

Espectroscopia de Infravermelho por Imagem de Átrios Cardíacos de Camundongos Tratados com Interleucina-1beta: Uma Análise Preliminar de Agrupamento

Raffaele Stasi e Denise Zezell
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A espectroscopia de infravermelho por imagem oferece uma abordagem poderosa e não destrutiva para caracterizar alterações bioquímicas em tecidos biológicos [1]. Neste estudo, aplicamos a espectroscopia de imagem por transformada de Fourier (FTIR) para examinar os átrios cardíacos de camundongos tratados com a citocina interleucina-1 beta (IL-1 β), conhecida por afetar o tecido cardíaco ao modular a composição da matriz extracelular e a expressão de proteínas [2] [3] [4]. Este estudo visa explorar as distinções fenomenológicas induzidas pela IL-1 β nos átrios cardíacos, sendo um passo para a caracterização futura do conteúdo proteico do tecido.

OBJETIVO

Analisar as alterações nos átrios cardíacos induzidas pelo tratamento com IL-1 β utilizando espectroscopia de imagem FTIR.

Identificar padrões espectrais distintos associados aos tecidos tratados com IL-1 β e aos controles.

Explorar possíveis aplicações da espectroscopia FTIR para caracterizar a composição dos tecidos.

A. Preparação e Imagem das Lâminas

Um conjunto de lâminas de baixa emissividade (low-e) para microscopia FTIR e um conjunto de lâminas coradas com

hematoxilina e eosina (HE) foram obtidos dos átrios cardíacos de camundongos C57BL/6 tratados com IL-1 β subcutânea e de um grupo controle tratado com solução salina. As amostras foram fixadas em formaldeído e embebidas em parafina. Essas lâminas low-e foram imageadas em um espectrômetro FTIR Cary 660 Agilent acoplado a um microscópio. A absorbância dos números de onda de 900 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ foi medida por reflexão.

B. Pré-processamento

Os espectros das imagens foram restritos entre 900 cm⁻¹ e 1800 cm⁻¹, e os pixels de parafina foram removidos pelo método de Otsu [5]. Em seguida, os espectros foram normalizados pelo método de Variável Normal Padrão (Standard Normal Variate) e suavizados com o filtro de Savitzky–Golay usando a derivada de segunda ordem [6]. A Correção Extensiva de Sinal Multiplicativo (EMSC) foi utilizada para corrigir a presença de parafina e vapor de água na amostra [7].

C. Análise

Um agrupamento k-means para quatro clusters foi feito combinando duas amostras tratadas com IL-1 β (Cytokine 1 e Cytokine 2) e duas amostras controle salinas (Saline 1 e Saline 2) [8]. Os espectros dos clusters que caracterizam cada grupo experimental foram comparados.

Dois dos quatro clusters k-means distinguiram entre os grupos experimentais. Um gráfico de cores falsas mostra a distribuição de todos os clusters na Fig. 1. O

primeiro cluster esteve principalmente presente nas amostras controle, com presença reduzida na amostra Cytokine 1 e quase completamente ausente na amostra Cytokine 2. O segundo cluster esteve principalmente presente nas amostras tratadas e quase completamente ausente de ambas as amostras controle salinas (Fig. 3). Os espectros de cada cluster são plotados juntos na Fig. 4 e comparados na Fig. 5. No geral, os clusters 1 e 2 têm perfis semelhantes, mas o cluster 1 apresenta picos e vales mais pronunciados do que o cluster 2. Grande parte da variação entre os clusters foi concentrada na região entre 1500 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} .

Neste estudo preliminar, a imagem FTIR foi capaz de distinguir entre átrios cardíacos tratados com IL-1 β e o grupo controle. Um agrupamento k-means mostrou dois clusters principalmente associados a cada grupo experimental. Os espectros desses dois clusters tinham perfis semelhantes, mas o cluster 1 apresentava picos mais altos e vales mais profundos do que o cluster 2. Isso foi mais notável no número de onda 1657 cm^{-1} , mas também em 1551, 1564, 1629 e 1703 cm^{-1} . Essa região está associada às bandas de amida I [9], sinalizando uma diferença no conteúdo de proteínas entre os tecidos. Esta pesquisa continuará a caracterizar essa distinção na direção de quantificar a composição molecular dos tecidos tratados com IL-1 β por meio de microscopia FTIR.

[1] Stuart, B H. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. John Wiley & Sons, 2004.

[2] Melton, E., and Qiu, H, "Interleukin-1 β in multifactorial hypertension: inflammation, vascular smooth muscle cell and extracellular matrix remodeling, and non-coding RNA

regulation". International Journal of Molecular Sciences, 22(16), 8639, 2021.

[3] Frangogiannis, N. G., "Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts". Discoveries, 3(1), 2015.

[4] Turner, N. A. "Effects of interleukin-1 on cardiac fibroblast function: relevance to post-myocardial infarction remodelling". Vascular Pharmacology, 60(1), pp. 1-7, 2014.

[5] Bangare, S. L., Dubal, A., Bangare, P. S., & Patil, S., "Reviewing Otsu's method for image thresholding". International Journal of Applied Engineering Research, 10(9), 21777-21783, (2015).

[6] Kitamura, K., and Hozumi, K., "Effect of savitzky—golay smoothing on second-derivative spectra". Analytica chimica acta, 201, pp. 301-304, 1987.

[7] Afseth, N. K., and Kohler, A. "Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial". Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 117, 92-99, 2012.

[8] Aggarwal, Charu C., and Chandan K. Reddy. "Data clustering." Algorithms and applications. Chapman&Hall/CRC Data mining and Knowledge Discovery series, Londra, 2014.

[9] Rohman, A., Windarsih, A., Lukitaningsih, E., Rafi, M., Betania, K. and Fadzillah, N. A., "The use of FTIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of biomolecules in biomedical fluids: A review". Biomedical Spectroscopy and Imaging, 8(3-4), pp. 55-71. 2019.

Este trabalho foi apoiado pelo CNPq (INCT-INTERAS 406761/2022-1, INCT-INFO 465763/2014-6; Sisfoton 440228/2021-2; PQ 314517/2021-9; IC 144705/2024-9), pela CAPES (código de financiamento 001) e pela FAPESP (21/00633-0).