

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM PATOLOGIA BUCAL

**THAÍSE GOMES E NÓBREGA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PELA  
ESPECTROSCOPIA RAMAN DAS ALTERAÇÕES  
EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL**

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM PATOLOGIA BUCAL

THAÍSE GOMES E NÓBREGA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PELA  
ESPECTROSCOPIA RAMAN DAS ALTERAÇÕES  
EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de doutora em Odontologia.

*Área de Concentração: Patologia Bucal*

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

PORTO ALEGRE

2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Gomes e Nóbrega, Thaíse  
Caracterização molecular pela espectroscopia raman  
das alterações epiteliais da mucosa bucal / Thaíse  
Gomes e Nóbrega. -- 2015.  
57 f.

Orientador: Manoel Sant'Ana Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2015.

1. Análise espectral Raman. 2. Leucoplasia. 3.  
Carcinoma de Células Escamosas. I. Sant'Ana Filho,  
Manoel, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

*Não existem palavras suficientes que possam expressar verdadeiramente a minha mais profunda gratidão, porém neste momento são as ferramentas que possuo para tal.*

*Agradeço a Deus, por me conduzir a este Doutorado em um lugar tão distante da minha família e amigos; por me ajudar a enfrentar todas as dificuldades encontradas; por me proteger em todas as situações em que de alguma forma eu estivesse vulnerável; por me presentear em conhecer pessoas tão especiais durante este período de Doutorado.*

*Aos meus pais, Edman e Goreti, agradeço pela educação que me deram e por não medirem esforços em investir na minha formação. Agradeço por me estimularem a vir ao Rio Grande do Sul tentar o Doutorado, agradeço pelo apoio, pela paciência, pelos conselhos. Vocês são meu norte, meus exemplos, meus heróis!*

*Ao meu irmão, Thales, agradeço pelo carinho, pela amizade, pelo companheirismo, pelo incentivo e pela compreensão.*

*Aos meus avós, Genival e Lourdinha, que sempre me tem em suas orações e se alegram com minhas vitórias. É uma honra ser neta de duas pessoas tão admiráveis!*

*À minha tia Jeane, que me aconselhou a seguir a vida acadêmica, que me tem como “filha mais velha” e cuida de mim como mãe.*

*Ao Alessandro, um verdadeiro presente inesperado que recebi durante o Doutorado. Agradeço a Deus todos os dias por este encontro de forma tão inesperada. Ninguém melhor para entender as escolhas da vida acadêmica. Obrigada por estar sempre me apoiando e me incentivando, mesmo que certas decisões influenciem tua vida. Obrigada pelo companheirismo. Sinto-me abençoada por compartilhar contigo quase todos os meus dias e quase o dia todo de maneira tão harmoniosa. Para quem teve uma vida marcada por batalhas tão solitárias, é muito bom ter encontrado alguém para lutar na busca “de um lugar ao sol”. Eu te amo!.*

*À professora Patrícia Teixeira, que ao saber do meu interesse em fazer o Doutorado em Patologia me recomendou ao professor Manoel, e por todo o carinho recebido nos nossos encontros nas SOBEPs.*

*À UFRGS por me disponibilizar um ensino de qualidade e me instigar a renovar meus conhecimentos acadêmicos por meio dos professores com excelente formação profissional.*

*À Família Histopatológica da UFRGS, que apesar de ir modificando ao longo desses quatro anos, sempre está acolhendo maravilhosamente as pessoas. Nesta família encontrei colegas de trabalho que estão constantemente se ajudando, estudando e ensinando a desvendar o diagnóstico dos casos mais estranhos quanto a organizar momentos ímpares de confraternização, ou a amparar em momentos*

*difíceis. Aos colegas, sem exceção, que me acolheram e fizeram com que eu me sentisse em casa, sendo que sempre pude contar com o apoio de todos eles: Anacláudia, Kelly, Grasi, Bruna, Viviane, Alessandra, Carol, Vivian, Artur, Alessandro, Felipe, Carlos, Frã, Liana, Isadora, Marina, Natalia K, Natália D., Luciano, Rúbia e Taiane. Vocês são especiais!!!*

*Ao Artur, que me ensinou a distinguir todas as “bolinhas róseas” em linfócitos, macrófagos, plasmócitos etc. e a conseguir identificar as patologias nas lâminas da rotina. Saudades, Tuks!*

*Às alunas de graduação que foram bolsistas de iniciação científica e trabalharam neste projeto de pesquisa Jaqueline, Júlia e Larissa, agradeço a ajuda, dedicação e o zelo que tiveram por este trabalho, o compromisso na participação. Foi gratificante orientá-las, mesmo que indiretamente. Aprendi muito convivendo com vocês nas orientações!*

*Aos técnicos do Laboratório de Patologia Bucal, Chris e ao Pedro pelo empenho em me orientar e auxiliar na utilização do seja nas rotinas ou nas pesquisas, por serem tão prestativos. Em especial agradeço à Alessandra, coincidentemente técnica responsável pelas principais pesquisas desenvolvidas por mim, obrigada por me ajudar na realização das minhas pesquisas, por me ensinar tão pacientemente alguns protocolos laboratoriais e por se tornar uma amiga tão querida!*

*Aos professores, Laura, Márcia, Anna, Vinícius, Marcelo, Lisi, Maria Cristina, Pantelis, Manoela, Marco e Fernanda, agradeço contribuírem de alguma forma para que hoje eu saiba um pouco mais sobre biologia, histologia, patologia, estomatologia e pesquisa. Agradeço por se tornarem referência de docentes e pesquisadores na área que escolhi me dedicar nestes últimos anos.*

*Aos professores, técnicos, alunos de iniciação científica e pós-graduação do LAMAD, agradeço por entenderem cederem horários, tirarem algumas dúvidas, enfim por sempre serem tão receptivos e prestativo comigo, que pertencia a outro grupo de pesquisa!*

*Ao professores Vicente Castelo Branco Leitune e Fabrício Mezzomo Collares, agradeço por todo apoio recebido durante este trabalho, ensinando, apoiando, incentivando e de certa forma orientando. Sou eternamente grata a vocês por estarem sempre me ajudando nas horas em que precisei, por abrirem as portas do LAMAD para mim, pela parceria obtida ao longo desses últimos 4 anos.*

*Ao meu professor orientador Manoel Sant’Ana Filho, agradeço pelo aprendizado constante, pela confiança, pela paciência e pelas oportunidades concedidas. Tu me abristes as portas da UFRGS e me concedeste alcançar os objetivos que eu tinha ao vir a fazer Doutorado. Obrigada por tonar esta experiência única!*

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade, estrutura e apoio.*

*À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado e financiamento do presente projeto.*

*O valor das coisas não está  
no tempo em que elas duram, mas  
na intensidade em que elas  
acontecem. Por isso existem  
momentos inesquecíveis, coisas  
inexplicáveis e pessoas  
incomparáveis.*

*(Fernando Pessoa)*

## RESUMO

NÓBREGA, Thaíse Gomes e. **Caracterização molecular pela espectroscopia raman das alterações epiteliais da mucosa bucal** . 2015. 57 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

A espectroscopia Raman é uma das tecnologias ópticas que tem ganho cada vez mais destaque na oncologia. Esta tecnologia fornece a composição molecular dos mais variados tipos de amostras, inclusive biofluidos, células e tecidos. Na tentativa de avaliar sua aplicação em lesões bucais, o objetivo deste trabalho foi obter um perfil espectral dos distúrbios epiteliais não-displásicos, displásicos, e do carcinoma espinocelular bucal, bem como verificar a possibilidade diagnosticar estas alterações pelos espectros. Inicialmente, foram usados 44 amostras de mucosa bucal em blocos de parafina, com diagnóstico de hiperplasia epitelial, hiperparaceratose, displasia epitelial e carcinoma espinocelular bucal. Da porção epitelial de cada uma destas amostras foram obtidos 10 espectros Raman. A média dos espectros de cada alteração gerou um perfil espectral correspondente à sua composição química. Os resultados desta análise apresentaram picos ou bandas espectrais referentes a moléculas usualmente encontradas nos tecidos biológicos: proteínas, lipídios e DNA. Em seguida, os dados espectrais foram submetidos a análise dos componentes principais (PCA) e análise discriminante linear (LDA), onde foi encontrada uma eficiência de 86,36% no uso da Espectroscopia Raman para o diagnóstico de alterações epiteliais. A validade do método foi comprovada pela Curva Roc resultando em 91% de sensibilidade e 96,9% de especificidade. Em um segundo momento, com a finalidade de avaliar a influência da fixação com formalina nas análises espectrais, a superfície epitelial de uma amostra de tecido bucal fresca *ex vivo* foi submetida a análise pela Espectroscopia Raman e armazenada em formalina tamponada a 10% por

24h para posteriormente se obter outro espectro. A análise comparativa entre os perfis espectrais de uma mesma amostra antes e após a fixação, demonstraram diferenças em relação aos picos de proteínas e DNA, que podem modificar o perfil espectral da alteração analisada e, portanto, gerar algum erro de classificação. De maneira geral, pelos resultados desta pesquisa, observou-se que a Espectroscopia Raman é uma tecnologia eficiente para identificar a composição molecular de amostras de tecido, seja imediatamente após a excisão cirúrgica, fixação em formalina ou emblocadas em parafina. Entretanto, deve-se considerar que estas diferentes formas de condicionamento influenciarão diretamente no resultado dos espectros.

Palavras-Chave: Análise Espectral Raman. Condições Pré-malignas. Carcinoma de células escamosas.



## ABSTRACT

NÓBREGA, Thaíse Gomes e. **Molecular characterization by Raman spectroscopy of epithelial oral mucosa lesions.** 2015. 57 f. Thesis (Doctorate) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Raman spectroscopy (RS) is one of the optical technologies that has garnered a great deal of interest in oncology. This technology provides the molecular composition of various types of samples, including biofluids, cells and tissues. In an attempt to assess its application in oral lesions, the purpose of this study was to obtain a spectral profile of epithelial disorders non-dysplastic, dysplastic, and oral squamous cell carcinoma, as well as checking the ability to diagnose these changes by the spectra. Initially, 44 samples of oral mucosa formalin-fixed paraffin embedded were used with epithelial hyperplasia, hyperparakeratosis, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. From the epithelial area of each sample were obtained 10 Raman spectra. The average of the spectra of each change generated a spectral profile corresponding to its chemical composition. Results of this analysis showed peaks or spectral bands related to molecules generally found in biological tissues: proteins, lipids and DNA. Then the spectral data were submitted to principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA), which was found 86.36% efficiency in the use of Raman spectroscopy (RS) for diagnosis of epithelial changes. The validity of the method was confirmed by Roc curve resulting in 91% sensitivity and 96.9% specificity. In a second step, in order to evaluate the influence of fixation with formalin in the spectral analysis, the epithelial surface of a sample of freshly biopsied oral tissue was subjected to analysis by RS and stored in 10% formalin for 24 hours for later obtain another spectrum. The comparative analysis of the spectral profiles of the same sample, before and after fixation, shows differences relative to spectral peaks of proteins and DNA that can modify the spectral profile of the analyzed change

and thus generate some misclassification. In general, the results of this research, it was observed that Raman spectroscopy is an efficient technology to identify the molecular composition of tissue samples, either immediately after surgical excision, either after fixation in formalin and embedded in paraffin. However, it should be considered that these different means of conditioning will influence the outcome of the spectra.

Key-words: Raman Spectrum Analysis. Precancerous conditions. Squamous cell carcinoma.

## SUMÁRIO

<b>ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Espectroscopia Raman.....</b>	<b>10</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO I.....</b>	<b>18</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO II.....</b>	<b>32</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO III.....</b>	<b>44</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>55</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>56</b>

## ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

### 1. Espectroscopia Raman

O desenvolvimento dos tumores malignos está associado a mutações que alteram vias de sinalização e influenciam os processos de reparo do DNA ou metabolismo de substâncias carcinogênicas (LAMPRI et al., 2015). A carcinogênese é um processo multifatorial que envolve alterações genéticas e moleculares (PÉRES-SAYAN et al., 2009) nos tecidos, antes de se refletirem microscopicamente e macroscopicamente. Identificar essas mudanças bioquímicas durante os estágios iniciais possibilitaria diagnóstico precoce do câncer e melhoraria o prognóstico dos pacientes por proporcionar uma intervenção precoce (HARRIS et al., 2010; TU e CHANG, 2011). Com este objetivo, várias tecnologias ópticas tem sido inseridas recentemente no campo da oncologia, e dentre elas se destaca a Espectroscopia Raman (ER) (LI et al, 2011; CALS et al, 2015).

A ER pode ser utilizada como uma alternativa ou um auxiliar ao diagnóstico, pela capacidade de fornecer informação molecular específica sobre amostras complexas como biofluidos, células e tecidos (KELLER;KANTER; MAHADEVAN-JANSEN, 2006; CALS et al., 2013; KONG; KENDALL; STONE; NOTINGHER, 2015). A sua utilização requer o mínimo ou nenhum preparo prévio das amostras, pois trata-se de uma técnica não-destrutiva e não-invasiva (BAENA E LENDI, 2004; TU e CHANG, 2011; CALS et al., 2013; CHRISTIAN et al., 2014; CALS et al., 2015). Em relação às demais tecnologias ópticas, a ER tem sido escolhida devido a alta precisão, a ultrassensibilidade, a alta tolerância com amostras aquosas e curto tempo de aquisição das análises ou espectros (HANLON et al., 2000; LI et al, 2011; MATTHEWS et al., 2011; CHRISTIAN et al., 2014).

O efeito Raman é resultado da interação de uma fonte de luz sobre a matéria (HANLON et al., 2000; KELLER;KANTER; MAHADEVAN-JANSEN, 2006). Quando a luz incide, a energia emitida pode ser absorvida, refletida,

atravessar a matéria ou ser espalhada (HARRIS et al., 2010; TU e CHANG, 2011). Se, durante o espalhamento, houver mudança no estado vibracional da molécula, ocorrerá transferência da energia emitida, seja ela proveniente da fonte de luz ou da matéria (KELLER;KANTER; MAHADEVAN-JANSEN, 2006; HARRIS et al., 2010; TU e CHANG, 2011). Estas alterações vibracionais com transferência de energia são localizadas nas ligações químicas e registradas em um gráfico denominado espectro (HANLON et al., 2000). Desta forma, considera-se que o espectro Raman fornece a “impressão digital” das amostras biológicas representando as vibrações moleculares das ligações químicas e fornecendo a sua composição bioquímica (FENN et al., 2011). A figura 1 trata de uma representação de um espectrômetro Raman (TU e CHANG, 2011) que gera um espectro semelhante à figura 2 (HARRIS et al., 2010).

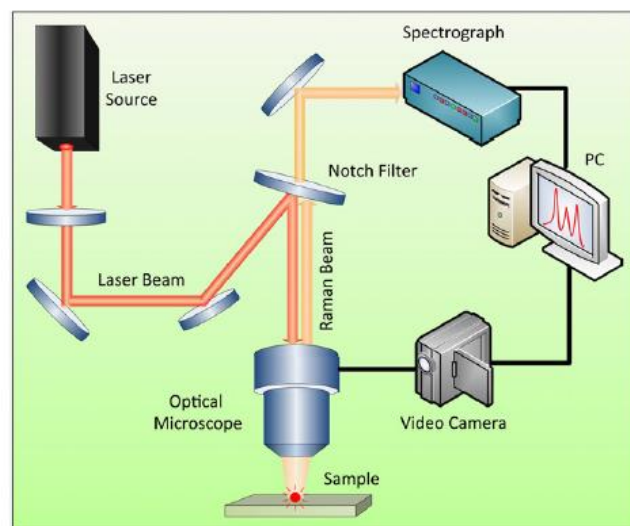


Figura1. Exemplo esquemático de um espectrômetro Raman (TU e CHANG, 2011).

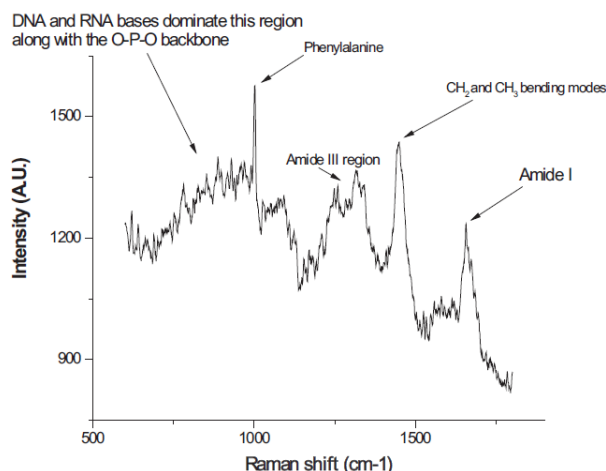


Figura 2. Espectro Raman de uma célula tireoidiana (HARRIS et al., 2010).

Os espectros Raman de amostras biológicas registram, principalmente, variações quanto a composição de DNA/RNA, proteínas e lipídios (FENN et al., 2011). Comparando com outras técnicas existentes, estes gráficos permitem a observação das alterações bioquímicas nas células, sem se limitar a uma única molécula ou classe de moléculas, ou seja, fornece uma espécie de “panorama” acerca da sua composição bioquímica (MATTHEWS et al., 2011; CARMELINGO et al., 2011). Uma vez que a progressão de uma patologia seria precedida de alterações químicas, a ER começou a ser explorada quanto à aplicabilidade no diagnóstico (HANLON et al., 2000), então muitos estudos foram desenvolvidos especialmente para detecção de lesões malignas (CALIS et al., 2015).

Krishna et al. (2004) usaram a ER para entender as variações nas camadas epitelial e subepitelial em amostras de mucosa oral normal e de carcinoma espinocelular bucal (CECB). Basicamente, os espectros de tecido normal e do CECB diferenciaram quanto às intensidades e frequências dos picos ou bandas espectrais, indicando variações na composição biomolecular. Desta maneira, a comparação entre a região epitelial e a subepitelial, a mucosa normal e o CECB, levou à constatação que a ER seria um instrumento capaz de fazer a distinção desses tecidos, além de validar o uso de amostras fixadas em formalina.

Esses resultados vão ao encontro dos obtidos por Cals et al. (2015) que discriminaram pela ER o CECB e os tecidos saudáveis da língua, usando mucosa bucal *ex vivo*. Assim, foram avaliados o espectro do CEC em relação

ao tecido epitelial, tecido conjuntivo, glândulas, músculos, tecido adiposo e nervos. Apesar dos espectros de algumas estruturas serem confundidos com os do CECB, de maneira geral, houve uma separação entre eles de forma a se obter uma eficiência acima dos 80%. Ao transporem estes dados para a rotina clínica, os autores apontam a aplicabilidade da técnica na definição de margens cirúrgicas durante a remoção dos tumores.

A maioria dos estudos realizados atestou uma predominância de picos espectrais relacionados a proteínas, em tecidos com alguma patologia. Em um estudos *ex vivo*, Malini et al. (2006) observaram esse fenômeno tanto nas mucosas bucais com lesões malignas quanto pré-malignas ou inflamatórias.

Em 2010, Guze et al. compararam o CECB com mucosa oral normal de amostras congeladas, cortadas com uma espessura de 6  $\mu\text{m}$ , colocadas sobre uma lâmina histológica. Os picos ou bandas espectrais foram identificados quanto a localização nas células: membrana, citoplasma e núcleo. Os resultados encontrados demonstraram não apenas as diferenças entre as amostras, mas também a heterogeneidade das células tumorais.

Abordagens *in vivo* da ER também já foi realizada. Singh et al. 2012 investigaram de condições pré-malignas com o auxílio de uma sonda de fibra ótica, acoplada a um espectrômetro. Foram obtidos espectros de manchas bucais com condições potencialmente malignas ou lesões malignas, do sítio contralateral sem lesão, de pacientes controle tabagistas e não-tabagistas. A maioria dos erros de diagnóstico ocorreu entre os espectros das lesões pré-malignas e dos pacientes tabagistas, mesmo assim, conseguiu-se discriminar pelos espectros as lesões pré-malignas das demais.

Além das amostras de mucosa bucal, os biofluidos também já foram usados na verificação de câncer bucal. Kho et al (2005) avaliaram amostras de saliva pela ER de 5 pacientes com câncer de bucal e 5 pacientes saudáveis, encontrando diferenças espectrais que poderiam levar ao diagnóstico precoce das lesões malignas. Em 2013, Sahu et al. verificaram os espectros Raman do soro extraído do sangue periférico de 54 pacientes com carcinoma espinocelular bucal, e obtiveram uma eficiência entre 54 e 67% no uso da técnica para identificar as lesões malignas.

De uma maneira geral, esses e os demais estudos desenvolvidos buscam fornecer dados para validar a aplicação clínica da ER (FENN et al.,

2011; CALS et al., 2015). Diante desses trabalhos, foram encontradas algumas dificuldades como a presença de interferências (ruídos) nos espectros, o tempo de obtenção dos resultados, interpretação os dados e adequação do aparelho para uso clínico (KELLER;KANTER; MAHADEVAN-JANSEN, 2006; TU e CHANG, 2011). Todavia, esses obstáculos se tornaram objetos de outros estudos com a finalidade de tornar a ER viável na rotina das áreas da saúde.

Poucos são os estudos disponíveis estabelecem um perfil espectral que diferencie as alterações epiteliais, considerando as alterações não-displásicas, bem como as displásicas e do cacinoma espinocelular. Além disso, não se sabe da existência de trabalhos que utilizem a a espectroscopia Raman em blocos de parafina, nem que avaliem a influência do condicionamento das amostras de tecido nos espectros.



## Referências Bibliográficas

- BAENA, J.; LENDI, B. Raman spectroscopy in biochemical analysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, n.8, p. 534-539. 2004.
- CALS, F.L.J et al. Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. **Journal of Raman Spectroscopy**, p. 1-9. 2013. DOI 10.1002/jrs.4318
- CALS, F.L.J. et al. Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins. **Laboratory Investigation**, p.1-11. 2015.
- CARMELINGO, C. et al. Micro-Raman spectroscopy and univariate analysis for monitoring disease follow-up. **Sensors**, v.11, p. 8309-22. 2011.
- CHRISTIAN, K. et al. Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma. **Biomedical Optics Express**. p.1-14. 2014.
- FENN, M.B. Raman spectroscopy for clinical oncology. **Advances in Optical Technologies**, v.2011, p.1-20. 2011.
- GUZE, K. et al. Comparison of molecular images as defined by Raman spectra between normal. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.42, p.1232-1239. 2011.
- HANLON, E.B. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics and Medicine Biology**, v.45, n.2, p. R1-59. 2000.
- HARRIS, A.T. et al. Raman spectroscopy in head and neck cancer. **Head and Neck Oncology**, v. 2, p.1-26. 2010.
- KELLER, M.D. et al. Raman Spectroscopy for Cancer Diagnosis. **Spectroscopy**, v.21, n.11, p.33-41. 2006.
- KONG, K. et al. Raman spectroscopy for medical diagnostics- from *in vitro* biofluid assays to *in vivo* cancer detection. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.009>.
- KRISHNA, C.M. et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. **Applied Spectroscopy**, v.58, n.9, p.1128-1132. 2004.
- KHO, K.W. et al. Surface Enhanced Raman Spectroscopic (SERS) study of saliva in the early detection of oral cancer. **Optics Diagnostics and Sensing V. Proceedings of SPIE**, v. 5702. 2005. doi: 10.1117/12.590142
- LAMPRI, E.S. et al. Biomarkers of head and neck cancer, tools or a gordian knot? **International Journal of Experimental Medicine**, v.8, n.7, p. 10340-57. 2015.
- LI, X. et al. Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v.17, n.3, p. 31-35.
- MALINI, O. et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. **Biopolymers**, v.81, n.3, p. 179-93. 2006.

MATTHEWS, M. et al. Biochemical of signatures *in vitro* radiation response in human lung, breast and prostate tumour cels observed in Raman spectroscopy. **Physics and Medicine Biology**, v.56, p. 39-52. 2011.

PEREZ-SAYANS, M. et al. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer. **Oncology Reports**, v.22, n.6, p.1277-82. 2009.

SINGH, S.P. et al. *In vivo* Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. **Journal of Biomedical Optics**, v.17, n. 10, p.1-9. 2012.

SAHU, a. et al. Raman spectroscopy of serum: an exploratory study for detection of oral cancers. **Analyst**, v.138, p.4161-74. 2013.

TU, Q.; CHANG, C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, p. 1-14. 2011.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Definir o perfil espectral dos distúrbios epiteliais não-displásicos, displásicos, e do carcinoma espinocelular, com auxílio da Espectroscopia Raman.

### Objetivos Específicos

1. Obter um perfil espectral da área de epitélio em bloco de parafina de lesões bucais com diagnóstico de alterações epiteliais não-displásicas, displásicas, e carcinoma espinocelular do arquivo do laboratório de patologia JJD Barbachan da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO UFRGS);
2. Comparar os espectros provenientes da área de epitélio em bloco de parafina de lesões com diagnóstico de alterações epiteliais não-displásicas, displásicas, e carcinoma espinocelular do arquivo do laboratório de patologia JJD Barbachan da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FO UFRGS);
3. Verificar a influência da fixação com formalina nas análises espectrais da área epitelial de uma amostra *ex vivo*, antes e após a fixação com formalina.

## ARTIGO CIENTÍFICO I

**Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico Histopathology (Qualis Odontologia A1 – Ano base 2014, Fator de impacto 3,453).**

**Perfil molecular pela espectroscopia Raman de alterações epiteliais, displásicas e malignas de amostras de mucosa bucal emblocadas em parafina.**

### ABSTRACT

Raman spectroscopy (RS) is one of the optical technologies that have been exploited in biomedical fields for allowing molecular analysis of various types of samples. The aim of this study was to evaluate the molecular profile of different epithelial alterations in the human oral mucosa by ER using formalin fixed paraffin embebed (FFPE). 11 histological slides were selected for each group according to the following epithelial alterations: epithelial hyperplasia, hyperparakeratosis, epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. In each slide was identified the most characteristic area of epithelial changes related and found in the corresponding paraffin block. This block was submitted to ER, focusing on the region found. Each change generated from the average spectrum of the spectra of each sample. As expected, the generated spectra confirmed the presence of molecules belonging to the usual components of biological tissues, proteins, lipids and DNA. Then carried k means clustering analysis to verify the similarities and differences between the spectra of each epithelial changes. It was observed that most of the samples were classified as Cluster 2 and the OSCC (oral squamous cell carcinoma) group were allocated in four different clusters. clusters. Analyzing the spectra of each change, it was observed that each one of the epithelial alterations presented its own molecular profiles and the similarities between spectral peaks can be attributed to the type of tissue scanned.

**Keywords:** Raman spectroscopy, biochemical phenomena, epithelium, squamous cell carcinoma.

## Introdução

O padrão ouro para diagnosticar lesões orais de tecido mole é o exame histopatológico da lesão biopsiada. Entretanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens como a invasividade do procedimento para remoção da amostra de tecido, o tempo de processamento, a experiência do examinador<sup>1</sup>, e a necessidade, em alguns casos, da realização de colorações especiais, as quais possuem alto custo<sup>2,3</sup>.

Nos últimos anos, os avanços das tecnologias ópticas têm sido estudadas no intuito de auxiliarem no diagnóstico. Estas tecnologias têm como princípio fornecer a composição molecular do tecido analisado. Assim, prometem superar as limitações encontradas para diagnóstico, inclusive o histopatológico<sup>1</sup>.

Neste contexto, a Espectroscopia Raman (ER) tem ganho destaque e mostrado resultados promissores. Esta é capaz de qualificar e quantificar os compostos presentes em sólidos, líquidos e gases, utilizando um laser não ionizado como a fonte de excitação. Ao ser excitada, a molécula tem seu estado vibracional alterado e ocorre transferência de energia, quer a partir do fóton para a molécula ou vice-versa. O espalhamento inelástico ou Raman ocorre quando a interação entre molécula e fóton gera o espalhamento de energia em um vetor diferente da energia incidente<sup>4</sup>. O resultado deste espalhamento de energia é registrado em um gráfico, denominado espectro Raman, constituído por uma série de picos ou bandas espectrais correspondentes a uma frequência vibracional característica da molécula, em  $\text{cm}^{-1}$ , em função da intensidade da excitação<sup>5</sup>.

Como as demais tecnologias ópticas, a ER registra a composição molecular pela vibração nas ligações químicas dos compostos presentes nas amostras. Assim, detecta-se alterações em nível celular no DNA, RNA, proteínas e lipídios. Já existem estudos usando a ER em cultura de células, amostras de sangue e saliva, e fragmentos de tecido, identificando lesões malignas, rejeições alográficas, biomarcadores, nanotubos etc. Atualmente, a

extrapolação do uso da ER para a clínica tem se concentrado na medicina forense e no diagnóstico<sup>6-8</sup>.

Vários estudos demonstram que a ER pode ser utilizada para avaliar diversos tipos de amostras com um mínimo ou nenhum processamento prévio<sup>6-10</sup>. Com base nesta ideia, o objetivo deste estudo foi verificar, pela espectroscopia Raman, se é possível caracterizar as alterações epiteliais demucosa bucal humana.

## **Material e Métodos**

### Blocos de parafina

Foram selecionados 44 blocos de parafina contendo amostras de mucosa bucal humana, pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o diagnóstico histopatológico de hiperplasia epitelial (HE), hiperparaceratose (HPC), displasia epitelial (DIS) ou carcinoma espinocelular (CEC). As lâminas histológicas originadas destes blocos foram revisadas por um patologista experiente (MSF) para confirmação do diagnóstico. A área do bloco a ser analisada foi selecionada com base na região de tecido epitelial mais representativa da alteração epitelial diagnosticada, a lâmina era sobreposta ao bloco para determinação macroscópica da área analisada. Esta pesquisa foi submetida à avaliação e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (UFRGS) com o parecer de número 523.144, em 18/12/2013.

### Obtenção do espectro Raman

Os espectros Raman das áreas selecionadas nos blocos foram obtidos em um espectrômetro Raman (Senterra, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha), com um laser de diodo de comprimento de onda de 785 nm, com 100mW de potência, abertura de 50x1000  $\mu\text{m}$  e resolução espectral de  $\sim 3,5\text{cm}^{-1}$ . O laser

foi emitido por 2 s, por cinco vezes, para obter cada espectro da amostra. A localização das áreas analisadas foi realizada com aumento de 200X na câmera CCD acoplada ao aparelho. De cada bloco foi obtido 10 espectros, dispostos sequencialmente, procurando-se obter a leitura da porção de tecido epitelial pré-selecionada na lâmina histológica. O espectro de um bloco contendo apenas parafina também foi obtido para se remover as interferências do material parafinado subtraindo-se este espectro dos espectros dos blocos de tecido de mucosa bucal humana com auxílio do software.

Ao final da leitura espectroscópica, a apresentação dos espectros de cada ponto do bloco precisaram ser submetidos a correção do côncavo na linha de base com uma interação e 64 pontos de base com os recursos do software Opus 7.2. (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). De cada bloco, obteve-se um espectro referente à média dos 10 espectros obtidos. Por fim, os 11 espectros de cada grupo de amostras foram comparados para se verificar diferenças entre os espectros das alterações epiteliais. Os dados obtidos foram transferidos para uma planilha eletrônica Microsoft Excel 2007 (Microsoft Redmond, WA, USA) para análise, a qual se limitou a região espectral entre 500-1800  $\text{cm}^{-1}$ .

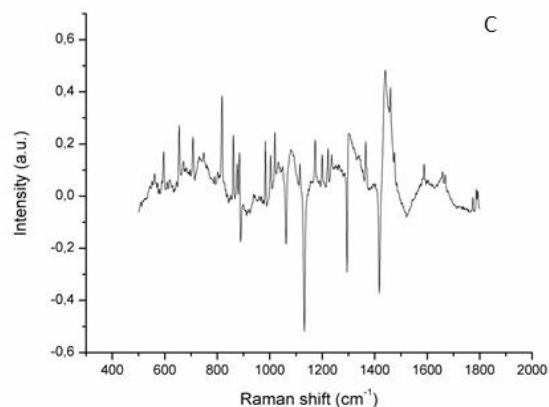
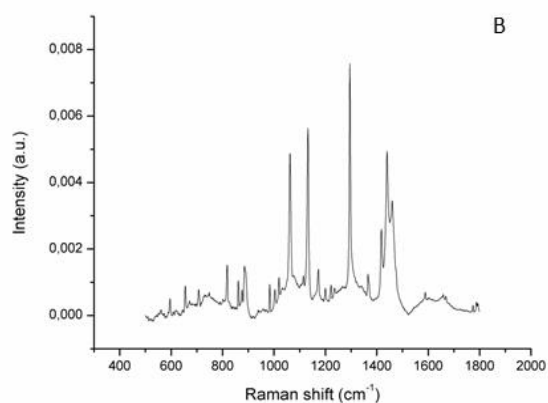
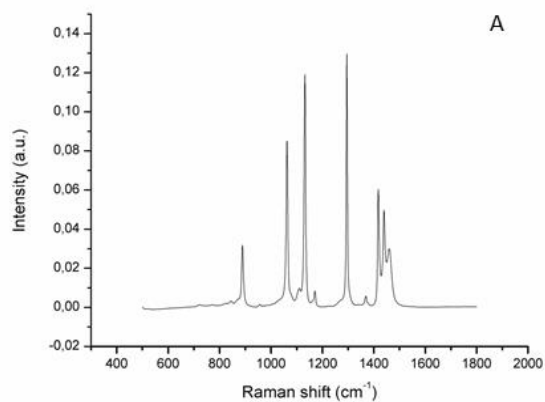
#### Análise estatística

Para avaliar estatisticamente os espectros dos blocos, foi utilizada a análise de agrupamento de partição ou análise cluster *k means*. Esta análise classifica as observações dentre os *k* grupos. Cada observação será classificada conforme a proximidade dos dados com a média. No presente estudo, a análise *k means* foi feita com auxílio do software SPSS 21 (IBM, Armonk, NY, USA), classificando as amostras dentro de cinco grupos (*k means*). A similaridade entre os espectros classificou as amostras entre esses cinco grupos.

## Resultados

## Análise das médias espectrais de cada grupo

Observou-se que os picos espectrais referentes à parafina (Figura 1A) se sobrepuseram sobre os picos espectrais dos componentes biomoleculares dos tecidos (Figura 1B). Todavia, o pico espectral  $1170\text{ cm}^{-1}$  (variando entre  $1169$  e  $1172\text{ cm}^{-1}$ ), referente a tirosina, era característico das amostras de tecido, estando presente na grande maioria dos espectros sem necessidade de remoção da parafina (Figura 1C).





Além do pico espectral na região do  $1170\text{ cm}^{-1}$ , para os tipos de alterações epiteliais estudados, outros picos espectrais se repetiram. Dois desses picos espectrais são referentes a aminoácidos,  $655\text{ (654)}$  e  $861\text{ (862)}\text{ cm}^{-1}$ , indicando triptofano e prolina, respectivamente. Os demais correspondem a colágeno, identificado pelo pico espectral  $817\text{ cm}^{-1}$ , e lipídio, pico espectral  $983\text{ cm}^{-1}$ .

As diferenças espectrais encontradas no grupo HE foram registrar o pico espectral  $1003$  e  $1263\text{ cm}^{-1}$ , referentes a fenilalanina e ácidos graxos, respectivamente, e não registrar o pico espectral  $1020\text{ (1019)}\text{ cm}^{-1}$ , referente a DNA. O grupo HPC apresentou os picos  $593$  e  $1237\text{ cm}^{-1}$ , referentes respectivamente a triptofano e DNA, em comum apenas com o grupo CEC.

O espectro das amostras de DIS detectaram o ponto  $1313\text{ cm}^{-1}$  diferentemente dos demais, correspondendo a colágeno. Em tais amostras, o pico espectral de lipídio,  $1296$  ou  $1297\text{ cm}^{-1}$ , presente nas demais amostras, não foi evidenciado.

O espectro resultante das amostras de CEC apontou uma maior quantidade de picos espectrais. Além disso, alguns desses picos foram predominantes apenas nestas amostras:  $707, 749, 876, 1083, 1200, 1222\text{ cm}^{-1}$ . Os pontos  $707, 749$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ , referem-se a algum componente molecular próprio dos ácidos nucleicos e os demais a proteínas. Os picos espectrais encontrados em cada grupo estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil espectral dos grupos avaliados com a ligação química e a molécula correspondente<sup>11,12</sup>.

HE (cm <sup>-1</sup> )	HPC (cm <sup>-1</sup> )	DIS (cm <sup>-1</sup> )	CEC (cm <sup>-1</sup> )	Ligação	Molécula
-	593	-	595	***	Triptofano
655	655	654	655	***	Cistina
-	-	-	707	***	Guanina
-	-	-	749	Respiração simétrica	Triptofano
817	818	817	818	C-C estrutural	Colágeno
861	861	861	862	C-C	Prolina
-	-	-	876	Estiramento C-C	Prolina
983	983	983	983	=CH	Lipídio
1003	-	-	1003	Vibração estrutural	Fenilalanina
-	1020	1019	1019	***	DNA
-	-	-	1083	Estiramento N	Proteína
1093	1093	1094	-	O-P-O estiramento simétrico	***
1171	1172	1171	1172	***	Proteína
-	-	-	1200	Aromático C-C	Ácido Nucleico
-	-	-	1222	Amida III	Proteína
-	1237	-	1236	***	DNA
1263	-	-	-	C-H	Adenina ou timina
1296	1297	-	1297	***	Lipídio
-	-	1313	-	CH <sub>3</sub> , dobra CH <sub>2</sub>	Colágeno
1440	1440	1440	1440	Deformação CH <sub>2</sub>	Lipídio

1460	1461	1460	1460	***	Adenina e guanina
1658	1660	1660	1658	Amida I	Proteína, ácido nucleico

\*\*\* Ligação química desconhecida

### Análise de agrupamento de partição ou análise cluster *k means*

Os dados espectrais referentes às médias de cada amostra foram submetidos a análise de cluster *kmeans* (Fig.2). Esta análise determina uma partição dos indivíduos em *k* classes segundo a homogeneidade ou separação entre as classes. Para a realização da análise deste estudo, nesta análise o número de classes foi limitado para 5. A maioria dos casos foram alocados em uma mesma classe (cluster 2 = 36). As amostras de CEC foram mais heterogêneas, sendo alocadas nos cluster 1 (1), clusters 2 (6), cluster 3 (3) e cluster 5 (1). O cluster 4 foi composto somente por uma amostra de DIS. A Tabela 2 ilustra a disposição das amostras entre os clusters.

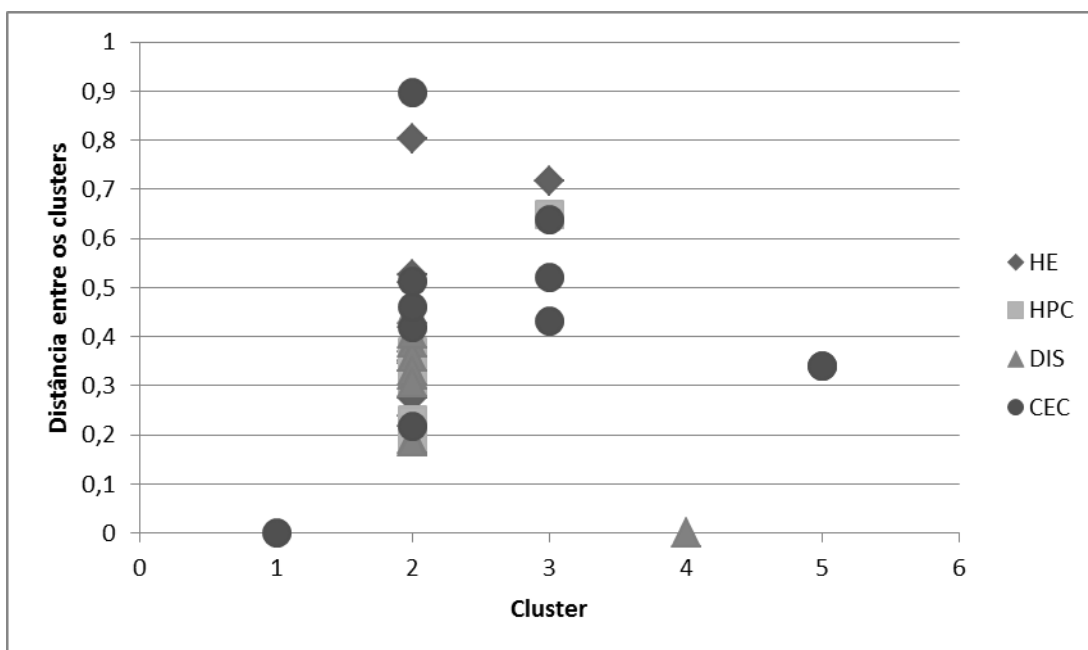


Figura 2: Gráfico de dispersão da análise classificatória de partição (*k means*).

Tabela 2: Distribuição das amostras entre as classes pela análise cluster *k means*.

<b>Grupo</b>	<b>Cluster 1</b>	<b>Cluster 2</b>	<b>Cluster 3</b>	<b>Cluster 4</b>	<b>Cluster 5</b>
<b>HE</b>	0	10	1	0	0
<b>HPC</b>	0	10	1	0	0
<b>DIS</b>	0	10	0	1	0
<b>CEC</b>	1	6	3	0	1

## Discussão

A espectroscopia Raman (ER) é das técnicas óticas de destaque no campo das ciências biomédicas. Devido alta sensibilidade e tolerância a água, estudos nessa área exploram sua capacidade de fornecer a composição molecular de amostras complexas<sup>5,13</sup>. Dentre as aplicabilidades clínicas estudadas, está a detecção da composição química das alterações teciduais por meio de espectros<sup>6</sup>. Nos últimos anos, foram publicados inúmeros estudos avaliando a capacidade da ER no diagnóstico de lesões malignas, inclusive o carcinoma espinocelular oral (CEC). Porém, poucos destes estudos procuraram diferenciar o CEC das alterações epiteliais displásicas e não-displásicas<sup>14-16</sup>. Assim, este estudo teve o objetivo de obter um espectro Raman de amostras com diferentes alterações epiteliais para compor um perfil espectral de composição molecular das mesmas.

As amostras deste trabalho foram compostas por tecidos de mucosa bucal humana emblocadas em parafina. Estes tecidos foram selecionados com base nas características histológicas do tecido epitelial, que lhe conferiram o diagnóstico de alguma das seguintes alterações epiteliais: hiperplasia epitelial (HE), hiperparaceratose (HPC), displasia epitelial (DIS) e carcinoma espinocelular (CEC). O uso dos blocos de parafina facilitou o estabelecimento de parâmetros no aparelho, por permitir realizar repetidas leituras para ajustar o comprimento de onda do laser, a potência e o tempo de incidência sem o risco de degradar a amostra. Além disso, a espessura da amostra evitou que o laser ultrapassasse atingindo o suporte onde a amostra era colocada, gerando um espectro indesejável.

Para avaliar estatisticamente as diferenças espectrais entre os grupos, utilizou-se as análises classificatórias de partição, *cluster k means*. Esta análise foi escolhida por identificar amostras semelhantes e agrupá-las. Os resultados da análise *cluster* refletiram algumas das observações feitas na comparação do perfil dos espectros.

São escassos os trabalhos existentes na literatura usando os tecidos emblocados em parafina. O cuidado ao se utilizar este tipo de amostra é a necessidade de remover o espectro da parafina para conseguir visualizar os picos espectrais característicos do tecido inserido no bloco. Além disso, ao se analisar tecidos com algum processamento químico, como a fixação em formalina tamponada a 10%, pode alterar a composição molecular. No caso do formalina tamponada a 10%, há a formação de ligações químicas cruzadas entre o grupo amina no terminal N ou na cadeia  $\text{NH}_2$ <sup>11</sup>. Neste trabalho, após a remoção do espectro do bloco de parafina propriamente dito, foram identificados picos espectrais similares nos grupos em virtude da utilização do mesmo tipo de tecido, tecido epitelial. Provavelmente, estas similiaridades favoreceram o agrupamento da maioria das amostras no mesmo cluster (cluster 2), independente da alteração epitelial que apresentavam. Estes achados confirmam que os espectros do tecido epitelial em diferentes condições, normal ou maligna, diferenciam pela intensidade e frequências dos comprimentos de onda registrados e minimamente pela composição em si<sup>11</sup>.

O perfil espectral do grupo HE apresentou pico espectral extra de lipídios e um pico espectral ausente referente a DNA. Este resultado pode sugerir que a HE está mais próximo da mucosa oral normal, baseando-se em achados da literatura que observam uma maior quantidade de picos espectrais de lipídios e menos de DNA e proteínas em amostras mucosa oral sem lesão<sup>14</sup>. A maior quantidade de lipídios em tecidos normais tem sido justificada pela organização arquitetural das camadas do epitélio, destacando a composição da camada dupla da membrana celular e baixa atividade proliferativa no interior do nucléolo devido à normalidade do seu funcionamento<sup>11,17,18</sup>.

O mesmo não pode ser extrapolado para o perfil espectral do grupo HPC. Este perfil se destacou por marcar os picos espectrais extras referentes a proteína e DNA. Estas bandas também foram observadas no perfil espectral do CEC. Na composição molecular de amostras de tecido epitelial com alteração inflamatória, potencialmente maligna e maligna, observou-se perda de lipídios e aumento na quantidade de proteínas, comparando-se com o tecido epitelial normal<sup>1,14,18,19</sup>. Estes aumentos de proteínas e DNA podem estar relacionadas com a maior atividade proliferativa observada em casos de HPC em relação ao tecido normal<sup>20</sup>.

O grupo DIS apresentou o marcação de colágeno no pico espectral 1313  $\text{cm}^{-1}$ , que não foi observado nos demais grupos. Carvalho et al. (2010)<sup>19</sup> afirmaram que a presença de colágeno no espectro pode indicar aumento na síntese de colágeno e produção fibras colágenas, observados em casos com algum processo inflamatório desencadeado. Pela análise de agrupamento *k means*, o grupo DIS diferenciou dos demais por alocar uma única amostra no cluster 4, porém não foram observados aspectos que justificassem este fato, microscopicamente. Segundo Malini et al. (2006)<sup>14</sup>, é difícil encontrar uma mudança gradual nos espectros de lesões potencialmente malignas para lesões malignas de forma a correlacioná-las. Deshmukh et al. (2011)<sup>21</sup> apontaram que as alterações displásicas nas camadas mais profundas do epitélio tem o espectro mascarado pela proximidade com o tecido conjuntivo. Esta dificuldade em se analisar espectros de lesões pré-malignas foi encontrada por Singh et al. (2012)<sup>15</sup>, quando tais espectros se confundiam com os espectros de mucosa oral sem lesão.

O perfil do CEC destaca-se por apresentar maior quantidade de bandas espectrais. Correlacionando esses picos espectrais com a molécula de referência, nota-se o maior registro de proteínas e ácidos nucleicos, diferenciando-se dos demais, principalmente do perfil do grupo HE. Esta observação concorda com a literatura<sup>3,11,18</sup>. A presença dos picos espectrais 1083, 1200 e 1240  $\text{cm}^{-1}$ , detectados no espectro deste grupo, são próprios de lesões malignas<sup>1,11,17</sup>. A alta detecção de proteínas pode ser explicada pelo aumento na produção de enzimas, anticorpos e receptores durante a carcinogênese, além disso a alta atividade proliferativa em lesões malignas justifica a maior quantidade de bandas espectrais de ácidos nucleicos em seus espectros<sup>1,3,18</sup>. Em relação ao CEC, Guze et al. (2010)<sup>18</sup> conseguiram identificar a heterogeneidade das suas células por meio dos espectros Raman, no nosso estudo essa heterogeneidade pode ser observada na maior quantidade e variedade de picos espectrais destacados ao se obter a média do grupo, e no agrupamento deste grupo em quatro diferentes clusters.

Portanto, pode-se avaliar pela espectroscopia Raman amostras de tecidos sem o risco de se perder suas propriedades durante a análise. Pelo perfil espectral da hiperplasia epitelial, devido a sua composição de lipídios em relação às demais alterações, pode-se inferir uma maior proximidade da normalidade que as demais alterações epiteliais. O perfil espectral das lesões malignas além de apresentar uma maior quantidade de picos espectrais relevantes, estes se referem a proteínas e ácidos nucleicos em virtude da mudança na funcionalidade das células devido ao processo da carcinogênese.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela PROAP/CAPES.

## Referências Bibliográficas

1. Christian K, Johana M, Werner A, Kathrin B, Tesfay GM, Robert H et al. Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma. *Biomedical optics express* 2014; 5 (9): 3252-65.

2. Fenn MB, Xanthopoulos P, Pyrgiotalis G, Grobmyer SR, Pardalos PM, Hench LL. Raman spectroscopy for clinical oncology. *Advances in optical Technologies* 2011. Doi:10.1155/2011/213783
3. Cals LJ, Schut TCB, Hardillo JA, Jong RJB, Koljenović S, Puppels GJ. Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins. *Laboratory Investigation* 2015; 1-11. doi:10.1038/labinvest.2015.85.
4. Tu Q, Chang C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: NBM* 2011;1-14. Doi:10.1016/j-nano.2011.09.013.
5. Hanlon EB, Manoharan R, Koo T-W, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in medicine and biology* 2000; 45 (2): R1-59.
6. Keating ME, Byrne HJ. Raman spectroscopy in nanomedicine: current status and future perspective. *Nanomedicine* 2013; 8(8); 1335-51.
7. Krafft C, Dietzek B, Schmitt M, Popp J. Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications. *Journal of Biomedical Optics* 2012; 17 (4): 1-15.
8. Krafft C, Popp J. The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2015: 407; 699-717. Doi:10.1007/s00216-014-8311-9.
9. Baena J, Lendi B. Raman spectroscopy in biochemical analysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 2004; 8: 534-9.
10. Harris AT, Rennie A, Waqar-Uddin H, Wheatley SR, Ghosh SK, Martin-Hirsch DP et al. *Head and Neck Oncology* 2010; 2 (26). doi: 10.1186/1758-3284-2-26.
11. Krishna CM, Sockalingum GD, Kurien J, Rao L, Venteo L, Pluot M et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. *Applied Spectroscopy* 2004; 58 (9); 1128-35.
12. Movasaghi, Z. et al. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Review* 2007: 42; 493-541.
13. Kong K, Kendall C, Stone N, Nottingher I. Raman spectroscopy for medical diagnosis- from in vitro biofluid assays to in vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015. doi:10.1016/j.addr.2015.03.009.
14. Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. *Biopolymers* 2006; 81; 179-93.
15. Singh SP, Deshmukh A, Chatuvedi P, Krishna CM. In vivo Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. *Journal of Biomedical Optics* 2012; 17 (10): 1-9.



16. Singh SP, Sahu A, Deshmukh A, Chatuvedi P, Krishna CM. In vivo Raman spectroscopy of oral buccal mucosa: a study on malignancy associated changes (MAC)/ cancer field effects (CFE). *Analyst* 2013; 138: 4175-82.
17. Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Valiathan M, Kumar NN, Krishna CM et al. Optical pathology of oral tissue: a Raman spectroscopy diagnostic method. *Current Science* 2001; 80 (5): 665-9.
18. Guze K, Short M, Zeng H, Lerman M, Sonis S. Comparison of molecular images as defined by Raman spectra between normal mucosa and squamous cell carcinoma in the oral cavity. *Journal of Raman Spectroscopy* 2011; 42: 1232-39.
19. Carvalho LFCS, Bitar RA, Arisawa EAL, Brandão AAH, Honório KM, Cabral LAG et al. Spectral region optimization for Raman-based optical biopsy of inflammatory lesions. *Photomedicine and Laser Surgery* 2010; 28 (supplement 1): S- 111-17.
20. Hildebrand LC, Carrard VC, Lauxen IS, Quadros OF, Chaves AC, Sant' Ana-Filho M. Evaluation of cell proliferate rate in non-dysplasic leucoplakia. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2010; 15(2); 328-34.
21. Deshmukh A, Singh SP, Chatuverdi P, Krishna CM. Raman spectroscopy of normal oral buccal mucosa tissues: study on intact and incised biopsies. *Journal of Biomedical Optics* 2011; 16 (12); 1-10.

## ARTIGO CIENTÍFICO II

**Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico Laboratory Investigation (Qualis Odontologia A1 – Ano base 2014, Fator de impacto 3,676).**

**Diferenciação biomolecular das alterações epiteliais não-displásicas, displásicas e malignas da mucosa bucal.**

### Abstract

Raman spectroscopy allows identification of molecular changes in the tissue, before some evidence of malignancy could be identified microscopically. The purpose of this research was to evaluate the ability of Raman spectroscopy in discern epithelial changes non-dysplastic, dysplastic and squamous cell carcinoma, using samples of oral epithelial tissue formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE). Forty four FFPE were selected based on histopathological diagnosis, and eleven FFPE for each of the following changes: epithelial hyperplasia, hyperparakeratosis, epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. The Raman spectra of each block were analyzed according to principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA), to check correspondence of the spectral data with the histopathological diagnosis, resulting in an efficiency of 86.36% and a sensitivity and specificity of 91% and 96.9% respectively. The Raman spectra were also divided into areas as the corresponding molecule, and the whole of these areas were analyzed using the Kruskal-Wallis test. It was observed that the squamous cell carcinoma samples showed higher concentration of proteins and DNA, with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). These results showed that Raman spectroscopy could be used as an adjunct to histopathology, and a tool for early diagnosis of oral cancer.

Keywords: Raman spectroscopy, biochemical phenomena, epithelium, squamous cell carcinoma.

### Introdução

A espectroscopia Raman (ER) é uma técnica óptica que consiste no espalhamento inelástico da luz pela vibração molecular e pode fornecer a composição química das células, tecidos ou biofluidos<sup>1</sup>. O espalhamento inelástico ocorre quando durante a interação da luz com a matéria há transferência de energia em quantidade diferente da energia incidida. Esta transferência é proporcional a um modo vibracional específico da molécula, registrado em um gráfico denominado espectro, onde a intensidade de vibração é disposta em função da mudança na frequência ( $\text{cm}^{-1}$ ) das ligações químicas<sup>2,3</sup>. As mudanças nas frequências dependem do tipo das moléculas presentes na amostra, sendo capaz de fornecer informações moleculares específicas sobre as alterações bioquímicas e conseqüentemente morfológicas de células e tecidos<sup>3</sup>. Esta tecnologia proporciona um resultado objetivo, com alta precisão e também sensível, sem necessitar qualquer tipo de pré-tratamento ou marcação externa para analisar as amostras e sem destruí-las<sup>4-7</sup>. Portanto, as características da ER tem sido bastante explorada para as aplicações biomédicas e clínicas<sup>8</sup>.

A detecção precoce do câncer é uma das principais abordagens dos estudos realizados com a ER, pois a detecção precoce da displasia e do câncer aumentam as chances de sucesso do tratamento<sup>3,9,10</sup>. A transformação de um tecido normal em uma lesão cancerosa é lenta e envolve alterações moleculares que só serão observadas na morfologia celular e disposição arquitetural do tecido afetado em estágios mais avançados<sup>11</sup>. Identificar esses eventos precoces tem sido cada vez mais importante, já que a carcinogênese promove alterações significantes na estrutura e conteúdo das biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios<sup>3,4</sup>. Por fornecer informações sobre estas variações moleculares, a ER pode ser usada como uma ferramenta complementar as técnicas diagnósticas já estabelecidas como o processamento histológico dos tecidos<sup>7</sup>.

Os resultados das pesquisas utilizando a ER *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para o diagnóstico de câncer tem resultados variados, porém promissores. Entretanto, a adesão desta tecnologia à prática clínica ainda encontra

dificuldades, como a necessidade de mais estudos e o tempo dispendido para análises imediatas<sup>3,7</sup>. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da ER em diferenciar as alterações epiteliais não-displásicas e displásicas, do carcinoma espinocelular, detectando quais seriam essas diferenças, usando amostras de tecido emblocadas em parafina.

## **Material e Métodos**

### Aprovação ética

Previamente à execução, este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP-UFRGS), aprovado em 18/12/2013 com parecer nº 523.144.

### Seleção da amostra

Os blocos de parafina neste trabalho são provenientes do arquivo do Laboratório de Patologia da UFRGS. Estes blocos foram selecionados conforme o diagnóstico histopatológico referente a alguma alteração epitelial benigna (hiperplasia epitelial, HE; hiperparaceratose, HPC), pré-maligna (DIS) e maligna (CEC). As lâminas histológicas dos blocos escolhidos foram revisadas por um patologista experiente (MSF) para confirmação do diagnóstico e localização da área mais característica, caso contrário o bloco seria substituído.

### Instrumentação Raman

A visualização das áreas selecionadas era feita com uma lente objetiva em um aumento de 200x acoplada a câmera CCD em um micro-espectroscópio Raman (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). O laser de excitação tinha um comprimento de onda de 785 nm proveniente de um laser de diodo, numa

potência de 100 mW, abertura de 5x1000  $\mu\text{m}$  e resolução espectral de  $\sim 3,5\text{cm}^{-1}$ . A emissão do laser era de dez segundos para cada espectro, ou seja, emitido por dois segundos com cinco co-adições. A fluorescência proveniente das amostras foi removida através da manipulação dos espectros com o software Opus 7.2.

## Espectros Raman

De cada bloco foram obtidos 10 espectros ao longo da região selecionada. O espectro da amostra era a média gerada a partir desses espectros.

## Análise Estatística

Os dados obtidos nos espectros foram submetidos a Análise dos Componentes Principais (PCA), os fatores obtidos foram analisados com a Análise dos Discriminantes Lineares (LDA). A sensibilidade e especificidade da Espectroscopia Raman, para o diagnóstico das alterações, foram avaliadas com a curva de ROC. As áreas referentes ao DNA, às proteínas e aos lipídios, foram analisadas pelo teste não-paramétrico Kruskal Wallis. Para o processamento dos dados, em cada análise estatística, utilizou-se o programa SPSS 21 (IBM, Armonk, NY, USA).

## Resultados

### Comparação da análise espectral com o diagnóstico histopatológico

De cada bloco, obteve-se um espectro referente à média dos 10 espectros obtidos. Os 11 espectros gerados de cada grupo foram comparados para se verificar diferenças entre os espectros das alterações epiteliais.

A PCA dos 44 espectros gerou 28 componentes principais, onde o primeiro componente acumulou a maioria das variáveis dos espectros. Esses 28 componentes principais foram submetidos a LDA que permitiu analisar as diferenças entre os grupos (grupo real) e o resultado do espectro Raman (Grupo Predito). Apenas 5 amostras apresentaram espectro discordante com o grupo ao qual pertenciam (Grupo Real) (Tabela 1). A curva de ROC para o diagnóstico de cada grupo resultou em 91% de sensibilidade e 96,9% de especificidade (Figura 1) .

Tabela1. Resultado da LDA comparando o Grupo Real com o Grupo Predito.

DH*	Raman				Total
	HE	HPC	DIS	CEC	
HE	10 (90,9 %)	1 (9,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	11 (100%)
HPC	0 (0,0%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	11 (100%)
DIS	0 (0,0%)	1 (9,1%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)	11 (100%)
CEC	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)	10 (90,9 %)	11 (100%)
<b>Total</b>					<b>44</b>

\* DH: diagnóstico histopatológico

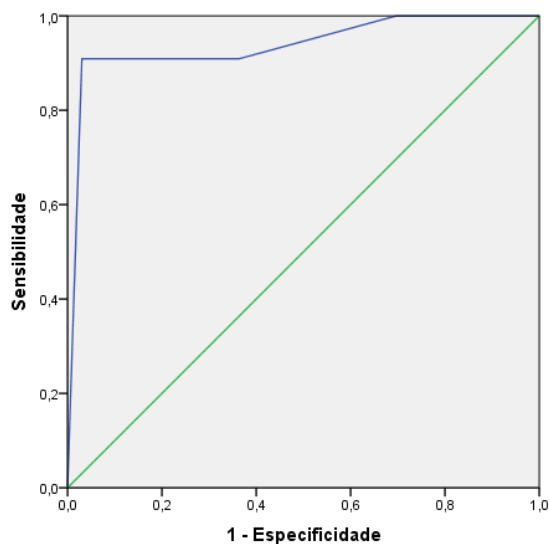


Figura 1. Curva de ROC para os grupos estudados (HE, HPC, DIS e CEC).

#### Análise das áreas espectrais

Para identificar as diferenças entre os grupos referentes às concentrações de proteínas, DNA e lipídios, os espectros médios das amostras foram subdivididos em áreas conforme os intervalos do comprimento que tais moléculas correspondem. O pico espectral  $1554\text{ cm}^{-1}$  serviu de referência, pois segundo Krishna et al. (2004) a intensidade de vibração molecular é semelhante em amostras de tecido bucal normal e tecido bucal com alteração maligna. Ao todo foram avaliadas 31 áreas, porém apenas aquelas que mostraram alguma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estão relacionadas na Tabela 2.

Tabela 2. Áreas espectrais com diferenças estatisticamente significante pelo teste de Kruskal-Wallis e resultado da comparação entre pares ( $p < 0,05$ ).

Molécula	Área	Intervalo ( $\text{cm}^{-1}$ )	Comparação por pares	Concentração	p
Proteína	1	595-635	DIS-CEC	1,215	0,027
	5	1000-1009	DIS-CEC	0,321	0,001
			HPC-CEC		0,020
	7	1030-1035	DIS-CEC	0,154	0,023
			HPC-CEC		0,027
13	1164-1177	HE-CEC	0,545	0,026	
28	1658-1700	DIS-HE	0,497	0,042	
DNA	2	655-749	DIS-CEC	4,737	0,026
			HPC-CEC		0,037
	20	1335-1342	DIS-CEC	0,213	0,007
22	1455-1510	DIS-CEC	3,282	0,017	
Lipídios	12	1120-1139	CEC-HPC	0,947	0,027
			CEC-DIS	0,949	0,022
	21	1435-1450	HPC-CEC	3,315	0,033
	27	1650-1656	DIS-CEC	0,142	0,003



Foram encontradas diferenças entre os grupos para cada uma das moléculas avaliadas. As concentrações de proteínas e DNA foram maiores no grupo CEC, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos (HE, HPC, DIS).

## **Discussão**

Este estudo utilizou amostras de tecido bucal contendo alterações epiteliais não-displásicas, displásicas ou malignas armazenados em blocos de parafina para análise pelo espectrômetro Raman. No nosso conhecimento, poucos são os estudos usando RS que fazem esta distinção entre as alterações epiteliais não-displásicas com as demais, bem como não existem trabalhos avaliando se amostras parafinizadas poderiam ser usadas na distinção de lesões pela ER.

O diagnóstico precoce de lesões malignas proporcionam intervenções antecipadas e aumentam as chances de cura<sup>13</sup>. O exame histopatológico é “padrão ouro” na detecção dessas lesões malignas e das pré-malignas<sup>14</sup>. Todavia, a carcinogênese é caracterizada por uma série de alterações bioquímicas, pela presença de marcadores tumorais bioquímicos que podem ser identificados por meio de tecnologias ópticas<sup>5</sup>. Dentre essas tecnologias, a ER destaca-se por permitir o uso sem preparo prévio ou marcações adicionais nas amostras e não ser destrutiva.

Primeiramente, para avaliar a capacidade de diagnóstico da ER sobre as amostras, análises multivariadas PCA e LDA foram realizadas. A PCA foi usada para diminuir a quantidade de variáveis extraídas do espectro, criando estatisticamente novas variáveis, os componentes principais. Neste estudo, foram gerados 28 componentes principais que em seguida foram analisados pela LDA para verificar a correspondência entre o Grupo Real, ou seja, o grupo da alteração epitelial diagnosticada microscopicamente, e o Grupo Predito, grupo diagnosticado pela ER. O resultado final da LDA obteve 86,36% de correspondência entre as técnicas de diagnóstico. As lâminas correspondentes

aos blocos reclassificados pela ER foram reexaminadas e verificou-se a presença de áreas com intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente, camada espessa de ceratina, áreas com alguma alteração citológica ou arquitetural no epitélio isolada, ou seja, havia presença de áreas que poderiam alterar a classificação pelo espectro. Mesmo com estas discordâncias, a ER apresentou 91% de sensibilidade e 96,9% de especificidade.

Análises estatísticas multivariadas são as mais utilizadas ao se trabalhar com espectros Raman na avaliação de amostras biológicas<sup>6,14-18</sup>. A redução do número de variáveis em componentes principais, permite identificar similaridades e variâncias entre os dados. A LDA maximiza a separação entre os grupos e minimiza as variâncias intragrupo<sup>19</sup>. A análise de carcinomas, displasias e epitélio normal do epitélio de diferentes sítios, laringe, tonsila, esôfago, estômago, bexiga e próstata, mostrou uma acurácia de 88,4%, com sensibilidade acima de 86% e especificidade de 87%<sup>14</sup>. Para o epitélio bucal, Singh et al. (2012)<sup>17</sup> obtiveram 94,7% de eficiência na comparação de espectros Raman *in vivo* de mucosa bucal normal, mucosa bucal com desordem potencialmente maligna e mucosa com carcinoma espinocelular, utilizando-se da PCA e LDA para analisar os dados espectrais. Além disso, as maiores discrepâncias foram observadas na classificação das desordens potencialmente malignas, onde houveram 80% de correspondência entre o diagnóstico histopatológico e o espectro Raman. Os resultados desta pesquisa confirmam as conclusões desses estudos anteriores quanto a alta capacidade da ER em diferenciar alterações teciduais, com porcentagens acima de 80% na avaliação da eficiência, especificidade, sensibilidade.

Os espectros Raman também foram analisados segundo as concentrações das biomoléculas encontradas. Para isso, a região espectral foi subdividida em áreas correspondendo a proteínas, DNA ou Lipídios. O grupo CEC apresentou as maiores concentrações de proteínas e DNA, sendo estatisticamente significativa e corroborando com outros estudos<sup>16,17</sup>. A maior concentração de DNA pode ser relacionada ao aumento na atividade proliferativa das células de uma neoplasia maligna, bem como das alterações citológicas como aumento da relação núcleo citoplasma e hiperchromatismo

nuclear<sup>16,18</sup>. Além disso, os tumores malignos também são marcados pelo aumento da regulação ou atividade de proteínas nas células<sup>16</sup>. Espectros Raman com predomínio de proteínas refletem grande quantidade de proteínas de superfície e receptores, enzimas, antígenos e anticorpos desencadeados pelos processos patológicos<sup>10</sup>. As áreas de proteínas que mostraram maior concentração no CEC, a área 1 se refere a triptofano e as áreas 5 e 7 a fenilalanina, corroborando com achados de Guze et al. (2011)<sup>16</sup> que acharam um aumento na marcação espectral dessas proteínas no CEC e sugeriram a associação deste aumento com o estresse oxidativo.

A ER pode ser usada como técnica auxiliar para a histopatologia e a imunoistoquímica, podendo aprimorar o diagnóstico de um grande número de doenças, incluindo o câncer<sup>19</sup>. Além de vantagens como não necessitar do uso de marcadores e qualquer outra preparação das amostras, a rapidez, a acurácia de seus resultados e podem ser uma solução para a subjetividade inter-observadores na classificação de lesões pré-malignas<sup>13,17</sup>. Os achados deste estudo reforçam para essas afirmações quanto à RS e apontam que se pode utilizar tecidos emblocados em parafina como amostra permitindo o diagnóstico e acompanhamento de lesões a nível molecular.

Portanto, este estudo mostrou que a ER pode ser aplicada para diagnóstico de lesões epiteliais, mesmo usando amostras de mucosa bucal emblocadas em parafina. As diferenças entre as alterações seguem os resultados já publicados por outros autores, ao atingir diferenciar corretamente a maioria das alterações e identificar uma maior quantidade de proteínas nas lesões malignas.

## Referências

1. Kong K, Kendall C, Stone N, Nottingher I. Raman spectroscopy for medical diagnosis- from in vitro biofluid assays to in vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015. doi:10.1016/j.addr.2015.03.009.
2. Hanlon EB, Manoharan R, Koo T-W, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in medicine and biology* 2000; 45 (2): R1-59.

3. Keller MD, Kanter EM, Mahadevan-Jansen A. Raman spectroscopy for cancer diagnosis. *Spectroscopy* 2006; 21 (11): 33-41.
4. Schie IW, Huser T. Methods and applications of Raman microspectroscopy to single-cell analysis. *Applied spectroscopy* 2013; 67 (8): 813-828.
5. Christian K, Johana M, Werner A, Kathrin B, Tesfay GM, Robert H et al. Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma. *Biomedical optics express* 2014; 5 (9): 3252-65.
6. Cals LJ, Schut TCB, Hardillo JA, Jong RJB, Koljenović S, Puppels GJ. Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins. *Laboratory Investigation* 2015; 1-11. doi:10.1038/labinvest.2015.85.
7. Krafft C, Popp J. The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2015; 407; 699-717. Doi:10.1007/s00216-014-8311-9.
8. Tu Q, Chang C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: NBM* 2011:1-14. Doi:10.1016/j-nano.2011.09.013.
9. Schut TCB, Witjes MJH, Sterenberg HJCM, Speelman OC, Roodenburg JLN, Marple ET et al. In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* 2000; 72 (24): 6010-6018.
10. Oliveira AP, Bitar RA, Silveira L, Zângaro RA, Martin AA. Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006; 24(3): 348-53.
11. Cals LJ, Schut TCB, Hardillo JA, Jong RJB, Koljenović S, Puppels GJ. Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. *Journal of Raman Spectroscopy* 2013; 1-10. DOI:10.1002/jrs.4318
12. Krishna CM, Sockalingum GD, Kurien J, Rao L, Venteo L, Pluot M et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. *Applied Spectroscopy* 2004; 58 (9); 1128-35.
13. Harris AT, Rennie A, Waqar-Uddin H, Wheatley SR, Ghosh SK, Maartin-Hirsch DP et al. Raman spectroscopy in head and neck cancer. *Head & Neck Oncology* 2010; 2 (26): 1-6.
14. Stone N, Kendall C, Sheperd N, Crow P, Barr H. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. *Journal of Raman Spectroscopy* 2002; 33: 564-573.
15. Guze K, Short M, Sonis S, Karimbux N, Chan J, Zeng H. Parameters defining the potential applicability of Raman spectroscopy as a diagnostic tool for oral disease. *Journal of Biomedical Optics* 2009; 14(1): 1-9.

16. Guze K, Short M, Zeng H, Lerman M, Sonis S. Comparison of molecular images as defined by Raman spectra between normal mucosa and squamous cell carcinoma in the oral cavity. *Journal of Raman Spectroscopy* 2011; 42: 1232-39.
17. Singh SP, Deshmukh A, Chatuvedi P, Krishna CM. In vivo Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. *Journal of Biomedical Optics* 2012; 17 (10): 1-9.
18. Singh SP, Sahu A, Deshmukh A, Chatuvedi P, Krishna CM. In vivo Raman spectroscopy of oral buccal mucosa: a study on malignancy associated changes (MAC)/ cancer field effects (CFE). *Analyst* 2013; 138: 4175-82.
19. Fenn MB, Xanthopoulos P, Pyrgiotalis G, Grobmyer SR, Pardalos PM, Hench LL. Raman spectroscopy for clinical oncology. *Advances in optical Technologies* 2011. Doi:10.1155/2011/213783

## ARTIGO CIENTÍFICO III

**Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico Spectroscopy Letters (Qualis Odontologia B2 – Ano base 2013, Fator de impacto 0,783).**

**Análise pela espectroscopia Raman de mucosa oral biopsiada antes e após a fixação: um estudo piloto.**

### Abstract

Many investigations have been developed to evaluate the capacity of Raman spectroscopy as a diagnostic device. However, the methods of conditioning the samples vary between studies that use frozen or formalin-fixed tissues. The aim of this study was to compare the molecular differences in Raman spectra from a freshly biopsied oral tissue before and after being formalin fixed. A biopsied oral tissue was stored in ice and analyzed by Raman spectroscopy. Then, the tissue sample was formalin fixed for 24h before being submitted to another analysis by Raman spectroscopy. The Raman spectra before and after fixation presented some similarities, but the differences were found. It was observed that the DNA and RNA peaks were altered, which could cause some misinterpretation.

Keywords: Raman spectroscopy; formalin fixative; tissue sample.

### INTRODUÇÃO

Espectroscopia de Raman tem sido estudada extensivamente como uma ferramenta promissora para diagnóstico. Esta tecnologia óptica proporciona uma "impressão digital" da composição biomolecular e conformação de amostras biológicas (1-3). Estudos aplicados com a Espectroscopia Raman em diferentes tipos de amostras como *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* tem sido publicados. *Ex vivo* e *in vitro* são as primeiras etapas para avaliar a capacidade do Espectroscopia Raman para distinguir tecidos e células, respectivamente (4). No entanto, diferentes formas de condicionamento são utilizadas, especialmente em relação a fixação da amostra (5).

Fixação de amostras biológicas é uma técnica essencial aplicada, a fim de preservar a estrutura do tecido e evitar a desintegração durante a coleta de dados (5, 6).

A solução de formalina tamponada a 10% é mais comumente utilizada para armazenamento de tecidos durante procedimentos histológicos devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade. O formalina tamponada a 10% é baseado em aldeído, que faz ligações cruzadas de proteínas com pontes de metileno, além de degradar proteínas e ácidos nucleicos (7-10). Desta forma, a preparação do tecido com formalina tamponada a 10% pode causar alguns erros de interpretação, ao usar a RS, criando artefatos ou supressão de informações no espectro.

Existem poucos estudos avaliando o uso de fixadores em amostras de espectros Raman e como os estudos de avaliação da capacidade de diagnóstico Espectroscopia Raman estão aumentando, torna-se importante ressaltar as diferenças entre os distintos tipos de condicionamento tecidual para os seus resultados. O objetivo deste estudo foi comparar as diferenças moleculares em espectros Raman de um tecido fresco antes e depois de ser fixados em formalina tamponada a 10%.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostra de tecido**

Uma amostra de tecido da mucosa bucal humana com diagnóstico clínico de leucoplasia foi coletada de uma biópsia de rotina em borda de língua que seria processada para exame histopatológico. Após a remoção cirúrgica, o tecido foi dividido em duas partes: uma foi armazenada em formalina tamponada a 10% e levada ao processamento histológico para não comprometer o diagnóstico; a outra foi armazenada no gelo e levada ao espectrômetro Raman. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (CEP/UFRGS nº

523.144, aprovado em 18/12/2013) e o paciente que forneceu a amostra de tecido assinou um termo de consentimento, concordando em participar do estudo.

### **Espectroscopia Raman**

O espectro Raman foi obtido em um espectrômetro Raman (Senterra, Bruker Inc., Kalshure, Alemanha). A amostra de tecido foi colocada sobre uma lâmina de vidro para obtenção do espectro. Nove diferentes pontos da superfície epitelial da amostra foram medidos, selecionados por uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplada) com abertura de  $5 \times 1000 \mu\text{m}$  e resolução espectral de  $\sim 3,5 \text{cm}^{-1}$ . A excitação da amostra ocorreu por meio de um laser de diodo em um comprimento de onda de 785 nm e uma potência de 100 mW. O espectro foi integrado por 20 vezes por cinco segundos. A fluorescência gerada pela interação da luz laser com a amostra foi removida pelo software Opus 7.2 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany). Após a primeira análise, amostra foi fixada em formalina tamponada a 10% por 24h e um novo espectro Raman foi obtido, com os mesmos parâmetros da primeira análise.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A região espectral analisada foi entre 497 a  $3250 \text{cm}^{-1}$ . Na região espectral acima de  $1893 \text{cm}^{-1}$ , poucos picos ou bandas espectrais foram observadas. Os picos apresentados por ambas amostras estão descritas na Tabela 1.



Table 1. Modo Vibracional e componentes estruturais obtido da amostra sem e com fixação.

Amostra sem fixação (cm <sup>-1</sup> )	Amostra Fixada (cm <sup>-1</sup> )	Modo Vibracional	Componentes Estruturais
-	547	S-S	Ponte de dissulfeto (2)
560	-	C-S	***
622	622	Torção C-C	Fenilalanina (3)
644	644	Torção C-C	Tirosina (3)
678	675	***	Ácido nucleico (1)
747	746	***	Ácido nucleico (11)
-	818	Suporte principal C-C	Colágeno (11)
826	-	Alongamento do suporte principal O-P-O	DNA (12)
853	854	Respiração do anel C-C	Proteína; DNA (12)
898	898	Alongamento C-C residual	*** (12)
938	938	α-helix C-C residual	Proteína (12)
-	983	***	Fenilalanina (2)
1003	1003	Respiração do anel	Fenilalanina (11-13)
1032	1033	Dobra C-H	Fenilalanina (11, 12)
1127	1127	Alongamento trans C-C	Lipídio (10, 12)
1176	1173	Dobra C-H	Tirosina (11)
1209	1208	Alongamento C-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Proteína (12)
1341	1341	***	Proteína; Ácido Nucleico (11)
1449	1449	Deformação CH <sub>2</sub> deformação	Proteína; Lipídio (11, 14)
1556	1556	***	Triptofano (12, 14)
1653	1653	Amida I	Proteína; Lipídio (11, 12, 14)
1893	1888	***	***
2138	2140	***	***
2330	2329	***	***
-	2426	***	***
2931	2932	CH <sub>2</sub> stretching mode	Proteína (10)

\*\*\* Modo vibracional ou componente estrutural desconhecido

Uma visão geral sobre os espectros mostra que eles têm muitas similaridades nos picos espectrais registrados pela amostra antes e após a fixação (Figura 1 e 2, respectivamente), o que também foi observado em outros estudos (4, 14-16). Entretanto, algumas pequenas diferenças também foram observadas.

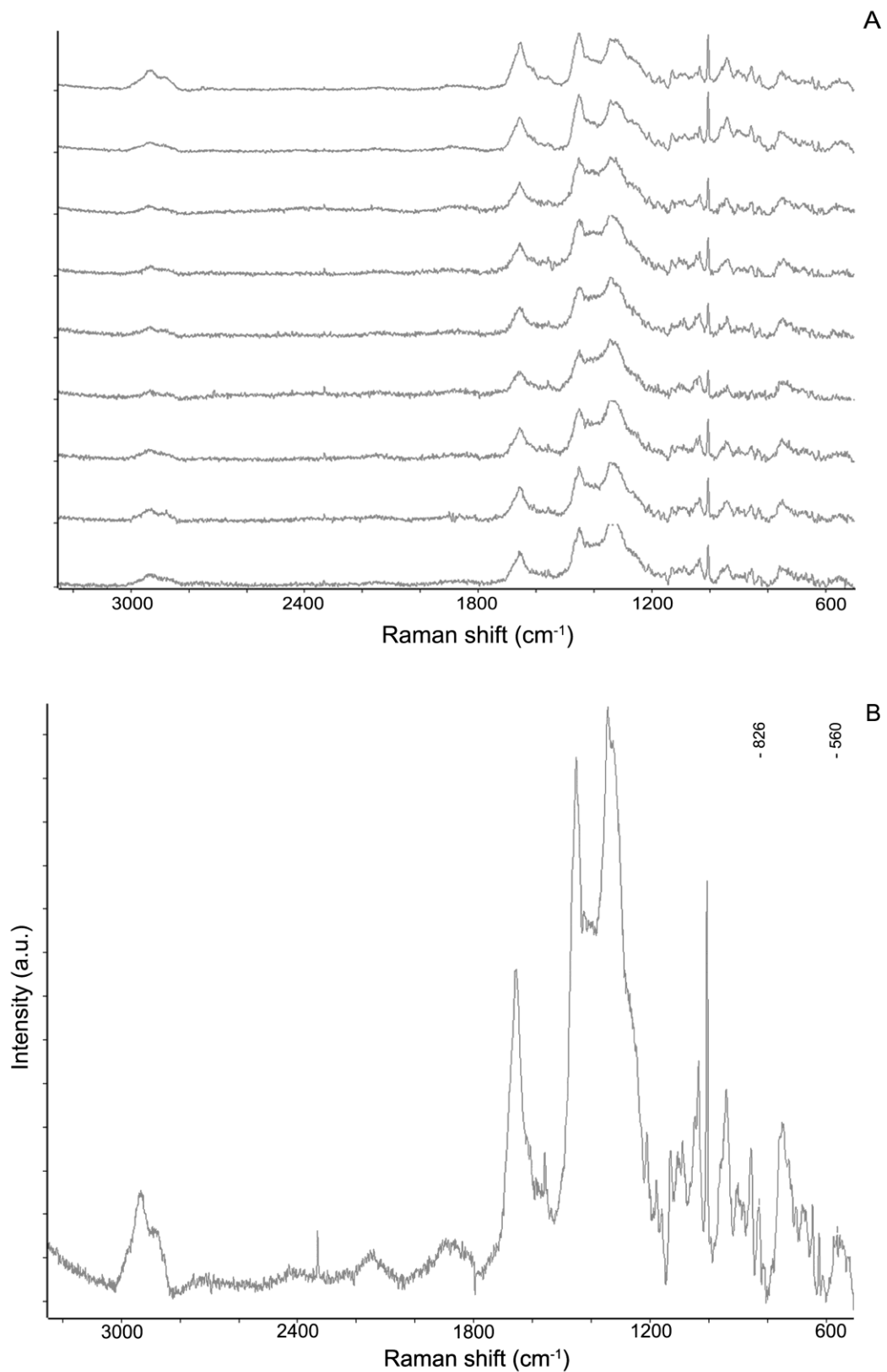


Figure 1. Espectros Raman obtido da superfície epitelial da amostra sem fixação (A) e o espectro médio dos 9 espectros da amostra sem fixação (B).

A

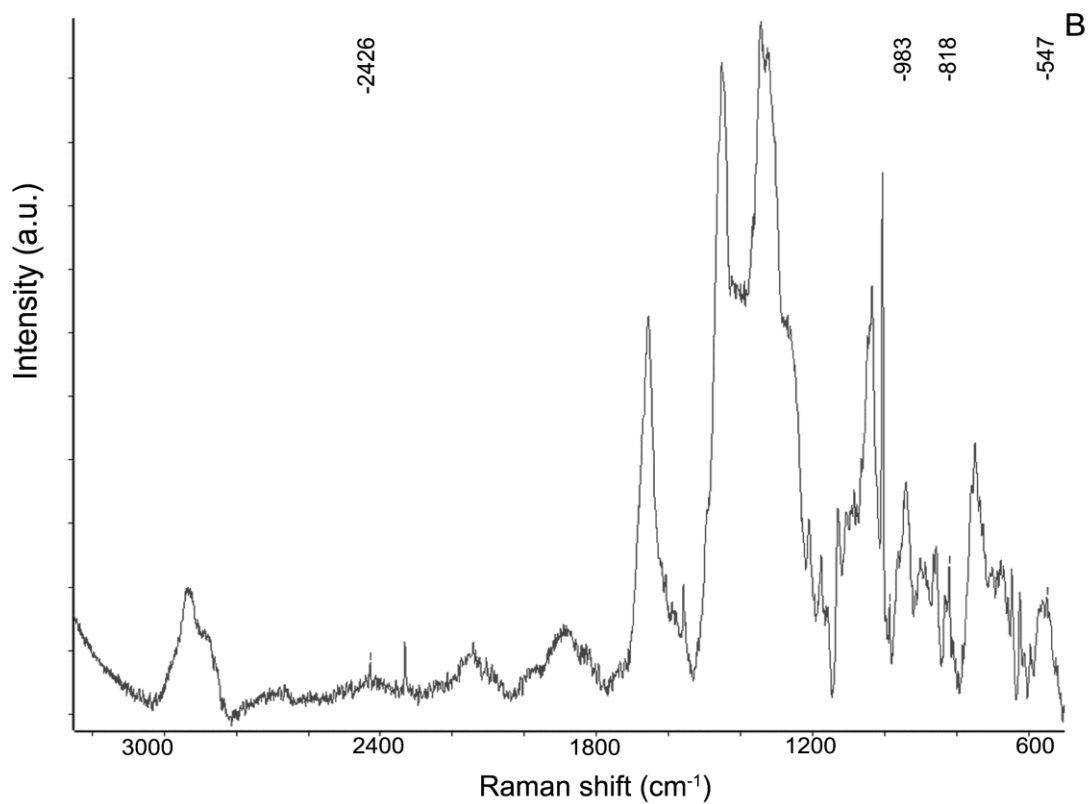
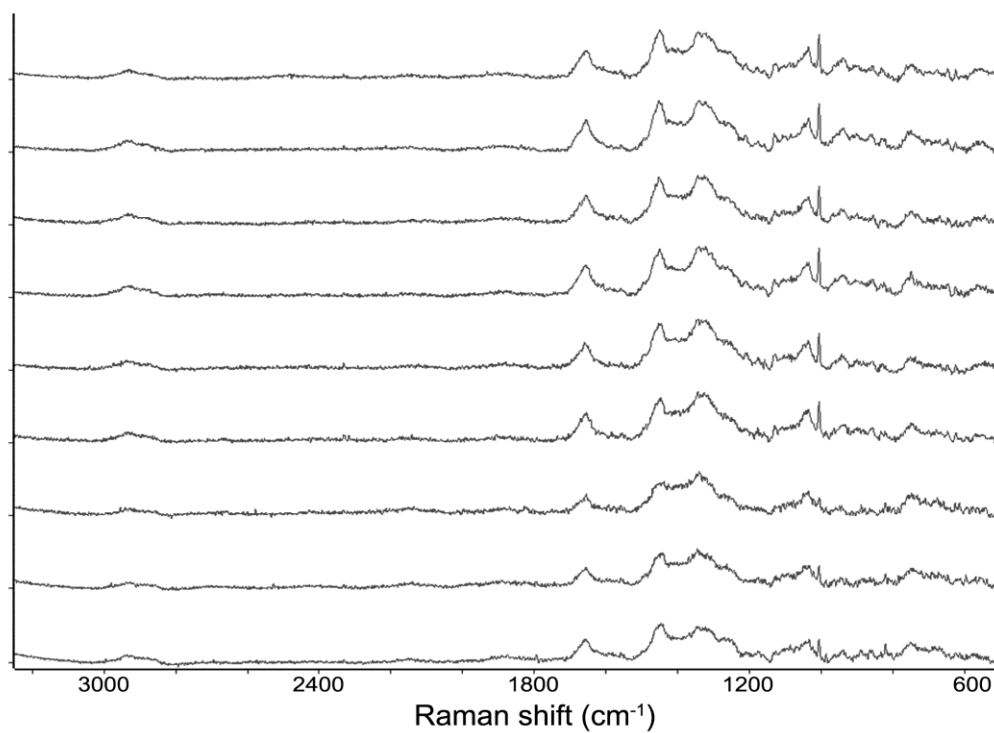


Figure 2. . Espectros Raman obtido da superfície epitelial da amostra com fixação (A) e o espectro médio dos 9 espectros da amostra com fixação (B).

Comparando o espectro de uma amostra fixada, os picos espectrais 560 e 826  $\text{cm}^{-1}$  não foram registrados. O pico 826  $\text{cm}^{-1}$  se refere a DNA e a ausência no espectro armazenado em formalina pode indicar a degradação desta molécula pela substância química. Alguns dos efeitos da fixação química envolvem alterações no DNA e RNA (6, 17, 18). A fixação com formalina tamponada a 10% degrada o DNA tecidual, dificultando o seu uso no diagnóstico e na pesquisa (9). Verificou-se que o tamanho da banda de DNA gerada no PCR é menor, em análises de amostras fixadas em formalina quando comparadas com outras substâncias fixadoras (9, 17). Em cultura celular, o uso da formalina tamponada a 10% como fixador diminui a concentração de DNA e RNA, avaliado pela espectroscopia Raman (9). Na análise de células cancerosas individuais, com diferentes métodos de fixação, a quantidade de DNA e RNA foi menor nas células fixadas com formalina que as demais analisadas pelo espectro Raman, porém a composição global não foi alterada (14).

Alguns picos espectrais foram observados apenas na amostra fixada. O pico 547  $\text{cm}^{-1}$  marcou a forma vibracional das pontes de dissulfeto quando a amostra foi fixada, isto poderia ser uma indicação da conversão de sulfidril (SH) em dissulfeto (SS) observado pela presença do formaldeído (16). Os outros picos observados foram relacionados a proteínas como o colágeno em 818  $\text{cm}^{-1}$  and fenilalanina em 983  $\text{cm}^{-1}$ .

As pesquisas feitas usando a RS, para distinguir tecidos normais, inflamatórios ou malignos, apontam que os tecidos com alguma condição patológica apresentam alterações nos picos espectrais de DNA e mais registros de picos espectrais de proteínas (11-13, 19). Em cultura celular, a fixação com formalina não gera resultados consistentes (5). Assim, baseado em nossos resultados, o uso da formalina poderia alterar consideravelmente a análise do perfil espectral.

O estudo da espectroscopia Raman como uma técnica de diagnóstico tem sido promissor. O método ideal da preparação da amostra para análise é crítico para a sensibilidade e reproducibilidade dos resultados (5).

## CONCLUSÃO

A interpretação dos resultados nas análises pela espectroscopia Raman de amostras de tecido fixadas em formalina devem ser realizadas com cautela quando o objetivo for o diagnóstico. A interação da formalina com o tecido deve ser considerada, devido as marcantes alterações espectrais apresentadas.

A análise pela espectroscopia Raman de amostra de tecido biopsiada sem fixação, apresenta os melhores resultados para diagnóstico.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela PROAP/CAPES.

## Referências

1. Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, Lane SM, Ihara K, Huser T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophysical journal*. 2006;90(2):648-56.
2. Andrade PO, Bitar RA, Yassoyama K, Martinho H, Santo AM, Bruno PM, et al. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(5):1643-8.
3. Guze K, Short M, Sonis S, Karimbux N, Chan J, Zeng H. Parameters defining the potential applicability of Raman spectroscopy as a diagnostic tool for oral disease. *Journal of biomedical optics*. 2009;14(1):014016.
4. Huang Z, McWilliams A, Lam S, English J, McLean DI, Lui H, et al. Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues. *International journal of oncology*. 2003;23(3):649-55.
5. Mariani MM, Lampen P, Popp J, Wood BR, Deckert V. Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy. *Analyst*. 2009;134(6):1154-61.
6. Kuzmin AN, Pliss A, Prasad PN. Changes in Biomolecular Profile in a Single Nucleolus during Cell Fixation. *Analytical chemistry*. 2014.
7. Kniggendorf A-K, Gaul TW, Meinhardt-Wollweber M. Effects of ethanol, formaldehyde, and gentle heat fixation in confocal resonance Raman microscopy of purple nonsulfur bacteria. *Microscopy Research and Technique*. 2011;74(2):177-83.

8. Kothmaier H, Rohrer D, Stacher E, Quehenberger F, Becker K-F, Popper HH. Comparison of Formalin-Free Tissue Fixatives: A Proteomic Study Testing Their Application for Routine Pathology and Research. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2011;135(6):744-52.
9. Craft WF, Conway JA, Dark MJ. Comparison of histomorphology and DNA preservation produced by fixatives in the veterinary diagnostic laboratory setting. *PeerJ*. 2014;2:e377.
10. Galli R, Uckermann O, Koch E, Schackert G, Kirsch M, Steiner G. Effects of tissue fixation on coherent anti-Stokes Raman scattering images of brain. *Journal of biomedical optics*. 2014;19(7):071402.
11. Su L, Sun YF, Chen Y, Chen P, Shen AG, Wang XH, et al. Raman spectral properties of squamous cell carcinoma of oral tissues and cells. *Laser Phys*. 2012;22(1):311-6.
12. Krishna CM, Sockalingum GD, Kurien J, Rao L, Venteo L, Pluot M, et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. *Applied spectroscopy*. 2004;58(9):1128-35.
13. de Carvalho LF, Bitar RA, Arisawa EA, Brandao AA, Honorio KM, Cabral LA, et al. Spectral region optimization for Raman-based optical biopsy of inflammatory lesions. *Photomedicine and laser surgery*. 2010;28 Suppl 1:S111-7.
14. Draux F, Gobinet C, Sulé-Suso J, Trussardi A, Manfait M, Jeannesson P, et al. Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the impact of sample fixation methods. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(7):2727-37.
15. Bot ACC, Huizinga A, de Mul FFM, Vrensen GFJM, Greve J. Raman microspectroscopy of fixed rabbit and human lenses and lens slices: New potentialities. *Experimental Eye Research*. 1989;49(2):161-9.
16. Schyns MW, Huizinga A, Vrensen GF, de Mul FF, Greve J. Paraformaldehyde fixation and some characteristics of lens proteins as measured by Raman microspectroscopy. *Exp Eye Res*. 1990;50(3):331-3.
17. Fairley JA, Gilmour K, Walsh K. Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *Current drug targets*. 2012;13(12):1475-87.
18. Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(11):1239-48.

19. Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, M. Pai K, Rao L, Kartha VB, et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study. *Biopolymers*. 2006;81(3):179-93.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da espectroscopia Raman permite a obtenção da composição molecular das amostras. Pesquisas avaliando lesões pré-malignas e malignas, ao fazer comparações com a mucosa normal, pretendem descobrir alterações moleculares que possam distinguir estas condições nos tecidos e identificar mesmo que indiretamente fatores preditores de transformação maligna, previamente a apresentação microscópica de características próprias de malignidade (CAL S et al., 2013; CHRISTIAN et al., 2014).

Este estudo foi realizado com o intuito de caracterizar o perfil espectral de alterações epiteliais da mucosa bucal humana e verificar se esse perfil permitiria diferenciá-las. Inicialmente, foram utilizadas amostras de tecido emblocadas em parafina. Um espectro característico de cada alteração epitelial foi obtido por meio de métodos estatísticos multivariados e se verificou 86,36% em eficiência discriminação das alterações estudadas. Além disso, observou-se a predominância de vibrações moleculares nas proteínas nos casos de carcinoma espinocelular bucal (CECB), podendo indicar uma maior quantidade deste tipo de biomolécula. Este achado está em concordância com a literatura (KRISHNA et al., 2004; SINGH et al., 2012; CHRISTIAN et al., 2014; CALS et al., 2015) e segundo a mesma está relacionado à presença de enzimas, anticorpos e receptores de proteínas, especialmente àquelas envolvidas na carcinogênese. Desconhece-se outro trabalho publicado que tenha usado a espectroscopia Raman com este tipo de amostra, e os resultados obtidos sugerem a utilização desta técnica como auxiliar ao exame histopatológico, principalmente no que se refere ao monitoramento de lesões. Sendo assim, poderia ser utilizado no acompanhamento de casos recorrentes ou resistentes ao tratamento, sem necessidade da utilização de corantes, de reagentes e do desgaste do bloco de parafina.

Muitos estudos com a espectroscopia Raman são realizados em amostras de tecido ex vivo (KRISHNA et al., 2004; MALINI et al., 2006; GUZE et al., 2011; CALS et al., 2015). Estes estudos usam amostras congeladas ou

fixadas com formalina. Com o intuito de verificar quais as diferenças espectrais que podem ser encontradas entre as análises de uma amostra, com e sem fixação em formalina, foi realizado um estudo piloto. Neste estudo, realizado com uma mesma amostra, obteve-se uma análise imediatamente após a excisão cirúrgica e outra após 24h de fixação em formalina tamponada a 10%, percebeu-se alterações espectrais quanto à detecção de picos espectrais referentes a DNA e proteínas. Este resultado pode servir para delinear estudos futuros ex vivo com amostras de tecido.

Os resultados deste trabalho reforçam a espectroscopia Raman como uma tecnologia óptica promissora para ser implantada como método auxiliar no diagnóstico histopatológico de alterações epiteliais. Todavia, mais estudos devem ser desenvolvidos para validação da técnica com amostras maiores e mais padronizadas.

## Referências Bibliográficas

CALS, F.L.J et al. Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. **Journal of Raman Spectroscopy**, p. 1-9. 2013. DOI 10.1002/jrs.4318

CALS, F.L.J. et al. Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins. **Laboratory Investigation**, p.1-11. 2015.

CHRISTIAN, K. et al. Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma. **Biomedical Optics Express**. p.1-14. 2014.

GUZE, K. et al. Comparison of molecular images as defined by Raman spectra between normal. *Journal of Raman Spectroscopy*, v.42, p.1232-1239. 2011.

KRISHNA, C.M. et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. **Applied Spectroscopy**, v.58, n.9, p.1128-1132. 2004.

MALINI, O. et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. **Biopolymers**, v.81, n.3, p. 179-93. 2006.

SINGH, S.P. et al. *In vivo* Raman spectroscopic identification of premalignant lesions in oral buccal mucosa. **Journal of Biomedical Optics**, v.17, n. 10, p.1-9. 2012.