

DIFERENÇAS NO ESPECTRO RAMAN NO PLASMA DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA VISANDO DIAGNÓSTICO

R. B. S. Jacinto*, A. M. Silva*, M. T. T. Pacheco*, R. A. Zângaro*, F. Callera** e L. Silveira Jr.*

*Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO, São José dos Campos, SP, Brasil

**Centro de Hematologia do Vale, São José dos Campos, SP, Brasil

e-mail: mljacinto@uol.com.br

Resumo: A busca por novas ferramentas e tecnologias que possam oferecer informações úteis à detecção de distúrbios como no caso das neoplasias do sistema hematológico, em especial as leucemias agudas, tem atraído pesquisadores de diferentes áreas. Com autonomia e reprodução de clones celulares anormais originadas de uma “célula-mãe” intramedular, perdendo suas funções e morfologias essenciais, estão doenças malignas de difícil diagnóstico e controle, chamadas onco-hematológicas. A espectroscopia Raman vem se firmando como um importante aliado nas diversas áreas da medicina, por seu elevado poder de detalhamento molecular e atuação não-invasiva ou minimamente invasiva, detectando alterações presentes nestas doenças. Fundamentado nas possibilidades oferecidas pela espectroscopia Raman, iniciou-se um estudo objetivando o perfil de amostras sanguíneas de pacientes com diagnóstico recente de leucemias mielóides agudas (LA) ($n = 10$) perante as amostras de indivíduos saudáveis ($n = 20$). As amostras foram submetidas a um espectrômetro Raman dispersivo ($\lambda = 785$ nm) na região 600 a 1800 cm^{-1} e seus dados comparados. Foram observados picos específicos em LMA que se reproduziram em todas as amostras, quando comparados aos plasmas saudáveis. O estudo sugere a espectroscopia Raman, como uma aliada para LMA, imprimindo às amostras um padrão plasmático com especificidade e sensibilidade que possa ser confrontado ao plasma saudável evidenciando esta patologia. Para a realização deste estudo, o projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, do qual recebeu aprovação sob o nº H126/CEP/2006.

Palavras-chave: espectroscopia Raman, leucemia mielóide aguda, onco-hematologia, diagnóstico.

Abstract: The search for new tools and technologies that can provide useful detection of disturbances as in the case of haematological malignancies, especially acute leukemias information, has attracted researchers from different areas. With autonomy and reproduction of abnormal cell clones originated from a “mother cell” intramedullary, losing their essential functions and morphologies, malignancies are difficult to diagnose

and control, oncohematologic calls. Raman spectroscopy has established itself as an important ally in many areas of medicine, for its high power of molecular detail and non-invasive or minimally invasive operations, detecting abnormalities present in these diseases. Based on the possibilities offered by Raman spectroscopy, began a study aiming the profile of blood samples from patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (LA) ($n = 10$) before the samples from healthy individuals ($n = 20$). The samples were subjected to a dispersive Raman spectrometer ($\lambda = 785$ nm) in the region 600-1800 cm^{-1} and the data compared. Specific peaks in AML that were reproduced in all samples, when compared to healthy plasmas were observed. The study suggests the Raman spectroscopy, as an ally to AML, printing to a plasma standard samples with specificity and sensitivity that can be compared to the healthy plasma showing this pathology. For this study, the project was submitted to the Research Ethics Committee, which received approval under No. H126 / CEP / 2006.

Keywords: Raman, spectroscopy, acute leukemia, onco-hematology,

Introdução

O estudo da espectroscopia Raman visando obter informações químicas nas mais diferentes áreas das Ciências tem se tornado algo cada vez mais frequente [1], principalmente por já ser conhecido o seu alto potencial de detalhamento sobre os níveis de energia vibracional das amostras estudadas. A técnica Raman é capaz de identificar a composição biomolecular do material sob estudo, definindo-se como uma “impressão digital” molecular [1-3]. Uma vez que os campos e possibilidades de aplicação da espectroscopia Raman são amplos, muitas publicações demonstram que a técnica Raman foi capaz de evidenciar alterações moleculares “*in vivo*” e “*in vitro*”, sugerindo estudos comparativos com os métodos convencionais para fins de avaliação e monitoramento de algumas patologias [4].

A leucemia mielóide aguda é uma das doenças onco-hematológicas de caráter clonal do tecido sanguíneo,

que se desenvolve a partir de células progenitoras da linhagem mielóide, chamadas de “células-mães” as quais se proliferam de maneira anormal, e representam cerca de 80% das leucemias em adultos [5,6]. Tal proliferação anormal leva a produção de células imaturas e com distúrbios morfológicos e funcionais, que substituem as células saudáveis do tecido normal, comprometendo seu funcionamento adequado [7]. Trata-se de uma doença de presença expressiva na população com incidência aproximada de 1 caso a cada 100.000 pessoas, sendo que este número se eleva para 1 caso a cada 10.000 pessoas com idade acima de 50 anos, com leve prevalência para o sexo masculino [8]. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil a taxa específica de leucemias é variável, oscilando entre 3,57 a 5,16 nas 4 regiões, sendo que no Sul, pode alcançar 9,33, como se observa na Tabela 1, porém os dados são representativos de todas as formas de leucemias, uma vez que a fonte não oferece taxas para linhagens mielóide e linfóide especificamente.

Tabela 1: Taxa bruta de casos de leucemias em homens e mulheres, sem diferenciação por linhagem mielóide ou linfóide.

Região	Homens (casos/100 mil)	Mulheres (casos/100 mil)
Norte	3,49	2,26
Nordeste	4,24	3,55
Centro-Oeste	4,22	3,46
Sudeste	5,35	4,31
Sul	7,98	6,23

Estes números, associados às co-morbididades, e pouca evolução quanto ao diagnóstico e tratamento das LMAs, são bastante motivadores para que a sociedade científica busque novas tecnologias e ferramentas que venham a somar com as já consagradas técnicas, no intuito de se obter maiores informações sobre distúrbios à saúde, sendo que a Engenharia Biomédica, através da espectroscopia Raman tem apresentado como resultados favoráveis, sabendo que a precocidade destas informações, pode ser o diferencial para a sobrevida do paciente [9]. Deve-se ressaltar ainda que na última década houve um crescimento considerável dos casos de transplantes autólogos de medula óssea, o qual tem apresentado curva de sobrevida significativa, porém não é aplicável para todas as leucemias [10].

Este estudo pretende utilizar a técnica Raman como uma ferramenta de identificação das diferenças espectrais entre plasma de pacientes com LMA e pacientes saudáveis, visando propor uma futura discriminação deste tipo de alteração plasmática.

Materiais e métodos

O estudo propôs fazer uso de amostras biológicas (sangue humano), sendo estas separadas em 2 grupos, o 1º denominado Grupo Controle e o 2º denominado de

Grupo Leucêmico, posteriormente submetidas a espectroscopia Raman dispersiva para a obtenção de seus respectivos espectros.

Do Grupo Controle com $n = 20$, participaram exclusivamente, pessoas consideradas saudáveis sob o ponto de vista onco-hematológico, assim como do Grupo Leucêmico com $n = 10$, o critério de inclusão foi, que seriam pessoas diagnosticadas com a doença leucemia mielóide aguda, previamente ao tratamento quimioterápico.

Coleta das amostras – Para a obtenção das amostras sanguíneas, utilizou-se de técnicas convencionais de venopunção de forma segura para o coletador e para o voluntário doador da amostra, seguindo os seguintes passos:

1 – escolha de veia com fácil acesso para a punção, com auxílio de torniquete;

2 – realização da antisepsia local para se evitar contaminações, com o uso de álcool 70% e algodão hidrofóbico;

3 – punção propriamente dita, através de sistema fechado da marca Sarstedt® com agulha 23G (25x0,8 mm) e tubo contendo EDTAK3 7,2mg para volume de 4 mL;

4 – após coletada a amostra, retirou-se o torniquete e a agulha do contato com o paciente, promovendo leve pressão local com algodão seco a fim de se evitar extravasamento sanguíneo;

5 – ao término de cada coleta, a amostra foi homogeneizada por inversão e de forma suave, para que o sangue tivesse contato absoluto com o anticoagulante EDTAK3;

6 – para a finalização do procedimento, aplicou-se curativo “stopper” no local da punção.

De posse das amostras, as mesmas foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos, em centrífuga Combate – CELM® para o isolamento do plasma sobrenadante.

Os plasmas dos doadores voluntários, foram então transferidos para tubos na ausência de conservantes (tubos secos) e encaminhados ao Laboratório de Espectroscopia Raman, em caixa térmica refrigerada entre 8 e 20°C, ideal para a conservação das amostras. Neste Laboratório, as amostras foram submetidas às análises espectrais utilizando-se de um espectrômetro Raman dispersivo (laser *Spectra Physics* em 785 nm, espectrômetro *Kaiser* f#1,8, câmera CCD 1024X256 refrigerada por N₂) na região espectral entre 600 a 1800 cm⁻¹, exemplificado na Figura 1. Para a calibração do espectrômetro, utilizou-se picos Raman conhecidos dos compostos naftaleno e álcool absoluto, respectivamente.

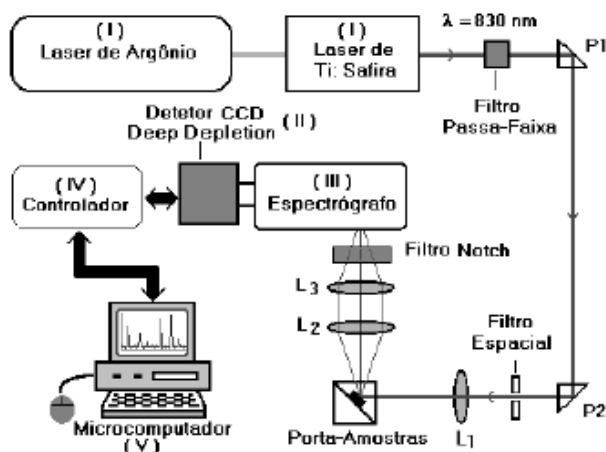


Figura 1: Diagrama de blocos ilustrando o sistema de espectroscopia Raman dispersivo detalhado no estudo de Souza et al. [11].

Amostras de 5 mL de plasma tanto de pacientes com LMA quanto de sujeitos saudáveis de controle foram colocadas em cubeta de quartzo, sendo o espectro de cada amostra coletado por um conjunto de lentes e filtro do tipo *notch*, cujo sinal foi direcionado ao espectrógrafo/CCD, que associado à um controlador e um microcomputador, fazem a leitura e processamento do sinal Raman. O tempo de leitura do espectro Raman em cada amostra foi de 60 s, em ambiente escuro.

Os espectros foram submetidos a procedimento de retirada de fluorescência, após os médios foram plotados visando uma análise comparativa entre os dois grupos, utilizando-se de software Excel.

Resultados

O comportamento espectral de plasmas sanguíneos de indivíduos do grupo Controle e grupo Leucêmico é apresentado na Figura 2 (espectros sem normalização) e na Figura 3 (espectros normalizados pelo pico em 1450 cm^{-1}). Destacam-se os picos Raman nas regiões espectrais de 1160 cm^{-1} e 1518 cm^{-1} .

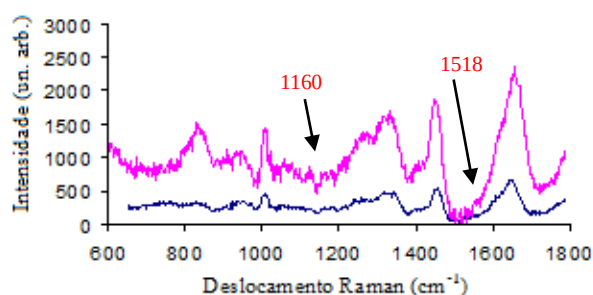


Figura 2: Plotagem do espectro Raman médio dos pacientes com LMA (rosa) em relação ao espectro médio dos indivíduos saudáveis (azul), apresentando diferenças nos picos das regiões de 1160 cm^{-1} e 1518 cm^{-1} .

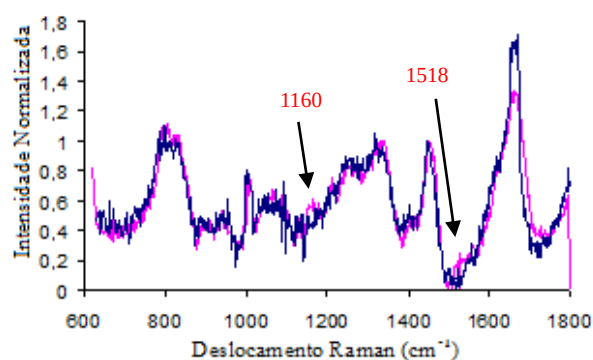


Figura 3: Plotagem dos espectros Raman normalizados de pacientes com LMA (rosa) e indivíduos saudáveis (azul).

Discussão

O comportamento gráfico de plasma sanguíneo humano através da espectroscopia Raman já fora descrito anteriormente [12]. No entanto, esta é a primeira comparação entre espectro de plasma com LMA comparativamente a plasma de paciente saudável. A diferença espectral observada, inicialmente entre os espectros médios de Controle e de Leucêmicos (Figura 1) e a diferença nas intensidades dos picos em 1160 cm^{-1} e 1518 cm^{-1} (Figura 2) podem ser atribuídas a uma possíveis alterações e expressões de oncogenes, peculiares às leucemias, que sintetizam proteínas que são liberadas no plasma sanguíneo [13] e capazes de provocar discrepâncias nas aquisições espectrais dos perfis estudados. Conhecendo-se o grande potencial que a espectroscopia Raman possui para detecção e monitoramento de algumas patologias [1,2,4,9] e do muito que tem sido aplicado sobre neoplasias, este estudo alcançou seu objetivo ao realizar comparações entre os grupos analisados e obteve sucesso ao identificar diferenças entre estes, ainda que necessitem de aprimoramentos no que se referem à metodologia, técnica e equipamento visando um diagnóstico diferencial entre patologias malignas como a LMA e outras patologias benignas que podem ser sintomaticamente confundidas.

No entanto, é importante ressaltar que algumas doenças, como as onco-hematológicas, possuem em suas classificações, subtipos e variantes que podem impor certa limitação à técnica, o que exigirá ampliações e variações da metodologia aplicada neste estudo. No entanto, com avaliação de múltiplas amostras e diferentes estados patológicos, o emprego da Espectroscopia Raman surge como uma importante ferramenta para diagnóstico de LMA.

Conclusão

Frente ao exposto, conclui-se que a espectroscopia Raman foi capaz de identificar diferenças espectrais Raman em indivíduos leucêmicos, ao menos 2 picos que

se sobressaem quando comparados aos espectros de indivíduos saudáveis, sugerindo que tais diferenças possam indicar, ainda que de forma qualitativa, a atividade da leucemia mielóide aguda

Referências

- [1] Crow P, Uff JS, Farmer JA, Wright MP and Stone N. The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma *in vitro*. *BJU International*. 93: 1232–6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2004.04852.x
- [2] Gniadecka M et al. Melanoma diagnosis by Raman Spectroscopy and neural network: Structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. *Journal of Investative Dermatology*. 2004;122:443-9.
- [3] Stone N; Kendall C; Smith J; Crow P; Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancer. *Faraday Discussions*. 2004; 126: 141-57.
- [4] Hanlon EB. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy Physics in Medecine and Biology. 2000; 45: 2-8.
- [5] Pino Blanco D. et al. Caracterización inmunofenotípica de pacientes con leucemia mieloide aguda. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2014; 30: 27-35.
- [6] Souto Filho JT., Portugal RD, Loureiro M, Pulcheri W, Nucci M. Characterization and analysis. of the outcome of adults with acute myeloid leukemia treated in a Brazilian University hospital over three decades. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*. 2011; 44: 660-5.
- [7] Arthur L. Cariótipo em Leucemia Mielóide Aguda: Importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2011; 49: 26-7.
- [8] Instituto Nacional do Câncer – INCA. Incidência do Câncer no Brasil: Estimativa para 2014 - Brasil Consolidado [internet]. 2014 Jun [cited 2014 Jun 03]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestado.s.asp?UF=BR>.
- [9] Vanna R. et al. Raman spectroscopy for the assessment of acute myeloid leukemia: a proof of concept study ", *Proc. SPIE* 8939, Biomedical Vibrational Spectroscopy VI: Advances in Research and Industry, 89390F (March 4, 2014); doi:10.1117/12.2039186; <http://dx.doi.org/10.1117/12.2039186>.
- [10] Callera AF, Silva AM, Callera F. Autologous stem cell transplant in Vale do Paraiba, State of São Paulo: demographics and clinical aspects and survival curves. *Journal of Health of Science Institute*. 201; 31:7-12.
- [11] Souza, FB et al. Evaluacion de ácido láctico intramuscular através de espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina del esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2003; 9: 388-95.
- [12] Pereira, A. et al. Caracterização espectral de concentrado de plaquetas pela espectroscopia FT-Raman. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. *Anais de Trabalhos Completos*. São José dos Campos, Univap. 2005; 24: 1322.
- [13] Licinio MA, Santos-Silva MC. Importance of detecting FLT3 and NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia – World Health Organization Classification 2008. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010; 32:476-481.