**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LUIZ FLÁVIO DE AZEVEDO VILLELA

**Caracterização dos tecidos tireoidianos por
espectroscopia no infravermelho**

Ribeirão Preto

2017

LUIZ FLÁVIO DE AZEVEDO VILLELA

**Caracterização dos tecidos tireoidianos por
espectroscopia no infravermelho**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Villela, Luiz Flávio de Azevedo

Caracterização dos tecidos tireoidianos por espectroscopia no infravermelho. Luiz Flávio de Azevedo Villela / Orientador: Luiz Carlos Conti de Freitas. Ribeirão Preto, 2017.

75p.:13il.; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Programa: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

1. Tireoide. 2. Câncer. 3. Espectroscopia. 4. FTIV. 5. Bócio.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Luiz Flávio de Azevedo Villela

Título: Caracterização dos tecidos tireoidianos por espectroscopia no infravermelho.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Dedicatória

À minha esposa Flávia R. S. Leirião Villela, pelos momentos de apoio, pela paciência e ternura nesta jornada, sempre ao meu lado nos melhores e piores momentos. À Joana Leirião Villela, minha amada filha.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus**, por abrir meus caminhos em prol do próximo e me dar oportunidade de fazer parte do desenvolvimento da ciência e da medicina.

Aos meus pais, **Ivan Mollica Villela** e **Maria Elisabeth de Azevedo Villela**, pelo árduo esforço em prover minha educação.

Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas**, por sua orientação, apoio e serenidade. Sua experiência na espectroscopia e visão na aplicabilidade desta na área médica me possibilitou alçar novos horizontes.

Ao **Prof. Dr. Luciano Bachman**, pela paciência e pelo empenho na construção desta ponte entre a Física e a Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Ao **Prof. Dr. Sílvio Antônio Bertacchi Uvo**, pelo seu exemplo e vida dedicada ao aperfeiçoamento da arte em cirurgia de cabeça e pescoço.

Ao **Prof. Dr. José Raphael de Moura Montoro**, por me mostrar o caminho do conhecimento e da ciência desde meus tempos de residente. Seu apoio e sua dedicação sempre foram fundamentais em meus pilares de especialista.

À **Profª. Dra. Vivian Regina Affonso**, pelo companheirismo e apoio. Seu exemplo e sua força de vontade foram inspiração para o meu esforço.

Ao **Dr. Júlio Cesar Marques Ricarte Filho**, por sua amizade.

RESUMO

VILLELA, L.F.A. **Caracterização dos tecidos tireoidianos por espectroscopia no infravermelho**. 2017. 75f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: Nos últimos anos, procedimentos cirúrgicos envolvendo a glândula tireoide têm aumentado em todo o mundo, bem como a incidência de neoplasias malignas sem, no entanto, se observar aumento da taxa de mortalidade. Muitas técnicas foram propostas para alcançar um diagnóstico pré-operatório acurado em doenças da tireoide. As técnicas de espectroscopia de FTIV (Infravermelho por transformada de Fourier) já apresentam evidências na caracterização de múltiplos tecidos, entre eles a glândula tireoide, tendo como vantagem sua rapidez e preservação do tecido analisado. O estudo de novas técnicas na diferenciação dos nódulos tireoidianos pode auxiliar na seleção de pacientes que serão submetidos ao tratamento cirúrgico adequado, evitando o sobretratamento.

Objetivos: Caracterizar os tecidos tireoidianos sadios e patológicos à luz da espectroscopia de infravermelho (IV), testar a viabilidade do método de espectroscopia no IV em diferenciar tecidos patologicamente alterados da glândula tireoide comparativamente aos achados espectroscópicos encontrados em tecidos sadios. **Casuística e Métodos:** Os pacientes foram selecionados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de 2014 a 2015. A amostra foi composta por 44 pacientes de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, com indicação de tireoidectomia. Quarenta e quatro amostras de nódulos em tireoide e 44 de tecidos normais foram analisadas por espectroscopia no IV utilizando-se um espectrômetro Nicolet 380 - Nicolet USA® em tecidos a fresco. A análise foi realizada definindo-se as áreas de cada banda, utilizando-se para os cálculos o programa *OriginPro* 8.6.0 (OriginLab Corporation Northampton, MA 01060 USA). A seguir, efetuou-se a normalização pela banda a 1240 cm^{-1} . A comparação das áreas foi calculada por meio do teste t-Student com $p < 0,05$. Após o cálculo das médias realizou-se avaliação de derivadas de segunda ordem do espectro para se evidenciar as posições de cada banda de absorção. Realizou-se, também, a análise de cada banda aplicando o teste t-Student para amostras pareadas e amostras independentes; e o teste de Wilcoxon para amostras pareadas e para comparação de duas amostras independentes. **Resultados:** O espectro IV de cada peça foi obtido, sendo expresso em função da absorbância e dos números de onda no IV médio ($4000 - 900\text{ cm}^{-1}$). O presente estudo demonstrou que na análise do tecido tireoidiano pela espectroscopia no IV é possível diferenciar os nódulos benignos do tecido sadio, com diferença significativa na área da banda B entre tecido sadio e bócio, que corresponde a $1452,90\text{ cm}^{-1}$ no tecido sadio (Proteínas e Lipídeos) e $1069,80\text{ cm}^{-1}$ no bócio (DNA); e também diferença estatisticamente significativa entre os tecidos normal e carcinoma para largura na banda C, onde a largura foi maior no tecido com carcinoma do que no tecido normal. **Conclusões:** A espectroscopia no IV é capaz de diferenciar os tecidos tireoidianos patologicamente alterados da glândula tireoide comparativamente aos achados em tecidos tireoidianos sadios. Concluiu-se que nos pacientes com doença nodular benigna da glândula tireoide é possível diferenciar o tecido sadio do bócio com significância estatística, bem como também diferenciar nódulos malignos do tecido sadio por meio da espectroscopia no IV.

Palavras-Chave: Tireoide. Câncer. Espectroscopia. FTIV. Bócio.

ABSTRACT

VILLELA, L.F.A. **Characterization of thyroid tissue using infrared spectroscopy**. 2017. 75f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2017.

Introduction: In recent years, surgical procedures involving the thyroid gland have increased worldwide, as well as the incidence of malignant neoplasia without, however, observing an increase in the mortality rate. Many techniques have been proposed to achieve an accurate preoperative diagnosis in thyroid diseases. The FTIR spectroscopy techniques already present evidence in the characterization of multiple tissues, among them the thyroid gland, having as an advantage its rapidity and preservation of the tissue analyzed. The study of new techniques in the differentiation of thyroid nodules can help in the selection of patients who will undergo the appropriate surgical treatment avoiding overtreatment. **Objectives:** To characterize healthy and pathological thyroid tissues in the light of infrared spectroscopy, to test the viability of the infrared spectroscopy method in differentiating pathologically altered tissues from the thyroid gland compared to the spectroscopic findings found in healthy tissues. **Casuistic and methods:** Patients were selected at the Head and Neck Surgery Service of the Hospital of Clinics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil, from 2014 to 2015. The sample consisted of 44 patients of both sexes, aged over 18 years, oriented about their participation in the study and with indication of thyroidectomy. The analysis was performed by defining the areas of each band, using the program OriginPro 8.6.0 (OriginLab Corporation Northampton, MA 01060 USA). The band was then normalized to 1240 cm⁻¹. The mean area was calculated using the Student t-test with p<0.05. After the calculation of the averages, the second-order derivative of the spectrum was evaluated to show the positions of each absorption band. We also performed the analysis of each band by applying the t-Student test for paired samples, Wilcoxon test for paired samples, Student's t-test for independent samples and the Wilcoxon test for comparison of two independent samples. **Results:** The infrared spectrum of each piece was obtained, being expressed as a function of absorbance and wave numbers in the mean IR (4000 - 900 cm⁻¹). The present study demonstrated that in the analysis of thyroid tissue by infrared spectroscopy, we can differentiate benign nodules from healthy tissue, with a significant difference in the area of the B-band between healthy tissue and goiter, which corresponds to 1452.90 cm⁻¹ in healthy tissue (Proteins and Lipids) and 1069.80 cm⁻¹ in goiter (DNA) and also a significant difference in width between normal thyroid tissue and carcinoma of the C band. **Conclusions:** Infrared spectroscopy is able to differentiate pathologically altered thyroid tissues from the thyroid gland compared to findings in healthy thyroid tissues. After the analysis of the results it was possible to conclude that in patients with benign nodular disease of the thyroid gland it is possible to differentiate healthy goiter tissue with statistical significance, as well as it is possible to differentiate malignant nodules from healthy tissue through infrared spectroscopy.

Keywords: Thyroid. Cancer. Spectroscopy. FTIR. Goiter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Espetro eletromagnético com o intervalo entre possíveis frequências da radiação eletromagnética, desde as ondas de baixa frequência (ondas de rádio) até as de maior frequência (radiação gama)	24
Figura 2:	Exemplo de espectro de absorção de um nódulo compatível com bócio adenomatoso. Os picos de absorção relacionam-se com compostos químicos específicos	36
Figura 3:	Espectro de absorção obtido por espectroscopia no infravermelho de uma amostra de carcinoma papilífero sobreposta a um espectro de tecido saudável de um mesmo paciente, demonstrando maior concentração de proteínas e lipídeos no espectro compatível com carcinoma	37
Figura 4:	Área (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com tumor benigno.....	41
Figura 5:	Posição (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com tumor benigno.....	42
Figura 6:	Largura (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com tumor benigno.....	42
Figura 7:	Área (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com carcinoma.....	43
Figura 8:	Posição (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com carcinoma	43
Figura 9:	Largura (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com carcinoma	44
Figura 10:	Área (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na comparação entre o tecido com tumor benigno, carcinoma e tecido normal	45
Figura 11:	Posição (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na comparação entre o tecido com tumor benigno, carcinoma e tecido normal	46
Figura 12:	Largura (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na comparação entre o tecido com tumor benigno, carcinoma e tecido normal	47
Figura 13:	Razão entre as áreas dos nódulos benignos e malignos da banda B	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de absorção no espectro de infravermelho para compostos orgânicos. Cada banda analisada apresenta em sua região do espectro, uma estrutura bioquímica correspondente	33
Tabela 2 -	Distribuição dos tumores segundo resultado anatomopatológico obtido após análise espectroscópica	35
Tabela 3 -	Média de pico de absorção das bandas A, B e C com seu respectivo desvio-padrão e sua associação biológica	38
Tabela 4 -	Médias obtidas na banda A da área, posição e diâmetro médio (largura), com seus respectivos desvios-padrão e segundo tipo de tecido analisado com número de amostras	38
Tabela 5 -	Médias obtidas na banda B da área, posição e diâmetro médio (largura), com seus respectivos desvios-padrão e segundo tipo de tecido analisado com número de amostras	39
Tabela 6 -	Médias obtidas na banda C da área, posição e diâmetro médio (largura), com seus respectivos desvios-padrão e segundo tipo de tecido analisado com número de amostras	39
Tabela 7 -	Média, mediana e desvio padrão das variáveis área, posição e largura em cada banda nos pacientes com tumor benigno nos dois tecidos coletados seguido do p-valor do teste t-Student e Wilcoxon para dados pareados	40
Tabela 8 -	Média, mediana e desvio-padrão das variáveis área, posição e largura em cada banda nos pacientes com carcinoma nos dois tecidos coletados, seguidos do p-valor do teste t-Student e Wilcoxon para dados pareados	41
Tabela 9 -	Média, mediana e desvio-padrão das variáveis área, posição e largura em cada banda nas duas amostras de pacientes (tumor benigno e carcinoma), seguido do p-valor do teste T-Student e Man-Whitney para comparação de amostras independentes.....	45
Tabela 10 -	Análise de variância (ANOVA) das médias das razões da banda B em tecidos normais e patológicos com o número de análises realizadas, média das razões e seu desvio-padrão.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR-	Reflexão total atenuada
BRAF	Proto-oncogene BRAF, Serina Treonina Kinase
cGy-	<i>Centigray</i>
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
EG-	Gleason
FLUS-	Lesão folicular de significância indeterminada
FTIV-	Infravermelho por transformada de Fourier
GALDA-	Análise genética seguida de análise discriminante linear
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
INCA-	Instituto Nacional do Câncer
IV-	Infravermelho
LLC-	Leucemia linfocítica crônica
MAPK-	Proteína quinase mitogênica-ativada
PAAF-	Punção aspirativa com agulha fina
LDA-	Análise discriminante linear
PET-FDG-	Tomografia com emissão de pósitrons com fluorodeoxiglicose
Rb-	Razão entre as bandas B benignas e malignas
RM-	Ressonância magnética
RNA-	Ácido ribonucleico
RET	Proto-oncogene RET
TC-	Tomografia Computadorizada
TF-	Transformada de Fourier
USG-	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Fisiologia e patologia da glândula tireoide	18
1.2. Epidemiologia	20
1.3. Diagnóstico dos nódulos tireoidianos	20
1.4. Aplicações diagnósticas da FTIV	25
 2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	30
3.1. Considerações éticas.....	31
3.2. Seleção dos pacientes.....	31
3.3. Preparo das amostras.....	31
3.4. Análise das amostras.....	32
 4. RESULTADOS	34
 5. DISCUSSÃO	49
 6. CONCLUSÕES.....	55
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
 8. ANEXOS	61
 9. APÊNDICES	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fisiologia e patologia da glândula tireoide

A glândula tireoide é um órgão endócrino, situado no pescoço, com a função de produzir os hormônios T3 e T4, que possuem efeitos fisiológicos na diferenciação e desenvolvimento celular, bem como nas vias metabólicas por meio da interação com o núcleo celular estimulando a síntese proteica; exercendo, dessa forma, ações em todos os tecidos do organismo. Os hormônios tireoidianos participam do desenvolvimento fetal e da primeira infância, estimulando o desenvolvimento do sistema nervoso central. Nos adultos, interferem no consumo de oxigênio, metabolismo de proteínas e carboidratos, lipídeos e vitaminas. Adicionalmente, alteram as taxas de síntese de proteínas e promovem degradação de vários outros hormônios e fatores de crescimento; influenciando, assim, outras vias endócrinas (VOLPI; STECK, 2013).

Uma gama de patologias pode acometer a glândula tireoide: inflamatórias, autoimunes, infecciosas, neoplasias de comportamento benigno (como os adenomas) e maligno. Incidentalomas são tumores inesperados e assintomáticos, descobertos durante a investigação de uma doença sem correlação com a tireoide (RUSS et al., 2014). A prevalência é de 67% com a ultrassonografia (USG), 15% com a tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) do pescoço e 1-2% com tomografia com emissão de pósitrons com fluorodeoxiglicose (PET-FDG). Nódulos palpáveis são reconhecidamente frequentes, com prevalência de 5% na população geral (HEGEDÜS, BONEMMA, BENNEDBAEK, 2003; RUSS et al., 2014). O risco de malignidade nos incidentalomas diagnosticados com USG cervical, TC ou RM é de 5-13%. Em contraste, esse risco quando diagnosticado pelo PET-FDG é muito maior (em torno de 30%), ressaltando-se que mesmo sabendo que este exame é realizado em virtude da suspeita de outros sítios malignos, a maioria dos incidentalomas são cânceres diferenciados de tireoide e não metástases intratireoideanas.

O câncer de tireoide compreende um grupo de tumores com características peculiares, desde tumores de comportamento pouco agressivo e doença localizada até tumores avançados com prognóstico sombrio. Os carcinomas diferenciados compreendem o grupo composto pelos carcinomas papilífero,

folicular e de células de Hurtle, com diferenças prognósticas entre eles. As duas outras formas mais comuns são: o carcinoma medular, um tumor de células C produtoras de calcitonina e o carcinoma anaplásico, que frequentemente se origina de uma neoplasia bem diferenciada. Linfomas e doenças metastáticas de outros sítios representam uma pequena proporção de doença maligna tireoideana (LOGULLO; SREDNI, 2001).

Os carcinomas bem diferenciados possuem, em geral, bom prognóstico, com sobrevida em 10 anos de 95% para o carcinoma papilífero e 85% para o folicular. Evidências epidemiológicas sugerem que o carcinoma papilífero pode ser herdado em 5% dos pacientes. Apesar de os genes ainda não serem identificados, acredita-se que se trata de herança autossômica dominante, com penetrância incompleta e expressão variável. Uma mutação no gene TTF1 pode ser responsável por pelo menos um subgrupo desses pacientes. O risco de câncer de tireoide em famílias afetadas é mais de cinco vezes maior que na população geral (KITAHARA; SOSA, 2016). Exposição à radiação durante a infância aumenta o risco de câncer de tireoide em 20 vezes. Similarmente, a incidência é aumentada em adultos submetidos a tratamento de doença de Hodgkin na infância, que receberam doses de 4000 cGy (centigray). As taxas de câncer de tireoide são aumentadas em regiões com deficiência de iodo, de acordo com estudos epidemiológicos, porém não há até o momento uma associação clara.

Numerosas alterações genéticas e moleculares foram descritas em neoplasias tireoidianas. A perda de cromossomos, ou aneuploidia, foi identificada em 10% de todos os carcinomas papilíferos, mas esteve presente em 25% a 50% dos pacientes que morreram pela doença. Similarmente, o desenvolvimento de adenomas foliculares é associado com a perda do braço curto do cromossomo 11 (11p), e a transição para um carcinoma folicular parece envolver deleções de 3p, 7q e 22q (KUO; KELZ, 2016). Certos oncogenes foram identificados na progressão inicial dos tumores. Mutações da família RAS são observadas em 40 a 50% das mutações do carcinoma folicular, 20% dos carcinomas papilíferos e 20 a 40% dos carcinomas indiferenciados da tireoide. Mutações na via da proteína quinase mitogênica-ativada (MAPK) estão envolvidas na transformação maligna do

carcinoma papilífero. Rearranjo ou ativação dos proto-oncogenes RET e BRAF, os quais podem ativar a via MAPK, também estão envolvidos no carcinoma papilífero (KUO, KELZ, 2016). O adenoma de tireoide representa uma neoplasia benigna derivada de células foliculares, que são ocasionalmente múltiplas e podem surgir em uma glândula normal, em bócio nodular e tóxico ou tireoidite; ocorrendo mais frequentemente em indivíduos com mais de 30 anos.

1.2 Epidemiologia

A estimativa de incidência de novos casos de câncer de tireoide no Brasil em 2016, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 1.090 casos para o sexo masculino e 5870 casos para o sexo feminino (INCA, 2015). Lira et al. (2014) observaram incidência de casos de câncer da glândula tireoide no sexo feminino de 82% (660 casos), ao passo que no sexo masculino foi de 18% (147 casos), demonstrando maior incidência no sexo feminino (KITAHARA; SOSA, 2016). O relatório europeu GLOBOCAN 2000 estimou que 122.803 casos de câncer de tireoide ocorreram no mundo em 2000, com 8.570 mortes (INCA, 2015). Tem-se notado aumento na incidência de novos casos de câncer de tireoide em todo o mundo, atribuído tanto ao desenvolvimento de ferramentas diagnósticas como ao maior acesso da população ao sistema de saúde. Na revisão realizada por Kitahara e Sosa (2016), observou-se aumento da incidência de câncer de tireoide acima de 4 cm de diâmetro (KITAHARA; SOSA, 2016). A incidência de casos com doença restrita ao sítio primário foi de 68%, em doença regional disseminada para linfonodos foi de 26% e à distância, 4%. A sobrevida em cinco anos foi de 99,9% na forma localizada, 97,8% na doença regional e 54,1% com metástase à distância (MAZZAFERRI, 1993).

1.3 Diagnóstico dos nódulos tireoidianos

A citologia por meio da punção aspirativa com agulha fina (PAAF) é considerada o método de maior acurácia (95% em mãos experientes) e bom

custo-benefício; e faz parte de algoritmos de decisão terapêutica em portadores de um nódulo ou mais nódulos tireoidianos (CARNEIRO; DOMINGUES, 2013). Existem inúmeras classificações para descrever os resultados da PAAF, sendo que neste estudo foi adotada a classificação de Bethesda. Essa classificação foi concebida para permitir melhor comunicação entre médicos e instituições para padronizar os resultados da PAAF, que são divididos de I a VI, de acordo com os aspectos celulares. Por essa classificação podem ser obtidos seis resultados esperados: inconclusivo (I),benigno (II), lesão folicular de significância indeterminada (FLUS) (III), neoplasia folicular (IV), suspeito para malignidade (V) e maligno (VI) (BALOCH et al., 2008). Essa classificação procura estratificar o risco de malignidade nos nódulos caracterizados dentro desse padrão, ou seja, para nódulos com resultado benigno o risco de malignidade é menor que 1%, para FLUS de 5% a 10%, para neoplasia folicular de 20% a 30%, para suspeito de malignidade de 50% a 75% e para maligno de 100%. Para os casos de lesão suspeita para malignidade (Bethesda IV e V), ou maligno, a cirurgia está indicada. Para os casos de lesão folicular de significado indeterminado, que correspondem a 24% dos resultados, a cirurgia não é sempre indicada, e deve ser baseada na associação de outras variáveis (ARTUR et al., 2001).

No século XIX, a tireoidectomia era considerada uma empreitada perigosa. Halsted publicou em 1920 “A história cirúrgica do bócio”, citando aproximadamente 70 referências da literatura para tireoidectomias realizadas antes de 1850, encontrando aproximadamente 40% de mortalidade. A cirurgia da tireoide ganhou grande avanço com o aparecimento de Theodore Kocher na Universidade de Berne, em 1872. A tireoide sempre representou um desafio para os cirurgiões, e no avançar dos anos novas entidades foram reconhecidas e as condutas melhor elaboradas.

As indicações de cirurgia de tireoide têm experimentado importante aumento nos últimos anos, dado o maior acesso a exames de rastreamento, especialmente a USG. Tradicionalmente, o exame de congelação intraoperatório tem sido útil para avaliar nódulos tireoidianos suspeitos; no entanto o tempo demandado para a realização desse exame contribui para o aumento do tempo cirúrgico, custo do procedimento e pode potencialmente elevar o risco e aumentar

a morbidade. Além disso, ele requer sacrifício do tecido a ser examinado, impossibilitando preservá-lo nos casos em que não há necessidade de ressecá-lo. A eficácia da biópsia de congelação na cirurgia de tireoide é controversa, com sensibilidade variando de 50% a 93%, especificidade de 95,7 a 100% e razões de acurácia de 89% a 97,8%. (RUSS et al., 2014). A citologia é insuficiente para distinguir lesões benignas e malignas no nódulo folicular, uma vez que lesões malignas são identificadas por meio de invasão capsular e/ou invasão microvascular. É necessária a avaliação capsular completa e a análise por congelação é, muitas vezes, inadequada.

Um biomarcador do câncer é qualquer entidade estrutural ou funcional que pode ser medida objetivamente como os genes, as proteínas, os metabólitos, as atividades e vias intermediárias, a morfologia, os parâmetros citogenéticos bem como qualquer característica física ou mudança detectável conectada com câncer em indivíduos humanos. Marcadores tumorais são produtos de determinadas células que podem distingui-las das normais (MONTORO, 2012). Métodos analíticos diferentes, unidos em análise genômica, de proteínas e/ou plataformas baseadas em linhagem celular foram desenvolvidos e utilizados na descoberta de novos biomarcadores no câncer. Um teste ideal deve requerer pouca manipulação da amostra, não ser invasivo, ser altamente sensível, específico e reprodutível, bem como viável para reduzir custos de testes clínicos. Assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de uma tecnologia capaz de definir o diagnóstico histopatológico sem a necessidade de uma biópsia excisional intraoperatória. Uma metodologia com o propósito de realizar uma “biópsia óptica” dos tecidos em cirurgias de tireoide poderia ser muito útil em possibilitar o tratamento cirúrgico adequado em um único procedimento, evitando reoperações e também evitando tratamentos além do necessário. Em estudo experimental, Zhang et al. (2011) evidenciaram diferença significativa entre bócio e carcinoma papilífero no intraoperatório.

Desde a metade do século XX, a espectroscopia no infravermelho (IV) associada à microscopia foi reconhecida como um método não destrutivo de alta capacidade analítica para aplicação em pesquisa no câncer. A investigação do

FTIV foi bastante aprimorada com o uso de computação na análise e interpretação dos dados nos últimos cinquenta anos.

Vários estudos foram realizados nos últimos trinta anos com aplicações em múltiplas linhagens celulares como células sanguíneas, colo uterino e pulmão. Com relação às células sanguíneas, Liu, Xu e Scott (2007) utilizaram a espectroscopia no IV em hematologia para avaliar a diferenciação de leucócitos na leucemia linfocítica crônica (LLC). Linhagens celulares eram induzidas a se diferenciar em células neoplásicas para estudo de seu fenótipo característico. O resultado demonstrou aumento da concentração de lipídeos na membrana celular de células doentes com diminuição de proteínas. Na comparação entre FTIV em células esfoliadas e citologia cervical, utilizando como referência a biópsia colposcópica direta, Fung et al. (1997) encontraram sensibilidade e especificidade de 98,6% e 98,8% para FTIV e 86,6% e 90,5% para esfregaço Papanicolaou. Com relação ao estudo de células pulmonares, Sarkar et al. (2017) realizaram espectroscopia FTIV em células pulmonares previamente diferenciadas quimicamente em transição epitelial mesenquimal para analisar o perfil metabólico de suas bandas. Foi encontrada diferença significativa nas áreas correspondentes à transição mesenquimal no nível de lipídeos ($2840 - 2960\text{ cm}^{-1}$), proteínas (3290 cm^{-1}) e água ($330 - 3500\text{ cm}^{-1}$), que apresentaram aumento gradual conforme se diferenciaram. Os resultados de todos esses estudos indicaram, claramente, que o FTIV associado à análise estatística apropriada tem acurácia na classificação de tecidos em normal e maligno na ordem de 80-100%. Em estudo realizado em 184 linfonodos suspeitos para carcinoma papilífero, Liu et al. (2011) identificaram treze picos compatíveis com ácido, proteína, lipídeo ou carboidrato. Os parâmetros que diferenciaram os espectros dos linfonodos metastáticos dos não metastáticos compreenderam a razão de intensidade relativa de 1240 cm^{-1} (ácido nucleico), 1640 a 1546 cm^{-1} (substâncias com nitrogênio), 1400 cm^{-1} (relacionado a lipídeo), que aumentaram significativamente no grupo metastático. Zhang et al. (2011) encontraram diferença entre nódulos benignos e malignos na espectroscopia no IV em posições de pico P1640 ($p=0,046$), P1124 ($p=0,000$), P1550 ($p=0,001$).

As ondas eletromagnéticas existem em uma faixa contínua de frequência conhecida como espectro eletromagnético. Os fótons de maior energia são associados a menores comprimentos de onda e maior frequência, caracterizando os raios X e gama. Os de menor energia, com maiores comprimentos de onda e menores frequências caracterizam as ondas de rádio de 40 a 50 MHz, sendo usadas em RM. A Figura 1 mostra a faixa do espectro visível e seus limites.

Figura 1- Espectro eletromagnético com o intervalo entre possíveis frequências da radiação eletromagnética, desde as ondas de baixa frequência (ondas de rádio) até as de maior frequência (radiação gama).

Fonte: Direitos autorais a Philip Ronan. Permissão para distribuição sob os termos de GNU Licença de Documentação Livre, Versão 1.2 ou qualquer outra versão publicada pela Fundação de Software Livre.

O IV ocupa um intervalo entre o vermelho visível e o começo das micro-ondas (13000 cm^{-1} a 10 cm^{-1}). São reconhecidas três regiões de comprimento de onda (λ) no IV: o proximal (780nm - $2,5\text{ }\mu\text{m}$), o médio ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ a $25\text{ }\mu\text{m}$) e o IV distante (25 a $1000\text{ }\mu\text{m}$). A unidade espectroscópica mais utilizada no IV é o número de onda, uma relação de $1/\lambda$, representada em centímetros recíprocos (cm^{-1}). O IV médio se estende de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Quando o feixe (fótons) é aplicado em determinada molécula seus valores energéticos podem se enquadrar nas transições intermoleculares, alterando seus movimentos periódicos.

De acordo com a lei de Hooke, a frequência da vibração (ν) é relacionada à constante $f = k\Delta r$, proporcional à separação e deslocamento de dois átomos. A frequência dessa vibração é diretamente proporcional à força de ligação e inversamente proporcional à massa. Assim sendo, o modo vibracional de uma

ligação química ou grupo interage de forma específica à determinada frequência aplicada, podendo sofrer mudanças em seu padrão vibratório tais como alongamento e torção. O espectrômetro acoplado a um *software* pode demonstrar a absorvância em função do número de onda aplicado. A frequência da radiação absorvida pela molécula é, por sua vez, a frequência da vibração molecular, demonstrada na abscissa em número de onda.

Três tipos de instrumentos para medida de absorção no IV estão disponíveis: (1) espectrômetros dispersivos que empregam monocromador em rede de difração; espectrômetros com transformada de Fourier (FT), que empregam um interferômetro e (3) fotômetros não dispersivos, que utilizam um filtro ou um gás absorvente, que são usados para análise de gases atmosféricos em comprimentos de onda específicos. No espectrômetro FT, a codificação é obtida dividindo-se a fonte de radiação em dois feixes, cujos caminhos ópticos podem ser variados periodicamente para fornecer padrões de interferência. Dessa forma, a FT é usada para o processamento de dados.

1.4 Aplicações diagnósticas da FTIV

A partir do desenvolvimento de espectroscópios com melhor resolução e menor custo, muitas instituições deram início a pesquisas para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e prognósticos. A aplicabilidade da FTIV no tecido esofágico foi demonstrada por Wang et al. (2007), que utilizaram a espectroscopia para análise de amostras de esôfago e tecido gástrico. Os autores compararam a composição de glicogênio, glicoproteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) em mucosa escamosa, no epitélio de Barret e gástrico, encontrando maior concentração de DNA na displasia de Barret, em relação ao epitélio. As bandas foram mais proeminentes a 970, 1051 e 1081 cm^{-1} . Em estudo piloto, Maziak et al. (2007) analisaram a utilidade da FTIV no diagnóstico do câncer de esôfago em pacientes submetidos à esofagectomia. Foram encontradas mudanças significativas no espectro das amostras malignas. A intensidade da banda a 964 cm^{-1} diminuiu consideravelmente, bem como a região entre 1000 e 1200 cm^{-1} ,

onde as bandas de glicogênio decresceram em intensidade. A 1155 cm^{-1} , o componente de glicogênio das amostras malignas quase desapareceu, ao passo que o componente proteico de 1155 cm^{-1} aumentou em intensidade.

O câncer de próstata também foi estudado utilizando-se a espectroscopia para avaliar seu potencial em discriminar tumores com pior prognóstico. Baker et al. (2008) utilizaram a FTIV para estabelecer sua capacidade de diagnosticar tumores mais agressivos, baseando-se na escala de Gleason (EG). Nesse estudo, as amostras foram divididas em grupos $EG < 7$, $EG = 7$ e $EG > 7$, sendo este último de pior prognóstico por caracterizar tumores com invasão extracapsular e além da vesícula seminal. Os resultados foram: sensibilidade 92,3% e especificidade de 98,9%. Na discussão também foi levantada a variabilidade de resultado na classificação histológica na EG, pois dois patologistas diferentes concordaram com mesmo resultado em 29,2% das análises. Nesse cenário, a FTIV é um método preciso, acurado e que pode evitar o sobretratamento de uma doença biologicamente pouco agressiva.

A técnica de espectroscopia também pode ser realizada utilizando microscopia (espectromicroscopia FTIV). Nesse caso, um sistema de microscopia é integrado ao sistema do espectroscópio gerando a imagem do tecido analisado. Em pesquisa com meningiomas humanos, Ali et al. (2008) procuraram padrões próprios em tecidos ressecados em cirurgia. Os autores compararam os tecidos periféricos normais com os tumorais. A diferença encontrada nos tumores foi relacionada à diminuição das bandas associadas aos lipídeos (1735 cm^{-1}) e mudanças nas bandas das proteínas principais, demonstrando aumento de proteínas indiferenciadas. A região amida II dos tumores apresentou mudança em relação aos controles ($1548\text{ a }1544\text{ cm}^{-1}$). Utilizando essas diferenças sobrepuseram as áreas das bandas alteradas à imagem do tecido estudado para auxiliar na identificação de áreas com neoplasia durante a análise histopatológica.

O câncer de mama também foi caracterizado por meio da FTIV em tecidos removidos durante a cirurgia por Zhou et al. (2006), que observaram diferença entre tecidos malignos e benignos nas razões de proteínas estruturais, lipídeos e ácidos nucleicos.

Em relação ao câncer de tireoide, a espectroscopia vem sendo testada para a diferenciação de nódulos benignos de malignos. Wu et al. (2016) realizaram espectroscopia FTIV com reflexão total atenuada (ATR). Esse método possibilita melhor resolução espacial da amostra analisando a peça no eixo da radiação e fora dele. Heather et al. (2010) coletaram amostras à fresco, encontrando diferença significativa nas bandas referentes aos ácidos nucleicos (1250cm^{-1}), que eram maiores no carcinoma do que no bócio, atribuindo como justificativa a proliferação celular acentuada e maior apoptose. Além disso, os picos foram aumentados em 1640, 1550, 1460, 1400, 1160 e 1080 cm^{-1} (proteínas, lipídeos e carboidratos). Apesar de sua casuística atingir 100% de acurácia na congelação, os autores referiram sensibilidade de 66-68,8% e especificidade de 99-100%, concluindo que a ATR-FTIV é uma ferramenta útil na diferenciação de tumores de tireoide. Zhang et al. (2011) encontraram diferença nos picos das bandas de 1640, 1240 e 1550 cm^{-1} , respectivamente, amida I, ácidos nucleicos e amida II.

No presente estudo, realizou-se análise de nódulos tireoidianos em carcinomas papilífero e folicular, adenoma folicular, tireoidite de Hashimoto e bócio coloide para avaliar a espectroscopia FTIV na diferenciação de tecidos malignos e benignos e normais. As bandas analisadas compreenderam o IV médio de 1160 a 2300 cm^{-1} .

A literatura demonstra diferenças de intensidade na absorção de lipídeos, amidas, DNA, RNA e fosfolipídios. Assim sendo, neste estudo optou-se pela análise das referidas bandas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar tecidos da glândula tireoide à luz da espectroscopia por IV.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade da espectroscopia por IV em diferenciar tecidos patologicamente alterados da glândula tireoide, comparativamente aos achados espectroscópicos em tecidos saudáveis.
- Avaliar a capacidade da espectroscopia por IV em identificar neoplasias da glândula tireoide, bem como diferenciar lesões malignas de benignas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo nº 14495/2012 (Anexo A).

Os pacientes foram convidados a participar voluntariamente do estudo, e após esclarecimento sobre os seus objetivos, condições, riscos e benefícios e aceitação dos indivíduos, foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos mesmos (Anexo B).

3.2 Seleção dos pacientes

Os pacientes foram selecionados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMRP-USP, no período de 2014 a 2015. Os critérios de inclusão foram: indivíduos portadores de nódulos tireoidianos maiores de 5 mm à USG, TSH normal ou aumentado, com PAAF indicativa para tireoidectomia (Bethesda I em duas amostras consecutivas, Bethesda II com sintomas compressivos, ou nódulos maiores que quatro centímetros no seu maior diâmetro Bethesda III, IV, V e VI). Foram excluídos aqueles com diagnóstico que geravam dúvida, linfonodos e adenomas de paratireoide. A amostra foi composta por 44 pacientes de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, orientados sobre sua participação no estudo e com indicação de tireoidectomia. Os pacientes selecionados foram submetidos à tireoidectomia (total ou parcial) no HCFMRP-USP.

3.3 Preparo das amostras

Foram utilizadas amostras de 44 pacientes de ambos os gêneros, obtidas por tireoidectomia realizada no HCFMRP-USP, divididas em tecido normal e tumor totalizando 88 amostras, sendo removidas e mantidas em solução de formalina em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à

espectroscopia no IV e a seguir enviadas ao Laboratório de Patologia, sendo coradas com hematoxilina-eosina. O intervalo médio de transporte e análise por FTIV foi de 15 horas.

Utilizou-se para análise o espectrômetro Nicolet 380 - Nicolet USA®. No preparo para a análise da amostra foi usado como redutor de sinal (diminuição dos níveis de CO₂ e H₂O) um purificador *Hiperfilter light* acoplado a um desumidificador *Metaplan air point*. No sistema acoplou-se uma mangueira de 100 cm preenchida com sílica gel (4/8 mm P.A, *Sinth*). A resolução adotada foi de 4 cm⁻¹, utilizando janela de fluoreto de cálcio (CaF₂) com 2,54 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura.

3.4 Análise das amostras

A análise foi realizada definindo-se as áreas de cada banda, utilizando para os cálculos o programa *OriginPro* 8.6.0 (OriginLab Corporation Northampton, MA 01060 USA). A seguir, procedeu-se a normalização pela banda a 1240 cm⁻¹ (DNA, RNA, fosfolipídeos). Esta banda foi adotada por ser mais estável frente à degradação pelo ressecamento do CO₂ e também por ser específica. A média das áreas foi calculada por meio do teste t-Student com p<0,05. Após o cálculo das médias, foram avaliadas as derivadas de segunda ordem do espectro para se evidenciar as posições de cada banda de absorção. O cálculo das derivadas foi empregado para eliminar os efeitos da linha de base e fundo. A seguir, foi realizada a avaliação de deslocamentos do pico de absorção, identificando suas macromoléculas. Também foram analisadas as razões. Neste tipo de cálculo, utiliza-se uma banda de absorção como referência para o grupo molecular. No presente estudo foi usada a banda localizada em 1630 cm⁻¹ (amida II) para DNA, RNA, fosfolipídeos e lipídeos. Esta banda foi escolhida por ser referência às proteínas, segundo Benedetti et al. (1997) e Surewicz, Mantsch e Chapman (1993). Uma vez definida a banda, foram calculadas as razões entre as áreas considerando Lipídeos/amida II, DNA/amida II, RNA/amida II, Fosfolipídeos/amida II, Lipídeos/DNA. Por meio desta razão realizou-se a diferenciação entre nódulos

benignos, malignos e tecido sadio pela análise de variância (ANOVA One-Way) e testes de Tukey e Fisher. Após, compararam-se as razões entre a banda B e C utilizando como parâmetro a banda A. Aplicou-se a análise de variância (ANOVA One-way) também para identificar diferenças entre as amostras. A Tabela 1 resume as regiões espectrais com suas respectivas representações bioquímicas.

Tabela 1 - Valores de absorção no espectro de infravermelho para compostos orgânicos. Cada banda analisada apresenta em sua região do espectro, uma estrutura bioquímica correspondente

Banda	Região Espectral	Estrutura Bioquímica
A	1630 cm ⁻¹	Amida I
B	1440 cm ⁻¹	Proteínas e Lipídeos
C	1240 cm ⁻¹	Colágeno, DNA

Foi realizada análise de cada banda aplicando o teste t-Student para amostras pareadas e amostras independentes e o teste de Wilcoxon para amostras pareadas e para comparação de duas amostras independentes. Os testes pareados foram aplicados para comparação de tecido sadio e tumor (adenomas e carcinomas); e os testes para amostras independentes foram utilizados para comparação entre os nódulos (benigno ou carcinoma). A escolha entre a metodologia paramétrica e não paramétrica foi feita a partir do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Em seguida, foram comparadas as razões entre as bandas B e C utilizando como parâmetro a banda A. Aplicou-se a análise de variância (ANOVA One-Way) para identificar diferenças entre as amostras.

4. RESULTADOS

A amostra foi composta por quarenta e quatro pacientes de ambos os sexos, com idade média de 54 anos, submetidos à tireoidectomia. O grupo composto por tumores benignos apresentou duas amostras de adenoma folicular, dezesseis de bócio coloide, três de tireoidite de Hashimoto, uma de tireoidite linfocítica e uma de tumor folicular. As amostras representando neoplasia maligna se distribuíram em dezenove pacientes portadores de carcinoma papilífero e em dois com carcinoma folicular. Os dados dos pacientes foram distribuídos em grupos discriminados de acordo com o resultado anatomopatológico. A distribuição dos resultados anatomopatológicos está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos tumores segundo resultado anatomopatológico obtido após análise espectroscópica

Anatomopatológico	Pacientes
Bócio coloide	16
Adenoma folicular	2
Tireoidite de Hashimoto	3
Tumor folicular	1
Tireoidite linfocítica	1
Carcinoma papilífero	19
Carcinoma folicular	2
Total	44

O espectro IV de cada peça foi obtido, sendo expresso em função da absorbância e números de onda no IV médio (4000 - 900 cm^{-1}). A Figura 2 exemplifica um espectro obtido na análise de uma amostra de bócio adenomatoso. As áreas de maior concentração de DNA se encontram a 900 - 1300 cm^{-1} , as de proteínas na região de 1450 - 1700 cm^{-1} e de lipídeos de 2800 - 3100 cm^{-1} .

Figura 2 - Exemplo de espectro de absorção de um nódulo compatível com bócio adenomatoso. Os picos de absorção relacionam-se com compostos químicos específicos.

A Figura 3 mostra a diferença de espectro entre o carcinoma papilífero e seu tecido saudável adjacente. Observa-se que a concentração de DNA e proteínas é mais intensa de 1200 a 1300 cm^{-1} , bem como há maior intensidade na banda amida I referente a proteínas (1600 cm^{-1}). A região de 2800 - 3100 cm^{-1} é relacionada a lipídeos.

Figura 3 - Espectro de absorção obtido por espectroscopia no infravermelho de uma amostra de carcinoma papilífero sobreposta a um espectro de tecido saudável de um mesmo paciente, demonstrando maior concentração de proteínas e lipídeos no espectro compatível com carcinoma.

As posições de pico de cada banda benigna e maligna com seu desvio padrão e correspondente químico estão apresentadas na Tabela 3. Para o cálculo, foi aplicado o teste t-Student, e como referência utilizou-se o estudo de Mostaço-Guidolin (2009), que apresentou uma tabela dos respectivos compostos químicos de acordo com o pico de absorção no espectro analisado pela espectroscopia FTIV.

Tabela 3 - Média de pico de absorção das bandas A, B e C com seu respectivo desvio-padrão e sua associação biológica

Banda	Amostra	Picos de Abs. (cm ⁻¹) + DP	Associação Biológica
A	Bócio	3496,42 (21)	Subestruturas “cis” ordenadas
	Normal	1636,11 (1)	Configuração β - Amida I
	Carcinoma	1639,47 (13)	Configuração β - Amida I
B	Bócio	1069,80 (22)	DNA
	Normal	1452,90 (6)	Proteínas e Lipídeos
	Carcinoma	1452,89 (6)	Proteínas e Lipídeos
C	Bócio	741,36 (22)	DNA RNA
	Normal	1239,82 (1)	DNA
	Carcinoma	1240,88 (5)	DNA

DP= desvio-padrão.

A região correspondente à banda A se estende de 1485 cm⁻¹ a 1785 cm⁻¹. Essa região do espectro corresponde à amida II e às proteínas. Nessa região foi realizado o cálculo da área da banda, do diâmetro médio e pico da absorbância. As amostras foram agrupadas em malignas, benignas e sadias. Na Tabela 4 estão apresentadas as médias dos resultados.

Tabela 4 - Médias obtidas na banda A da área, posição e diâmetro médio (largura), com seus respectivos desvios-padrão e segundo tipo de tecido analisado com número de amostras

Resultados da Banda A			
	Área (M+/-DP)	Posição (cm ⁻¹ +/-DP)	Largura (+/-DP)
Bócio (23)	15 +/- 3	1636 +/-2	77+/-22
Carcinoma (19)	13+/-3	1639 +/-13	75+/-28
Normal (18)	14+/-2	1636+/-1	73+/-15

A banda B compreende a região espectral de 1345 cm⁻¹ a 1482 cm⁻¹, correspondente à amida II e III. As médias se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 - Médias obtidas na banda B da área, posição e diâmetro médio (largura), com seus respectivos desvios-padrão e segundo tipo de tecido analisado com número de amostras

Resultados da Banda B			
	Área (+/- DP)	Posição (cm ⁻¹ +/-DP)	Largura (+/-DP)
Bócio (22)	0,9+/-0,2	1452,7 +/- 6	63,4 +/- 21
Carcinoma (19)	0,7+/-0,2	1453 +/- 6	64,9 +/- 19
Normal (18)	0,7+/-0,3	1452,9 +/- 5	58,8 +/- 18

A banda C compreende a região de 1182 cm⁻¹ a 1345 cm⁻¹ (DNA e RNA). A Tabela 6 resume seus resultados.

Tabela 6 - Médias obtidas na banda C da área, posição e diâmetro médio (largura), com seus respectivos desvios-padrão e segundo tipo de tecido analisado com número de amostras

Resultados da Banda C			
	Área (+/- DP)	Posição (cm ⁻¹ +/-DP)	Largura (+/-DP)
Bócio (23)	0,75+/-0,4	1238+/-8	39+/-16
Carcinoma (19)	0,5+/-0,3	1240+/-4	37+/-7
Normal (18)	0,57+/-0,3	1241+/-3	31+/-4

Foi avaliada estatisticamente a diferença entre o tecido normal e o tecido patológico. O teste considerado em cada amostra foi o teste t-Student para dados pareados, no caso em que se encontrou normalidade da variável/banda, e Wilcoxon para dados pareados nos casos em que a normalidade foi rejeitada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

A Tabela 7 mostra que para os pacientes com tumor benigno houve diferença estatisticamente significativa na área entre o tecido normal e aquele com tumor benigno quanto à área da banda B (p=0,0418). Na Tabela 8 observa-se a amostra dos pacientes com carcinoma, em que se verificou diferença estatisticamente significativa entre os tecidos normal e com carcinoma para

largura na banda C ($p=0.0238$), sendo que a largura foi maior no tecido com carcinoma do que no tecido normal. As demais bandas não apresentaram significância estatística. As médias e o desvio-padrão entre os nódulos benignos e tecidos normais e nódulos malignos e tecidos normais estão demonstrados nas Figuras 4 a 9.

Tabela 7 - Média, mediana e desvio padrão das variáveis área, posição e largura em cada banda nos pacientes com tumor benigno nos dois tecidos coletados seguido do p-valor do teste t-Student e Wilcoxon para dados pareados

Variável	Normal				Tumor Benigno				p-valor
	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	
Área A*	19	14.36	13.88	2.79	23	15.61	15.26	3.26	0.1219
Posição A*	18	1636.12	1635.42	1.37	23	1636.7	1636.87	2.06	0.5184
Largura A**	18	73.34	70.31	15.09	23	77.43	69.57	22.9	0.6397
Área B*	18	0.73	0.67	0.31	22	0.9	0.87	0.27	0.0418
Posição B**	18	1452.9	1456.06	6.65	23	1452.73	1455.1	6.51	0.5876
Largura B*	18	56.14	55.41	17.62	23	63.4	69.78	21.16	0.4301
Área C*	18	0.58	0.51	0.35	23	0.76	0.74	0.44	0.0806
Posição C**	18	1239.82	1239.82	1.37	23	1238.39	1240.07	8.01	0.6570
Largura C**	18	34.89	33.71	6.3	23	39.27	34.17	16.88	0.8650

Tabela 8 - Média, mediana e desvio-padrão das variáveis área, posição e largura em cada banda nos pacientes com carcinoma nos dois tecidos coletados, seguidos do p-valor do teste t-Student e Wilcoxon para dados pareados

Normal					Carcinoma				
Variável	N	Média	Mediana	Desvio-Padrão	N	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p-valor
Área A*	17	13.9	13.95	2.09	19	13.53	13.4	3.18	0.6641
Posição A*	17	1640.72	1637.35	14.33	20	1639.47	1636.39	13.3	0.1413
Largura A*	17	77.78	70.12	30.33	20	75.81	69.45	28.18	0.3719
Área B*	17	0.73	0.75	0.24	19	0.74	0.72	0.27	0.9187
Posição B**	18	1448.91	1455.34	18.1	19	1452.89	1456.06	6.82	0.8945
Largura B*	18	58.8	59.82	18.4	20	64.93	71.22	19.47	0.4513
Área C*	17	0.47	0.39	0.36	19	0.57	0.49	0.31	0.2874
Posição C*	18	1241.38	1240.55	3.26	20	1240.89	1239.34	4.98	0.6017
Largura C*	16	31.89	32.38	4.11	18	37.51	36.26	7.26	0.0238

Figura 4 - Área (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com tumor benigno.

Figura 5 - Posição (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com tumor benigno.

Figura 6 - Largura (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com tumor benigno.

Figura 7 - Área (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com carcinoma.

Figura 8 - Posição (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com carcinoma.

Figura 9 - Largura (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na amostra de pacientes com carcinoma.

Posteriormente, foi feita a comparação entre os tecidos patológicos (carcinoma x tumor benigno). Nesse caso, o teste t-Student para amostras independentes foi aplicado quando a normalidade foi observada; e o teste de Wilcoxon para amostras independentes para as bandas sem normalidade. Não foi possível identificar nenhuma diferença estatisticamente significativa para nenhuma das bandas (Tabela 9). As Figuras 10, 11 e 12 representam a média e o desvio-padrão entre nódulos malignos e benignos.

Tabela 9 - Média, mediana e desvio-padrão das variáveis área, posição e largura em cada banda nas duas amostras de pacientes (tumor benigno e carcinoma), seguido do p-valor do teste T-Student e Man-Whitney para comparação de amostras independentes

Variável	Carcinoma				Tumor Benigno				p-valor
	N	Média	Mediana	Desvio-Padrão	N	Média	Mediana	Desvio-Padrão	
Área A*	19	13.53	13.4	3.18	23	15.61	15.26	3.26	0.0441
Posição A**	20	1639.5	1636.39	13.3	23	1636.7	1636.87	2.06	1.0000
Largura A**	20	75.81	69.45	28.18	23	77.43	69.57	22.9	0.9903
Área B*	19	0.74	0.72	0.27	22	0.9	0.87	0.27	0.0612
Posição B**	19	1452.9	1456.06	6.82	23	1452.7	1455.1	6.51	0.6866
Largura B**	20	64.93	71.22	19.47	23	63.4	69.78	21.16	0.7995
Área C*	19	0.57	0.49	0.31	23	0.76	0.74	0.44	0.1178
Posição C**	20	1240.9	1239.34	4.98	23	1238.4	1240.07	8.01	0.9613
Largura C**	18	37.51	36.26	7.26	23	39.27	34.17	16.88	0.7641

Figura 10 - Área (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na comparação entre o tecido com tumor benigno, carcinoma e tecido normal.

Figura 11 - Posição (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na comparação entre o tecido com tumor benigno, carcinoma e tecido normal.

Figura 12 - Largura (média $\pm$ desvio-padrão) para cada banda na comparação entre o tecido com tumor benigno, carcinoma e tecido normal.

Realizou-se, a seguir, a análise das razões. O cálculo das razões é utilizado principalmente na diferenciação de DNA, RNA e amidas (MOSTAÇO-GUIDOLIN, 2009). No presente estudo, foi adotado este método selecionando-se uma banda de absorção como referência. Para o cálculo das proteínas e lipídeos referentes às bandas B e C (DNA, RNA e Fosfolipídeos) foram utilizados, como referência, os grupos amida I e II (banda A). Também, se realizou razão entre Proteínas/DNA. O teste selecionado para a diferenciação dessas razões foi a ANOVA One-Way, com $p < 0,05$. A Tabela 10 demonstra os resultados com diferença estatisticamente significativa entre o tecido sadio e os nódulos benignos. Entre os nódulos benignos e malignos não houve diferença significativa com este método de análise. A Figura 13 exhibe a diferença entre o tecido sadio e o bócio na banda B, que corresponde a $1452,90 \text{ cm}^{-1}$ no tecido sadio (proteínas e lipídeos) e $1069,80 \text{ cm}^{-1}$ no bócio (DNA). As Tabelas contendo o agrupamento de área, diâmetro e número de onda dos tecidos analisados se encontram nos Apêndices A, B, C e D.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) das médias das razões da banda B em tecidos normais e patológicos com o número de análises realizadas, média das razões e seu desvio-padrão

	N	Média	Desvio Padrão
Rb-normal	18	0,048	0,012
Rb-benigno	20	0,058	0,013
Rb-normal	15	0,051	0,01
Rb-maligno	15	0,058	0,033

N= número de análises realizadas.

Figura 13: Razão entre as áreas dos nódulos benignos e malignos da banda B.

5. DISCUSSÃO

A identificação de nódulos tireoidianos menores que 1 cm aumentou com o advento da USG e o maior acesso da população às ferramentas diagnósticas, demandando cada vez mais métodos de alta acurácia na identificação do câncer, evitando o sobretratamento da população, definido como “tratamentos realizados com bases sólidas e as preferências do paciente, mas que não irão ajudar/alterar a condição clínica deste” (PROQUALIS, 2016). Há controvérsia sobre o aumento da incidência de neoplasias tireoidianas. Vaccarella et al. (2016) analisaram o sobrediagnóstico das neoplasias tireoidianas, principalmente após a década de 1980, identificando uma mudança substancial na curva de incidência estimada pela idade, com aumento da incidência atribuído a pacientes mais jovens. Utilizando como referência dados da década de 1960 (antes da introdução da USG), os autores estimaram uma curva histórica, encontrando crescimento exponencial com a idade similar à maioria dos tumores epiteliais. Observaram, ainda, que em países onde se aplicou uma política de atenção voltada para detecção de nódulos, a incidência foi ainda maior sem alterações na taxa de mortalidade. Esses dados corroboram para maior atenção na indicação da tireoidectomia. O estudo de novas técnicas na diferenciação dos nódulos tireoidianos pode auxiliar na seleção de pacientes que serão submetidos ao tratamento cirúrgico adequado, evitando o sobretratamento. Neste estudo avaliou-se a espectroscopia FTIV para a diferenciação dos tecidos tireoidianos.

Em pesquisa utilizando espectroscopia no IV para a detecção de carcinoma de tireoide, Zhang et al. (2011) encontraram diferença entre bócio nodular e carcinoma papilífero de tireoide nos picos 1640 cm^{-1} (relacionado à amida I), 1240 cm^{-1} (DNA) e 1550 cm^{-1} (amida II). Diferentemente, na amostra do presente estudo foram comparados os nódulos benignos e o carcinoma a 1640 cm^{-1} (p: 1,0), 1240 cm^{-1} (p: 0,9) e 1452 cm^{-1} (p: 0,6) e não foram observadas diferenças significativas em relação aos números de onda, área e diâmetro médio.

A identificação de tecidos tireoidianos pela espectroscopia no IV foi estudada no intraoperatório de tireoidectomia para discriminação de nódulos benignos e malignos por Wu et al. (2016). Os autores identificaram sete picos de absorção, com diferença significativa nas posições 1460 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} relacionadas a lipídeos, 1240 cm^{-1} (ácido nucleico) e 1160 cm^{-1} (relacionados a carboidrato).

Segundo eles, esses parâmetros isoladamente não foram capazes de diferenciar os dois grupos. Assim sendo, foi desenvolvida uma análise discriminante utilizando o programa MATLAB. Os resultados indicaram sensibilidade de 84,4%, especificidade de 88% e acurácia de 86,6. Nesse cenário, métodos auxiliares são empregados para análise das bandas. No presente estudo, adotou-se o cálculo das razões entre bandas para diferenciar os tecidos, utilizando como referência as regiões amida I e II e testes de t-Student e de Wilcoxon para análise. Outras regiões são utilizadas como parâmetro. Andrus e Strickland (1998) utilizaram DNA (1121 cm^{-1}), identificando maior intensidade de absorbância em linfomas de alto grau.

A lobectomia está indicada em nódulos suspeitos <4 cm com citologia indeterminada, baixo risco à USG e baixa suspeita clínica, de acordo com a atualização do Consenso Brasileiro para Nódulo e Câncer de Tireoide (ROSÁRIO et al., 2013). Essa diretriz também recomenda que a lobectomia inicial possa ser realizada no carcinoma papilífero clássico <1 cm unifocal sem acometimento linfonodal e invasão extratireoidiana. A totalização de uma tireoidectomia parcial pode ser dispensada no carcinoma papilífero, descrito anteriormente, no carcinoma folicular minimamente invasivo (menor que dois cm) ou variante folicular de carcinoma papilífero encapsulada, sem invasão linfática e <2 cm. Nesse sentido, a espectroscopia no IV seria capaz de identificar alterações moleculares compatíveis com nódulos tireoidianos benignos ou malignos, acrescentando informação para uma abordagem cirúrgica inicial quanto à preservação de tecido tireoidiano. O presente estudo demonstrou que na análise do tecido tireoidiano pela espectroscopia no IV, é possível se diferenciar os nódulos benignos do tecido sadio, com diferença significativa na área da banda B, compreendida entre 1345 cm^{-1} a 1482 cm^{-1} , e nódulos malignos dos tecidos sadios com significância entre o diâmetro médio a 1240 cm^{-1} .

A utilização da espectroscopia no IV no campo da oncologia engloba pesquisas em diferentes estruturas e tecidos. Em estudo sobre a diferenciação de paratireoides e tireoides, McWade et al. (2013) demonstraram que com o uso de fluorescência no IV proximal pode-se diferenciar esses tecidos com maior intensidade de fluorescência das paratireoides em relação às tireoides com

$p=5,91 \times 10^{-14}$. A vantagem dos métodos ópticos é a sua velocidade, que possibilita a identificação quase instantânea dos tecidos e a ausência de remoção deste para a interpretação diagnóstica. O sistema de espectroscopia utilizado durante as cirurgias era composto de um espectrômetro acoplado a um laser de diodo, um computador e um probe de fibra óptica. Liu et al. (2011) utilizaram um espectrômetro FTIV na sala de cirurgia para detecção de metástases linfáticas de carcinoma papilífero em linfonodos, com tempo de procedimento de 2-3 minutos. Os autores encontraram aumento nas razões de intensidade de 1240 cm^{-1} , 3280 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} e 1546 cm^{-1} (ácido nucleico) e 1400 cm^{-1} (lipídeos) nos linfonodos metastáticos. Na amostra deste estudo, a banda a 1240 cm^{-1} , que corresponde ao DNA, apresentou diferença no diâmetro entre tecido sadio e carcinoma.

Shaw et al. (1999) observaram diferenças entre a razão de áreas normais e pré-cancerosas nas regiões de $1130\text{-}1180 \text{ cm}^{-1}$ e $1180\text{ a }1260 \text{ cm}^{-1}$. No presente estudo, utilizou-se o cálculo das razões entre áreas com diferença entre área de bócio e tecido normal e testes t-Student e de Wilcoxon com diferença entre tecidos malignos e normais. Sarkar et al. (2017) realizaram FTIV em células pulmonares induzidas à transformação epitelial-mesenquimal. Tal alteração está relacionada ao potencial de disseminação metastática celular. A indução se deu por meio do uso de fator de transformação beta-1, sendo confirmada por imuno-histoquímica. As células diferenciadas apresentaram mudanças na concentração de proteínas e *turnover* de ácido nucleico, respectivamente, a $960\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$ e $1400\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$. Esse estudo apresentou a particularidade de analisar o potencial da espectroscopia na identificação de células com potencial de disseminação metastática. No presente estudo, foram utilizadas células não modificadas; assim sendo, futuros estudos poderão ser realizados em células tireoidianas induzidas à diferenciação.

O estudo de tecidos de próstata, ao longo de gerações, foi alvo da pesquisa realizada por Theophilou et al. (2015). Os autores avaliaram tecidos prostáticos benignos tratados por prostatectomia transuretral em pacientes de mesmo grupo etário (60 a 69 anos), utilizando a técnica RTA-FTIV associada a Raman. As amostras foram selecionadas no período de 1983 a 2013 e comparadas por análise multivariada de componente principal, seguida de análise

discriminante linear (LDA), algoritmo de progressão sequencial e análise genética seguida de análise discriminante linear (GALDA). Após a análise espectroscópica, as amostras dos anos de 1983-1984 e 2012-2013 foram submetidas à imuno-histoquímica para avaliar as possíveis alterações epigenéticas. Por meio da RTA-FTIV e Raman concluiu-se que houve variação da área do espectro contendo DNA - RNA ($1000-1490\text{ cm}^{-1}$) entre as gerações. Os possíveis fatores de risco relacionados compreendem mudanças dietéticas (álcool, carnes vermelhas e vegetais) e a síndrome metabólica (dislipidemia, diabetes, hipertensão e baixos níveis de HDL). Assim sendo, tal estudo pode relacionar quais mudanças no estilo de vida podem ter impacto na prevenção do câncer de próstata. A espectroscopia, por meio da detecção de alterações em nível molecular, permite diferenciar os diferentes tecidos ao longo dos anos. Dessa forma, também é possível utilizar amostras de bancos de tecidos para avaliar as mudanças no perfil epigenético. No presente estudo, foram usados tecidos em formalina para a análise espectroscópica e não se aplicou outro método na análise discriminante.

Os tumores da glândula adrenal foram analisados por Dudala et al. (2016), que utilizaram FTIV em tecidos submetidos à ressecção cirúrgica. O método aplicado foi a microespectroscopia acoplada a um espectroscópio para diferenciação entre adenoma, hiperplasia e feocromocitomas. Em sua análise, os autores encontraram diferenças significativas na região entre 2997 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} , que correspondem a lipídeos e 1770 cm^{-1} e 1485 cm^{-1} , assinatura de bandas de amida e ácidos nucleicos. Os níveis de lipídeos foram maiores em adenoma e hiperplasia, em relação aos feocromocitomas, estes mais ricos em proteínas. As razões de intensidade de proteínas estruturais α e β (1654 cm^{-1} e 1631 cm^{-1}) foram discretamente aumentadas nos adenomas comparados ao feocromocitoma e à hiperplasia. O passo seguinte foi avaliar qual das estruturas apresentava diferença mais significativa. A ferramenta utilizada foi a análise discriminante múltipla por meio dos testes de Wilks λ parcial F, observando que a razão lipídeo/proteína foi o parâmetro mais significativo na discriminação geral das lesões. Não foi realizada análise discriminante no presente estudo. Este teste poderá ser aplicado em futuros estudos, analisando múltiplos tipos de lesões tireoidianas e qual razão da região do espectro pode apresentar maior impacto em sua diferenciação.

Outros métodos ópticos também possibilitam diferenciar tecidos tireoidianos sem destruição dos mesmos e em tempo hábil para utilização intraoperatória. Brandão et al. (2015) utilizaram a fluorescência resolvida no tempo para diferenciar tecidos normais, malignos e benignos de tireoide. A fluorescência resolvida no tempo avalia a queda de intensidade de um fóton em tecidos excitados a 298-300 nm e sua queda de intensidade a 340 e 450 nm. Para cada emissão (340 e 450 nm), os tecidos benignos, saudáveis e malignos foram analisados quanto ao tempo de queda de valores. Os tempos de vida curto e longo a 340 nm foram comparados para cada variável, concluindo que houve diferença significativa entre tempo de vida dos tecidos malignos e saudáveis em ambos os tempos de vida e não se observou diferença entre tecido sadio e bócio. Para emissão a 450 nm não houve diferença significativa para saudável, maligno e benigno no tempo de vida curto, mas em tempos de vida maiores verificou-se diferença entre tecido maligno e saudável, mas não entre saudável e benigno. A aplicação de FTIV em tecido tireoidiano possibilitou a diferenciação entre tecidos sadios e benignos e tecidos sadios e malignos. Em estudos futuros talvez se possa combinar as duas modalidades para diferenciação intraoperatória de tecidos tireoidianos.

6. CONCLUSÕES

A espectroscopia no IV é capaz de diferenciar os tecidos tireoidianos patologicamente alterados da glândula tireoide, comparativamente aos achados em tecidos tireoidianos saudáveis. Após a análise dos resultados concluiu-se que:

- Nos pacientes com doença nodular benigna da glândula tireoide, foi possível diferenciar o tecido saudável do bócio com significância estatística, bem como diferenciar nódulos malignos do tecido saudável por meio da espectroscopia no IV.
- Quando comparados os nódulos benignos da tireoide com os malignos não foram observadas diferenças significativas à luz da espectroscopia no IV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

ALI, K. et al. Fourier transform Infrared spectromicroscopy and hierarchical cluster analysis of human meningiomas. **Int J Mol Med**. v. 21, n. 3, p. 297-301, 2008.

ANDRUS, P. G. L.; STRICKLAND, R. D. Cancer grading by Fourier transform infrared spectroscopy. **Biospectroscopy**. v. 4, n. 1, p. 37-46, 1998.

ARTUR, J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Ther**. v. 69, p. 89-95, 2001.

BAKER, M. J. et al. FTIR- based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. **Br J Cancer**.v. 99, n. 11, p. 1859-66, 2008.

BALOGH, et al. The National Cancer Institute Thyroid fine needle aspiration state of science conference: a summation. **Cytojournal**. v. 5, p. 6, 2008.

BRANDAO, M. et al. Fluorescence lifetime of normal, benign, and malignant thyroid tissues. **J Biomed Opt**. v. 20, n. 6, p. 067003, 2015.

BENEDETTI, E. et al. Determination of the relative amount of nucleic acids and proteins in leukemic and normal lymphocytes by means of Fourier transform microspectroscopy. **Appl Spectrosc**. v. 51, p. 792-7, 1997.

CARNEIRO, P. C.; DOMINGUES, R. B. Punção aspirativa com agulha fina em tireoide e paratireoide. In: VOLPI, E.; STECK, J. H. (eds.). **Cirurgia da tireoide e da paratireoide**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2013; p. 79-81.

DUDALA, J. et al. Investigation of biochemical composition of adrenal gland tumors by means of FTIR. **Pol J Pathol**. v. 67, n. 1, p. 60-8, 2016.

FUNG, M. K. et al. Comparison of Fourier- transform infrared spectroscopic screening of exfoliated cervical cells with standard Papanicolaou screening. **Gynecol Oncol**. v. 66, n. 1, p.10-5, 1997.

HEGEDÜS, L.; BONNEMA, S. J.; BENNEDBAEK, F. N. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. **Endocr Rev**. v. 24, n. 1, p. 102-32, 2003.

HEATHER, J. G. et al. The advantages of an attenuated total internal reflection infrared microspectroscopic imaging approach for kidney biopsy analysis. **Appl Spectrosc**. v. 64, n. 1, p. 15-22, 2010.

INCA (Instituto Nacional de Câncer) - Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016**. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015, 122p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acesso em 20 jul. 2016.

KITAHARA, C; SOSA, J. The changing incidence of thyroid cancer. **Nat Rev Endocrinol.** v. 12, n. 11, p. 646-53, 2016.

KUO L. E.; KELZ, R. R. Management of thyroid nodular disease: current cytopathology classifications and genetic testing. **Surg Oncol Clin N Am.** v. 25, n. 1, p. 1-16, 2016.

LIRA, B. R. et al. Evolution in the profile of thyroid cancer cases treated in an oncology reference service: what changed in the last 20 years. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 41, n. 5, p. 320-4, 2014.

LIU, K.; XU, M.; SCOTT, D. A. Biomolecular characterization of leucocytes by infrared spectroscopy. **Br J Haematol.** v. 136, n. 5, p. 713-22, 2007.

LIU, Y. et al. Detection of cervical metastatic lymph nodes in papillary thyroid carcinoma by Fourier transform infrared spectroscopy. **Br J Surg.** v. 98, n. 3, p. 380-4, 2011.

LOGULLO, A. F.; SREDNI, S. T. Patologia e classificação de tumores da tireóide. In: CARVALHO, M. B. (ed.). **Tratado de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 2001. capítulo 53, p. 645-6.

MAZZAFERRI, E. L. Management of a solitary thyroid nodule. **N Engl J Med.** v. 328, n. 8, p. 553-9, 1993.

MAZIAK, D. E. et al. Fourier-transform Infrared spectroscopic study of characteristic molecular structure in cancer cells of esophagus: Na exploratory study. **Cancer Detect Prev.** v. 31, n. 3, p. 185-262, 2007.

McWADE, M. A. et al. A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands. **Surgery.** v. 154, n. 6, p. 1371-7, 2013.

MONTORO, J. R. C. M. et al. Expression of cancer-testis antigens MAGE-4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. **Head Neck.** v. 34, n. 8, p. 1123-8, 2012.

MOSTAÇO-GUIDOLIN, L. B. **Caracterização bioquímica de células sadias e neoplásicas através de espectroscopia vibracional.** 2009. 134f. Dissertação (Mestrado em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

PROQUALIS. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde, Fiocruz. **Overtreatment.** (20--?) Disponível em <<http://proqualis.net/glossrio/overtreatment>>. Acesso em 25 Jan 2017.

ROSÁRIO, P. W. et al. Nódulo tireoidiano e câncer diferenciado de tireoide: atualização do consenso brasileiro. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 57, n. 4, p. 240-64, 2013.

RUSS, G. et al. Thyroid Incidentalomas: epidemiology, risk stratification with ultrasound and workup. **Eur Thyroid J.** v. 3, n. 3, p. 154-63, 2014.

SARKAR, A. et al. Fourier transform ifra-red spectroscopic signatures for lung cells epithelial mesenchymal transition: A preliminar report. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** v. 173, p. 809-16, 2017.

SHAW, R. A. et al. Infrared spectroscopy of exfoliated cervical cell specimens: proceed with caution. **Anal Quant Cyt Histol.** v. 21, n. 4, p. 292-302, 1999.

SUREWICZ, W. K.; MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. **Biochemistry.** v. 32, n.2, p. 389-94, 1993.

THEOPHILOU, G. et al. A biospectroscopic analysis of human prostate tissue obtained from different time periods points to a trans-generational alteration in spectral phenotype. **Sci Rep.** v. 5, p. 13465, 2015. *Erratum in:* **Sci Rep.** v. 5, p. 14886, 2015.

VACCARELLA, S. et al. Worldwide thyroid cancer epidemic? The increased impact of overdiagnosis. **N Engl J Med.** v. 375, n. 7, p. 614-7, 2016.

VOLPI, E.; STECK, J. H. **Cirurgia da tireoide e da paratireoide.** São Paulo: AC Farmacêutica, 2013; 360p.

WANG, T. D. et al. Detection of endogenous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 104, n. 40, p. 15864-9, 2007.

WU, M. et al. Intraoperative diagnosis of thyroid diseases by Fourier transform Infrared spectroscopy based on support vector machine. **Int J Clin Exp Med.** v. 9, n. 2, p. 2351-8, 2016.

ZHANG, X. et al. Intraoperative detection of thyroid carcinoma by Fourier transform infrared spectrometry. **J Surg Res.** v. 171, n. 2, p. 650-6, 2011.

ZHOU, S. et al. FTIR spectroscopic characterization of freshly removed breast cancer tissues. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.** v. 28, n. 7, p. 512-4, 2006.

8. ANEXOS

ANEXO A

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 05 de dezembro de 2012

Ofício nº 4303/2012
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 14495/2012

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“IDENTIFICAÇÃO DE TECIDOS NORMAIS E PATOLÓGICOS POR TÉCNICAS ÓPTICAS (FTIR E FLUORESCÊNCIA) DURANTE A CIRURGIA DE TIREÓIDE E PARATIREÓIDE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 357ª Reunião Ordinária realizada em 03/12/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2.**

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PROF. DR. LUIZ CARLOS CONTI DE FREITAS

DR. LUCIANO BACKMANN (Pesquisador participante)

Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “**Identificação de tecidos normais e patológicos por técnicas ópticas (FTIR e Fluorescência) durante a cirurgia de tireóide e paratireóide**”.

Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas

Pesquisador participante: Dr. Luciano Backmann

(Contato: Av. Bandeirantes 3900. Ambulatório Utilidade 08 – Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP - 2 andar. Ribeirão Preto – SP Fone: 16 36022353/36022801)

Convidamos você para participar de nossa pesquisa sobre avaliação de um novo método para diagnóstico das doenças da glândula tireóide e paratireóide, que será realizado durante a sua cirurgia. Para este estudo, será necessário coletar uma parte da sua glândula que seria descartada após a avaliação pelo patologista. Serão utilizados para o estudo, tanto a parte normal da glândula quanto a doente. Hoje o diagnóstico é dado durante a cirurgia através do exame de congelação da glândula realizado laboratório de patologia. Esse novo método será aplicado também sobre os tecidos retirados porém no laboratório de física da USP. Esse método é muito promissor e esperamos, que no futuro, possamos aplicá-lo nos pacientes na sala de cirurgia. Com isso ganharíamos tempo e a cirurgia seria mais rápida e com menor risco de complicações. Nesse estudo, não haverá qualquer modificação na indicação de cirurgia e nem no procedimento que será realizado. Sua cirurgia será exatamente a mesma, participando ou não do estudo. O objetivo é avaliar o potencial das técnicas espectroscópicas no diagnóstico de tecidos doentes em cirurgia de tireóide e paratireóide, sendo estas a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fluorescência estática e fluorescência resolvida no tempo.

A cirurgia realizada no estudo é a mesma utilizada habitualmente, não havendo nenhuma diferença de técnica cirúrgica ou de evolução do pós-operatório.

Você não é obrigado a participar da pesquisa e pode desistir de participar a qualquer momento, sem prejuízo em relação ao tratamento recebido neste hospital.

Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, e a sua participação não oferece riscos à sua saúde. Além disso, será garantido o sigilo de seus dados pessoais utilizados. Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas.

Quanto aos resultados obtidos no estudo, meu telefone está escrito logo acima, e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

Diante do exposto, eu, _____, abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições de que trata o Projeto de

Pesquisa apresentado, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Nome e Assinatura do paciente

Nome e Assinatura do pesquisador

9. APÊNDICES

APÊNDICE A

BANDA A

Tabela 1 - Resultados das áreas das amostras benignas e malignas com respectivos tecidos sadios

Área na banda A					
Amostra	Normal	Carcinoma	Amostra	Normal	Tumor Benigno
P02	12,4794	13,30907	P01	11,97415	12,0736891
P04	12,98103	13,30907	P03	11,73056	13,15367
P05	NEGAT	NEGAT	P06	17,01356	19,92911
P11	14,10792	16,92826	P07	18,94617	11,45109
P16	20,23409	14,90315	P09	--	17,55345
P17	15,03243	13,52133	P12	14,64078	21,0123
P18	13,94847	15,14715	P13	15,82241	19,018018
P20	13,06302	13,03907	P14	13,76923	18,43658
P21	12,3486	20,20774	P15	21,45781	12,99549
P23	12,17093	10,41533	P22	14,37176	22,01432
P24	13,08988	5,19556	P27	12,16602	12,9689
P26	14,40673	13,86332	P29	17,78321	15,66708
P31	14,6591	14,59266	P34	--	13,77219
P32	--	14,06727	P36	15,03054	12,16637
P35	--	13,40076	P39	12,23227	15,25753
P37	14,71815	18,2775	P40	12,91158	19,77559
P38	14,26938	9,83432	P41	--	13,2638
P43	10,26883	11,81391	P44	12,7288	14,05666
P47	15,64427	12,455	P46	10,91146	16,22754
P51	12,86771	12,85754	P49	13,93388	14,48901
			P53	11,466	15,50944
			P55	13,88203	17,7409
			P56	--	10,56908

Tabela 2 - Resultados das posições das amostras benignas e malignas com respectivos tecidos sadios

Amostra	Posição na banda A				
	Normal	Carcinoma	Amostra	Normal	Benigno
P2	1636,867	1637,349	P1	1638,314	1635,421
P04	1638,314	1635,421	P03	1635,421	1636,867
P05	1696,17	1695,688	P06	1635,421	1638,314
P11	1636,867	1636,867	P07	1635,421	1642,171
P16	1637,349	1637,349	P09	--	1638,314
P17	1635,421	1638,796	P12	1637,349	1636,867
P18	1634,939	1634,939	P13	1635,421	1636,867
P20	1638,314	1638,314	P14	1636,867	1636,867
P21	1635,421	1635,421	P15	1635,421	1637,349
P23	1636,867	1635,421	P22	1639,278	1637,349
P24	1638,796	1638,314	P27	1636,385	1638,314
P26	1638,314	1635,421	P29	1636,385	1635,421
P31	1637,349	1638,314	P34		1639,278
P32	--	1635,903	P36	1634,939	1635,421
P35	--	1635,421	P39	1634,939	1634,939
P37	1637,349	1635,421	P40	1634,939	1631,081
P38	--	1636,867	P41	--	1637,349
P43	1638,314	1634,939	P44	1634,939	1636,867
P47	1638,314	1635,421	P46	1635,421	1635,421
P51	1637,349	1637,831	P49	1638,314	1636,385
--	--	--	P53	--	1634,939
--	--	--	P55	1634,939	1634,939
--	--	--	P56	--	1637,349

Tabela 3 - Resultados dos diâmetros médios das amostras benignas e malignas com respectivos tecidos saudáveis

Largura na banda A					
Amostra	Normal	Carcinoma	Amostra	Normal	Benigno
P2	72,603306	69,10301	P1	73,4129	72,57495
P04	70,28788	69,70739	P03	71,64425	72,7984
P05	194,8951	194,9766	P06	65,0654	64,66426
P11	70,11856	66,46845	P07	64,26615	142,8952
P16	63,29264	68,18381	P09	--	65,46975
P17	68,97635	69,99315	P12	69,43985	128,8975
P18	69,40099	68,41444	P13	67,68578	63,36746
P20	68,89169	70,20364	P14	70,64807	66,29866
P21	72,38288	64,16477	P15	132,6368	71,29917
P23	73,35729	77,06664	P22	69,96569	131,7004
P24	68,4606	66,86576	P27	72,44422	69,56876
P26	69,309633	70,14013	P29	65,77315	67,97815
P31	70,12437	68,69743	P34	--	69,90834
P32	--	68,05506	P36	68,08429	72,6647
P35	--	70,64686	P39	70,6664	68,88981
P37	--	68,34104	P40	73,73376	65,21235
P38	75,11235	69,19006	P41	--	70,93823
P43	76,65683	74,15562	P44	71,49467	70,67946
P47	67,50678	71,65738	P46	74,86586	66,78545
P51	70,80591	70,17274	P49	69,75042	68,9497
--	--	--	P53	--	68,74524
--	--	--	P55	68,58768	65,47606
--	--	--	P56	--	75,19502

APÊNDICE B

BANDA B

Tabela 1 - Pareamento da área das amostras benignas e malignas com o seu respectivo tecido sadio

Área na Banda B					
Amostra	Normal	Maligno	Amostra	Normal	Benigno
P02	0,4918	0,84637	P1	0,46818	0,52444
P04	0,55335	0,62155	P03	0,44988	0,55784
P05	PROB	PROB	P06	1,0449	1,2715
P11	0,66908	0,949731	P07	1,25199	1,15422
P16	1,15908	0,72164	P09	--	0,89566
P17	0,80202	0,59354	P12	0,66837	1,41431
P18	0,97944	0,94676	P13	0,89003	1,1426
P20	0,86768	0,81782	P14	0,71035	1,11324
P21	0,51695	1,40853	P15	1,43007	0,75251
P23	0,48549	0,29649	P22	0,63495	1,44953
P24	1,03067	0,90838	P27	0,51841	0,98063
P26	0,76522	0,71915	P29	1,0713	0,837717
P31	0,74828	0,66165	P34		0,81997
P32		0,851741	P36	0,88591	0,50349
P35		0,63375	P39	0,59573	0,92958
P37	0,8272	1,12871	P40	0,21778	0,741186
P38	0,727934	0,3738	P41	--	0,58298
P43	0,29037	0,42619	P44	0,53587	0,68896
P47	1,05931	0,52607	P46	0,40173	1,0114
P51	0,50648	0,67931	P49	0,66303	0,7675
			P53	--	0,82301
			P55	0,75804	0,94229
			P56	--	--

Tabela 2- Pareamento da posição das amostras benignas e malignas com o seu respectivo tecido sadio

Posição na Banda B					
Amostra	Normal	Maligno	Amostra	Normal	Benigno
P2	1445,939	1456,547	P1	1443,529	1436,779
P4	1453,172	1456,547	P3	1436,779	1456,547
P05	1379,886	--	P6	1456,547	1454,136
P11	1453,654	1453,654	P7	1456,547	1456,547
P16	1456,547	1456,064	P9		1451,243
P17	1456,547	1452,689	P12	1453,654	1453,172
P18	1456,064	1456,064	P13	1456,547	1456,547
P20	1455,582	1456,064	P14	1456,547	1454,136
P21	1456,547	1456,547	P15	1456,547	1456,547
P23	1443,529	1436,297	P22	1454,136	1456,547
P24	1456,064	1456,064	P27	1453,172	1455,1
P26	1453,654	1456,547	P29	1454,618	1456,547
P31	1455,1	1454,618	P34	--	1454,136
P32	--	1456,547	P36	1456,547	1436,779
P35		1456,547	P39	1456,064	1453,172
P37	1456,547	1456,547	P40	1457,993	1454,136
P38	1456,547	1440,636	P41		1456,064
P43	1436,297	1453,654	P44	1456,064	1456,064
P47	1456,064	1436,779	P46	1436,779	1456,547
P51	1452,689	1456,547	P49	1453,654	1452,207
			P53	--	1456,547
			P55	1456,547	1456,547
			P56	--	1436,779

Tabela 3 - Pareamento da largura das amostras benignas e malignas com o seu respectivo tecido sadio

Largura na Banda B					
Amostra	Normal	Maligno	Amostra	Normal	Benigno
P2	72,51229	51,78003	P1	67,26723	66,1532
P4	68,05668	71,11534	P3	71,01106	69,78245
P11	52,22235	66,63479	P6	46,32164	32,05464
P16	75,27827	85,16074	P7	74,4786	35,65305
P17	35,34292	85,93957	P9	--	84,62066
P18	33,13293	48,9419	P12	57,22384	87,21896
P19	57,41503	28,68833	P13	50,16155	87,84234
P20	35,68763	35,0038	P14	73,94422	33,81436
P21	53,27263	81,78121	P15	79,56217	72,27008
P23	75,33162	47,49893	P22	36,38655	86,92427
P24	32,5572	38,37562	P27	54,12016	38,8404
P26	62,21646	74,3787	P29	33,77168	48,49431
P31	76,0308	87,55263	P34	--	78,7446
P32	--	86,29294	P36	32,90375	78,05387
P35	--	76,28573	P39	71,06357	81,50132
P37	82,83919	76,95706	P40	21,94322	26,13586
P38	86,79362	71,31578	P41		80,59257
P43	57,14086	66,92418	P44	51,7965	74,50076
P47	33,33772	80,6441	P46	56,70647	69,51476
P51	69,30094	37,39291	P49	82,66779	79,00606
			P53	--	66,51653
			P55	49,24173	31,72551
			P56		48,32596

APÊNDICE C

BANDA C

Tabela 1 - Pareamento da área das amostras benignas e malignas com o seu tecido sadio

Área da Banda C					
Amostra	Normal	Maligno	Amostra	Normal	Benigno
P02	0,334915	0,45407	P01	0,333912	0,332857
P04	0,47976	0,47041	P03	0,30561	0,39548
P05	PROB	PROB	P06	0,77667	1,15287
P11	0,56733	0,95509	P07	1,08762	0,77667
P16	1,62966	0,725908	P09	--	1,03821
P17	0,65587	0,57601	P12	0,82967	1,60331
P18	0,27446	0,58737	P13	0,7718	1,10493
P20	0,22186	0,245728	P14	0,56379	1,15803
P21	0,28999	1,33953	P15	1,43899	0,35852
P23	0,270342	0,0771	P22	0,59004	1,87413
P24	0,03389	0,58691	P27	0,3236	0,30471
P26	0,6233	0,47792	P29	1,0018	0,75174
P31	0,6249	0,67231	P34	--	0,45249
P32	--	0,494108	P36	0,56498	0,26495
P35	--	0,421384	P39	0,374838	0,669609
P37	0,69032	1,15787	P40	0,25104	1,05049
P38	0,174606	0,66071	P41	--	0,38211
P43	0,08303	0,30065	P44	0,33062	0,55278
P47	0,56567	0,314033	P46	0,10014	0,839665
P51	0,38745	0,24411	P49	0,45881	0,59181
			P53	--	0,73909
			P55	0,33135	0,90212
			P56		0,13932

Tabela 2 - Pareamento da posição das amostras benignas e malignas com o seu tecido sadio

Posição na Banda C					
Amostra	Normal	Maligno	Amostra	Normal	Benigno
P2	1242,476	1238,137	P1	1240,548	1245,851
P4	1241,512	1239,101	P3	1240,548	1242,476
P05	1247,78	1258,869	P6	1240,065	1240,065
P11	1240,548	1239,101	P7	1240,065	1203,905
P16	1235,726	1236,69	P9	--	1238,619
P17	1239,101	1239,101	P12	1235,726	1239,583
P18	1239,583	1240,065	P13	1239,583	1241,03
P20	1239,101	1240,548	P14	1239,583	1240,548
P21	1241,994	1240,548	P15	1240,548	1241,512
P23	1245,851	1249,226	P22	1241,512	1232,351
P24	1238,619	1237,173	P27	1239,583	1239,583
P26	1241,03	1242,476	P29	1240,065	1241,512
P31	1239,583	1239,101	P34	--	1238,137
P32	--	1241,03	P36	1239,583	1241,512
P35	--	1240,548	P39	1238,619	1238,137
P37	1239,583	1238,137	P40	1239,101	1237,173
P38	1243,923	1238,137	P41	--	1236,69
P43	1248,262	1241,512	P44	1239,583	1241,03
P47	1239,583	1239,583	P46	1240,548	1239,101
P51	1240,548	1238,619	P49	1242,476	1237,655
--			P53	--	1240,065
--			P55	1239,101	1241,512
--			P56		1244,887

Tabela 3 - Pareamento da largura das amostras benignas e malignas com o seu tecido sadio

Largura na Banda C					
Amostra	Normal	Maligno	Amostra	Normal	Benigno
P2	36,31267	42,44323	P01	35,85034	42,73321
P4	32,45507	48,42156	P03	45,6938	31,80708
P05	--	--	P06	39,22373	31,23645
P11	--	--	P07	36,22071	108,5917
P16	31,8947	49,32056	P09	--	49,60923
P17	28,94533	32,86736	P12	50,78843	44,62888
P18	28,94533	32,86736	P13	39,14241	49,6256
P20	32,82066	36,56713	P14	39,74652	33,20994
P21	38,125868	31,24005	P15	36,74232	34,16961
P23	21,64304	40,98189	P22	29,94155	51,54266
P24	32,4026	35,94324	P27	28,74622	23,94074
P26	32,36409	47,23537	P29	30,75741	34,76226
P31	--	38,11882	P34	--	36,95067
P32	--	33,6379	P36	28,0864	36,57489
P35	38,82424	30,8031	P39	35,3886	31,07235
P37	32,7904004	46,1931	P40	31,82707	27,18276
P38	32,47767	30,5846	P41	--	43,50309
P43	27,214414	43,1796	P44	28,75668	31,95136
P47	31,47472	27,37733	P46	29,16324	29,91648
P51	31,47472	27,37733	P49	32,03197	30,47157
			P53	--	29,84874
			P55	29,8985	30,85104
			P56	--	39,08732

APÊNDICE D

RAZÕES ENTRE AS ÁREAS DAS BANDAS A, B E C

Rb-normal	Rb-maligno	Rc-normal	Rc-maligno	Rbc-normal	Rbc-maligno
0,03941	0,06359	--	--	--	--
0,04263	0,0467	--	--	--	--
0,04743	0,0561	0,04021	0,05642	1,17935	0,99439
0,05728	0,04842	0,08054	0,04871	0,71124	0,99412
0,05335	0,0439	0,04363	0,0426	1,22283	1,03043
0,07022	0,0625	0,01968	0,03878	3,56861	1,61186
0,06642	0,06272	0,01698	0,01885	3,91093	3,32815
0,03989	0,02847	0,02221	0,0074	1,79584	3,84553
0,07874	0,17484	0,00259	0,11296	30,41222	1,54773
0,05312	0,05187	0,04326	0,03447	1,22769	1,50475
0,05105	0,04534	0,04263	0,04607	1,19744	0,98414
0,0562	0,06175	0,0469	0,06335	1,19828	0,97482
0,05101	0,03801	0,01224	0,06718	4,16901	0,56576
0,02828	0,03608	0,00809	0,02545	3,49717	1,41756
0,03936	0,05283	0,03011	0,01899	1,30721	2,7828