

CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO DE COLÓIDES TIREOIDIANOS SADIOS E HIPERPLÁSICOS

Pereira T.M^{1,2,3,5}, Diem M², Bird B², Miljkovic M², Ana PA³, Bachmann L⁴, Zezell DM¹

1 - Centro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-CNEN/SP, São Paulo, SP, Brasil

2 - Department of Chemistry & Chemical Biology, Northeastern University, Boston, Estados Unidos
3 - Universidade Federal do ABC, Santo Andre, Brazil

4 - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

5 - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo, São José dos Campos Brasil

e-mail: thiago.m.p@usp.br

Resumo

O presente trabalho mostra a caracterização da Tiroglobulina contidos nos colóides tireoidianos por espectroscopia no infravermelho. A produção da tiroglobulina é alterada em pacientes com Bócio Nodular. Assim, as informações bioquímicas desta glicoproteína podem ser utilizada como indicador desta disfunção. Os resultados utilizando espectroscopia no infravermelho revela diferenças bioquímicas nas conformação da proteína, hormônios e carboidratos.

Palavras-chave: Diagnóstico óptico, FTIR, tireoide, proteína

Abstract

The characterization of thyroglobulin from thyroid's colloids by infrared spectroscopy is reported. The thyroglobulin biochemistry properties has differences between normal and abnormal patients. Thus, thyroglobulin can be used as indicator of same thyroid disorders. The results using infrared spectroscopy reveals biochemistry differences on thyroglobulin from normal and goiters patients such as proteins, hormones and carbohydrates.

Keywords: optical diagnosis, infrared spectroscopy, thyroid, proteins

Introdução

A glândula tireoide é uma das mais importantes do sistema endócrino[1]. Ela secreta principalmente dois hormônios: Triiodotirosina (T3) e Tetraiodotironina (T4), que são necessários para diversos processos fisiológicos tais como a homeostase e o controle da temperatura corpórea. Ela está em constante estado de adaptação devido a diversos estados fisiológicos tais como: gravidez, lactação, puberdade ou em certos casos de estresse psicológico. Nestas situações, a tireoide se torna maior e mais ativa, seus folículos crescem e as células epiteliais tornam-se mais colunares[2].

Histologicamente, a glândula tireoide consiste em uma fina camada de células epiteliais denominadas células foliculares, cuja principal função é produzir uma iodoglicoproteína, a tiroglobulina, que é precursora dos hormônios T3 e T4[3]. Essa proteína é armazenada dentro dos folículos tireoidianos, em estruturas chamadas de colóides, até ser utilizada pelo organismo.

A síntese dos hormônios é um processo extremamente complexo e pode ser dividido em quatro etapas. As duas primeiras ocorrem dentro das células foliculares, são a síntese protéica e a glicosilação; as duas últimas são a iodinação e a conjugação, que ocorrem dentro dos colóides. Portanto a caracterização bioquímica dos colóides[4] pode fornecer informações de processos metabólicos que ocorrem dentro das células foliculares, o que pode auxiliar no diagnóstico de algumas neoplasias.

O objetivo do presente trabalho é fazer a caracterização por espectroscopia no infravermelho de

colóides de tecidos de pacientes normais e com bócio nodular.

Materiais e métodos

Amostras

O presente projeto utilizou dois tipos de microarrays (US Biomax inc Rockville, EUA): um microarray contendo 80 cortes de tecidos normais e outro contendo 35 bócios nodulares. Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos a partir da escolha aleatória de 5 cortes provenientes de pacientes normais e 5 cortes provenientes de pacientes com bócio nodular. Para as medidas em microespectroscopia no infravermelho, os microarrays foram montado sobre uma lâmina que é altamente reflexiva na região do infravermelho (Kevley, Cleveland OH). Para correlacionar os resultados obtidos por espectroscopia com a análise histológica, foram comprados microrrays dos mesmos tipos, os quais foram depositados sobre uma lâmina de microscópio comum e corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Aquisição dos espectros

O sistema utilizado para aquisição dos dados espectrais foi Perkin Elmer, modelo Spotlight 400, que está acoplado a um microscópio. As imagens coletadas, no presente trabalho foram feitas no modo transflexão (reflexão/transmissão) com resolução espectral de 4 cm^{-1} , utilizando a média de 2 interferogramas por pixel. O background foi coletado numa região da lâmina que não continha nenhum tecido, usando a média de 120 interferogramas. Todo o equipamento foi purgado com ar seco mantendo a umidade relativa abaixo de 5% para eliminar a contribuição do vapor d'água nos espectros.

Processamento dos espectros.

O processamento das imagens espectrais foi realizado da seguinte forma:

- Remoção de pixels que não contêm amostra e/ou têm grande contribuição do espalhamento.
- Remoção de ruídos utilizando a técnica de NAPC (*noise adjust principal components*).
- Restrição da região espectral entre 778-1800 cm^{-1} .

- Cálculos da segunda derivada utilizando o filtro svitz-golay com polinômio de segunda ordem e uma janela de 11 pontos.

- Remoção da contribuição relativa ao espalhamento dos espectros utilizando a metodologia de correção da fase.

- Normalização vetorial na região de 778 cm^{-1} -1800 cm^{-1} .

- Criação de imagens com pseudocores utilizando a técnica de agrupamento hierárquico (HCA) para seleção dos espectros provenientes dos colóides.

- Foram selecionados aleatoriamente 40 espectros de cada corte histológico totalizando 200 espectros normais e 200 com bócio. Foi calculado o espectro médio de cada grupo a partir dos espectros selecionados.

- Foi realizado um teste t em cada número de onda para determinar quais regiões do espectro possui diferenças estatisticamente diferente considerando o valor de p menor que 1% e 5%.

Resultados e discussão

A figura 1 mostra os espectros médios obtidos a partir de 5 cortes histológicos de pacientes normais e com bócio nodular.

A partir da análise da figura 1 é possível visualizar que a Tiroglobulina (colóide) produzido por células hiperplásicas (Bócio) possuem diferenças em relação as produzidas por células normais. Dentre estas, as principais estão na região da amida I (1600-1700 cm^{-1}) as quais estão relacionadas a estrutura secundária da proteína. Observa-se que os pacientes normais possuem conformação majoritariamente alfa hélice (1664 cm^{-1}) enquanto que nos tecidos com bócio não apresenta esta banda.

Na banda de 1468 cm^{-1} é menos intensa nos tecidos com bócio. Este modo vibracional[5] esta relacionado a quantidade de iodo incorporado no aminoácido tirosina que ocorre nos anéis fenólicos na posição 3 ou 5[6]. Portanto, uma menor intensidade desta banda nos tecidos com bócio nodular indica que este hiperplasia leva a uma menor capacidade de produzir hormônios.

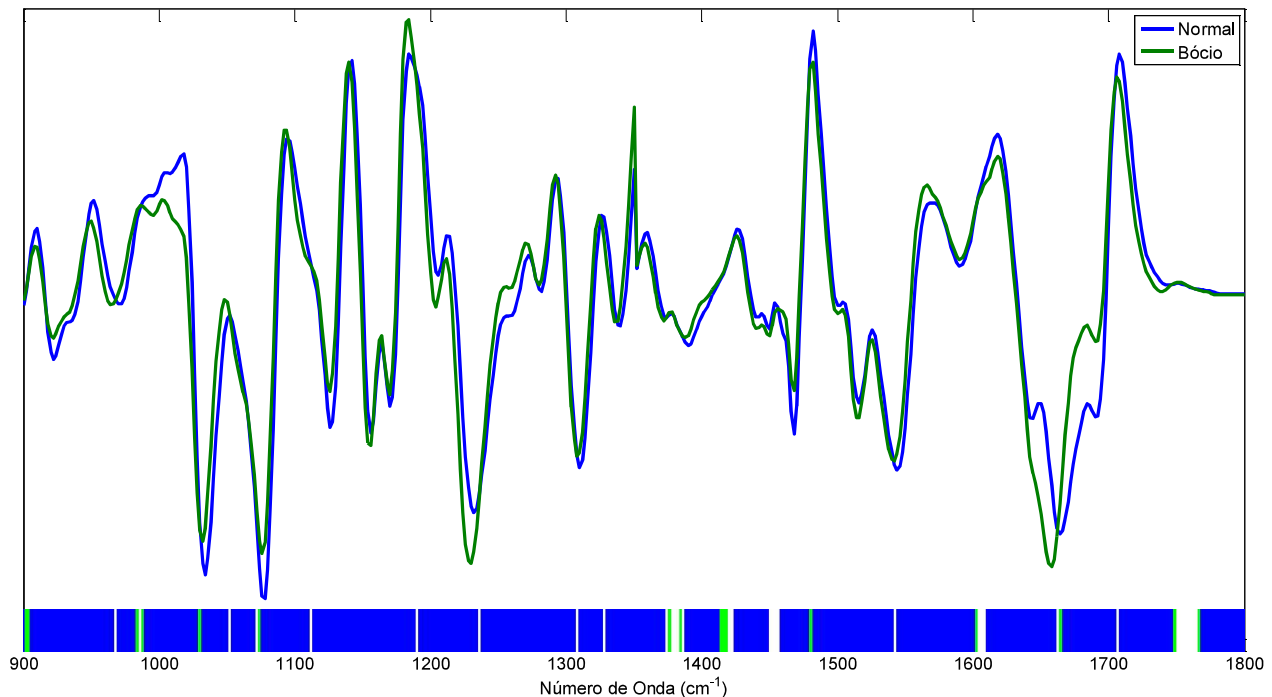


Figura 1: Espectros médios de colóides provenientes de tecidos normais e com bócio nodular. A barra de cor representa o resultado do *t test*. Regiões em azul são estatisticamente significante considerando valor de *p* menor que 0,01. Regiões em verde são estatisticamente significante considerando valor de *p* menor que 0,05.

Na região dos carboidratos (1000-1100 cm^{-1}) os tecidos com bócio apresentam bandas menos intensas. Este resultado indica que a Tiroglobulina proveniente destes tecidos o apresentam menor quantidade de carboidratos do que os tecidos normais. Isto se deve ao fato que células hiperplásicas metabolizam uma maior quantidade de carboidratos afetando o processo de glicosilação das proteínas.

Conclusão

A partir dos resultados apresentados é possível concluir que a técnica de espectroscopia no infravermelho é capaz de determinar diferenças bioquímicas presentes nos tecidos tireoidianos normais e com bócio nodular.

Agradecimentos

CNPq-INFO (573916/2008), CNPq (143166/2009-3; 555621/2009-0; 308277/2009-0), FAPESP-CEPID (05/51689-2) e CAPES (9036-11-3).

Referências

1. Kirsten, D., The thyroid gland: physiology and pathophysiology. Neonatal network : NN, 2000. 19(8).
2. Teixeira, C.S.B., et al. Evaluation of thyroid tissue by Raman spectroscopy. in Conference on Biomedical Vibrational Spectroscopy IV. 2010. San Francisco, CA.
3. Hall, A.C.G.a.J.E., Textbook of medical physiology. 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders,.
4. Deshpande, V. and S.G. Venkatesh, Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1999. 1430(2): p. 157-178.
5. Thiago M Pereira, D.M.Z., Benjamin Bird, Milos Miljković and Max Diem, The characterization of normal thyroid tissue by micro-FTIR Spectroscopy. Analyst, 2013.

6. Alvarez, R.M.S., R.N. Farias, and P. Hildebrandt, Comparative vibrational analysis of thyronine hormones using infrared and Raman spectroscopy and density functional theory calculations. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2004. 35(11).