelo bioquímico baseado em ajuste de mínimos quadrados (LSqF) foi utilizado para calcular a concentração relativa dos compostos bioquímicos mais relevantes encontrados nos tecidos e responsáveis pelas bandas Raman como actina, elastina, leucina, glicogênio, sangue (hemoglobina), fosfatidilcolina (fosfolipídios), beta-caroteno e água. O modelo espectral foi desenvolvido ajustando os espectros

dos constituintes bioquímicos com os espectros dos tecidos da próstata. Foram obtidas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas concentrações de actina, hemoglobina, elastina, fosfatidilcolina e água para discriminação tanto dos espectros Raman dos tecidos benignos como dos malignos. Segundo Silveira *et al.*, os resultados obtidos no estudo demonstram que a espectroscopia Raman pode ser utilizada para ajudar a revelar a bioquímica da próstata para discriminação entre o tecido da próstata benigno e maligno *in vitro*. Concluem que apesar de pequenas diferenças espectrais entre próstata saudável e neoplásica, a distância Euclidiana discriminou tumores do tecido normal com sensibilidade de 75% e especificidade de 74% utilizando as concentrações bioquímicas de fosfatidilcolina e água.

O trabalho realizado por Silveira *et al.* (2014) corrobora com o modelo deste trabalho baseado em ajuste de mínimos quadrados (LSqF). Como Silveira *et al.* chegaram ao resultado de concentração bioquímica, esse trabalho também chegou às diferenças significativas da concentração bioquímica em cada tecido estudado. Como em Silveira *et al.*, também foi utilizado o beta-caroteno e o sangue, os resultados da concentração de beta-caroteno obtidos apresentaram-se maior no cerebelo normal em comparação ao glioblastoma, schwannoma e meduloblastoma. A concentração de beta-caroteno no meningioma foi maior em comparação a meninge normal. A concentração de sangue (hemoglobina) apresentou maior concentração no glioblastoma em relação ao cerebelo normal, schwannoma e meduloblastoma. Na meninge a concentração de sangue (hemoglobina) foi maior do que no meningioma, isso deve ter ocorrido pelas amostras da meninge estarem mais vascularizadas no momento da obtenção dos espectros. A classificação realizada pela LDA obteve sensibilidade, especificidade e precisão de 96,4%, 91,0% e 93,3%, respectivamente, na comparação das concentrações do cerebelo normal em relação aos tumores, e sensibilidade, especificidade e precisão de 98,7%, 100% e 99,3%, respectivamente, na comparação das concentrações da meninge em relação ao meningioma.

Beljebbar *et al.* (2008) utilizaram a microespectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (μ -FTIR) para criar um modelo espectroscópico e avaliar a química de tecidos cerebrais, normais e tumorais, como o glioma. O modelo foi construído incluindo espectros individuais de tecido normal do cérebro e do glioma, constituídos de lipídios e proteínas. Os compostos bioquímicos utilizados foram o colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomiéline, galactocerebrósídeos, ácido linolênico e

ácido oleico. Fizeram a extração de lipídios de amostras de cérebro normal de rato, parte branca (corpo caloso) e parte cinza (córtex) e de glioma induzido no cérebro do rato através da injeção de células do glioma C6. Para quantificar a alteração bioquímica entre os tecidos cerebrais normal e glioma foi realizado o ajuste das médias dos espectros dos grupos do corpo caloso, córtex e tumor com a média dos espectros dos componentes bioquímicos, objetivando quantificar as características da composição química dos tecidos cerebrais. Foi utilizado o método de mínimos quadrados múltiplos (*multiple least squares* – MLS) para ajustar os espectros das amostras com os espectros dos elementos bioquímicos. Concluíram que as partes branca e cinza do cérebro contém grande quantidade de lipídio/fosfolipídios. Segundo os autores, os resultados obtidos pelo MLS mostraram que lipídios como o colesterol têm maior quantidade na parte branca do que na parte cinza do cérebro. A fosfatidiletanolamina tem maior concentração na parte branca e a parte cinza tem maior concentração de fosfatidilcolina em relação à parte branca do cérebro. Afirmaram que o glioma tem aumento de concentração de esfingomiéline, ácido nucleico e oleico. Os autores concluíram informando que a parte branca contém maior quantidade de lipídios do que a parte cinza, e que o desenvolvimento do tumor é caracterizado pela redução total do conteúdo de lipídios, e que as proteínas e o ácido nucleico podem ser utilizados como biomarcadores espectroscópicos para se obter a diferença entre tecido cerebral normal e tumoral. O resultado obtido no trabalho citado acima corrobora com o resultado do trabalho aqui descrito porque o modelo bioquímico empregado obteve a concentração de esfingomiéline no glioblastoma acima da concentração obtida nos outros tumores meduloblastoma e schwannoma, como também a concentração de ácido nucleico no glioblastoma se apresentou maior do que nos outros tumores.

Steiner *et al.* (2003) demonstraram que a composição molecular do tecido cerebral pode ser bem detectada pela espectroscopia de infravermelho usada em conjunto com a histopatologia. Cânceres do tecido cerebral como o astrocitoma e o glioblastoma podem ser discriminados por espectros de infravermelho mediante a aferição do seu grau. Os espectros mostraram características na composição dos tecidos. Steiner *et al.* citam que é natural o aumento de lipídios no tecido cerebral normal como gangliosídeos e fosfolipídios. Entretanto, foi detectado aumento de lipídios em tumores do cérebro comparado ao tecido normal. Isso corrobora o trabalho aqui realizado, já que a concentração de lipídios e fosfolipídios evidenciados pelo modelo bioquímico

empregado neste trabalho mostra que existe aumento de lipídios nos tumores. Por exemplo, os resultados de concentração obtidos nesse trabalho apresentados nas Figuras 12 e 13 demonstram que a concentração de colesterol é maior no glioblastoma em relação ao meduloblastoma e ao schwannoma, como também de esfingomielina em relação ao schwannoma e meduloblastoma. A concentração de fosfatidilcolina apresentou um aumento significativo na média do glioblastoma em relação à média dos outros tumores e também ao tecido normal, isso se dá pela agressividade e letalidade do tumor que está correlacionada ao aumento de células tumorais devido ao processo de crescimento desordenado que requer mais nutrientes para multiplicação das células. O ácido linolênico apresentou maior concentração no cerebelo normal em relação aos outros tumores como também na meninge normal em relação ao meningioma.

Riboni *et al.* (1984) compararam os tipos de lipídios dos meningiomas em relação à meninge normal através da técnica de extração utilizando a cromatografia. Segundo eles, os elementos bioquímicos encontrados nos tumores eram os mesmos da meninge normal, mas com um padrão quantitativo diferente, como a diminuição de fosfatidilcolina e esfingomielina. As concentrações obtidas através do modelo bioquímico empregado neste trabalho evidenciaram concentração menor de fosfatidilcolina e esfingomielina no meningioma em relação à concentração obtida da meninge normal. A concentração de ácido linolênico foi maior na meninge em relação ao meningioma. Já a concentração de trioleína foi maior no meningioma em relação à meninge normal. Esses resultados demonstram que a técnica de extração associada a um modelo bioquímico pode ser eficiente se comparada até mesmo com outros métodos de quantificação bioquímica.

Peres *et al.* (2011) utilizaram a espectroscopia Raman para classificar o tecido arterial usando um modelo simplificado utilizando informações bioquímicas basais e as extraídas dos espectros Raman das artérias não ateroscleróticas, com aterosclerose e calcificadas. Segundo os autores, um total de 111 espectros Raman de fragmentos arteriais foram utilizados para desenvolver o modelo e esses espectros foram comparados com os espectros de colágeno, colesterol, células musculares lisas, cristais de cálcio e adipócito. A distância de Mahalanobis foi empregada para discriminar as concentrações bioquímicas, colesterol, colágeno e adipócito para cada tipo de tecido arterial com aterosclerose, não aterosclerose e calcificado. O modelo de diagnóstico bioquímico simplificado mostrou que o colesterol, colágeno e os adipócitos foram os

constituintes teciduais que deram a melhor capacidade de classificação. Em conclusão, afirmam que a espectroscopia Raman pode discriminar diferenças bioquímicas entre normal e placas ateroscleróticas com alta sensibilidade e especificidade. Peres *et al.* utilizaram um modelo bioquímico similar a este trabalho com o mesmo intuito de detectar as diferenças na concentração bioquímica. A concentração de colesterol obtida neste trabalho foi maior no glioblastoma em relação ao schwannoma e meduloblastoma, devido ao aumento das bandas com picos em 549 e 1661 cm^{-1} característicos de vibrações moleculares de lipídios/fosfolipídios.

Esses achados demonstraram a capacidade da técnica Raman de distinguir alterações bioquímicas em tecidos e as alterações bioquímicas encontradas entre os tecidos normais e tumorais do cérebro neste trabalho mesmo sendo pequenas revelam a diferenciação do tumor em relação ao normal.

5.3. Resultados de discriminação comparados a outros estudos

A análise de discriminação empregada neste trabalho com tecidos cerebrais também foi utilizada em outros tecidos humanos ou de animais para discriminar os espectros Raman dos grupos de tecidos.

Kraft *et al.* (2006) considerando que os gliomas são os tumores primários mais frequentes do cérebro, utilizaram a espectroscopia Raman para realizar uma abordagem diagnóstica molecular entre o tecido cerebral normal, astrocitoma de grau III e glioblastoma de grau IV. Após a obtenção dos espectros de cada tecido normal e tumoral do cérebro, os autores utilizaram os dados espectrais para criar um modelo de classificação através da LDA, obtendo o resultado de classificação de 100% de precisão nos dados espectrais do tecido cerebral normal em comparação aos dados espectrais dos gliomas e de 93% de acerto na classificação dos gliomas malignos entre si. Concluem que, pela alta taxa de sucesso, a espectroscopia Raman pode complementar métodos estabelecidos como a histopatologia e a imunohistoquímica, através da caracterização da diferença química que existe entre o tecido normal e tumoral.

Os resultados de discriminação através da LDA obtidos nesta tese realizam separação das concentrações espectrais bioquímicas de tecido normal do cerebelo e tumores glioblastoma, meduloblastoma e schwannoma, separando os dados espectrais de acordo com a concentração de colágeno, colesterol, ácido linolênico, beta-caroteno, DNA, esfingomiéline, fenilalanina, fosfatidilcolina, trioléina, glicose e sangue (hemoglobina), chegando a 93,3% de acerto na classificação. Nessa classificação por LDA das médias das concentrações bioquímicas obtidas pelo modelo, 6 espectros do grupo normal se agruparam no grupo dos tumores e dois espectros tumorais se agruparam no grupo normal. A sensibilidade da classificação foi de 96,4% e especificidade de 91,0%.

Koljenovic *et al.* (2002) estudaram tecidos do glioblastoma mediante a microscopia Raman para identificar a possibilidade de desenvolvimento de um método Raman *in vivo* para orientação intraoperatória em tempo real da biópsia cerebral. Os autores utilizaram um modelo de discriminação para classificar os dados Raman obtidos do tecido tumoral em comparação ao tecido necrótico do glioblastoma através da LDA, com acerto de 100% de precisão. Este estudo classificou por LDA concentrações obtidas de tecidos normais e tumorais do cérebro obtidas pelo modelo bioquímico LSqF, diferente dos autores citados anteriormente que desenvolveram um trabalho *in vivo*, que é excelente para aprofundar estudos com a técnica Raman, as classificações dos trabalhos tanto com espectros obtidos *in vivo* como *in vitro*, foram extremamente bem classificadas pelo modelo LDA.

Koljenovic *et al.* (2005) estudaram meningioma e meninge normal da dura mater para possível desenvolvimento de um método de diagnóstico Raman a fim de guiar a ressecção cirúrgica *in vivo*. Chegaram à conclusão que existe diferença no espectro Raman do meningioma em relação ao espectro Raman da meninge dura mater. Desenvolveram um modelo de discriminação dos espectros da meninge da dura mater e tumor baseado na LDA, obtendo acerto na classificação de 100% de precisão. Concluíram que o mínimo detalhe de diferenciação de colesterol da meninge da dura mater em relação ao meningioma foi detectado pela espectroscopia Raman e que o meningioma pode ser distinguido da meninge da dura mater pelos espectros Raman. Os resultados de Koljenovic *et al.* corroboram com os resultados alcançados nesta tese na parte de discriminação das concentrações bioquímicas da meninge e meningioma através da LDA. Os resultados ora obtidos da concentração estimadas pelo Raman nos grupos da

meninge e meningioma também tiveram uma excelente discriminação, em torno de 99,3% de precisão no acerto com 98,7% de sensibilidade e 100% de especificidade. Isto demonstra que o emprego da análise de discriminação foi satisfatório. Na classificação por LDA todos os 69 espectros das concentrações da meninge normal ficaram no seu grupo e nenhum foi para o grupo dos tumorais, já os 73 espectros correspondentes as concentrações obtidas para o meningioma 73 ficaram no grupo do meningioma e um espectro se agrupou no grupo dos espectros das concentrações da meninge normal.

Mehta *et al.* (2018) utilizaram a LDA para diferenciar espectros da meninge normal em relação ao meningioma. Esses espectros foram classificados pela LDA que utilizou os 10 PCs que carregam a maior variação espectral, obtendo 92% de precisão no acerto. O acerto na classificação por LDA dos autores mencionados ficou abaixo do acerto na classificação deste trabalho, que foi de 99,3%, bem próximo de 100% de precisão no acerto. A precisão de 100% não ocorreu devido um espectro de concentração do meningioma se agrupar no grupo das concentrações da meninge.

Zhou *et al.* (2012) examinaram tecidos cerebrais humanos (meningioma, meninge normal, glioblastoma multiforme, neuroma acústico, adenoma pituitário benigno) *in vitro*, pela espectroscopia Raman em um sistema micro-Raman de 532 nm e deslocamento espectral na faixa de 200 a 4000 cm^{-1} . Para discriminar os dados espectrais eles utilizaram os algoritmos de máquina de vetores de suporte (*support vector machine* – SVM) e análise de componente principal (*principal component analysis* – PCA), para detectar qual o componente principal carregava mais informações espectrais. No entanto, o que corrobora os resultados deste trabalho ora apresentado são os resultados via Raman em tecidos cerebrais da meninge, meningioma e glioblastoma. Nesta pesquisa, os resultados de classificação por LDA das concentrações obtidas da meninge normal e meningioma alcançaram 99,3%, com sensibilidade de 98,7% e especificidade de 100%. Caso o estudo citado acima tivesse sido realizado com a classificação dos dados espectrais cerebrais obtidos por LDA, os resultados poderiam ser mais bem representados, já que neste trabalho a classificação por LDA demonstrou excelente classificação.

Gajjar *et al.* (2013) utilizaram a espectroscopia Raman e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no diagnóstico de tecidos cerebrais humanos, onde a associação com a análise multivariada ampliou a discriminação entre tecidos do cérebro

normal e diferentes tipos de tumores (meningioma, glioma e metástases cerebrais), através da informação espectral de lipídios e proteínas. Fizeram a análise multivariada dos dados com a LDA e PCA-LDA. A PCA foi empregada e apontou os componentes presentes nos dados originais que carregam 95% da variação espectral. A significância estatística de contribuição de cada discriminante linear foi determinada pela análise ANOVA. Concluíram também que a diferença dos PCs dos tumores em relação aos tecidos normais é estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Diferentemente do trabalho citado, este trabalho não utilizou PCA-LDA para obter quais componentes principais carregam 95% da variação espectral, e sim a LDA na classificação das concentrações obtidas pelo modelo bioquímico, as concentrações obtidas foram extremamente significativas entre si ($p < 0,05$), isso demonstra que a técnica Raman detecta diferenças entre espectros de tecidos normais e tumorais independente do tipo de classificação usada para o diagnóstico espectral.

Abramczyk *et al.* (2017) usaram a espectroscopia Raman para discriminação de um tumor cerebral humano (meduloblastoma) em comparação a amostras de tecidos normais do cérebro. Basearam-se nos espectros Raman como também nas imagens Raman obtida através do microscópio. Utilizaram o PLS para discriminar os dados Raman do tumor cerebral e dos tecidos normais para auxiliar a espectroscopia Raman em diferenciar os grupos que carregam semelhanças espectrais idênticas, obtendo sensibilidade e especificidade de 98,5% e 96%, respectivamente. Neste trabalho foi utilizada uma amostra de meduloblastoma, tumor cerebral raro, no qual a média espectral mostrou diferenças significativas em comparação as médias espectrais do glioblastoma, schwannoma e cerebelo normal, principalmente em bandas com picos de lipídios/fosfolipídios. Os espectros obtidos do meduloblastoma foram classificados pelo PLS, no grupo do cerebelo tumor, obtendo 97,5% de precisão na classificação em comparação ao grupo cerebelo normal. Na classificação entre grupo normal (cerebelo + meninge) e tumor (cerebelo + meninge) a precisão na classificação por PLS foi de 94,1%.

Kelly *et al.* (2011) detectaram espectros Raman representativos de biomoléculas presentes em amostras biológicas. Segundo os autores, o material celular produz informações complexas devido às ligações químicas. Incluíram algumas análises multivariadas, como a análise dos componentes principais (PCA), mínimos quadrados parciais (PLS), análise discriminante linear (LDA). Na classificação por PCA, o estudo demonstrou que os 3

componentes principais PCs carregam a maior variância espectral que chega a 99%. O resultado apresentado pelos autores cita que os espectros Raman carregam informações de ligações moleculares de amostras biológicas, e este trabalho demonstrou que os tecidos cerebrais normais e tumorais possuem diferenças bioquímicas e que a obtenção das concentrações bioquímicas permitiu o diagnóstico por LDA e PLS.

Jong *et al.* (2006) utilizaram a LDA para classificação entre os tecidos tumorais e normais da bexiga. Concluíram que a LDA permitiu 98,7% de acertos na classificação de tecidos normais em relação aos tumorais da bexiga, com sensibilidade de 100% e especificidade de 95%, concluindo que a classificação dos tecidos tem alta precisão utilizando LDA. Como Jong *et al.*, nesta pesquisa também foi obtida uma ótima classificação através da LDA. O emprego da LDA neste estudo apresentado foi eficiente em classificar os tecidos normais e tumorais do cerebelo com acerto de 93,3%, e na meninge e meningioma com acerto de 99,3%, e sensibilidade e especificidade de 96,4% e 91,0% para cerebelo normal e tumores, e 98,7% e 100% para meninge e meningioma.

Silveira *et al.* (2012) utilizaram espectroscopia Raman para discriminar lesões da pele de tecidos normais através da análise de componentes principais PCA-DA e também pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais PLS-DA baseadas nas distâncias de Mahalanobis e Euclidiana, obtendo um total de acerto na classificação de 82,8% a 91,9%, chegando à conclusão geral do trabalho de que a PCA e a PLS podem discriminar os espectros Raman dos tecidos da pele. Schleusener *et al.* (2015) também utilizaram a espectroscopia Raman para avaliar tecidos da pele e realizaram a classificação dos dados espectrais através da análise discriminante PLS-DA com precisão de acertos em torno de 85%.

Portanto, é evidente que não só Silveira *et al.* (2012) obtiveram acertos de classificação satisfatórios mas Schleusener *et al.* (2015) e Kelly *et al.* (2011) mostraram a mesma precisão da discriminação em outros tecidos humanos mediante a PLS-DA, corroborando o achado de que esse modelo discriminante de dados é eficiente em análise de tecidos tumorais versus benignos e normais via espectroscopia Raman.

Hedegaard *et al.* (2010) utilizaram a técnica Raman para distinguir células tumorais de camundongos que disseminam metástase e se agregam em órgãos. A discriminação dos espectros

Raman foi realizada através da PLS-DA, chegando ao resultado de 92% de acerto na classificação das amostras.

Nesta tese foi utilizada a PLS-DA para discriminação dos espectros obtidos dos tecidos normais do cerebelo e da meninge, assim como dos tumores glioblastoma, meduloblastoma, schwannoma e meningioma. O estudo obteve êxito na classificação dos espectros divididos em grupos normais e tumorais de 97,5% a 99,3% e em todos os espectros juntos de 94,1%. Esse resultado mostra a capacidade da espectroscopia Raman em distinguir pequenas diferenças entre os dados discriminados a nível molecular, e corrobora este estudo no sentido de que mesmo em tecidos diferentes do cérebro humano como no de animais, os dados Raman contém informações importantes para a classificação por PLS.

Dreissig *et al.* (2009) extraíram lipídios da parte branca e parte cinza do cérebro de um suíno. Após essa extração, espectros Raman foram obtidos dos compostos bioquímicos e um modelo de quantificação foi criado para os principais lipídios, baseado na PLS. Os extratos lipídicos que foram previstos pela regressão PLS dos espectros de Raman foram comparados com a quantificação lipídica por cromatografia. A discriminação com PLS foi eficiente e corroborou o êxito no emprego dessa análise de classificação no estudo dos espectros utilizados. Neste trabalho, a classificação por PLS mostrou eficiência em classificar todos os espectros dos grupos com 85.5% de acerto; a discrepância que ocorreu na classificação dos espectros considerando os grupos individualmente foi nos espectros do schwannoma que nenhum se agrupou no seu grupo; 6 espectros se agruparam no grupo meningioma e 2 espectros no grupo glioblastoma. Esse erro pode ter ocorrido devido as amostras serem do mesmo fragmento, porque nas outras classificações (cerebelo normal e tumor) e (normal e tumor) os espectros do schwannoma obtiveram excelente classificação.

5.4. Possibilidades da técnica Raman no futuro diagnóstico

A espectroscopia Raman tem vantagem sobre as técnicas de diagnóstico de tumores pelo motivo de não requerer nenhum método preparatório da amostra que será utilizada para gerar a informação espectral, seja *in vivo* ou *in vitro*. As desvantagens seriam alta fluorescência que existe em acordo com o tipo de amostra estudada, baixa sensibilidade para sinais Raman fracos,

que levam a tempo longo nas aquisições e análise de dados. Por sua vez, a técnica de imunohistoquímica requer procedimentos demorados para integrar a amostra ao método de análise. A biópsia óptica promovida pela técnica Raman tem potencial para ser utilizada como complemento às técnicas investigativas atuais, aprimorando os resultados na detecção de margens cirúrgicas para retirada de tumores cerebrais.

Alguns desenvolvimentos precisam ser realizados acerca da técnica de espectroscopia Raman, como o melhoramento da produção do sinal sem interferências ambientais, desenvolvimento de sondas para biópsias *in vivo* e ferramentas para acessos mais profundos nos diagnósticos *in vivo*. O tempo de aquisição dos espectros deve ser reduzido para que seja mais rápida a identificação da constituição bioquímica de margens tumorais para auxiliar a remoção de tumores cerebrais no momento cirúrgico.

O uso da técnica Raman está sendo empregada em estudos na área *in vivo*. Jermyn *et al.* (2016) citam que as células invasivas do câncer cerebral não podem ser visualizadas durante a cirurgia, e não sendo removidas, gerando ocorrência de recidivas. A espectroscopia Raman pode detectar essas células cancerosas invasivas em pacientes com glioma de graus 2 e 4. Eles citam que o sinal Raman pode sofrer interferências devido às luzes da sala de cirurgia e que o uso de redes neurais artificiais melhora esse sinal.

Desroches *et al.* (2018) relataram que as técnicas atuais de diagnóstico do câncer se utilizam de biópsia de agulha direcionada, sendo que muitas vezes ocorrem erros de direcionamento fazendo com que sejam realizadas biópsias repetidas, o que eleva o risco ao paciente. O uso da espectroscopia Raman superficial, precedendo a biópsia tradicional do cérebro, pode analisar o tecido antes da remoção, prevenindo erros de localização.

Hollon *et al.* (2016) informaram que a identificação do tumor é um desafio e que a técnica Raman através da microscopia de espalhamento Raman coerente (CRS) permite imagens histológicas para detectar as margens tumorais em tempo real sem a necessidade de processamento, corte ou coloração de tecidos.

Uckermann *et al.* (2014) utilizaram o microscópio com espalhamento Raman anti-Stokes para fornecer imagens e propriedades de tecidos do cérebro de ratos com tumores induzidos como o glioblastoma, câncer de mama e metástases cerebrais de melanoma. Chegaram à conclusão de que o contraste das imagens possibilitou a identificação de tumores cerebrais e a

espectroscopia Raman permitiu identificar o conteúdo lipídico total dos tumores. A técnica se demonstrou mais eficaz na detecção de tumores glioblastoma, do que nas metástases.

Eberhardt *et al.* (2017) relatam as vantagens da técnica Raman para diagnóstico molecular. Os autores registram que a técnica é não destrutiva e não invasiva, exige preparação mínima da amostra, não necessita de nenhum tipo de corante ou produtos tóxicos (*label free*), possui alta especificidade, possibilidade de aplicação da fibra óptica *in vivo* em órgãos ocos e é essencial na análise química na classificação de amostras biológicas. Concluem que, com o desenvolvimento de fibras ópticas, a espectroscopia Raman pode ser utilizada em conjunto com a endoscopia.

Zengh *et al.* (2014) informaram que os espectrômetros portáteis têm qualidade espectral inferior aos de bancada, devido à menor sensibilidade, faixa de varredura e potência do laser. A pesquisa realizada nesta tese foi feita com um espectrômetro de bancada, com alta sensibilidade, alta resolução e potência do laser ajustável. Seria necessário que os espectrômetros portáteis tivessem a mesma qualidade dos espectrômetros de bancada.

Li *et al.* (2017) utilizaram um espectrômetro Raman em miniatura (785 nm de excitação) para detecção do câncer de mama *in vitro*, mas devido à baixa relação sinal/ruído espectral foi difícil obter uma discriminação espectral usando o espectrômetro para o diagnóstico precoce do câncer de mama.

Atualmente, softwares são utilizados via Raman para aquisição e análise de dados. O sistema Renishaw[®] Raman identifica e diferencia, por exemplo, células do câncer de células normais, células tronco de outro tipo de células, conteúdo lipídico das células do câncer para melhor entender sua diferenciação, alterações de DNA em células do câncer em comparação com as células normais. Ainda adquire informações químicas por meio de procedimentos não invasivos por fibra óptica, obtém o espectro completo com informações químicas de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios.

A Horiba Scientific desenvolveu um equipamento de espectroscopia Raman miniaturizado que disponibiliza sonda Raman compacta com CCD refrigerado, obtendo resultado com uma faixa espectral de 200 a 1800 cm^{-1} , com comprimento de onda em 532, 660 e 785 nm com potência entre 50 e 300 mW. A Horiba dispõe de um software chamado LabSpec 6, que traz algumas funcionalidades importantes na aquisição e análise de dados Raman, possui

análise multivariada de dados complexos como PCA, PLS, método clássico de mínimos quadrados (CLS) e resolução de curvas multivariadas (MCR).

Todos esses avanços demonstram que a técnica vem se aperfeiçoando no passar dos anos e em breve estará pronta para ser usada como um método de diagnóstico molecular sem necessidade de nenhum preparo da amostra e com resultado em tempo real. A técnica Raman tem atingido grandes avanços ao longo dos mais de 15 anos de estudo e tem mostrado sua eficiência para possível uso no dia a dia na parte clínica permitindo um diagnóstico confiável.

Um desafio futuro para a técnica Raman é aperfeiçoar a sua utilização em conjunto com a biopsia estereotáxica, no diagnóstico de lesões expansivas, fornecendo uma biopsia correta do tecido cerebral acometido com o tumor, evitando o erro na biópsia.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que a técnica de espectroscopia Raman se mostrou eficiente na obtenção da concentração dos constituintes bioquímicos do tecido cerebral através do modelo baseado em ajuste de mínimos quadrados (LSqF) e na discriminação por LDA utilizando os dados das concentrações e na discriminação por PLS utilizando os espectros totais dos tecidos cerebrais normais e tumorais.

Com relação à concentração dos elementos bioquímicos estimada pelo modelo, os tecidos do cerebelo normal e glioblastoma tiveram maiores concentrações de fosfatidilcolina, enquanto os tecidos do schwannoma tiveram maiores concentrações de fenilalanina comparativamente ao tecido do glioblastoma, com o valor de $p < 0.0001$ para o elemento fosfatidilcolina e $p < 0.0001$ para o elemento fenilalanina. A meninge teve maior concentração do elemento bioquímico ácido linolênico em comparação ao meningioma, com valor de $p < 0.0001$ para o elemento ácido linolênico.

Os resultados de discriminação pela LDA utilizando as concentrações dos constituintes bioquímicos obteve precisão de 93,3% entre o tecido normal e tumoral do cerebelo e precisão de 99,3% entre a meninge e o meningioma. A classificação espectral via LDA entre os grupos do cerebelo, meduloblastoma, glioblastoma e schwannoma utilizando as concentrações bioquímicas mostrou sensibilidade de 96,4% e especificidade de 91,0%. No grupo espectral das concentrações obtidas da meninge e meningioma, a classificação por LDA obteve sensibilidade de 98,7% e especificidade de 100%. O modelo de discriminação baseado na PLS utilizando todo o espectro obteve precisão de 94,1% na classificação dos dados espectrais do normal (cerebelo e meninge) e tumores (glioblastoma, schwannoma, meduloblastoma, meningioma). Na classificação dos dados espectrais da meninge em comparação ao meningioma, o modelo PLS-DA obteve precisão de 99,3%, com sensibilidade de 98,7% e especificidade de 100%. Na classificação dos dados espectrais do cerebelo normal e tumores pela PLS-DA, a precisão foi de 97,5%, com sensibilidade de 98,2% e especificidade de 96,9%.

O estudo realizado com a espectroscopia Raman na comparação de tecidos cerebrais normais e tumorais obteve resultados importantes que contribuem para incentivar novos

trabalhos em oncologia buscando avanços da técnica para utilização clínica, principalmente *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMCZYK, H.; IMIELA, A. The biochemical, nanomechanical and chemometric signatures of brain cancer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 188, p. 8-19, 2017.

AGUIAR, R. P. **Discriminação de Tecidos Cerebrais Normais e Tumorais Através da Espectroscopia Raman: Estudo *In Vitro***. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado Bioengenharia) - Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, 2012.

AGUIAR, R. P.; SILVEIRA, L.; FALCÃO, E. T.; PACHECO, M. T. T.; ZÂNGARO, R. A.; PASQUALUCCI, C. A. Discriminating neoplastic and normal brain tissues in vitro through Raman spectroscopy: a principal components analysis classification model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 12, p. 1-10, 2013.

ALIFIERES, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: **Pathogenesis and treatment. Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 63-82, 2015.

AYDIN, O.; ALTAS, M.; KAHRAMAN, M.; BAYRAK, F. O.; CULHA, M. Differentiation of healthy brain tissue and tumors using surface-enhanced raman scattering. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 63, n. 10, p. 1095-1100, 2009.

BANERJEE, H. N.; BANERJI, A.; BANERJEE, N. A.; RIDDICK, E.; PETIS, J.; EVANS, S.; PATEL, M.; PARSON, C.; SMITH, V; GWEBU, E.; VOISIN, S. Deciphering the finger prints of brain cancer glioblastoma multiforme from four different patients by using near infrared Raman spectroscopy. **Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 44-47, 2015.

BATASH, R.; ASNA, N.; SCHAFFER, P.; FRANCIS, N.; SCHAFFER, M. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 27, p. 3002-3009, 2017.

BELJEBBAR, A.; AMHARREF, N.; LÉVÈQUES, A.; DUKIC, S.; VENTEO, L.; SCHNEIDER, L.; PLUOT, M.; MANFAIT, M. Modeling and quantifying biochemical changes in C6 tumor gliomas by fourier transform infrared imaging. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 22, p. 8406-8415, 2008.

BELJEBBAR, A.; DUKIC, S.; AMHARREF, N.; MANFAIT, M. Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 477-487, 2010.

BENZ, L. S.; WRENSCH, R. M.; SCHILDKRAUT, M. J.; BONDY, L. M.; WARREN, L. J.; WIEMELS, L. J.; CLAUS, B. E. Quality of life after surgery for intracranial meningioma. **Cancer**, v. 124, n. 1, p. 161-166, 2018.

BERG, J. **Bioquímica**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 350,459.

BERTOLUCCI, P. H. F. **Neurologia para o Clínico Geral**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2014, p. 456.

BIKMUKHAMETOVA, L. R.; ROMANISHKIN, D.; SAVELIEVA, T. A.; SKOBELTSIN, A. S.; MAKLYGINA, YU. S.; LOSCHENOV, V. B.; KOSYRKOVA, A. V.; GORYAJNOV, S. A.; POTAPOV A. A. Spontaneous Raman spectroscopy for intracranial tumor diagnostics. **Journal of Physics**, v. 1439, p. 15-20, 2020.

BRASILEIRO FILHO, G. **Blogliolo Patologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 1006.

BRENNAN, J. F.; RÖMER, T. J.; LEES, R. S.; TERCYAK, A. M.; KRAMER, J. R.; FELD, M. S. Determination of human coronary artery composition by Raman spectroscopy. **Circulation**, v. 96, n. 1, p. 99-105, 1997.

BROW, T. A. **Bioquímica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 89, 242, 254.

CHEN, M. Y. M.; POPE, T. L.; OTT, D. J. **Radiologia Básica**. 2ª ed. Porto Alegre: MacGrawHill: Brasil, 2012.

DAKOVIC, M.; STOJILJKOVIĆ, A. S.; BAJUK-BOGDANOVIĆ, D.; STARČEVIĆ, A.; PUŠKAŠ, L.; FILIPOVIĆ, B.; USKOKOVIĆ-MARKOVIĆ, S.; HOLCLAJTNER-ANTUNOVIĆ, I. Profiling differences in chemical composition of brain structures using Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 117, p. 133-138, 2013.

DESROCHES, J.; JERMYN, M.; MOK, K.; LEMIEUX-LEDUC, C.; MERCIER, J.; ST-ARNAUD, K.; URMEY, K.; GUIOT, M. C.; MARPLE, E.; PETRECCA, K.; LEBLOND, F. Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification. **Biomedical Optics Express**, v. 6, n. 7, p. 2380-2397, 2015.

DEVPURA, S.; PALYVODA, O.; KALKANIS, S.; NAIK, V. M.; SIDDIQUI, F.; NAIK, R.; CHETTY, I. J. Vision 20/20: The role of Raman spectroscopy in early stage cancer detection and feasibility for application in radiation therapy response assessment. **Medical Physics**, v. 41, n. 5, p. 050901-050915, 2014.

DIEM, M.; MAZUR, A.; LENAU, K.; SCHUBERT, J.; BIRD, B.; MILJKOVIĆ, M.; KRAFFT, C.; POPP, J. Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging. **Journal of Biophotonics**, v. 6, n. 11-12, p. 855-886, 2013.

DREISSIG, I.; MACHILL, S.; SALZER, R.; KRAFFT, C. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p. 5, p. 2069-2075, 2009.

EBERHARDDT, K.; STIEBING, C.; MATTHÄUS, C.; SCHMITT, M.; POPP, J. Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 6, p. 773-787, 2015.

FISHER, R. A. The use of multiple measurements in taxonomic problems. **Annals of Eugenics**, v. 7, n. 2, p. 179-188, 1936.

FRANZEN, L.; WINDBERGS, M. Applications of Raman spectroscopy in skin research – From skin physiology and diagnosis up to risk assessment and dermal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.89, p. 91-104, 2015.

GAJJAR, K.; HEPPESTALL, L. D.; PANG, W.; ASHTON, K. M.; TREVISAN, J.; PATEL, I. I.; LLABJANI, V.; STRINGFELLOW, F. H.; MARTIN-HIRSCH P. L.; DAWSON, T.; MARTIN, F. L. Diagnostic segregation of human brain tumours using Fourier-transform infrared and/or Raman spectroscopy coupled with discriminant analysis. **Analytical Methods**, v. 5, p. 89-102, 2013.

GOLDBRUNNER, R.; MINNITI, G.; PREUSSER, M.; JENKINSON, M. D.; SALLABANDA, K.; HOUDART, E.; DEIMLING, A.; STAVRINOU, P.; LEFRANC, F.; LUND-JOHANSEN M.; COHEN-JONATHAN M. E.; BRANDSMA, D.; HENRIKSSON, R.; SOFFIETTI, R.; WELLER, M. Eano guidelines for the diagnosis and treatment of meningiomas. **Lancet Oncology**, v.17, n. 9, p. e383-e391, 2016.

HAJJAWI, O. Human brain biochemistry. **American Journal of BioScience**, v. 2, n. 4, p. 122-134, 2014.

HAKA, A. S.; SHAFER-PELTIER, K. E.; FITZMAURICE, M.; CROWE, J.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy. **Cancer Research**, v. 62, n. 18, p. 5375-5380, 2002.

HANLON, E. B.; MANOHARAN, R.; KOO, T. W.; SHAFER, K. E.; MOTZ, J. T.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J. R.; ITZKAN, I.; DASARI, R. R.; FELD, M. S. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine & Biology**, v. 45, n.2, R1-R59, 2000.

HEDEGAARD, M.; KRAFFT, C.; DITZEL, H. J.; JOHANSEN, L. E.; HASSING, S.; POPP, J. Discriminating isogenic cancer cells and identifying altered unsaturated fatty acid content as associated with metastasis status, using k-means clustering and partial least squares-discriminant analysis of Raman maps. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 7, p. 2797-2802, 2010.

HOLLON, T.; LEWIS, SPENCER.; FREUDIGER, C. W.; XIE, X. S.; ORRINGER, D. A. Improving the accuracy of brain tumor surgery via Raman-based technology. **Neurosurgical Focus**, v. 40, n. 3, p. E9, 2016.

HORIBA. **Raman Imaging and Spectrometers**. Disponível em: <https://www.horiba.com/en_en/products/by-segment/scientific/surface-characterization/raman-imaging-and-spectrometers/>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2020.

INCA. **Estimativa triênio 2020/2022**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>> Acesso em 23 de agosto de 2020.

JERMYN, M.; DESROCHES, J.; MERCIER, J.; TREMBLAY, M. A.; ST-ARNAUD, K.; GUIOT, M. C.; PETRECCA, K.; LEBLOND, F. Neural networks improve brain cancer detection with Raman spectroscopy in the presence of operating room light artifacts. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 9, p. 94002, 2016.

JERMYN, M.; MOK, K.; MERCIER, J.; DESROCHES, J.; PICHETTE, J.; SAINT-ARNAUD, K.; BERNSTEIN, L.; GUIOT, M. C.; PETRECCA K.; LEBLOND, F. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 274, p. 274ra19, 2015.

JONG, B. W. D.; SCHUT, T. C. B.; MAQUELIN, K.; KWAST, T.; BANGMA, C. H.; KOK, D. J.; PUPPELS, G. J. Discrimination between non tumor bladder tissue and tumor by Raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 22, p. 7761-7769, 2006.

KALKANIS, S. N.; KAST, R. E.; ROSENBLUM, M. L.; MIKKELSEN, T.; YURGELEVIC, S. M.; NELSON, K. M.; RAGHUNATHAN, A.; POISSON, L. M.; AUNER, G. W. Raman spectroscopy to distinguish grey matter, necrosis, and glioblastoma multiforme in frozen tissue sections. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 116, n. 3, p. 477-485, 2014.

KALLAWAY, C.; ALMOND, L. M.; HUGH, B.; WOOD, J.; HUTCHINGS, J.; KENDALL, C.; STONE, N. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 207-219, 2013.

KAST, R. E.; AUNER, G. W.; ROSENBLUM, M. L.; MIKKELSEN, T.; YURGELEVIC, S. M.; RAGHUNATHAN, A; POISSON, L. M.; KALKANIS, S. N. Raman molecular imaging of brain frozen tissue sections. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 120, n. 1, p. 55-62, 2014.

KATRIB, A.; JEONG, H. H.; FRANSEN, N. L.; HENZEL, K. S.; MILLER, J. A. An inflammatory landscape for preoperative neurologic deficits in glioblastoma. **Frontiers in Genetics**, v.10, p. 1-10, 2019.

KELLY, J. G.; TREVISAN, J.; SCOTT, A. D.; CARMICHAEL, P. L.; POLLOCK, H. M.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; MARTIN, F. L. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: a multistage approach linking computational analysis with biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v.10, n. 4, p. 1437-1448, 2011.

KIRSCH, M.; SCHACKERT, G.; SALZER, R.; KRAFFT, C. Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 4, p. 1707-1713, 2010.

KOHLER, M.; MACHILL, S.; SALZER R.; KRAFFT, C. Characterization of lipid extracts from brain tissue and tumors using Raman spectroscopy and mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 5, p. 1513-1520, 2009.

KOLJENOVIC, S.; CHOO-SMITH, L. P.; SCHUT, T. C. B.; KROS, J. M.; BERGE, H. J.; PUPPELS, G. J. Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 10, p. 1265-1277, 2002.

KOLJENOVIC, S.; SCHUT, T. B.; VINCENT, A.; KROS, J. M.; PUPPELS, G. J. Detection of meningioma in dura mater by Raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 24, p. 7958-7965, 2005.

KRAFFT, C.; NEUDERT, L.; SIMAT, T.; SALZER, R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 7, p. 1529-1535, 2005.

LEBART, L.; MORINEAU, A.; PIRON, M. **Statistique Exploratoire Multidimensionnelle**. Dunod: Paris, 1995.

LESLIE, D. G.; KAST, R. E.; POULIK, J. M.; RABAH, R.; SOOD, S.; AUNER, G. W.; KLEIN, M. D. Identification of pediatric brain neoplasms using Raman spectroscopy. **Pediatric Neurosurgery**, v. 48, n. 109-117, 2012.

LI, Q.; HAO, C.; XU, Z. Diagnosis of breast cancer tissues using 785 nm miniature Raman spectrometer and pattern regression. **Sensors**, v. 17, n. 3, p. 1-10, 2017.

LOPES, B.; RAMOS, I. C. O.; RIBEIRO, G.; CORREA, R.; VALBON, B. FREITAS.; LUZ, A. C.; SALOMÃO, M.; LYRA, J. M.; AMBRÓSIO, R. Bioestatísticas: conceitos fundamentais e aplicações práticas. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 73, n. 1, p. 16-22, 2014.

LOUIS, D. N. OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. WHO classification of tumors of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LYNG, F. M.; FAOLÁIN, E. O.; CONROY, J.; MEADE, A. D.; KNIEF, P.; DUFFY, B.; HUNTER, M. B.; BYRNE, J. M.; KELEHAN, P.; BYRNE, H. J. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 82, n. 2, p. 121-129, 2007.

MAITRA, S.; YAN, J. Principle component analysis and partial least squares: two dimension reduction techniques for regression. **Casualty Actuarial Society**, p. 79-90, 2008. Disponível em: <<https://www.casact.org/pubs/dpp/dpp08/08dpp76.pdf>>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

MATHWORKS. **Least-Squares Fitting**. Disponível em: <<https://www.mathworks.com/help/curvefit/least-squares-fitting.html>>. Acesso em: 15 de outubro de 2020.

MARIA, C. A. B. **Bioquímica Básica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2014. p. 97.

MARTINEZ, A. **Neuroanatomia Essencial**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 6.

MARZZOCO, A. **Bioquímica Básica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 170.

MEHTA, K.; ATAK, A.; SAHU, A.; SRIVASTAVA, S.; KRISHNA C. M. An early investigative serum Raman spectroscopy study of meningioma. **Analyst**, v. 143, n. 8, p. 1916-1923, 2018.

MENESES, M. **Neuroanatomia Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 2 e 228.

MIZUNO, A.; KAWAUCHI, K.; MURAISHI, S.; OZAKI, Y. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic study of human brain tissues and tumours. **Journal Raman Spectroscopy**, v. 25, p. 25-29, 1994.

MOLER, C. Least squares, in numerical computing with matlab: electronic edition. **The MathWorks Inc**, 2008.

- MORSY, A. A.; NG, W. H. Re-do craniotomy for recurrent glioblastoma. **CNS Oncology**, v. 4, n. 2, p. 55-57, 2015.
- MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 493-541, 2007.
- NUNES, A. C.; FREITAS, P. M.; PINHEIRO, M. C. A.; BASTOS, C. S. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.
- NYGREN, C.; HOLST, H.; MÅNSSON, J. E.; FREDMAN, P. Increased levels of cholesterol esters in glioma tissue and surrounding areas of human brain. **British Journal of Neurosurgery**, v. 11, n. 3, p. 216-20, 1997.
- OHGAKI, H. Epidemiology of brain tumors. **Methods in Molecular Biology**, v. 472, p. 323-342, 2009.
- PERES, M. B.; SILVEIRA, L.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; PASQUALUCCI, C. A. Classification model based on Raman spectra of selected morphological and biochemical tissue constituents for identification of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 5, p. 645-655, 2011.
- PINTO, F. G. C. **Manual de Iniciação em Neurocirurgia**. 2ª ed. São Paulo: Santos, 2012. p. 160.
- PINTO, W. J. **Bioquímica Clínica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. pg. 30, 96, 100, 108, 409.
- RAMAN, C.; KRISHNAN, K. A new type of secondary radiation. **Nature**, v. 121, p. 501-502, 1928.
- RAMANUJAM N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. **Neoplasia**, v. 2, p. 89-117, 2000.
- RENISHAW. **Espectroscopia Raman**. Disponível em: <<https://www.renishaw.com.br/pt/raman-spectroscopy--6150>>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2020.
- RIBONI, L.; GHIDONI, R.; SONNINO, S.; OMODEO-SALÈ, F.; GAINI, S. M.; BERRA, B. Phospholipid content and composition of human meningiomas. **Neurochemical Pathology**, v. 2, n. 3, p. 171-188, 1984.
- RODWELL, V. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2017. p. 46.
- ROWLAND, L. **Merrit-Tratado de Neurologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

- SACKHEIM, G. **Química e Bioquímica para Ciências Biomédicas**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2001. p. 400.
- SALONER, D.; UZELAC, A.; HETTS, S.; MARTIN, A.; DILLON, W. Modern meningioma imaging techniques. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 99, n. 3, p. 333-340, 2010.
- SCHLEUSENER, J.; GLUSZCZYNSKA, P.; REBLE, C.; GERSONDE, I.; HELFMANN, J.; FLUHR, J. W.; LADEMANN, J.; RÖWERT-HUBER, J.; PATZELT, A.; MEINKE, M. C. In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 10, p. 767-772, 2015.
- SHIBASAKI, T.; UKI, J.; KANO, T.; KAWAFUCHI, J. Composition of free amino acids in brain tumors. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 60, p. 301-311, 1979.
- SIGMA ALDRICH. **Lipídios, Fosfolipídios e Proteínas**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 20 outubro 2020.
- SILVEIRA, L. **Correlação entre a Técnica de Espectroscopia Raman e a Análise Histopatológica das Placas Ateromatosas em Artéria Coronárias Humanas**. 2001. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVEIRA, L.; LEITE, K. R. M.; SILVEIRA, F. L.; SROUGI, M.; PACHECO, M. T. T.; ZÂNGARO, R. A.; PASQUALUCCI, C. A. Discrimination of prostate carcinoma from benign prostate tissue fragments in vitro by estimating the gross biochemical alterations through Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 4, p. 1469-1477, 2014.
- SILVEIRA, L.; SILVEIRA, F. L.; BODANESE, B.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 7, p. 077003, 2012.
- SNELL, R. **Neuroanatomia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 70.
- SOUZA, S. E. M. **Tratamento das Doenças Neurológicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 325.
- STEINER, G.; SHAW, A.; CHOO-SMITH, L. P.; ABUID, M. H.; SCHACKERT, G.; SOBOTTKA, S.; STELLER, W.; SALZER, R.; MANTSCH, H. H. Distinguishing and grading human gliomas by IR spectroscopy. **Biopolymers**, v. 72, n. 6, p. 464-471, 2003.
- STONE, N.; KENDALL, C.; SMITH, J.; CROW, P.; BARR, H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discussions**, v. 126, p. 141-157, 2004.

STONE, N.; PRIETO, M. C. H.; CROW, P.; UFF, J.; RITCHIE, A. W. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urological pathologies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 5, p. 1657-1668, 2007.

THARWAT, A.; IBRAHIM, A.; HASSANIEN, A. E. Linear discriminant analysis: A detailed tutorial. **AI Communications**, v. 30, n. 2, p. 169-190, 2017.

UCKERMANN, O.; GALLI, R.; TAMOSAITYTE, S.; LEIPNITZ, E.; GEIGER, K. D.; SCHACKERT, G.; KOCH, E.; STEINER, G.; KIRSCH, M. Label-free delineation of brain tumors by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy in an orthotopic mouse model and human glioblastoma. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107115, 2014.

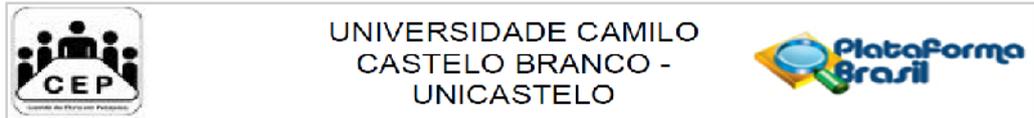
YATES, A.; THOMPSON, D. K.; BOESEL, C. P.; ALBRIGHTSON, C.; HART, R. W. Lipid composition of human neural tumors. **Journal of Lipid Research**, v. 20, p. 428-436, 1979.

ZHANG, J.; FAN, Y.; HE, M.; MA, X.; SONG, Y.; LIU, M.; XU, J. Accuracy of Raman spectroscopy in differentiating brain tumor from normal brain tissue. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, p. 36824-36831, 2017.

ZHENG, J.; PANG, S.; LABUZA, T. P.; HE, L. Evaluation of surface-enhanced raman scattering detection using a handheld and a bench-top Raman spectrometer: A comparative study. **Talanta**, v. 129, p. 79-85, 2014.

ZHOU, Y.; LIU, C. H.; SUN, Y.; PU, Y.; BOYDSTON-WHITE, S.; LIU, Y.; ALFANO, R. R. Human brain cancer studied by resonance Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 11, p. 116021, 2012.

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: A ESPECTROCOPIA RAMAN PARA ESTIMAR A BIOQUÍMICA DE TECIDOS DO CÉREBRO NORMAL E NEOPLÁSICOS

Pesquisador: Ricardo Pinto Aguiar

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04193712.0.0000.5494

Instituição Proponente: Universidade Camilo Castelo Branco

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.903.652

Apresentação do Projeto:

Apresentação do projeto

A presente pesquisa tem como objetivo evidenciar as diferenças espectrais de tecido cerebral com presença de massa tumoral e de tecido cerebral hígidos por meio de espectroscopia Raman. Neste estudo, as amostras de tecidos normais serão obtidas de peças anatômicas (cadáver) no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da USP, enquanto as amostras de tecido cerebral neoplásico serão oriundas de cirurgias para remoção de tumores em pacientes previamente diagnosticados, realizadas no Hospital São José em Ilhéus por um neurocirurgião associado ao projeto. A análise dos dados será realizada por meio da média e desvio padrão dos picos mais relevantes a partir da média e desvio padrão dos espectros dos diferentes tecidos comparados com o tecido normal. Após será aplicado testes de variâncias considerando um nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Este trabalho tem por objetivo utilizar a técnica de espectroscopia Raman para buscar diferenças bioquímicas nos tecidos acometidos com o tumor maligno cerebral, comparados com os tecidos normais, e desenvolver uma ferramenta que possa realizar a diferenciação espectral e discriminar os tecidos de acordo com a avaliação anatomopatológica.

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 584

Bairro: ITAQUERA

CEP: 06.230-030

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2070-0167

E-mail: comite.etica.sp@unicastelo.edu.br



UNIVERSIDADE CAMILO
CASTELO BRANCO -
UNICASTELO



Continuação do Parecer: 1.903.652

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão associados ao procedimento cirúrgico e não ao foco direto da pesquisa.

Um benefício indicado pelos autores é propiciar uma análise diagnóstica com a identificação dos elementos bioquímicos relacionados a carcinomas de diferentes graus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é realizar uma análise por espectroscopia Raman de tecidos cerebrais com carcinoma e hígidos visando estabelecer diferenças espectrais entre as amostras. O método está bem delineado. O cronograma está de acordo com a metodologia a ser empregada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido menciona os riscos e benefícios da realização da pesquisa e ressalta a garantia dos direitos dos sujeitos da pesquisa quanto à informação e privacidade e encaminhamento indicando que os itens mencionados, estão sob responsabilidade do orientador, dos alunos e da instituição onde os dados serão coletados em consonância a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. As informações aos sujeitos da pesquisa sobre o acesso ao pesquisador e o CEP estão contempladas no TCLE. O projeto contempla a carta assinada do local onde serão coletados os dados.

Recomendações:

Corrigir o título da pesquisa;
Alterar o nome da instituição para Universidade Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ajustar as informações do projeto com o que foi inserido na plataforma Brasil;
Favor colocar o número do Projeto Fapesp

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado aprovou o parecer do relator ficando o projeto na condição de Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_795672 E1.pdf	21/11/2016 11:12:52		Aceito

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 584
Bairro: ITAQUERA CEP: 08.230-030
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2070-0167 E-mail: comite.etica.sp@unicastelo.edu.br



UNIVERSIDADE CAMILO
CASTELO BRANCO -
UNICASTELO



Continuação do Parecer: 1.903.652

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.docx	21/11/2016 11:05:46	Ricardo Pinto Aguiar	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	21/11/2016 11:04:33	Ricardo Pinto Aguiar	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TC_Amostras_Normais.jpg	21/11/2016 10:53:52	Ricardo Pinto Aguiar	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TC_Amostras_Tumorais.pdf	21/11/2016 10:49:26	Ricardo Pinto Aguiar	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	21/11/2016 10:41:51	Ricardo Pinto Aguiar	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 01 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
SILVIA CRISTINA NUNEZ
(Coordenador)

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 584
Bairro: ITAQUERA
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)2070-0167

CEP: 08.230-030

E-mail: comite.etica.sp@unicastelo.edu.br