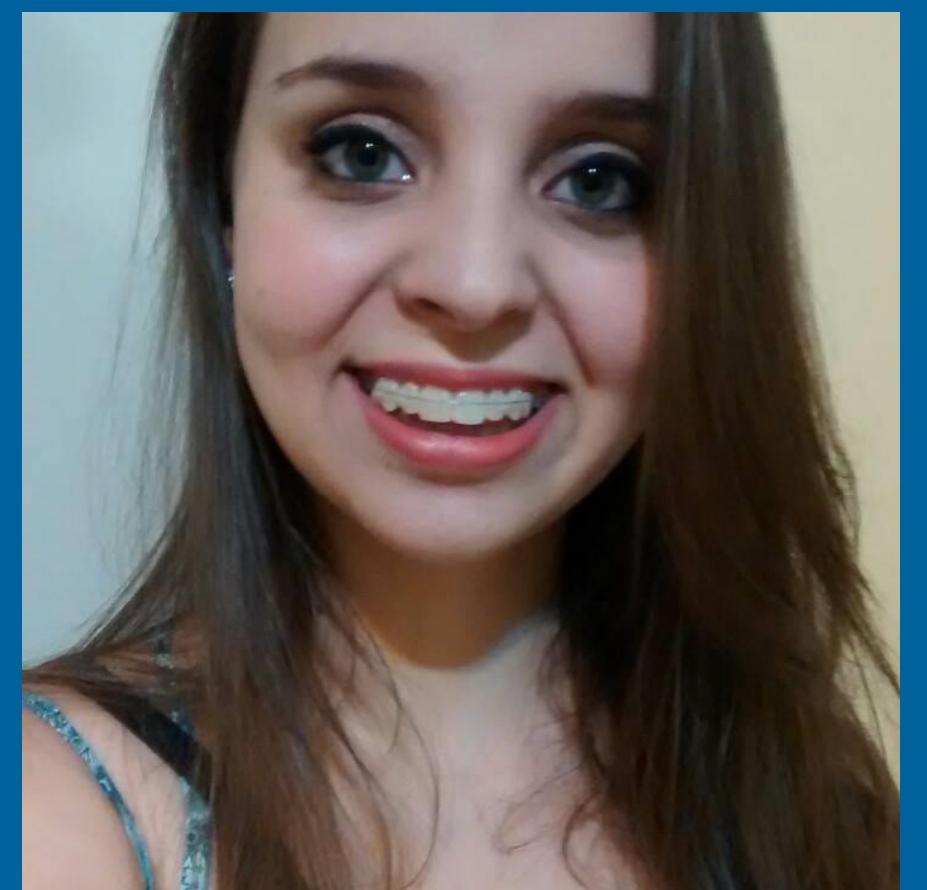


Análise molecular pela espectroscopia Raman de amostras de tecido bucal de ratos Wistar sob diferentes métodos de armazenamento / Análise Final

MÜLLER, L. C. ¹; SANT'ANA FILHO, M. ²

¹ Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Professor Titular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



larissacmuller@gmail.com

Introdução

Muitos estudos com a Espectroscopia Raman estão sendo desenvolvidos avaliando a sua capacidade como um método de diagnóstico. Porém, não há um consenso sobre o método de condicionamento de amostras que são analisados no espectro Raman.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi verificar se há diferenças nos picos espectrais de amostras de tecido analisadas antes e após a fixação com formol a 10%.

Métodos

5 amostras de língua de ratos tipo Wistar (Material de descarte de projeto com aprovação no CEUA no. 26102, armazenadas a -80°C). O Tecido era descongelado.

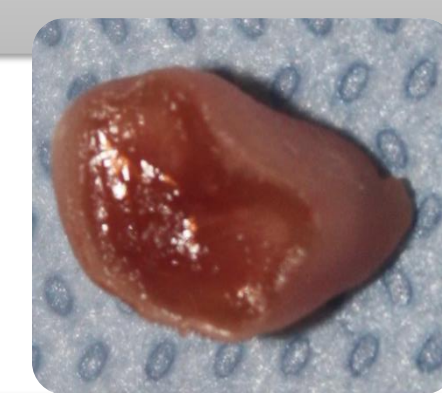
As amostra eram cortada ao meio



Leitura na Espectroscopia Raman em Tecido epitelial, resultando em 50 espectros de tecido epitelial sem fixação (10 de cada amostra)



Leitura na Espectroscopia Raman em Conjuntivo resultando em 50 espectros de tecido conjuntivo sem fixação (10 de cada amostra)



Fixação por 72h com formalina 10%

Novas leituras na espectroscopia Raman com os mesmo parâmetros (50 espectros de tecido epitelial fixado com formol e 50 espectros de tecido conjuntivo fixado por formol)

Foi realizada a média de cada um dos 50 espectros, resultando em 4 médias, os picos das médias foram analisados.

A amostra foi analisada por um espectrômetro Raman (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha), através de um laser de diodo 785 nm com potência de 100 mW, 20 vezes por 5 segundos. Os pontos de leitura foram selecionados por uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplada) com abertura de 5x1000 µm e com 3-5 cm⁻¹ de resolução espectral, e a faixa espectral analisada foi de 500-1500 cm⁻¹.

Resultados

Picos Tecido epitelial de superfície (Tabela 1) (MOVASAGHI, 2007; KRISHNA,2004)

❖ Todos os picos do Tecido epitelial sem fixação, também ocorreram no Tecido epitelial com fixação;

❖ 510 cm⁻¹

Forma vibracional de pontes de dissulfeto ocorre quando a amostra é fixada pois a ligação de sulfidril se transforma em dissulfeto (SCHYNS et al, 1990; MOELANS et al, 2011; GALLI et al., 2014)

❖ 1251 cm⁻¹

Amida III ocorre quando as ligações cruzadas que são formados entre o átomo de nitrogênio de lisina e o átomo de nitrogênio de uma ligação peptídica. Esta ligação cruzada de pontes de metileno altera a amida, transformando uma amida II em amida III que pode ser observada nos espectros fixados por formalina. (FAOLÁIN, 2005)

Sem fixação	Com formol	Molécula	Modo vibracional
	510	Cistina	Dissulfeto de alongamento de banda de colágeno N S-S
559	553	****	****
	591	PO ₄ ⁻³	Vibração simétrica de alongamento
622	622	Fenilalanina	Torção C-C
644	645	Tirosina	Torção C-C
675	674	Ácidos nucleicos	****
746	746	DNA/RNA	T anel aromático
819	818	Colágeno	Suporte principal C-C
853	851	Proteína e DNA	Respiração do anel C-C
885	885	Disaccharide (cellobiose)	(C-O-C) Modo esquelético
939	936	Prolina	Cadeia principal estiramento C-C
984	983	Lípídeos e proteínas	C-C e =CH
1003	1003	Fenilalanina	Respiração do anel
1032	1032	Fenilalanina	Dobra C-H
1100	1101	****	C-C da cadeia gauche-ativada
		Ácidos nucleicos	****
1127	1128	Lípídeo	Alongamento trans C-C
1174	1174	Tirosina	Dobra C-H
1207	1206	Proteína	Alongamento C-C6H5
	1251	Amida III	****
1341	1341	****	Proteína e ácidos nucleicos
1448	1449	Proteína e lípídeo	Deformação CH2

Tabela 1: Picos espectrais da média de 50 espectros de tecido epitelial sem fixação e picos espectrais da média de 50 espectros de tecido epitelial com fixação por formol. Em grená, picos que só ocorreram em tecido epitelial com formol. **** Informação desconhecida

Picos Tecido conjuntivo (Tabela 2) (MOVASAGHI, 2007; KRISHNA,2004)

❖ Os picos 622 cm⁻¹, 644 cm⁻¹, 938 cm⁻¹, 1003 cm⁻¹, 1032 cm⁻¹, 1127 cm⁻¹, 1174 cm⁻¹, 1208 cm⁻¹ e 1449 cm⁻¹ se mantiveram constantes apesar do tipo de tecido e armazenamento, o que demonstra que não houve alterações bioquímicas relevantes nessas faixas espectrais.

❖ Houve uma maior heterogeneidade entre os picos das amostras com e sem fixação por formol, isto pode ser devido a maior variabilidade de tipos celulares deste tecido ou a uma maior alteração do tecido pelo uso de formol em relação ao tecido epitelial de superfície.

❖ 676 cm⁻¹, 746 cm⁻¹, 984 cm⁻¹ e 1335 cm⁻¹

Correspondem a proteínas e DNA ocorreram apenas em tecido conjuntivo fixado por formol. Pode ter ocorrido devido a diferentes áreas de leitura.

❖ 545 cm⁻¹ e 655 cm⁻¹

Foi observado na amostra de tecido conjuntivo fixada por formol, essa faixa espectral marca a forma vibracional de pontes de dissulfeto que é observada em amostras fixadas por formalina. (SCHYNS et al, 1990; MOELANS et al, 2011; GALLI et al., 2014)

❖ 1249 cm⁻¹

Relacionado a amida III, só ocorreram nas amostras fixadas por formol. (FAOLÁIN, 2005)

❖ 757 cm⁻¹, 827 cm⁻¹, 854 cm⁻¹, 1084 cm⁻¹ e 1341 cm⁻¹

Correspondem a faixas espectrais referentes a proteínas, DNA e aminoácidos apenas ocorreram na amostra sem fixação por formol, o que sugere que o formol causou alterações bioquímicas destas moléculas no processo de fixação (KNIGGENDORF et al., 2011; GALLI et al., 2014; KOTHMAIER et al., 2011).

❖ 719 cm⁻¹, 877 cm⁻¹ e 1267 cm⁻¹

Correspondente a classe de lípídeos e ácidos graxos e só ocorreram no Tecido conjuntivo sem fixação. Os estudos sugerem que existe ajustes devido a fixação por formol na deformação do lípídeo, gerando diferença nos modos de vibração dos espectros nestas regiões nas amostras de tecido conjuntivo com formol (MEADE et al, 2010).

Sem fixação	Com formol	Molécula	Modo vibracional
	545	Ponte de dissulfeto	C-S
557		****	****
	591	PO ₄ ⁻³	Vibração simétrica de alongamento
	607	Glicerol (ácidos graxos)	****
622	622	Fenilalanina	Torção C-C
644	644	Tirosina	Torção C-C
	655	Cistina	****
	676	Ácidos nucleicos	****
719		Lípídeos	Vibração simétrica estiramento de grupo colina Nth (CH ₃) ₃
	746	DNA/RNA	T anel aromático
757		Triptofano	***
	818	Colágeno	Suporte principal C-C
		DNA	Alongamento do suporte principal O-P-O
827		Proteína e DNA	Respiração do anel C-C
854	861	Grupo Fosfato	****
877		Carboidrato e Lípídeo	C-C-enésimo estiramento simétrico e C-O-C Anel
	885	Disaccharide (cellobiose)	(C-O-C)
938	939	Prolina	Cadeia principal estiramento C-C
	984	Lípídeos e proteínas	C-C e =CH
1003	1003	Fenilalanina	Respiração do anel
1032	1032	Fenilalanina	Dobra C-H
1045		Glicogênio	****
1084		Ácidos nucleicos	****
	1098	****	C-C da cadeia gauche-ativada
1127	1127	Lípídeo	Alongamento trans C-C
1174	1174	Tirosina	Dobra C-H
1208	1207	Proteína	Alongamento C-C6H5
	1249	Amida III	****
1267		Lípídeo	C-H
	1335	Colágeno	CH3CH2
1341		Proteína e ácidos nucleicos	****
	1366	Fosfolípídeo	CH3
1449	1449	Proteína e lípídeo	Deformação CH2

Tabela 2: Picos espectrais da média de 50 espectros de tecido conjuntivo sem fixação e picos espectrais da média de 50 espectros de tecido conjuntivo com fixação por formol. Em grená, picos que só ocorreram em tecido conjuntivo com fixação, faixa espectral referente a pontes de dissulfeto. Em rosa, faixa espectral referente a amida III, que só ocorreu em amostra com fixação. Em azul claro, faixas espectrais referentes a proteínas e ácidos nucleicos que só ocorreram em amostra sem fixação. Em verde, faixas espectrais referentes a lípídeos e ácidos graxos, que só ocorreram em amostras sem fixação. **** Informação desconhecida

Conclusões

Os resultados deste estudo sugerem que a Espectroscopia Raman pode realizar análises de tecido epitelial para uso em diagnóstico independente do método de fixação, pois esse tecido apresenta poucas alterações bioquímicas após a fixação por formol. Em tecido conjuntivo é necessário avaliar qual o tipo de fixação do tecido que será analisado para espectroscopia Raman, não sendo muito indicado para uso em diagnóstico, pois a fixação gera relevantes alterações bioquímicas no tecido.

Agradecimentos,
À doutora Tháise Gomes e Nóbrega, agradeço por poder fazer parte do suas pesquisas de doutorado, e me proporcionar oportunidades de aquisição de conhecimento, pela paciência e aprendizado.

Ao professores Vicente Castelo Branco Leitune e Fabrício Mezzomo Collares, agradeço por abrirem as portas do LAMAD para realizar o trabalho e me auxiliarem e resolver inúmeras dúvidas sobre o Raman, sendo sempre muito prestativos e atenciosos.

Ao meu professor orientador Manoel Sant'Ana Filho, agradeço pelo aprendizado constante que me proporcionou, pela paciência, por tornar este trabalho tão gratificante e importante para minha formação.

À CAPES, pelo financiamento do presente projeto.

REFERÊNCIAS

SCHYNS M.W., et al. Paraformaldehyde fixation and some characteristics of lens proteins as measured by Raman microspectroscopy. *Experimental eye research*. v. 50, n. 3, p.331-333, 1990.
MOELANS, C. B. Formaldehyde substitute fixatives analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *American journal of clinical pathology*, v.136, n. 4, p. 548-556, 2011.
KNIGGENDORF, A-K., et al. Effects of ethanol, formaldehyde, and gentle heat fixation in confocal resonance Raman microscopy of purple nonsulfur bacteria. *Microscopy research and technique*, v. 74, n. 2, p. 177-183, 2011.
FAOLÁIN, E. Ó., et al. Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* v.53, n.1, p. 121-129, 2005.
GUZE, K., et al. Comparison of molecular images as defined by Raman spectra between normal mucosa and squamous cell carcinoma in the oral cavity. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 42, n. 6, p. 1232-1239, 2011.
MEADE, A. D., et al. Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry* v.396, n. 5 p.1781-1791, 2010.
GALLI, R., et al. Effects of tissue fixation on coherent anti-Stokes Raman scattering images of brain. *Journal of biomedical optics*, v. 19, n. 7, p. 071402-071402, 2014.
KOTHMAIER, Hannelore et al. Comparison of formalin-free tissue fixatives: a proteomic study testing their application for routine pathology and research. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 135, n. 6, p. 744-752, 2011.
MOVASAGHI, Z., et al. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, v.42, n.5, p. 493-541, 2007.
KRISHNA, C. M., et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. *Applied spectroscopy*, v. 58, n. 9, p. 1128-1135, 2004.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

