

ANA LUCIA NORONHA FRANCISCO

ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE  
LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE ORAL: ESTUDO PROSPECTIVO

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Estomatopatologia, área de  
concentração em Patologia

Orientador: Dr. Luiz Paulo Kowalski

Piracicaba, S.P.

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

F847e Francisco, Ana Lucia Noronha.  
Espectroscopia de fluorescência para detecção de lesões potencialmente malignas e carcinoma epidermóide da cavidade oral: estudo prospectivo / Ana Lucia Noronha Francisco. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Neoplasias. 2. Diagnóstico precoce. I. Kowalski, Luiz Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Fluorescence spectroscopy for detection of premalignant lesions and squamous cell carcinoma of the oral cavity: prospective study

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Neoplasms. 2. Early diagnosis

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Luiz Paulo Kowalski, Cristina Kurachi, Márcio Ajudarte Lopes

Data da Defesa: 25-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2011, considerou a candidata ANA LUCIA NORONHA FRANCISCO aprovada.

---

Prof. Dr. LUIZ PAULO KOWALSKI

---

Profa. Dra. CRISTINA KURACHI

---

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES



## DEDICATÓRIA

À minha família,  
pela compreensão dos momentos ausentes  
e pelo apoio em todas as horas.



## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e pela contribuição que deram à minha vida.

Ao Dr. Luiz Paulo Kowalski, meu orientador, pela paciência, pelo conhecimento transmitido, pela confiança depositada, pelo incentivo e por me abrir as portas para concretização desta pesquisa.

A Dra. Cristina Kurachi, professora no IFSC-USP, que devo muito mais que milhões de “obrigado”, agradeço a paciência, a didática, o apoio, as orientações e a amizade. Para mim, um exemplo de educadora a ser seguido.

Ao Dr. Clóvis A. Lopes Pinto, médico titular do Hospital A C Camargo, pela notável colaboração, incentivo e orientações na execução deste trabalho.

Aos professores Lauro N. Rosa e Laura Hildebrand da Odontologia da UFRGS pelo estímulo e por terem despertado em mim o interesse pela área em que me encontro.

Aos médicos, titulares e residentes, do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo pela paciência, apoio e bons momentos proporcionados, os quais foram fundamentais para realização deste trabalho.

Aos professores Luciane H. Azevedo, Vivian C. Galletta e Dante Migliare, da Odontologia da USP, pela disposição e participação na coleta dos casos.

À Rita de Cássia Rodrigues pelos bons momentos proporcionados por resolver todos os problemas e correrias. Obrigada pela colaboração, apoio e amizade.

Aos funcionários do Hospital A.C. Camargo do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, da Estomatologia, do Setor de

Internação, do Centro Cirúrgico Ambulatorial e do Centro Cirúrgico e as instrumentadoras do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia por sempre estarem à disposição e me ajudarem em todos os momentos.

A enfermeira Julia M. Toyota pela amizade, apoio e companhia nos momentos de captação de pacientes.

Aos pacientes e voluntários que aceitaram participar da pesquisa, muito obrigada pela compreensão e participação.

Ao Hospital A.C. Camargo e ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia da USP (LELO) por permitirem que eu realizasse a coleta da pesquisa.

Aos professores da FOP / UNICAMP do departamento de Estomatopatologia pelo acolhimento e ensinamentos.

Aos meus colegas de curso Rose, Sibebe, Kátia, Tânia, Juliana, Wilfredo, Marco Aurélio e Rogério, pela amizade e momentos compartilhados durante o mestrado.

Aos meus amigos, obrigada pelo apoio, compreensão e amizade. Em especial a Luisa Torres, minha amiga desde a UFRGS, residente em Piracicaba, por ser um ótimo ombro e estar presente nos melhores e piores momentos.

Ao Wagner R. Correr pela paciência em me ensinar estatística, por processar matematicamente os espectros e pela disposição.

À FAPESP, à CAPES e ao CePOF/CEPID pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo e auxílio à pesquisa, sem estes não seria possível desenvolver esta pesquisa.



À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, como para meu crescimento pessoal e profissional. Minha sincera admiração aos meus familiares, amigos e mestres.



## EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma  
nova idéia jamais voltará ao seu  
tamanho original.”

Albert Einstein



## RESUMO

O câncer da boca é um problema de saúde pública, com grande incidência na população brasileira. O paciente afetado geralmente apresenta-se para o tratamento com a doença em estádios avançados, com conseqüente diminuição das taxas de sobrevivência. Diante disso, torna-se imprescindível a detecção do câncer de boca em estádios precoces. A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta diagnóstica não invasiva que pode auxiliar na detecção do câncer em tempo real, com o potencial de fornecer sensibilidade e especificidade semelhantes ao diagnóstico clínico de profissionais experientes. É uma técnica relativamente simples, rápida e acurada que consiste em avaliar a composição bioquímica e a estrutura do tecido pelo espectro de fluorescência emitido por ele, após aplicação de uma fonte de luz. Quando há progressão de um estado normal para um estado alterado, isso é refletido nas características espectrais da fluorescência dos tecidos, podendo ser correlacionada com o exame histopatológico destes tecidos. O objetivo do presente estudo consistiu em discriminar, na mucosa bucal, tecido sadio de neoplásico, por meio de espectroscopia de fluorescência. As avaliações ocorreram nos pacientes do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A. C. Camargo e do Laboratório Especial de Laser em Odontologia da USP, São Paulo, Brasil. O estudo obteve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições participantes. A amostra consistiu de 150 indivíduos nos quais se realizou a espectroscopia de fluorescência dos quais 55 pacientes eram portadores de carcinoma oral, 30 voluntários com mucosa oral clinicamente normal, 35 pacientes sem lesão oral, com história prévia de neoplasia, que foram submetidos à cirurgia ou à cirurgia e radioterapia, e 30 pacientes com lesão clinicamente detectável e potencialmente maligna. 81 casos (54%) do sexo masculino e a média de idade foi de 62,7 anos. Em relação aos fatores de risco, 76 (50,6%) eram fumantes e 31(20,7%) etilistas. Foram realizadas biópsias e os resultados destas duas metodologias foram comparados, usando o diagnóstico

histopatológico como padrão ouro, para identificar características espectrais de cada tipo de lesão. Os espectros foram classificados e comparados com a histopatologia para determinação da eficiência na discriminação diagnóstica empregando-se a fluorescência. A análise consistiu de diversos tipos de processamentos matemáticos dos espectros, sendo as acurácias Bayes 0.513 e 0.618 e J48 0.829 e 0.887 nos comprimentos 532 e 406nm, respectivamente. Observou-se a variabilidade entre as doenças, entre os sítios anatômicos, entre os indivíduos e entre regiões da mesma lesão. Os valores de especificidade e sensibilidade da técnica variam em função do tipo de análise empregada, como na excitação em 406 nm o algoritmo J48+CFS mostrou valores de sensibilidade igual a 88,5% e de especificidade igual a 93,8%, podendo em alguns casos, pode-se constatar o seu potencial de uso como instrumento auxiliar do diagnóstico do câncer de boca.

**Palavras-chave:** carcinoma epidermóide, espectroscopia de fluorescência, diagnóstico precoce, neoplasia, cavidade oral.

## ABSTRACT

Oral cancer is a public health problem with high incidence in the Brazilian population. The affected patient usually presents for clinical investigation, with advanced stage disease, the consequence of this delay is a reduction in survival rates. Given this, it's essential to detect oral cancer in early stages. Fluorescence spectroscopy is a non-invasive diagnostic tool that can aid in cancer detection in real time, with the potential to provide similar sensitivity and specificity for clinical diagnosis of experienced professionals. This technique is relatively simple, fast and accurate which evaluates the biochemical composition and structure of the tissue fluorescence spectrum emitted by it, after application of a light source. When there is a progression from normal state to an altered state, this is reflected in the spectral characteristics of fluorescence of tissues, which may be correlated with the histopathological examination of tissues. The aim of this study was to discriminate, in the oral mucosa, healthy tissue and tumor, through fluorescence spectroscopy. Assessments occurred in patients of the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, Hospital A. C. Camargo and the Special Laboratory of Laser in Dentistry, USP, São Paulo, Brazil. The study was approved by the Ethics Research Committee of the participant institutions. The sample consisted of 150 individuals who were submitted to fluorescence spectroscopy, of whom 55 patients had oral carcinoma, 30 volunteers with normal oral mucosa, 35 patients without oral lesions, but with a previous history of malignancy, who underwent surgery or surgery and radiotherapy, and 30 patients with a clinically detectable potentially malignant lesions. 81 cases (54%) were male and the mean age was of 62.7 years. Regarding risk factors, 76 (50.6%) were smokers and 31 (20.7%) consumed alcohol. Biopsies were performed and the results of these two methods were compared using the histopathologic diagnosis as the gold standard for comparison to the spectral characteristics of each type of lesion. The spectra were classified and compared to histopathology for determining the efficiency in

diagnostic discrimination employing fluorescence. The analysis consisted of various types of mathematical processing of spectra, and the accuracies Bayes 0,513 and 0,618 and J48 0,829 and 0,887 in lengths of 532 and 406nm, respectively. It can be observed variability among diseases, among the anatomical sites among individuals and among regions of the same injury. The specificity and sensitivity of the technique varies depending on the type of analysis employed as the excitation at 406 nm the algorithm J48 + CFS showed sensitivity of 88,5% and specificity of 93,8% and may in some cases, one can see its potential use as an aid to diagnosis of oral cancer.

**Keywords:** squamous cell carcinoma, fluorescence spectroscopy, early diagnosis, cancer, oral cavity.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3 PROPOSIÇÃO.....	17
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	19
4.1 Amostra.....	19
4.2 Instrumentos.....	19
4.2.1 Descrição do Sistema.....	19
4.3 Anamnese e exame clínico.....	23
4.4 Espectroscopia de fluorescência.....	24
4.5 Biópsia.....	26
4.6 Citologia esfoliativa.....	28
4.7 Análise dos espectros de fluorescência.....	28
5 RESULTADOS.....	33
5.1 Análise clínica e histopatológica.....	34
5.2 Análise qualitativa dos espectros coletados.....	39
5.2.1 Análise dos espectros em voluntários de mucosa normal.....	42

5.2.2	Análise dos espectros comparando pacientes com lesões potencialmente malignas com mucosa contralateral normal.....	44
5.2.3	Análise dos espectros comparando pacientes com lesões de carcinoma epidermóide com mucosa contralateral normal.....	55
5.2.4	Análise dos espectros comparando mucosa normal de pacientes com lesões malignas, pacientes com lesões potencialmente malignas e com voluntários de mucosa normal.....	63
5.2.5	Análise comparando mucosa de voluntários saudáveis com lesões potencialmente malignas com lesões malignas.....	67
5.3	Análise do Principal Component Analysis (PCA).....	71
5.4	Índices espectrais.....	77
5.5	Classificadores computacionais.....	78
5.6	Análise cruzada.....	82
6	DISCUSSÃO.....	85
7	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS.....	97
	ANEXOS.....	103

## 1 INTRODUÇÃO

Anualmente, são diagnosticados cerca de 10 milhões de tumores malignos no mundo, sendo o câncer de boca e faringe responsável por 6% dos casos. No Brasil, a boca representa a quinta localização de maior incidência de câncer em homens, com estimativa, para 2010, de 10.060 novos casos e a sétima localização de maior incidência em mulheres, com 3.410 novos casos. Entre os principais fatores de risco relacionados ao câncer de boca, citam-se o consumo de tabaco e o de bebidas alcoólicas que, se associados, aumentam consideravelmente esse risco (INCA, 2010).

Na maioria das vezes, o paciente apresenta-se para o tratamento tardiamente, com a doença em estágio avançado, com conseqüente diminuição da taxa de sobrevida. Entre 1999-2003, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010), mais de 60 % das neoplasias malignas da boca diagnosticadas no Brasil estavam em estádios avançados (estádios III e IV). O tratamento destes pacientes pode ser ainda desfigurante e debilitante (Gillenwater *et al.*, 1998). Apesar dos avanços nas técnicas reconstrutivas para tratamento do carcinoma epidermóide, tem havido um pequeno aumento da taxa de sobrevida destes pacientes, sendo que os mesmos necessitam também de seguimento contínuo para detecção de segundos tumores primários (Heintzelman *et al.*, 2000).

Torna-se importante, neste contexto, a realização do diagnóstico precoce do câncer de boca, com o intuito de melhorar a qualidade de vida e a taxa de sobrevida desses pacientes. Na prática clínica, o diagnóstico precoce, convencionalmente realizado, requer a realização de acurado exame clínico e biópsia para avaliação histopatológica do local suspeito para determinar seu potencial maligno (Gillenwater *et al.*, 1998). Porém, vários fatores contribuem para dificuldade de emprego efetivo de mais ferramentas para detecção precoce do câncer de boca, como profissionais inexperientes que não reconhecem alterações

indicativas de displasia e neoplasia (Heintzelman *et al.*, 2000), distinção entre alterações inflamatórias, que são muito mais prevalentes, de alterações pré-neoplásicas (Cruz *et al.*, 2005; INCA, 2010; Lane *et al.*, 2006). Além disso, nos pacientes de alto risco, toda mucosa bucal apresenta alterações (Müller *et al.*, 2003), sendo difícil reconhecer quando e onde a biópsia deverá ser realizada (Heintzelman *et al.*, 2000). Acrescenta-se também que a abordagem do carcinoma epidermóide de boca é complexa, pois, muitas vezes, enfrenta-se a falta de recursos dos profissionais da área de saúde, além de envolver o medo e o preconceito dos pacientes. Estas intercorrências são extremamente prejudiciais, atrasando ainda mais o diagnóstico e o tratamento, piorando o prognóstico (Brenner *et al.*, 2007).

Atualmente, há um grande interesse em técnicas que utilizam fluorescência para avaliação de lesões de forma não-invasiva e não-destrutiva. Com base nas propriedades ópticas e na sensibilidade dessas técnicas em captar a fluorescência emitida por fluoróforos endógenos e diferenciar as variações teciduais. A espectroscopia de fluorescência tem se mostrado uma importante ferramenta na detecção de lesões potencialmente malignas e malignas na mucosa oral (Georgakoudi *et al.*, 2002; Kurachi *et al.*, 2004).

A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta diagnóstica não-invasiva, acurada e rápida que pode ser utilizada para detecção precoce e diagnóstico de câncer em tempo real. A composição bioquímica e a arquitetura do tecido podem ser avaliadas pelo espectro de fluorescência emitido por ele, que vai ser modificado na presença de alterações teciduais, podendo ser comparada com a histopatologia destes tecidos. Algoritmos matemáticos podem ser então desenvolvidos e otimizados para classificar tecidos em sua respectiva categoria histológica, baseados nas suas características espectrais (Ramanujam *et al.*, 1996; Ingrams *et al.*, 1997; Ramanujam, 2000; Chu *et al.*, 2006).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Diferentes tumores podem afetar a cavidade oral, sendo o carcinoma epidermóide o tipo histológico observado em mais de 90% dos casos (Silverman, 1988; Gorsky, 1990; Robbins, 1996).

A característica multifatorial da etiologia do câncer envolve fatores endógenos, como predisposição genética e imunológica, e fatores exógenos ambientais e comportamentais. O sexo masculino e o grupo etário acima de 45 anos de idade são os mais acometidos (Reichart, 2001).

Estudos epidemiológicos evidenciam hábitos como tabagismo e etilismo associados à etiologia do câncer de boca. Segundo Hamada *et al.* (1991) o uso disseminado de álcool e tabaco nas últimas décadas contribuiu para a elevada incidência da doença no Brasil. Todas as formas de consumir o tabaco representam risco para o câncer bucal; o fumo, porém, é a forma mais consumida (Johnson, 2001; Döbróssy, 2005). O risco do tabagismo para o câncer de boca é cumulativo em relação à duração e a intensidade do hábito, segundo Winn (2001). Estudos coorte apontaram de duas a cinco vezes mais risco de câncer de cavidade oral e orofaringe para indivíduos que consomem bebidas alcoólicas em excesso do que para os indivíduos que consomem álcool eventualmente (UICC, 2010).

Alguns carcinomas de células escamosas da cavidade oral se desenvolvem a partir de lesões potencialmente malignas e causam notáveis alterações clínicas e histológicas na mucosa oral (Silverman, 1984; Silverman, 1968). Embora as lesões orais sejam comuns, prever quais lesões irão sofrer transformação para carcinoma invasivo e quais permanecerão estáveis e ter um curso clínico indolente é um desafio. O exame padrão ouro para o diagnóstico de lesões é a análise histológica, e as decisões de tratamento são baseadas em diagnóstico

microscópico e não na apresentação clínica. A maioria das lesões potencialmente malignas apresenta-se clinicamente como leucoplasia ou eritroplasia, mas histologicamente, elas podem ter uma ampla variedade de fenótipos, tais como hiperqueratose, displasia ou carcinoma (Deepak, K, 2007).

A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais freqüente da mucosa oral. A OMS definiu-a como uma mancha ou placa de coloração branca da mucosa oral, não removível por raspagem e que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como outra doença. Seu processo de diagnóstico é um tanto complexo devido à diversidade de seu aspecto clínico e pela ausência de sintomatologia. Os sítios mais comumente atingidos são língua, mucosa jugal e assoalho bucal. A probabilidade de transformação maligna varia de acordo com tipo e localização da lesão, tipo e freqüência dos fatores de risco a que o paciente está exposto e presença histológica de hiperqueratose ou o grau de displasia (Silverman S Jr *et al.*, 1984; van der Waal I *et al.*, 1997; Kowalski LP *et al.*, 2008).

Eritroplasia e eritroleucoplasia são lesões orais que apresentam maior potencial de transformação maligna. A eritroplasia oral é o termo usado para descrever uma placa ou lesão macular vermelha na boca, não removível à raspagem no qual um diagnóstico clínico específico não pode ser estabelecido (OMS, 2010). Lesões são chamadas de eritroleucoplasia quando as áreas vermelhas e brancas são associadas ou manchas brancas estão presentes sobre a placa vermelha (Hosni ES, 2009). É uma lesão rara de etiologia desconhecida que apresenta, em cerca de 90% das lesões, associação de displasia moderada a intensa, ou carcinoma *in situ*, ou carcinoma invasor (Kowalski LP, 2008).

O carcinoma epidermóide pode se apresentar de forma endofítica ou exofítica que clinicamente pode ter o aspecto leucoplásico, eritroplásico, eritroleucoplásico, ulcerado ou ambos. A lesão ulcerada é a mais freqüente, normalmente assintomática, não cicatriza nem regride, de longa duração, apresenta bordas elevadas, firmes, endurecidas e irregular e o centro pode ser

necrótico, irregular, granular ou verrucoso (Pindborg, 1981; Silverman, 1988; Sonis, 1995; Kowalski LP, 2008).

Histologicamente, a progressão neoplásica pode ser avaliada a partir da acantose, aumento da razão núcleo/citoplasma, hipercromatismo nuclear, perda da polaridade celular, pleomorfismo celular, displasia epitelial, angiogênese, invasão epitelial no tecido conjuntivo subjacente, mitoses atípicas e pérolas de ceratina. Caracteriza-se pelas ilhas e cordões invasivos de células epiteliais escamosas, bem diferenciadas ou não, que invadem irregularmente os tecidos subjacentes, crescendo como entidades independentes. Essa invasão, chamada disseminação metastática, pode ocorrer em vasos sanguíneos e/ou linfáticos e ser transportada para outras regiões do mesmo órgão, mesma região anatômica ou até mesmo para órgãos distantes (Sonis, 1995; Sauk, 2000; Neville, 2009).

O diagnóstico precoce é um dos fatores mais importantes para o prognóstico dos pacientes. O controle do carcinoma oral avançado é extremamente difícil, já as lesões iniciais são mais facilmente controladas, removidas e, conseqüentemente, menor a mutilação do paciente e melhor prognóstico (Pindborg, 1981; Neville, 2002).

A detecção e o diagnóstico da lesão inicial assintomática é um dos principais desafios do cirurgião-dentista na clínica diária (Kurachi, 2004). As lesões iniciais aparecem como uma alteração superficial em textura e cor, geralmente indolores; como áreas branco-avermelhadas, avermelhadas ou pequenas úlceras que são confundidas com lesões inflamatórias. (Sonis, ST, 1995; Robbins SL *et al.*, 2008).

Os carcinomas bucais são estadiados pelo sistema TNM que quantifica os tumores em relação ao tamanho do tumor primário, envolvimento de linfonodos regionais e envolvimento de metástases distantes. Esse sistema padronizado auxilia no estabelecimento do prognóstico, planejamento do tratamento, avaliação

do resultado do tratamento e facilita troca de informações entre centros de tratamento (Pindborg, 1981; Jameson MJ *et al.*, 2006; Neville, 2009).

O tratamento mais empregado para os carcinomas epidermóides da cavidade oral é a ressecção cirúrgica, sendo ou não acompanhada de radio e/ou quimioterapia. Independente da terapia escolhida, o tratamento é simplificado e a sobrevida aumenta quando as lesões encontram-se em estádios iniciais (Pindborg, 1981; INCA, 2010; IARC, 2010). Frente a isto, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para um diagnóstico precoce de câncer boca torna-se de grande importância.

O diagnóstico de tumores da cavidade oral é realizado por meio da avaliação clínica e confirmação histopatológica, após biópsia da área suspeita. A histopatologia é o método diagnóstico considerado padrão ouro, porém a classificação da patologia depende da experiência do clínico em coletar um material representativo da lesão, ou seja, região mais característica e material suficiente e do patologista em reconhecer características celulares e teciduais presentes na área analisada (Silverman, 1988; Roger *et al.*, 2001; Kurachi, 2005).

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais objetivas é uma tendência atual e é de grande relevância na tentativa de minimizar o grau de subjetividade e diminuir o tempo de espera do resultado da técnica convencional. Assim, a biópsia óptica vem sendo apresentada como uma técnica para a detecção de lesões, e, portanto, auxiliar no diagnóstico (Ebihara *et al.*, 2003; Kurachi C, 2004; Xin-Hua Hu, 2005).

A detecção óptica se baseia nas alterações bioquímicas e estruturais, celulares e teciduais modificando a interação da luz com o tecido. Os tecidos biológicos são compostos por diversas biomoléculas e estruturas que interagem com os fótons (cromóforos); dependendo do tipo de interação observada elas podem ser denominadas como absorvedores, espalhadores e fluoróforos. As



propriedades ópticas de cada cromóforo dependerão do comprimento de excitação e do tipo de tecido (Pavlova *et al.*, 2008).

Para a realização da técnica, não há necessidade de introdução de corantes exógenos, nem procedimentos invasivos, nem experiência prévia de diagnóstico clínico (Gillenwater *et al.*, 1998; Heintzelman *et al.*, 2000). Além disso, a fluorescência também permite melhorar a detecção de lesões clinicamente ocultas. Pode auxiliar os profissionais a direcionarem a melhor localização da biópsia e a determinar as margens de ressecção do tumor (Heintzelman *et al.*, 2000; Ramanujam, 2000; Müller, 2003). Ainda, aumenta o potencial do tratamento curativo, além de reduzir complicações e custos do tratamento. Pode também monitorar a resposta dos tecidos às várias intervenções terapêuticas (Ramanujam, 2000). É uma técnica objetiva que suplementa o diagnóstico clínico (Müller *et al.*, 2003).

O aparelho utilizado requer uma fonte de luz, filtros de emissão e excitação, uma sonda de investigação e fotodetector. A fonte de excitação é uma luz monocromática ou de banda estreita de emissão, conduzida ao tecido por um condutor flexível que também coleta a luz emitida pelo meio biológico. Um dispersor separa a luz emitida em seus respectivos comprimentos de onda; e um detector mede a intensidade para cada comprimento de onda de emissão (Ramanujam, 2000; Lane *et al.*, 2006). A fluorescência pode ser detectada e visualizada diretamente ou gravada e visualizada indiretamente (Lane *et al.*, 2006).

A espectroscopia de fluorescência ocorre devido à presença de fluoróforos endógenos intracelulares, como às proteínas colágeno e elastina, que são componentes estruturais do tecido. Citam-se também como fluoróforos, a nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida (NADH), triptofano, tirosina, fenilalanina e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A fluorescência associada ao colágeno, elastina e proteínas, em geral, é devido à presença de

aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina) que refletem a estrutura celular e tecidual (Ganesan *et al.*, 1998; Chu *et al.*, 2006). Em contraste, os derivados da piroxina, NADH e FAD, variam com o estado metabólico dos tecidos (Lane *et al.*, 2006) e seus níveis se alteram na presença de condições patológicas. A fluorescência destas moléculas é refletida pelas suas concentrações e distribuição, assim como as propriedades físicoquímicas do meio em que se encontram. Considerando que a alteração protéica e da conformação celular devem ser a razão da transformação maligna, essa ferramenta é bastante útil para diferenciar neoplasia de tecido normal (Ganesan *et al.*, 1998).

De modo geral, a absorção e dispersão tecidual modificam a intensidade e distribuição espectral da fluorescência detectada. Alterações bioquímicas do colágeno ocorrem devido à quebra de matriz extracelular pelas células displásicas. As alterações que acompanham a progressão displásica também afetam as propriedades de absorção e dispersão dos tecidos, as quais, por sua vez, modificam a fluorescência. Além disso, a microvascularização aumentada que acompanha a carcinogênese leva à absorção aumentada devido a maior concentração de hemoglobina, principal biomolécula absorvedora na região do visível. Portanto, a perda de fluorescência associada às alterações associadas à progressão maligna é decorrente principalmente da quebra da matriz de colágeno e à absorção de luz aumentada da hemoglobina. Secundariamente, citam-se a dispersão aumentada no epitélio, espessura epitelial e diminuição da concentração de FAD (Müller *et al.*, 2003; Lane *et al.*, 2006; Poh *et al.*, 2006).

Müller *et al.* (2003), avaliaram 53 localizações *in vivo* de 15 pacientes portadores de neoplasia do trato aerodigestivo, e 38 localizações de 8 voluntários sem lesão clínica, associando três técnicas espectroscópicas (espectroscopia de fluorescência intrínseca, espectroscopia de reflectância difusa e espectroscopia de dispersão de luz). Utilizando as informações obtidas pelas três técnicas (espectroscopia trimodal), os autores obtiveram 96% de sensibilidade e 96% de especificidade na distinção entre neoplásico/displásico (leve, moderado e severo)

do tecido normal. Já na distinção entre tecido displásico e neoplásico, obtiveram uma sensibilidade de 64% e uma especificidade de 90%.

Poh *et al.* (2006) realizaram 122 biópsias utilizando *punch* em 20 pacientes portadores de neoplasia oral. Em cada neoplasia foi realizada uma biópsia e nas margens da lesão foram realizadas no mínimo quatro biópsias, totalizando 102. De 10 neoplasias apresentando perda de fluorescência em uma ou várias direções de sua margem com extensão maior que 10 mm, 6 apresentaram alto grau de displasia, em mucosa clinicamente normal. Ao avaliarem essa região por biologia molecular, os autores verificaram que havia uma correlação entre a diminuição de fluorescência nas margens da neoplasia e a alteração molecular (perda de heterozigosidade). De acordo com os autores, a remoção arbitrária de tecido adjacente à neoplasia como margem de segurança de 1 cm realizada pelos cirurgiões ainda é falha devido ao alto risco de cancerização de campo em muitos pacientes, resultando em alta taxa de recorrência da lesão. Os autores verificaram alterações subclínicas em 19 das 20 margens dos espécimes avaliados e que a extensão dessas alterações varia consideravelmente, entre 4 a 25 mm, freqüentemente se estendendo em, no mínimo uma direção, em mais de 10 mm.

De acordo com Veld *et al.* (2003), a distinção entre tecido saudável e alterado em um mesmo paciente nem sempre é bem definido, já que alterações espectroscópicas também ocorrem nas adjacências do tecido alterado, onde há anormalidades subclínicas. Isso seria resolvido se a classificação algorítmica se tornasse menos dependente da própria mucosa aparentemente "saudável" do paciente, mas sim a partir de um banco de dados de mucosa saudável de um grande grupo de voluntários. Para Muller *et al.* (2003), o que dificulta é a variedade tecidual da mucosa oral, ora queratinizada, ora não, diferindo em cada região avaliada.

Ganesan *et al.* (1998) avaliaram *in vitro*, células epiteliais neoplásicas (linhagem 1483) e células normais obtidas de tonsilectomia. Os autores

verificaram que as diferenças observadas entre tecido normal e patológico no espectro de excitação de 340 nm foram devido a alterações da absorção óptica dos resíduos de aminoácidos nas proteínas celulares contendo triptofano, tirosina, fenilalanina, entre outros. Os autores recomendaram a utilização do comprimento de onda de 340 nm para diferenciação entre tecido normal e neoplásico. Segundo Ramanujam (2000), as diferenças entre células normais e neoplásicas observadas no espectro de excitação de 340 nm, são atribuídas ao triptofano e à tirosina.

De acordo com Chu *et al.* (2006), o espectro de fluorescência do colágeno, NADH e FAD, avaliados em amostras congeladas de tecidos colorretais, é de 395 nm, 455 nm e 545 nm, respectivamente.

Segundo Schwarz *et al.* (2009) o processo de carcinogênese na cavidade oral, alterações bioquímicas e estruturais no tecido epitelial e no estroma podem alterar as propriedades ópticas dos tecidos displásicos e cancerosos. Aumento do tamanho nuclear, da razão citoplasma/núcleo, da microvascularização e o aumento da degradação de colágeno do estroma, e as alterações na concentração de fluoróforos mitocondrial, tais como a NADH e FAD, levam a mudanças na dispersão óptica, absorção e características internas de autofluorescência do tecido.

Em relação à emissão da fluorescência no espectro vermelho, que está sendo atribuído às porfirinas (pico de emissão próximo a 630 nm), existem controvérsias sobre os reais emissores, se endógenos ou exógenos. Harris e Werkhaven (1987) observaram autofluorescência restrita às áreas necróticas ulceradas em neoplasias induzidas em hamsters, explicado pelos autores pela presença de porfirinas bacterianas localizadas nos tecidos necróticos e ulcerados. Porém, nesse espectro, a língua e tecido adjacente normal avaliado em voluntários, foram os locais que mais apresentaram resultados falso-positivos. Para os autores, deve-se realizar profilaxia da cavidade oral antes da realização

dos testes, para eliminação das bactérias que podem apresentar autofluorescência devido síntese bacteriana de hematoporfirina.

De acordo com Inaguma e Hasimoto (1999), de 78 carcinomas orais expostos ao comprimento de onda de 410 nm, 85% destes exibiram autofluorescência no espectro vermelho, apresentando um espectro bimodal, sendo este semelhante ao espectro de emissão das porfirinas, enquanto áreas normais não apresentaram essa característica. Essa autofluorescência estava presente tanto na área necrótica quanto nos tecidos viáveis da neoplasia, sendo que nas áreas necróticas e ulceradas, a fluorescência era maior. De 43 lesões benignas avaliadas pelos autores (incluindo 15 leucoplasias), 40 delas (93%) não apresentaram o espectro bimodal. Os autores extraíram protoporfirina de três espécimes de biópsia de carcinoma e os três extratos apresentaram autofluorescência no comprimento de onda de 630 nm. Ao separarem estes extratos pela eletroforese, verificaram que os compostos fluorescentes continham concentrações diversas de porfirina, apresentando diferenças quali e quantitativas. Para estes autores, a fluorescência dos carcinomas no espectro vermelho, é atribuída às porfirinas, e não à contaminação microbiana.

Lane *et al.* (2006) observaram que a fluorescência visualizada diretamente na mucosa neoplásica após aplicação da luz azul apresenta-se verde pálida. Utilizando-se a histopatologia como padrão-ouro, em 50 locais avaliados, essa técnica forneceu 85% de sensibilidade e 100% de especificidade para discriminar áreas normais de pré-neoplásicas e neoplásicas.

Na avaliação de espécimes de biópsias, Fryen *et al.*, 1997, observaram que a autofluorescência torna-se heterogênea nas áreas neoplásicas com pleomorfismo celular. O rompimento da membrana basal e o núcleo mais escuro e maior das células neoplásicas causam uma diminuição da fluorescência. Fibras elásticas, vistas nos tecidos conjuntivos saudáveis adjacentes se tornam mais compactas nas bordas da lesão e as pérolas de queratina emitem significante

autofluorescência. Os diferentes graus de queratinização de acordo com a diferenciação das lesões causam visualização mais distinta da alteração, ao contrário do epitélio normal. Mesmo pequenas lesões pré-neoplásicas como displasia e carcinoma *in situ* mostram diferentes graus de autofluorescência. Porém, a fluorescência interindividual é heterogênea. Observações *in vivo* e *in vitro* revelaram que autofluorescência está aumentada nas bordas da neoplasia, na displasia ou carcinoma *in situ* com queratinização, e está diminuída em lesões basalóides indiferenciadas e especialmente nas infiltradas profundamente.

Ao avaliarem, por espectroscopia de fluorescência, nove estruturas anatômicas da boca de oito voluntários saudáveis e de 15 pacientes com suspeita de neoplasia, Gillenwater *et al.* (1998) observaram variações entre os indivíduos com mucosa normal, e estas foram maiores em relação ao lado contralateral do mesmo indivíduo e entre diferentes estruturas anatômicas. Para cada paciente com suspeita de neoplasia, o pico da intensidade de fluorescência foi comparado ao local contralateral normal, com a intensidade de fluorescência dos locais suspeitos apresentando-se menor, em relação à estrutura clinicamente normal. De acordo com os autores, 337 nm e 410 nm foram os comprimentos de onda que forneceram melhor discriminação entre normal e anormal (atipia, displasia ou câncer).

Heintzelman *et al.* (2000) verificaram que os comprimentos de onda de excitação de 350 nm, 380 e 400 nm podem ser indicados para detecção de neoplasia oral. Ao utilizarem os comprimentos de onda de excitação de 350 nm e 400 nm, em cavidade oral, obtiveram uma emissão de fluorescência em 472 nm, com 90% de sensibilidade e 88% de especificidade, após avaliarem 20 indivíduos (nove voluntários normais e 11 pacientes com suspeita de neoplasia), em testes de treinamento. Nos testes de validação do experimento, os autores obtiveram 100% de sensibilidade e 98% de especificidade, utilizando os mesmos parâmetros de comprimento de onda, ao avaliarem 53 voluntários sadios e três pacientes com suspeita de neoplasia. De acordo com os autores, a mucosa oral normal

demonstrou maior intensidade de emissão de autofluorescência (450 nm) no comprimento de onda de excitação de 380 nm em relação à mucosa neoplásica.

Veld *et al.* (2003) avaliaram, por espectroscopia de fluorescência, 97 voluntários com mucosa oral clinicamente normal utilizando sete diferentes comprimentos de onda de excitação. Os autores avaliaram 13 localizações anatômicas da boca (mucosa jugal; borda lateral, dorso e ventre de língua; transição entre língua e assoalho da boca; assoalho da boca; gengiva livre; gengiva inserida; mucosa labial inferior, borda da semimucosa labial, palato duro e mole). A intensidade de autofluorescência foi máxima entre 500 e 510 nm. As menores intensidades de fluorescência foram observadas na borda da semimucosa labial e na borda lateral da língua; e as maiores, no palato e mucosa jugal. Os autores verificaram que existem poucas diferenças espectroscópicas entre as diferentes localizações anatômicas. Apenas a borda da semimucosa labial e o dorso da língua apresentaram-se estatisticamente diferentes das demais regiões, sendo estas regiões mais facilmente classificadas. Porém, a intensidade total de fluorescência não pode ser usada como referência, para se comparar com um banco de dados, já que existem diferentes intensidades de autofluorescência nos diferentes sítios anatômicos, além da variabilidade entre pacientes.

Palmer *et al.* (2002) realizaram biópsias em 11 pacientes com suspeita de neoplasia. Os espécimes foram colhidos da lesão e do lado contralateral normal, e depois congelados, para serem avaliados espectroscopicamente. Os autores observaram que as maiores diferenças entre tecido normal e displásico foram encontradas no comprimento de onda de excitação de 410 nm. Amostras displásicas e malignas tiveram fluorescência aumentada acima de 600 nm, quando comparadas com amostras normais, com picos de emissão de 635 e 690 nm, indicando que lesões displásicas exibem uma característica fluorescente que não está presente na mucosa normal. O método utilizado pelos autores apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia de fluorescência para

diferenciar tecido histologicamente normal de displásico e neoplásico de 90%, 91% e 91%, respectivamente.

A realização de estudos *ex vivo* (imediatamente após realização de biópsia) revelou que o espectro de emissão de fluorescência é preservado, exceto entre 500 nm e 700 nm. Nesse intervalo, a emissão de fluorescência é dramaticamente diminuída. Isso pode ser explicado pelas medidas de reflectância difusa, que sugerem uma diminuição da oxigenação da hemoglobina nos tecidos *ex vivo*, e um aumento da absorção da hemoglobina nas amostras congeladas e descongeladas. Ocorre uma lise celular, o que poderia aumentar a quantidade de sangue presente nas camadas superficiais do tecido, aumentando os efeitos de absorção pela hemoglobina. Além disso, a lise celular também pode causar alteração nas propriedades de espalhamento da luz, o que poderia levar a diminuição da intensidade da reflectância difusa. Isso acarretaria diminuição da intensidade da fluorescência espectral dos tecidos congelados e descongelados. Após um tempo de 90 minutos, as alterações espectroscópicas causadas pela degradação dos tecidos após biópsia foram significativamente menores (10 a 30% de variação na intensidade) que aquelas associadas com os processos de congelamento e descongelamento, com 50 a 70% de diminuição da intensidade (Palmer *et al.*, 2002).

Segundo Chu *et al.* (2006), amostras de tecido congeladas cinco minutos após realização de biópsia revelaram apenas 3% de alterações na autofluorescência, ao serem comparados com amostras frescas.

Após utilizarem três métodos de análise linear multivariada (análise do componente principal - PCA, quadrado mínimo parcial - PLS e regressão linear multivariada - MVLR), ao avaliarem biópsias congeladas de tecido colorretal, Chu *et al.* (2006) observaram que os métodos PLS e MVLR alcançaram acurácia diagnóstica preditiva melhor que o PCA. O PLS apresentou acurácia de 86% para os tecidos neoplásicos e 93% para os tecidos normais, enquanto que o MVLR



apresentou 86% e 96% e o PCA, 91% e 89%, para os tecidos neoplásicos e normais, respectivamente. Os autores relataram que as características espectrais de fluorescência dos tecidos orais são bastante similares aos tecidos do cólon, onde em tecido normal e displásico, o pico do colágeno é mais alto que o do NADH. No tecido neoplásico, o pico do colágeno é menor que o do NADH. De acordo com os autores, a intensidade do pico do colágeno decresce e do NADH aumenta com o desenvolvimento da neoplasia. Para os tecidos orais, o PLS obteve melhor resultado diagnóstico para os tecidos normais, e o MVLR para o tecido neoplásico e displásico, em relação ao PLS e PCA. Porém, o PCA forneceu a melhor acurácia diagnóstica para a lesão potencialmente maligna e carcinoma *in situ*, sendo que esta capacidade de diferenciação é importante para o diagnóstico precoce do câncer na prática clínica, já que o tecido neoplásico é mais facilmente diagnosticado ao exame clínico. Porém, o PLS é capaz de obter maior variância que o PCA, com melhor acurácia diagnóstica global.

Como o câncer bucal ainda é uma neoplasia prevalente na população brasileira, os profissionais da área da saúde têm por obrigação tentar debelar esse problema de saúde pública. Devido à acessibilidade da cavidade oral e dos fatores de risco se apresentarem bem definidos, essa área torna-se ideal para detecção precoce e prevenção de neoplasias. Porém, deve-se salientar que essas lesões muitas vezes podem passar despercebidas pelos profissionais, já que são indolores em seus estádios iniciais e menos prevalentes que lesões de natureza benigna, acarretando um diagnóstico clínico incorreto e a não realização da biópsia (Lane *et al.* 2006).

A espectroscopia de fluorescência vem a ser um método indolor e rápido, e diferentemente da biópsia, é uma ferramenta diagnóstica que terá uma maior aceitação pelo paciente, que muitas vezes se recusa a ser submetido a uma biópsia pelo medo do procedimento cirúrgico, além de se evitar o desconforto no pós-operatório. Porém, uma vez detectada alguma alteração espectroscópica, a biópsia deverá ser indicada para confirmação do diagnóstico, com a vantagem de

já se ter o local de sua realização pré-definido pela alteração da emissão da fluorescência tecidual. Por ser um método de detecção em tempo real, a espectroscopia de fluorescência poderá melhorar o prognóstico e a qualidade de vida destes pacientes, devido a detecção precoce da neoplasia. Assim, potencialmente poderão ser evitadas cirurgias mutiladoras, além do que o paciente pode ficar constantemente monitorado, com medidas espectrais periódicas, mesmo após realização de remoção de neoplasia, para detecção de novas alterações teciduais.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente estudo foi determinar a capacidade de discriminação entre mucosa bucal normal e alterada (potencialmente maligna e/ou maligna), por meio de espectroscopia de fluorescência.



## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1 Amostra**

Neste estudo prospectivo a captação dos indivíduos da amostra foi realizada no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo e no L.E.L.O.-USP (Laboratório Especial de Laser em Odontologia), São Paulo. Para não onerar nem ao paciente nem à Instituição, a pesquisa foi realizada quando das consultas rotineiras do paciente ao ambulatório. Todos os indivíduos e responsáveis que estiveram de acordo em participar voluntariamente da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 1 e 2).

### **4.2 Instrumentos**

O sistema de espectroscopia de fluorescência foi desenvolvido no Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo e foi fornecido em regime de empréstimo dentro da colaboração técnico-científica entre as instituições envolvidas no projeto.

#### **4.2.1 Descrição do Sistema**

O sistema é composto por fonte de luz para excitação, uma sonda de investigação, um espectrofotômetro e um laptop (figura 1). Dois sistemas laser de estado sólido, um de diodo emitindo em 406 nm e outro de Nd:YAG dobrado em 532 nm, foram empregados. A sonda de investigação é do tipo Y, sendo uma extremidade conectada ao laser e a outra ao espectrofotômetro (figura 2). A ponta de investigação possui uma área total com 2 mm de diâmetro. Duas fibras ópticas de 600  $\mu\text{m}$  de diâmetro cada estão posicionadas lado a lado, uma conduz a luz de excitação e a outra coleta a luz re-emitida pelo tecido (figura 3). Uma ponteira de

alumínio foi confeccionada para a proteção da sonda e manuseio clínico (figura 4). O diâmetro da área de leitura é de 1,6 mm e o diâmetro total da área que entra em contato com o tecido é de 3,2 mm. A ponteira de alumínio tem um diâmetro na extremidade de 7,75 mm, a área circular externa à sonda de investigação evita a uma iluminação ambiente do tecido alvo (figura 5). O espectrofotômetro portátil USB 2000 (Ocean Optics, EUA) realiza a leitura entre 350 e 800 nm. O filtro passa alta (*longpass filter*) é selecionado de acordo com o comprimento de onda empregado, para 406 nm utiliza-se o filtro em 435 nm (GG435, Schott, EUA) e para 532 nm, o filtro em 570 nm (OGG570, Schott, EUA) (Figura 6, A e B). O software para aquisição dos dados (OOIbase32/Ocean Optics) foi desenvolvido em ambiente LabView, de acordo com as características da investigação clínica do projeto. O laptop possibilita ao monitoramento em tempo real dos espectros coletados e o armazenamento dos dados coletados. O sistema possui três opções de potência de excitação para ambos comprimentos de onda: 4, 6 e 8 mW. Isso é relevante dada às diferenças das características ópticas dos tecidos que investigados.



Figura 1 – Sistema de espectroscopia de fluorescência.



Figura 2 – Imagem da sonda de investigação com uma extremidade conectada ao laser e a outra ao espectrofotômetro.



Figura 3 – Imagem da ponteira de investigação que possui uma área total de 2 mm de diâmetro.



Figura 4 – Ponteira de alumínio confeccionada para proteção e manuseio das fibras ópticas.



Figura 5 – Imagem da ponteira de alumínio externa à sonda de investigação protegendo-a da iluminação do ambiente.



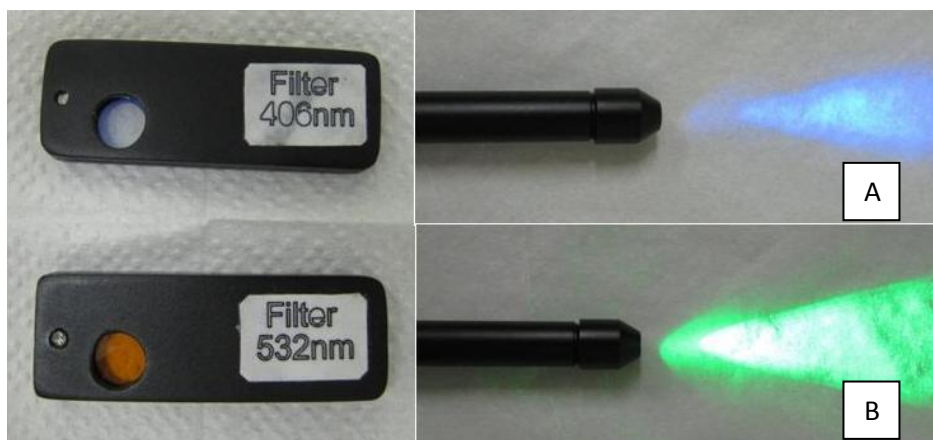


Figura 6 – Filtros para comprimento de 406 nm e 532 nm. A – Emissão da fluorescência para o comprimento 406 nm; B – Emissão da fluorescência para o comprimento 532 nm.

### 4.3 Anamnese e exame clínico

Todos os participantes foram entrevistados e os dados preenchidos em uma ficha de anamnese padronizada que contem informações referentes a hábitos associados ao risco do câncer (cigarro e álcool), antecedentes familiares, entre outros (Anexo 3). Um exame clínico minucioso foi realizado com auxílio de espátulas de madeira, sob luz branca fornecida por um refletor. Nos portadores de carcinoma ou qualquer lesão clinicamente detectável, foram anotadas as características clínicas, localização e medidas da lesão. A impressão clínica do avaliador foi obtida seguindo a classificação em mucosa normal, mucosa alterada sem suspeita de malignidade, mucosa alterada suspeita e carcinoma. As características clínicas também foram anotadas como eritroplasia, leucoplasia, ulceração, presença de necrose, dentre outras. Todas as lesões foram fotografadas com máquina digital (Canon Modelo Power Shot SX200 IS).

#### **4.4 Espectroscopia de fluorescência**

Foi realizada antissepsia bucal dos participantes com solução fisiológica para minimizar possíveis contaminantes na mucosa, como detritos de alimentos. Os indivíduos permaneciam em jejum, por no mínimo 1 hora, para se evitar que substâncias corantes ingeridas alterassem o padrão de fluorescência da mucosa avaliada.

A ponteira de alumínio sempre era revestida de filme PVC bem fino, transparente e bem esticado, não deixando dobras na extremidade ativa evitando, assim, contaminação e/ou qualquer influência do filme PVC na coleta.

Todos foram submetidos à espectroscopia de fluorescência, nos 2 comprimentos de onda (Anexo 4). Nos portadores de lesão clinicamente detectável abaixo de 1 cm foi realizada a varredura pontual cobrindo toda a área alterada e em toda sua margem, radialmente, de modo que essa medida se afastou da lesão em aproximadamente 5 milímetros. Nos portadores de lesão acima de 1 cm, em caso da identificação de heterogeneidades superficiais, foram escolhidas regiões representativas para correlacionar com os diferentes padrões clínicos, evitando-se área de necrose. Em cada área escolhida, foram realizadas, no mínimo, 5 medidas espectroscópicas, em cada comprimento de onda. Nas margens de lesões acima de 1 cm, foi escolhida uma área de 1 cm<sup>2</sup> em que se realizaram as medidas espectroscópicas, de forma concêntrica, de modo que foram realizadas no mínimo 5 medidas em cada linha, se afastando da lesão, com no mínimo, 5 linhas. Sempre que possível, uma região de mucosa contralateral ou de mucosa bucal de mesma classificação, clinicamente normal, também foi investigada. Cada região ou lesão em que foi realizada a espectroscopia de fluorescência foi dividida em quadrantes e demarcada em papel, para se determinar o local correto da aferição e a localização da biópsia. As aferições foram realizadas no Centro Cirúrgico do Hospital A.C. Camargo, após indução da anestesia geral, e no ambulatório do L.E.L.O., antes do procedimento de biópsia

ou remoção total das lesões. Nos indivíduos portadores de neoplasia oral um segundo exame de varredura pontual, nos 2 comprimentos de onda, foi realizado na peça cirúrgica após ressecção da lesão, avaliando centro e bordas da lesão e limites da peça, num momento *ex vivo* (Figura 7 e 8).

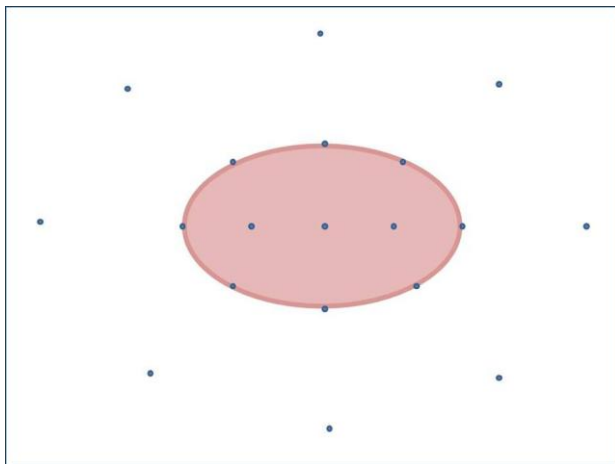


Figura 7 – Esquema representativo de uma lesão com centro (rosa claro) e limite (rosa escuro) e os pontos de coleta com o sistema de espectroscopia de fluorescência.



Figura 8 – Paciente com lesão potencialmente maligna de aspecto heterogêneo sendo submetido ao exame de espectroscopia de fluorescência.

Nos voluntários com mucosa clinicamente normal e indivíduos em seguimento, foram selecionados as seguintes regiões: borda lateral de língua, dorso de língua, assoalho bucal, mucosa labial inferior, mucosa jugal, gengiva ou rebordo alveolar, palato e lábio, com no mínimo, 5 aferições de espectroscopia em cada comprimento de onda, por área selecionada. Nos indivíduos em seguimento foi evitada a área cicatricial. Cada região ou lesão em que foi realizada a espectroscopia de fluorescência foi demarcada para se determinar o local correto da aferição e a localização da citologia. As aferições e coleta da citologia esfoliativa foram realizadas no ambulatório do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo.

#### **4.5 Biópsia**

A biópsia com *punch* de 4 mm foi realizada nos portadores de neoplasia no momento da cirurgia. De todos os pacientes já havia sido preenchida da ficha clínica e obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As biópsias foram realizadas no Centro Cirúrgico, após a segunda varredura por espectroscopia de fluorescência na peça ressecada, enquanto o paciente estava anestesiado e passando pela cirurgia. Este procedimento não afetou o andamento da cirurgia a que o paciente foi submetido. Os pacientes portadores de lesão até 2 cm foram submetidos a 1 biópsia no interior da lesão. Nas lesões de 2 a 4 cm, foram realizadas 2 biópsias no interior da lesão. Nas lesões acima de 4 cm, foram realizadas 3 biópsias no interior da lesão. Todas as biópsias foram realizadas em locais onde previamente foram realizadas as medidas espectroscópicas e foram realizadas de acordo com a heterogeneidade da lesão (área eritroplásica, área leucoplásica, área ulcerada, área nodular). Nas margens das lesões, foram realizadas 4 biópsias, a 5 mm da borda da lesão, evitando-se proximidade a áreas necróticas (Figura 9 e 10).



Figura 9 – Paciente com lesão heterogênea ulcerada em mucosa jugal lado esquerdo.



Figura 10 – Biópsia de lesão suspeita.

Os espécimes foram acondicionados em frascos plásticos contendo formol a 10%, para posterior processamento. O tecido foi classificado clinicamente em normal, alterado sem suspeita de malignidade, alterado displásico e maligno (carcinoma).

#### **4.6 Citologia Esfoliativa**

Nos pacientes em seguimento ou nos voluntários sadios que consentiram, foi realizada coleta citológica de material da cavidade oral. Foi utilizada a espátula, que foi friccionada nas seguintes localizações: borda lateral de língua, dorso de língua, assoalho bucal, mucosa labial inferior, mucosa jugal, gengiva ou rebordo, palato e lábio. Após coleta, foi preparado um esfregaço citológico em lâmina e fixado em etanol 95%, para posterior análise. O exame citológico foi realizado somente nos indivíduos do grupo controle para termos um resultado anatomopatológico correspondente ao indivíduo sadio.

#### **4.7 Análise dos espectros de fluorescência**

Os espectros coletados foram analisados em função das diferentes localidades anatômicas e do tecido alterado pela lesão comparando com o tecido normal. Os resultados dos espectros foram correlacionados com o diagnóstico histopatológico. Diferentes tipos de processamentos matemáticos foram realizados buscando a melhor discriminação entre tecido normal *versus* tecido alterado potencialmente neoplásico *versus* tecido alterado neoplásico.

No primeiro momento, as análises foram feitas por paciente em cada sítio anatômico na qual foram anotadas as características de forma e intensidade de cada espectro. Depois foi feita uma junção para comparar lesão com mucosa

normal, e a partir desse momento foram feitas análises com mais de um paciente, começando a análise com todos e depois separando por sítio.

A importação e processamento dos espectros foram feitos no MATLAB ou no WEKA (classificadores computacionais). Foi desenvolvido um algoritmo para importar os dados utilizando como base a planilha de dados. Como havia a presença de bandas de emissão tanto antes quanto após a região principal, foram removidas regiões do espectro antes de proceder com as análises. Nos espectros obtidos com laser de 532 nm foi selecionada a região entre 543,5 e 790,7 nm. Para o laser de 406 nm foi selecionada a região entre 419,6 e 790,7 nm. Após isto, foi aplicado um filtro de Savintzky-Golay para “alisar” os espectros (para a análise derivativa, o filtro foi aplicado após a derivação) e a linha de base foi removida (a média do final do espectro, que é aproximadamente constante, ficou sendo a média dos 15 últimos valores). Para o laser 532 nm, pacientes após o 100 não entraram na análise devido à má qualidade dos espectros, possivelmente ocasionada por problema com o filtro passa-alta. Para o laser 406 nm, alguns pacientes foram excluídos em determinadas análises devido a alta intensidade dos espectros. Para todas análises, realizadas até o presente momento, somente foram incluídos espectros obtidos *in vivo*. Para a “Análise Cruzada” e “Classificadores computacionais”, o sítio *Dorso de língua* foi excluído dada sua alta variabilidade, justificada pela presença de porfirinas secretadas por bactérias presentes nesta região (da flora natural ou não).

*Análise de Componentes Principais* (PCA) é um método largamente utilizado em conjuntos de dados multivariados, uma vez que sua principal característica é a redução da dimensionalidade. A PCA resume-se basicamente em um problema de auto-valores e auto-vetores. Foram testados três tipos de pré-processamento da base de dados: normalização, padronização e análise derivativa.

A normalização é obtida através da divisão do espectro pelo seu máximo, assim qualquer espectro possui resposta máxima igual a 1. Isto prioriza a forma do espectro e acaba perdendo informações de intensidade.

A padronização é feita pelos comprimentos de onda. Para padronizar um dado comprimento de onda, subtrai-se sua média e divide-se o resultado pelo seu desvio padrão. Procede-se desta maneira para todos os espectros da base e para todos os comprimentos de onda. No final todo comprimento de onda terá média nula e desvio padrão igual à unidade.

Na análise derivativa calcula-se a primeira e a segunda derivada dos espectros. Foi aplicado o filtro de Savitzky-Golay após a derivação a fim de suavizar as curvas obtidas.

Os grupos propostos para avaliação foram: Normal de voluntário (N), lesão potencialmente maligna (P), carcinoma epidermóide (C). Inicialmente foi feita uma avaliação global, isto é, independente do sítio anatômico. Em um segundo momento foi feita uma PCA dividindo os espectros conforme o sítio anatômico ao qual pertenciam.

Uma segunda abordagem foi feita somente para as lesões potencialmente malignas. Dois grupos foram selecionados: aqueles que apresentavam lesões potencialmente malignas e também carcinoma epidermóide (PC) e aqueles que apresentavam somente lesões potencialmente malignas (PP). Foi feita uma avaliação global e outras dependentes do sítio.

**ANÁLISE DOS ÍNDICES ESPECTRAIS:** Foram observadas algumas alterações no formato dos espectros de tecidos de lesões pré-malignas quando comparados com de tecidos saudáveis.



<p>Para o <b>406 nm</b> foram calculados os seguintes índices:</p> <p>R1 = I1/I3                      R2=I2/I3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• I1: área sob a curva entre 433,7 e 455,2 nm</li> <li>• I2: área sob a curva entre 506,3 e 527,6 nm</li> <li>• I3: área sob a curva entre 485,4 e 506,3 nm</li> </ul>	<p>Para o <b>532 nm</b> foram calculados os seguintes índices:</p> <p>R1 = I1/I3                      R2=I2/I3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• I1: área sob a curva entre 557,7 e 577,7 nm</li> <li>• I2: área sob a curva entre 608,3 e 628,5 nm</li> <li>• I3: área sob a curva entre 584,5 e 604,9 nm</li> </ul>
--	--

Estes índices foram confeccionados a fim de verificar se são capazes de distinguir entre os grupos em quatro análises distintas:

- Normal de voluntário (NN) *versus* Normal de portador de lesão potencialmente maligna (NP);
- Normal de voluntário (NN) *versus* Lesões potencialmente malignas (P);
- Normal de voluntário (NN) *versus* Lesões potencialmente malignas (P) *versus* carcinoma epidermóide (C);
- Lesões potencialmente malignas (PP) *versus* Lesões potencialmente malignas de pacientes com carcinoma epidermóide (PC).

USO DE CLASSIFICADORES COMPUTACIONAIS: Foram utilizados, num segundo momento, classificadores computacionais na base de dados. Em uma análise, os classificadores foram aplicados na base sem normalização e em outra análise os espectros foram normalizados pelo máximo (mesmo procedimento descrito para o pré-processamento da PCA).

Os grupos nesta análise foram: Normal de voluntário (NN), lesões potencialmente malignas (P) e carcinoma epidermóide (C). Os resultados obtidos para a acurácia e taxa de falso positivo são valores médios ponderados para cada classe. Foram avaliados três classificadores e dois métodos de seleção de atributos. Os métodos de seleção de atributos são algoritmos que selecionam os

atributos mais relevantes para o problema segundo algum critério (Tan *et al.*, 2006). Neste caso os atributos são os comprimentos de onda. Foi procedido da mesma forma para os dois comprimentos de onda de excitação e os algoritmos utilizados foram Bayes, kNN e J48. Os métodos de seleção foram ReliefF e CFS (Correlation-Feature Selection).

ANÁLISE CRUZADA: Foram utilizados espectros obtidos com o laser 406 nm e selecionados aqueles que eram de pacientes que apresentavam carcinoma epidermóide e seus respectivos sítios contra-lateral do mesmo paciente. Foram selecionados 55 pacientes e 75 sítios com lesões (pacientes apresentavam carcinoma epidermóide em mais de um sítio anatômico). Foi calculado o seguinte índice: a razão da área sob a curva entre 623,1 e 643,2 nm e a área sob a curva entre 485,4 e 506,6 nm, isto é, a razão entre integrais. Este índice foi calculado tanto para espectros dos sítios com carcinoma epidermóide como das contralaterais.

## 5 RESULTADOS

A amostra consistiu em 150 indivíduos acima de 18 anos, de ambos os sexos, fumantes e não fumantes, e foi assim distribuída: 55 pacientes atendidos pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, portadores de carcinoma oral, em vários estádios de desenvolvimento, ou lesão clinicamente detectável que foram submetidos à cirurgia sob anestesia geral; 30 voluntários com mucosa oral clinicamente normal, sem presença de neoplasia maligna nas vias aéreas e digestivas superiores; 35 pacientes sem lesão oral, com história prévia de neoplasia oral, que foram submetidos à cirurgia ou à cirurgia e radioterapia, que são rotineiramente seguidos pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo; e 30 pacientes com lesão clinicamente detectável e potencialmente maligna atendidos pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo ou pelo L.E.L.O.-USP (Laboratório Especial de Laser em Odontologia) (Tabela 1).

Tabela 1. Diagnóstico clínico das mucosas orais observadas:

<b>Mucosa alterada</b>	65	Potencialmente malignas	30
		Operada previamente	35
<b>Com câncer bucal</b>			55
<b>Mucosa normal</b>			30

Os resultados foram analisados em função do diagnóstico histopatológico. Foram determinados padrões de fluorescência, procurando identificar assinaturas

espectroscópicas para cada tipo de lesão avaliada, com especial atenção ao carcinoma epidermóide. Os espectros foram processados matematicamente para, se possível, estabelecer algoritmos para discriminação normal *versus* carcinoma. O índice de acurácia foi determinado utilizando o diagnóstico histopatológico como padrão ouro.

Todos foram submetidos à espectroscopia de fluorescência em 2 comprimentos de onda. Dois sistemas laser, um emitindo em 406 nm e outro em 532 nm, foram empregados.

### 5.1 Análise Clínica e Histopatológica

Do total de 150 indivíduos que foram submetidos ao sistema de espectroscopia de fluorescência, 69 (46%) eram mulheres e 81 (54%) homens. A média de idade foi 58,59 de anos, sendo que entre as mulheres foi de 54,5 anos e entre os homens foi de 62,69 (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de idade e número de pacientes submetidos à pesquisa.

Pacientes	Mulheres	Homens	Total
<b>Número</b>	69 (46%)	81 (54%)	150
<b>Média de Idade</b>	54.5	62.7	58.6
<b>(Variação)</b>	(de 28 a 85 anos)	(de 30 a 86 anos)	(de 28 a 86 anos)

Nessa pesquisa 61 (75,3%) indivíduos do gênero masculino e 15 (21,73%) indivíduos do gênero feminino eram fumantes. Em relação ao consumo de bebidas alcoólicas 121 indivíduos faziam uso, sendo 23 (15,3%) etilistas crônicos, 10 (6,6%) ex-etilistas crônicos e 88 (58,6%) consumidores eventuais de bebidas

alcoólicas. O sítio anatômico mais acometido foi borda lateral de língua em 35 (41,2%) dos casos (Figura 11).



Figura 11 – Paciente com lesão úlcero- infiltrativa em borda de língua lado direito.

Das impressões espectroscópicas somadas as impressões clínicas do avaliador os resultados foram obtidos seguindo a classificação em mucosa normal, mucosa alterada sem suspeita de malignidade, mucosa alterada suspeita e carcinoma, neste primeiro momento. Os espectros foram processados matematicamente para, se possível, estabelecer algoritmos para discriminação normal *versus* carcinoma.

Os pacientes foram identificados por meio de um código numérico e cada peça biopsiada foi analisada obtendo-se o diagnóstico e as características histopatológicas. Cinco pacientes apresentavam mais de uma lesão, sendo 150 indivíduos e 164 lesões no total. Nesse estudo foram avaliados 8 lesões de hiperqueratose sem atipia epitelial, 16 de displasia leve, 15 de displasia moderada,

3 de displasia intensa, 5 de carcinoma *in situ* (Figura 12), 2 de carcinoma microinvasor, 49 de carcinoma invasor (Figura 13) e 1 lesão leucoplasia verrucosa proliferativa com epitélio displásico (Tabela 3).

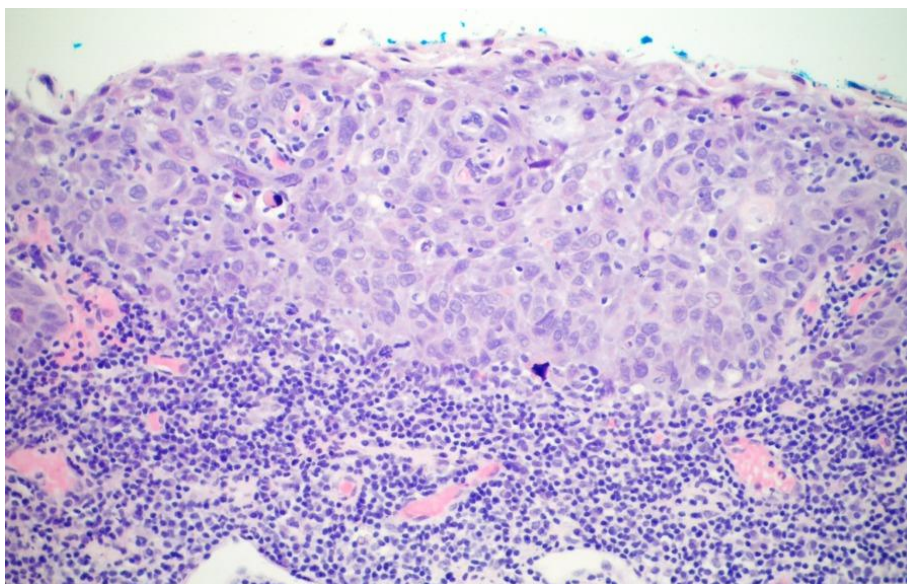


Figura 12 – Carcinoma *in situ*.

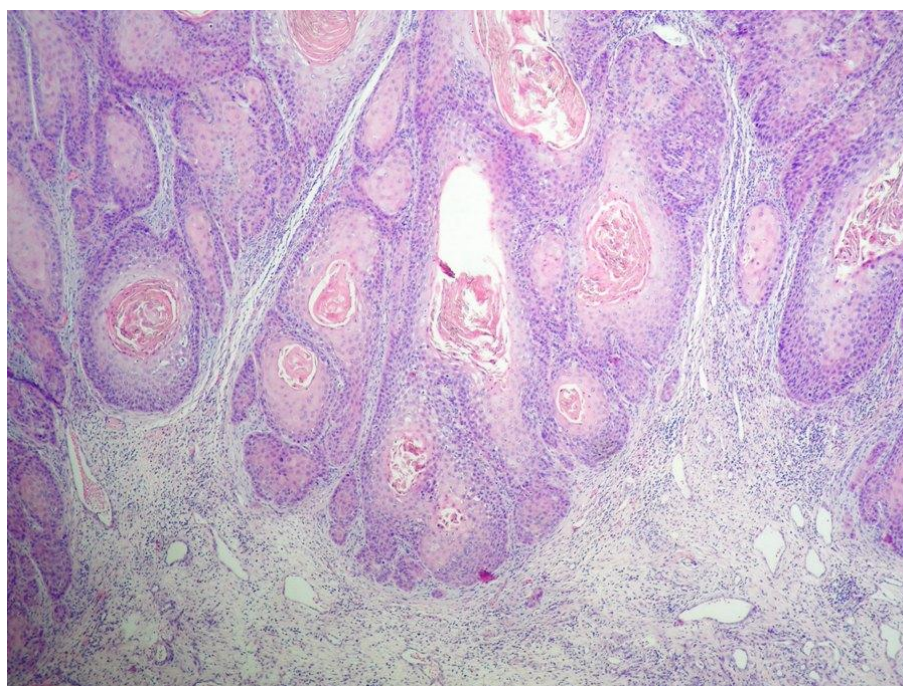


Figura 13 – Carcinoma epidermóide bem diferenciado.



Tabela 3: Distribuição dos resultados de acordo com a comparação do diagnóstico clínico versus diagnóstico histopatológico:

Diagnóstico Patológico	Diagnóstico Clínico			Total
	Câncer	Normal	Pot. Malignas	
Normal	0	65	0	65
Hiperkeratose	0	0	8	8
Displasia Leve	0	0	16	16
Displasia Moderada	0	0	15	15
Displasia Intensa	0	0	3	3
Carcinoma <i>in situ</i>	5	0	0	5
Carcinoma microinvasor	1	0	1	2
Carcinoma invasor	49	0	0	49
Outros	0	0	1	1
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>65</b>	<b>44</b>	<b>164</b>

Índice Kappa = 0.9904.

Quando separado por sítio anatômico a língua foi a mais acometida tanto pelas lesões potencialmente malignas, 14 lesões, quanto pelas lesões carcinomatosas, 25 lesões. A mucosa jugal foi a segunda localização mais freqüente tanto para lesões potencialmente malignas quanto para lesões malignas, sendo 11 e 10 lesões, respectivamente. Os sítios seguintes de acometimento das lesões potencialmente malignas foram gengiva / rebordo alveolar (8), assoalho bucal (6), mucosa labial / lábio (3) e palato (2). Já as lesões de carcinoma epidermóide tiveram o acometimento dos sítios mucosa labial / lábio (5), assoalho bucal (5), retromolar (4), palato e gengiva / rebordo (3 cada), respectivamente. (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição das lesões por sítio anatômico correlacionando com o diagnóstico histopatológico das lesões.

<b>Sítio Anatômico</b>	<b>Nº total de lesões</b>	<b>Nº lesões por diagnóstico histopatológico</b>	
<b>Língua</b>	39	Potencialmente maligna	14
		Carcinoma <i>in situ</i>	2
		Carcinoma microinvasor	0
		Carcinoma invasor	23
<b>Assoalho bucal</b>	11	Potencialmente maligna	6
		Carcinoma <i>in situ</i>	2
		Carcinoma microinvasor	0
		Carcinoma invasor	3
<b>Mucosa jugal</b>	21	Potencialmente maligna	10
		Carcinoma <i>in situ</i>	0
		Carcinoma microinvasor	1
		Carcinoma invasor	10
<b>Mucosa labial</b>	8	Potencialmente maligna	3
		Carcinoma <i>in situ</i>	0
		Carcinoma microinvasor	0
		Carcinoma invasor	5
<b>Gengiva/rebordo</b>	11	Potencialmente maligna	8
		Carcinoma <i>in situ</i>	0
		Carcinoma microinvasor	0
		Carcinoma invasor	3
<b>Retromolar</b>	4	Potencialmente maligna	0
		Carcinoma <i>in situ</i>	0
		Carcinoma microinvasor	1



<b>Palato</b>	5	Carcinoma invasor	3
		Potencialmente maligna	2
		Carcinoma <i>in situ</i>	1
		Carcinoma microinvasor	0
		Carcinoma invasor	2

A avaliação dos resultados foi inicialmente realizada com uma análise qualitativa dos espectros de fluorescência para a verificação de assinaturas espectrais que discriminem o câncer epidermóide da mucosa bucal normal, de modificações espectrais em função do sítio anatômico, variações espectrais em voluntários normais e pacientes. Outras análises foram realizadas levando em consideração fatores de risco, consumo de tabaco e bebida alcoólica.

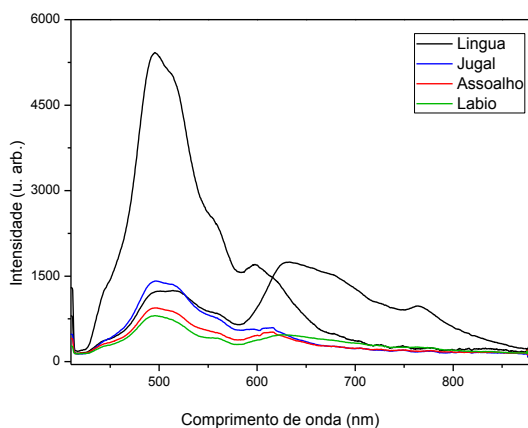
## 5.2 Análise qualitativa dos espectros coletados.

Dentro de um total de 150 indivíduos e 164 lesões foram coletados e considerados neste estudo 2404 espectros em 532 nm e 3876 espectros em 406 nm, sendo 398 espectros em 532 nm e 387 espectros de 406 nm em lesões potencialmente malignas, 484 espectros em 532 nm e 837 espectros de 406 nm em lesões malignas, 154 espectros em 532 nm e 162 espectros de 406 nm em mucosa normal de indivíduos com lesões potencialmente malignas, 174 espectros em 532 nm e 233 espectros de 406 nm em mucosa normal de indivíduos com lesões malignas, 337 espectros em 532 nm e 482 espectros de 406 nm em região de margem de segurança, 663 espectros em 532 nm e 154 espectros de 406 nm em peça cirúrgica (*ex vivo*) e 150 espectros em 532 nm e 1143 espectros de 406 nm em mucosa normal de voluntários normais.

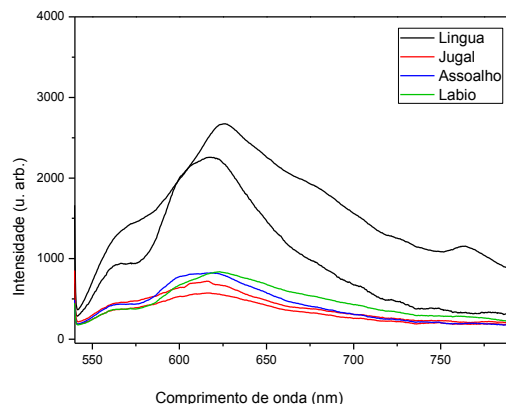
Os espectros de fluorescência coletados apresentam diferenças dependendo do comprimento de onda de excitação, do sítio anatômico

investigado, composição bioquímica e arquitetura tecidual. O comprimento de onda de excitação influencia o espectro de fluorescência final, uma vez que diferentes fluoróforos endógenos são excitados. A comparação entre a efetividade da luz violeta e da luz verde na excitação da fluorescência para a detecção do câncer de boca foi realizada. A mucosa bucal apresenta características estruturais distintas nos diferentes sítios anatômicos investigados.

Os dados coletados pelo espectrômetro por meio do programa OOIBase32 apresentam valores de intensidade em função do comprimento de onda (Figura 14 (A) e (B)). A curva apresentada no gráfico corresponde a fluorescência que foi avaliada neste trabalho, que é a luz re-emitida do tecido com frequências distintas da excitação, e é ela que traz informações relevantes, dependendo das características do tecido investigado, a curva será diferente por causa das interações da luz com diversas biomoléculas e estruturas do tecido que agem como fluoróforos ou absorvedores. Cada curva do gráfico representa um ponto de leitura.



(A)



(B)

Figura 14 – Espectros coletados de diferentes regiões anatômicas mostrando as diferenças ópticas dos tecidos. A – usando o comprimento em 406 nm; B – usando o comprimento em 532 nm.

Num dado gráfico espectral com análise de um ponto alvo temos o eixo x, linha horizontal, que representa cada comprimento de onda de excitação, no caso desse estudo em 406 nm e 532 nm (nanômetros); e o eixo y, linha vertical, que representa a intensidade de fluorescência emitida (em unidades arbitrárias). Na figura 12 temos exemplos de espectros em diferentes sítios anatômicos analisados nos dois comprimentos de onda e podemos observar que o formato das curvas e intensidade variam.

As intensidades máximas observadas foram ao redor de  $5 \times 10^4$  (47.180,832) no comprimento de onda de excitação violeta em um paciente com carcinoma epidermóide de borda de língua, na região da borda da lesão, e também ao redor de  $5 \times 10^4$  (47.998,207) no comprimento de onda de excitação verde em um voluntário de mucosa normal, com história prévia de câncer da cavidade oral que encontra-se em acompanhamento ambulatorial. Devido grandes variações de intensidade e deficiência da técnica em posicionamento da fibra, iluminação

externa e pressão exercida no ato do exame os valores de intensidade não foram levados em consideração nas análises estatísticas.

### 5.2.1 Análise dos espectros em voluntários de mucosa normal

Os espectros que foram obtidos dos voluntários de mucosa normal seguem um padrão semelhante quando separados por sítio anatômico, tanto na excitação em 406 nm quanto na excitação em 532 nm, como mostra nas figuras 15 a 20.

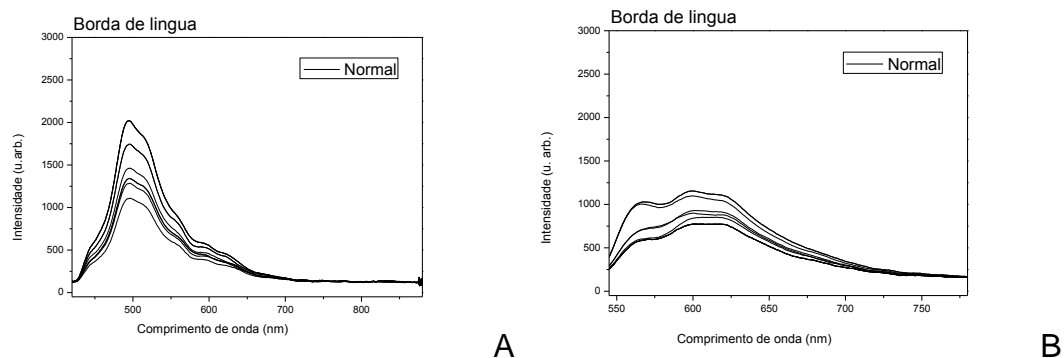


Figura 15 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm (A) em 532 nm (B) coletados de mucosa normal de voluntários, região de borda de língua.

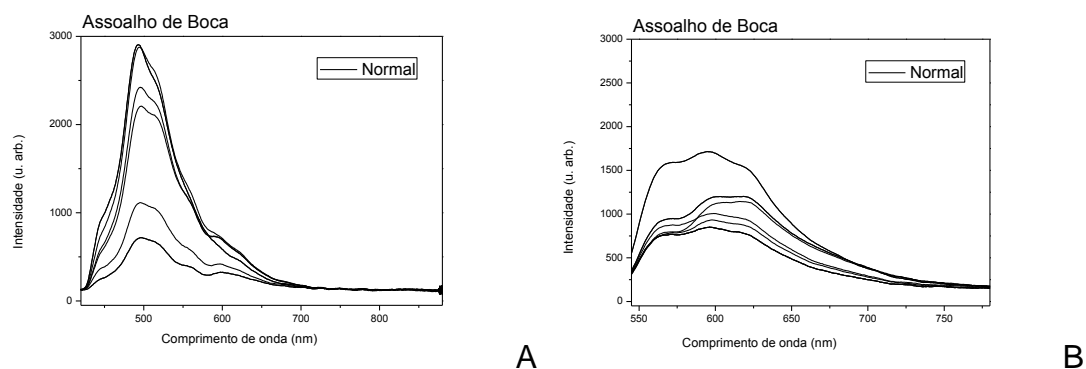
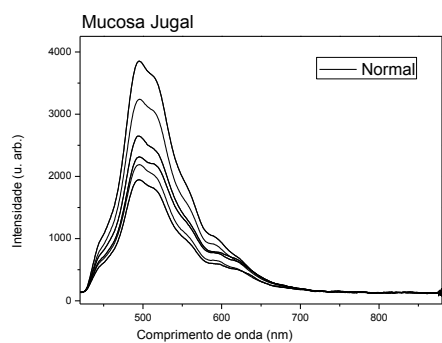
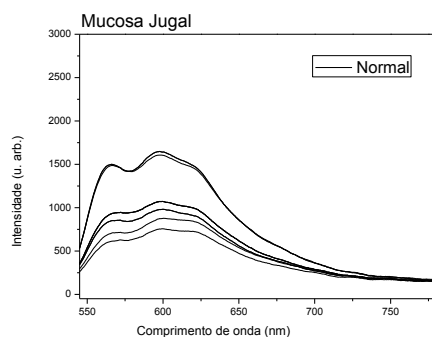


Figura 16 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm (A) em 532 nm (B) coletados de mucosa normal de voluntários, região de assoalho bucal.

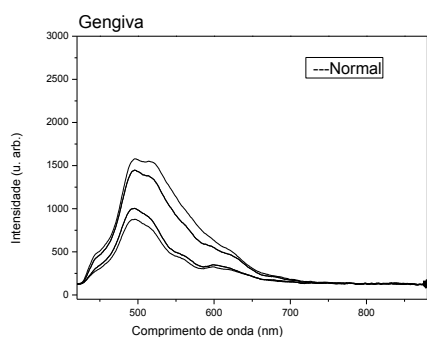


A

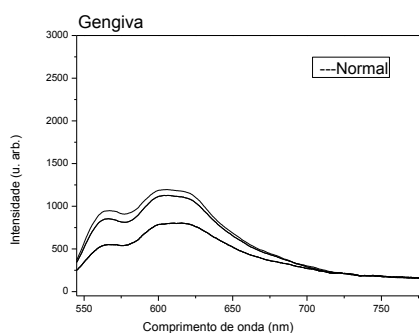


B

Figura 17 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm (A) em 532 nm (B) coletados de mucosa normal de voluntários, região de mucosa jugal.

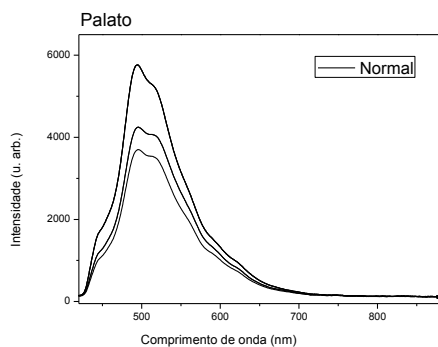


A

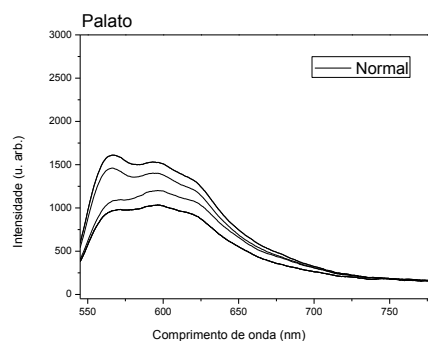


B

Figura 18 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm (A) em 532 nm (B) coletados de mucosa normal de voluntários, região de gengiva.



A



B

Figura 19 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm (A) em 532 nm (B) coletados de mucosa normal de voluntários, região de palato duro.

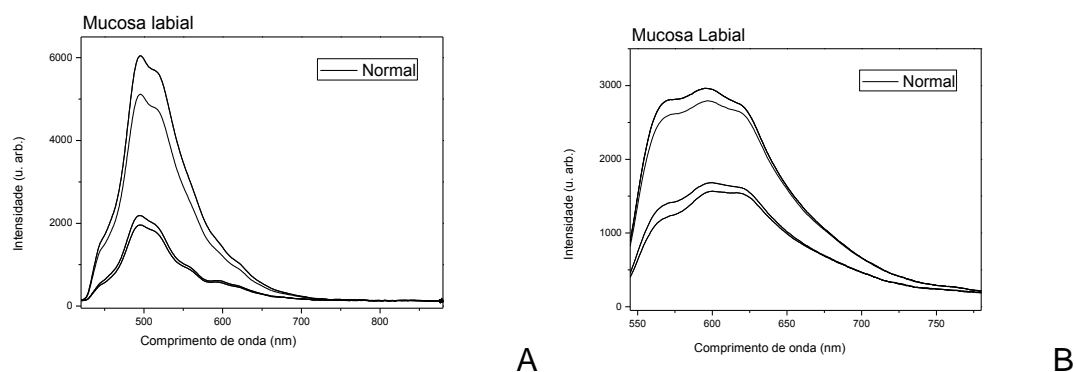


Figura 20 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm (A) em 532 nm (B) coletados de mucosa normal de voluntários, região de mucosa labial.

As curvas, separadas por sítio anatômico, seguem um padrão, mesmo sendo de indivíduos diferentes. Cada curva é um espectro coletado de um voluntário diferente escolhido aleatoriamente.

Nos voluntários normais os sítios anatômicos gengiva, borda de língua e assoalho bucal apresentaram baixa intensidade na excitação em 406 nm, mas na excitação em 532 nm todos sítios anatômicos tiveram intensidade de re-emissão semelhantes, exceto a mucosa labial que apresentou alta intensidade de retroespalhamento. A língua e o assoalho são tecidos altamente vascularizados, e a hemoglobina é o principal componente que apresenta grande absorção de fótons, o que explicaria a baixa intensidade dos espectros coletados.

### 5.2.2 Análise dos espectros comparando pacientes com lesões potencialmente malignas com mucosa contralateral normal

As lesões potencialmente malignas mais observadas neste estudo foram as leucoplasias, 30 lesões, seguidas das eritroplasias, 11 lesões, e eritroleucoplasias,

3 lesões. Os sítios anatômicos mais envolvidos foram borda de língua e mucosa jugal (Figura 21).

As diferentes apresentações clínicas das lesões potencialmente malignas agem nas modificações dos espectros junto com o sítio anatômico. As lesões mais ceratinizadas tendem a ter intensidade de re-emissão de luz mais intensa do que as lesões pouco ceratinizadas, isso ocorre porque a ceratina é um importante emissor de luz. Lesões heterogêneas, exemplo a figura 21 (C), tiveram todas as diferentes áreas da lesão examinadas, como as regiões leucoplásica, eritroplásica e acastanhada.

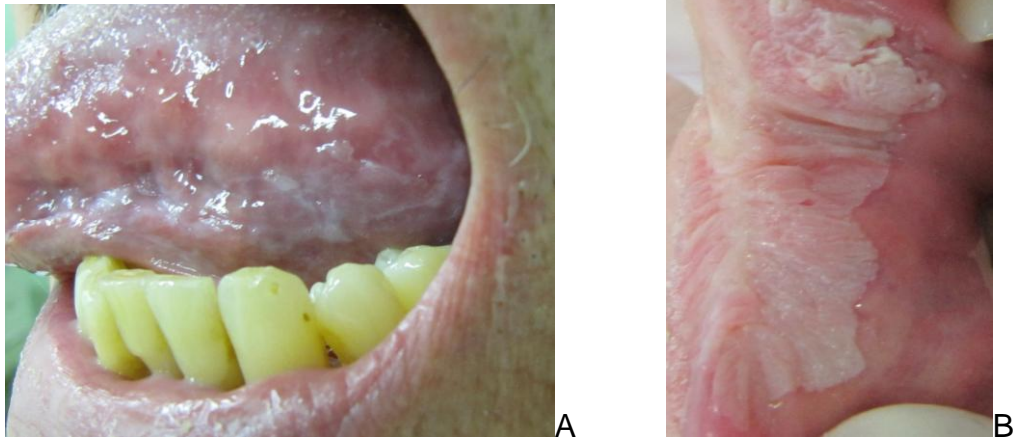


Figura 21 – Lesões potencialmente malignas: A – leucoplasia difusa em região borda de língua lado esquerdo, B – leucoplasia homogênea de limites definidos em comissura labial direita;

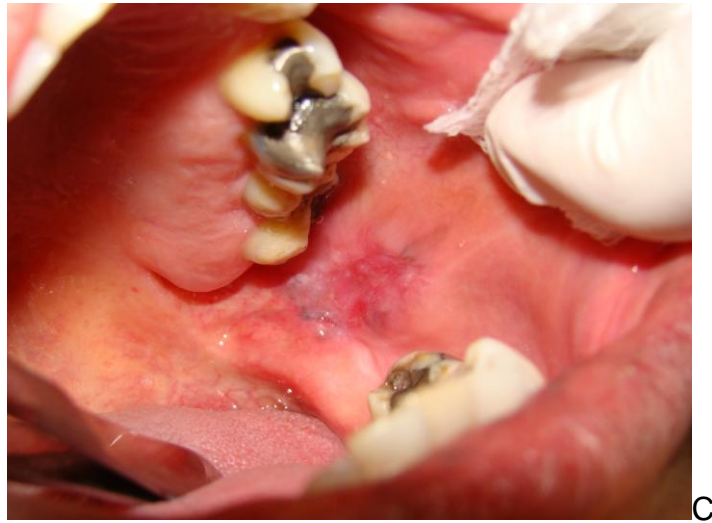


Figura 21 – C – eritroleucoplasia em mucosa jugal, posterior, lado esquerdo.

Das 30 leucoplasias examinadas, 8 tiveram o diagnóstico histopatológico de hiperqueratose, 12 de displasia leve, 9 de displasia moderada e 1 de displasia intensa (Figura 22). Já as eritropplasias, 4 foram diagnosticadas histopatologicamente em displasia leve, 6 em displasia moderada e 1 em carcinoma microinvasor, sendo esta, transferida para o grupo das lesões malignas. E as 3 eritroleucoplasias tiveram diagnóstico histopatológico de displasia intensa.



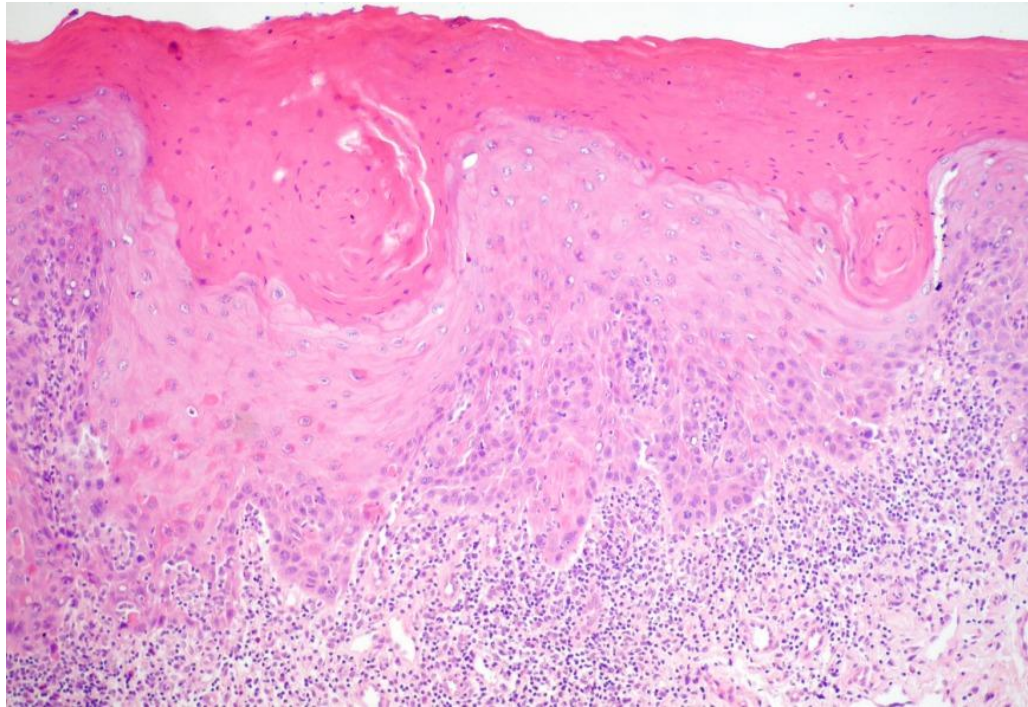


Figura 22 – Imagem histológica de uma lesão leucoplásica com diagnóstico de displasia moderada apresentando hiperqueratose.

Os gráficos de espectros de comparação entre lesões potencialmente malignas e mucosa normal contralateral seguem um padrão semelhante quando separados por sítio anatômico, tanto na excitação em 406 nm quanto na excitação em 532 nm, como mostra nas figuras abaixo (Figuras 23 a 32). Poucas são as diferenças de formato de curvas e de intensidades. A maior diferença ocorre no formato da curva da figura 25 de excitação em 532 nm e em borda de língua. Essa diferença pode ter ocorrido pelo posicionamento da sonda de investigação mais próximo ao dorso de língua.

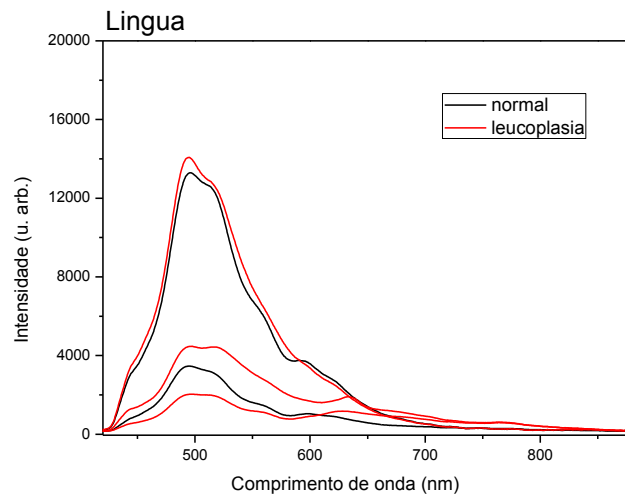


Figura 23 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de borda de língua.

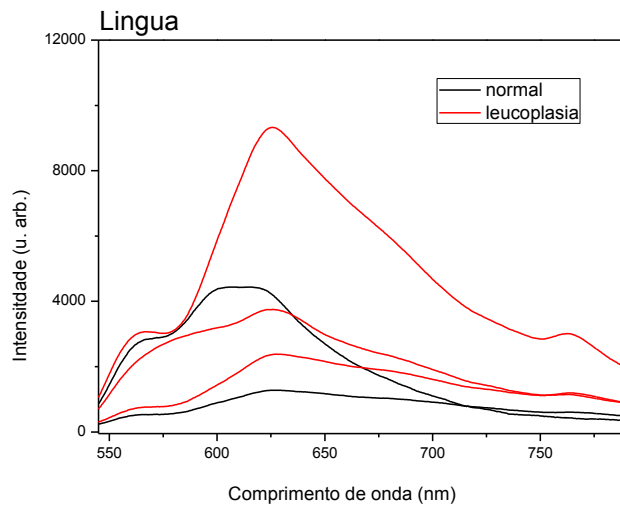


Figura 24 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de borda de língua.

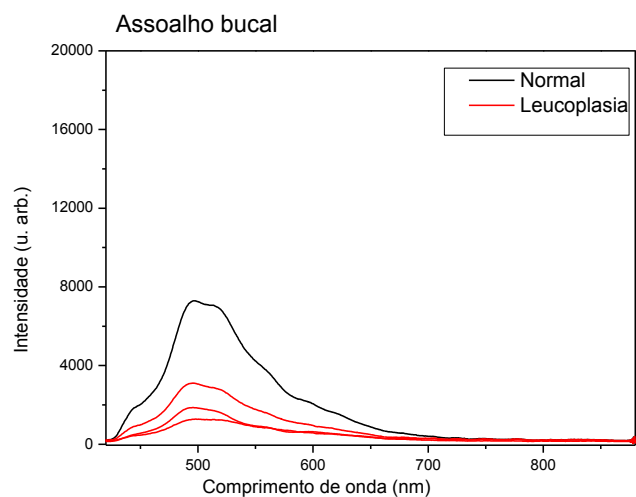


Figura 25 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de assoalho bucal.

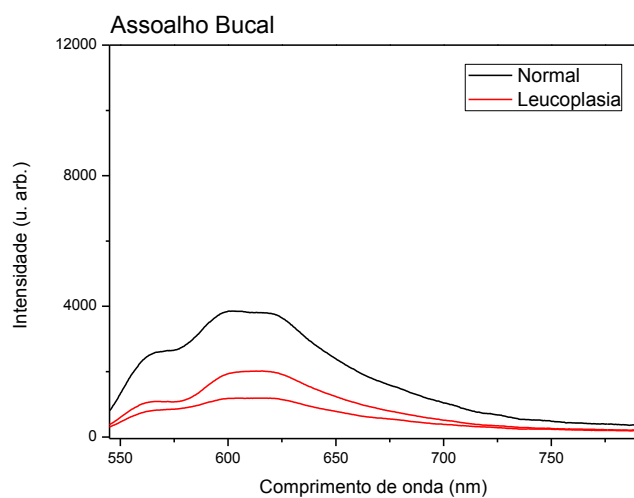


Figura 26 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de assoalho bucal.

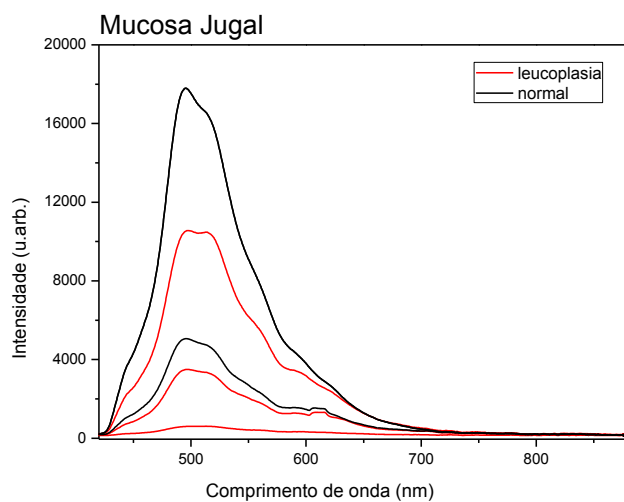


Figura 27 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de mucosa jugal.

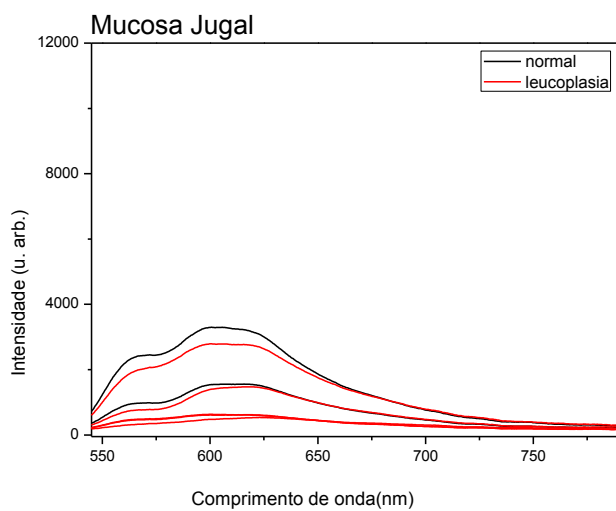


Figura 28 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de mucosa jugal.

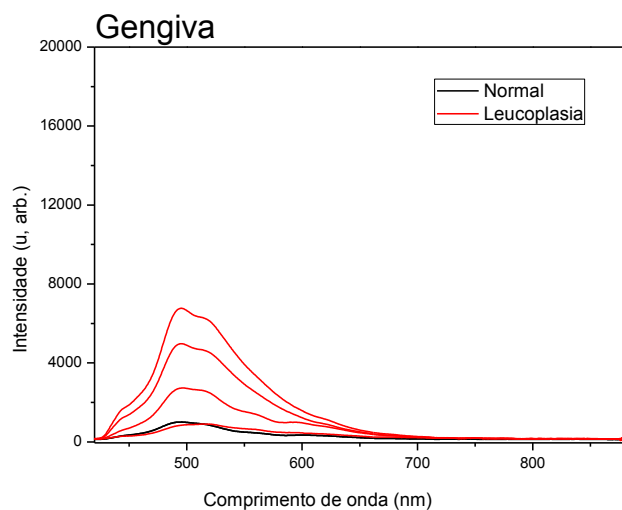


Figura 29 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de gengiva.

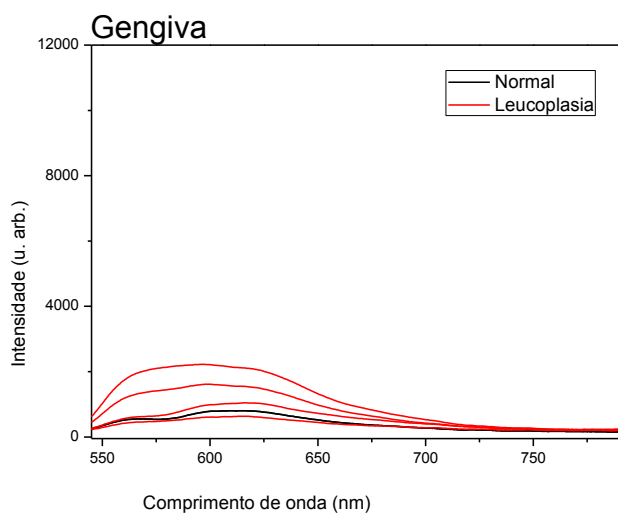


Figura 30 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de gengiva.

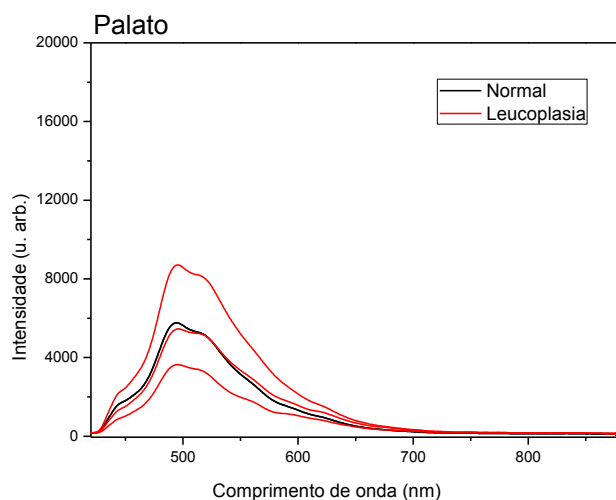


Figura 31 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de palato duro.

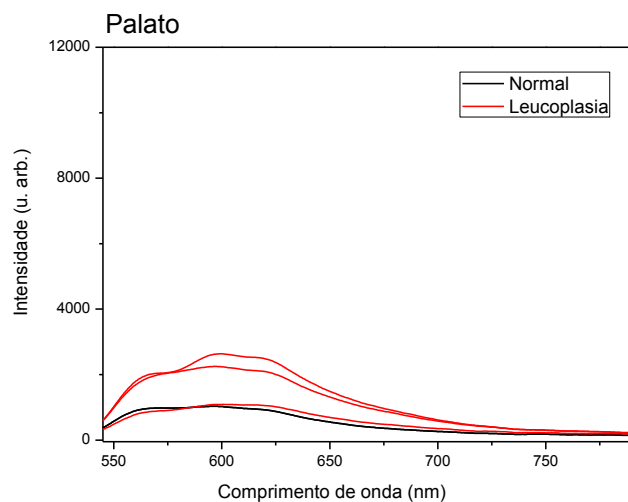


Figura 32 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com lesões leucoplásicas e mucosa contralateral normal, região de palato duro.

Os gráficos dos espectros de comparação entre lesões potencialmente malignas eritroplásicas e mucosa normal contralateral seguem um padrão semelhante quando separados por sítio anatômico. As maiores diferenças ocorrem no formato das curvas de excitação em 406 nm das regiões eritroplásicas com a formação de novas bandas, como mostra nas figuras figuras 33 a 36. Na excitação em 532 nm poucas são as diferenças de formato de curvas e de intensidades (Figuras 33 e 36).

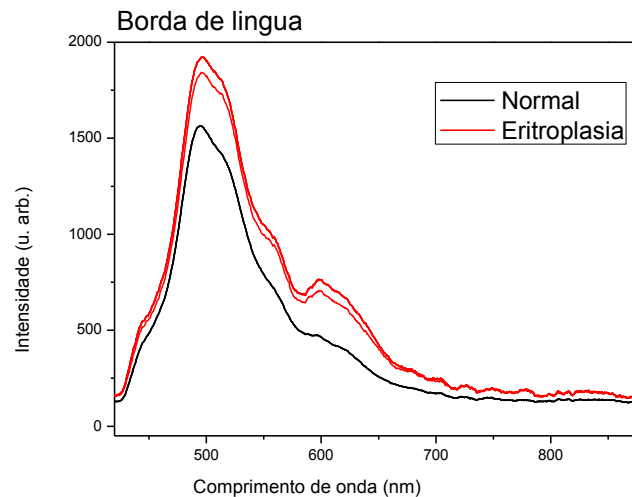


Figura 33 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre lesões eritroplásicas e mucosa normal contralateral, região de borda de língua. Podemos visualizar a formação de nova banda na região  $X \approx 590$  e  $Y \approx 760$ .

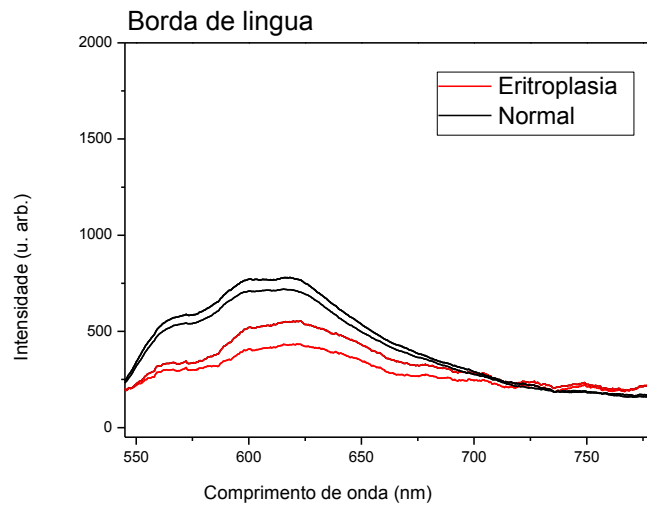


Figura 34 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre lesões eritroplásicas e mucosa normal contralateral, região de borda de língua.

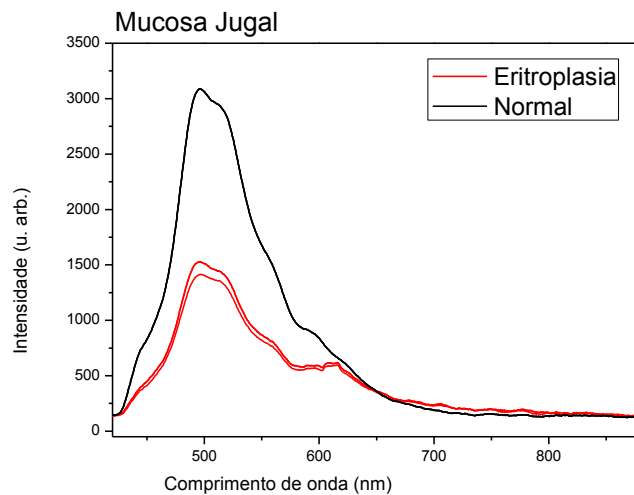


Figura 35 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre lesões eritroplásicas e mucosa normal contralateral, região de mucosa jugal. Podemos visualizar a formação de nova banda na região região X  $\approx$  610 e Y  $\approx$  590.



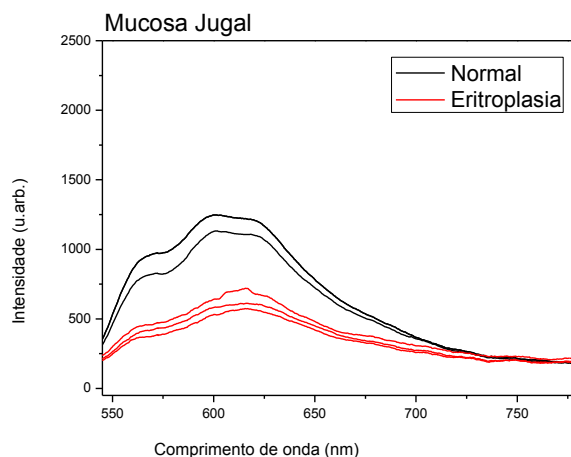


Figura 36 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre lesões eritroplásicas e mucosa normal contralateral, região de mucosa jugal.

As mucosas normais contralaterais apresentaram intensidades maiores do que as lesões eritroplásicas dos pacientes com lesões potencialmente malignas, exceto na figura 33 na qual as curvas espectrais de excitação violeta de maior intensidade são as coletadas no sítio afetado. Isso pode ser justificado pelo mau posicionamento da fibra e captação de luz ambiente, uma vez que os mesmos pontos avaliados com o laser em 532 nm confirma a menor intensidade de fluorescência do sítio afetado.

### **5.2.3 Análise dos espectros comparando pacientes com lesões de carcinoma epidermóide com mucosa contralateral normal**

Do total de 85 indivíduos com lesões em mucosa oral, 56 eram portadores de carcinoma epidermóide e foram submetidos à cirurgia para remoção da lesão com margens de segurança. O sítio anatômico mais acometido foi borda lateral de

língua, em 25 (45,5%) lesões, seguido da mucosa jugal, 11 lesões, assoalho bucal e mucosa labial, 5 lesões cada, e região retromolar, 4 lesões.

O carcinoma epidermóide pode se apresentar de forma endofítica ou exofítica. As lesões exofíticas geralmente são massas papilares, fungiformes ou verrucosas e as lesões endofíticas são ulceradas e crateriforme. Inicialmente tendem a ser superficiais e a medida que crescem invadem tecidos subjacentes (Figura 37 A, B e C).

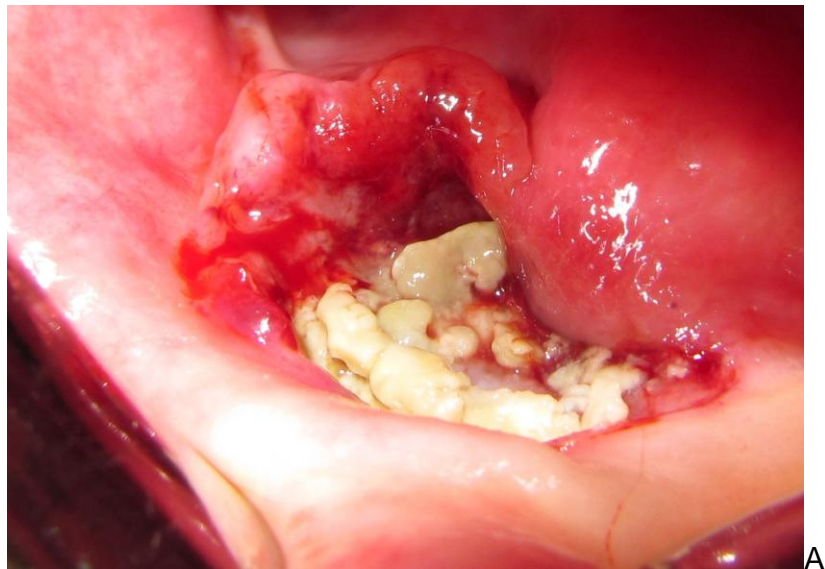


Figura 37 – Carcinoma epidermóide em suas diferentes apresentações clínicas:  
A – de rebordo alveolar lado direito de aspecto ulcerado;



Figura 37 – B – de fundo de sulco superior lado direito;

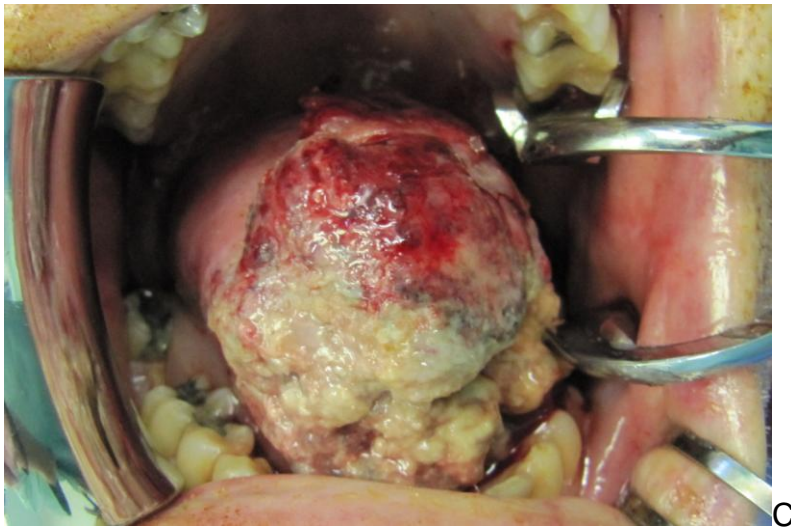


Figura 37 – C – de borda de língua lado esquerdo estendendo-se para base e ponta de língua e assoalho.

Os espectros foram previamente normalizados pela amplitude no comprimento de onda de excitação para possibilitar a comparação entre os dados

minimizando eventuais variações de intensidade entre as leituras são decorrentes do posicionamento da sonda, da angulação e da pressão aplicada e das diferenças teciduais em cada sítio anatômico.

Os gráficos apresentados nas figuras 38 a 44 foram obtidos a partir de amostras por sítio anatômico, mas de indivíduos diferentes escolhidos aleatoriamente. Cada curva do gráfico representa um ponto de investigação na área de interesse.

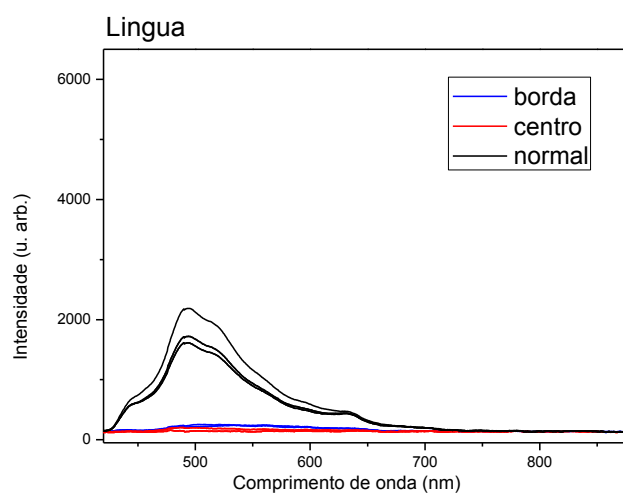


Figura 38 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com carcinoma epidermóide e mucosa contralateral normal, região de borda de língua.

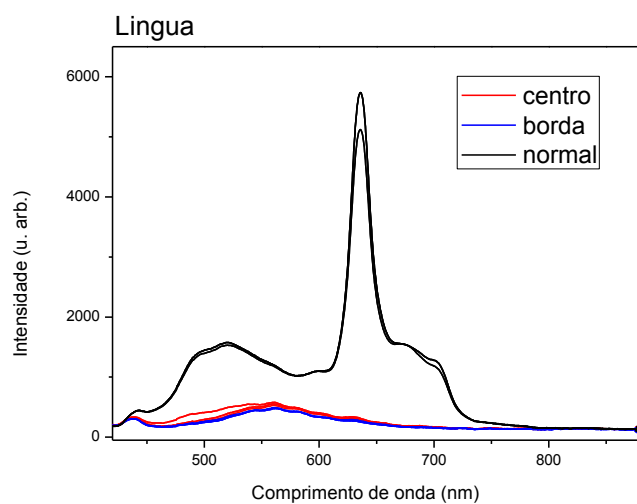


Figura 39 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com carcinoma epidermóide e mucosa contralateral normal, região de borda de língua.

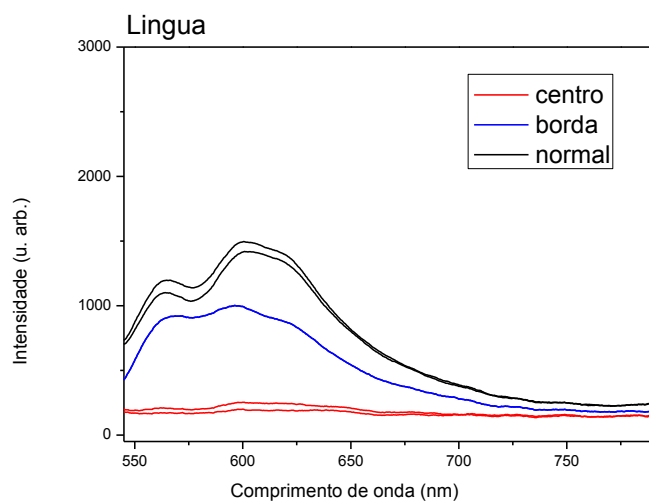


Figura 40 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com carcinoma epidermóide e mucosa contralateral normal, região de borda de língua.

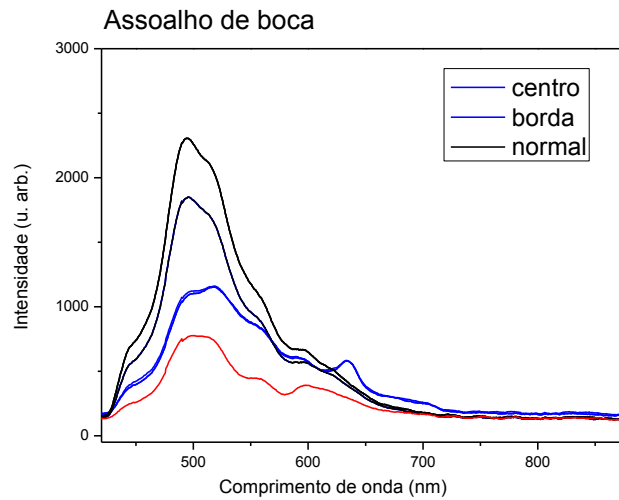


Figura 41 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com carcinoma epidermóide e mucosa contralateral normal, região de assoalho bucal.

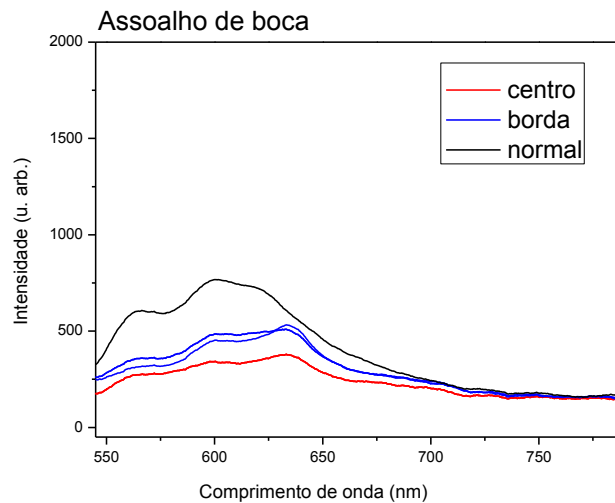


Figura 42 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com carcinoma epidermóide e mucosa contralateral normal, região de assoalho bucal.

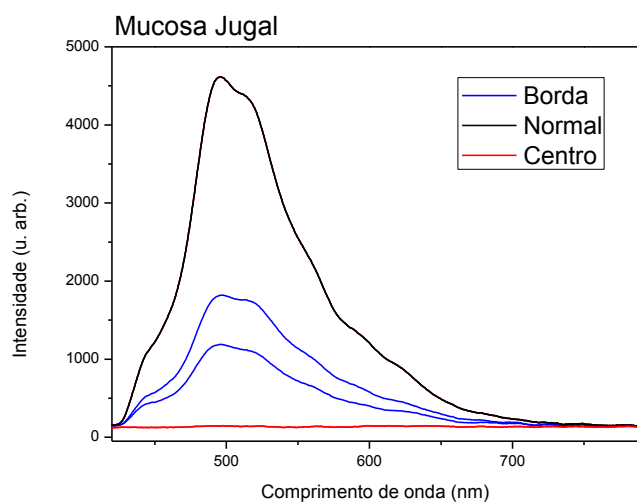


Figura 43 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre indivíduos com carcinoma epidermóide e mucosa contralateral normal, região de mucosa jugal.

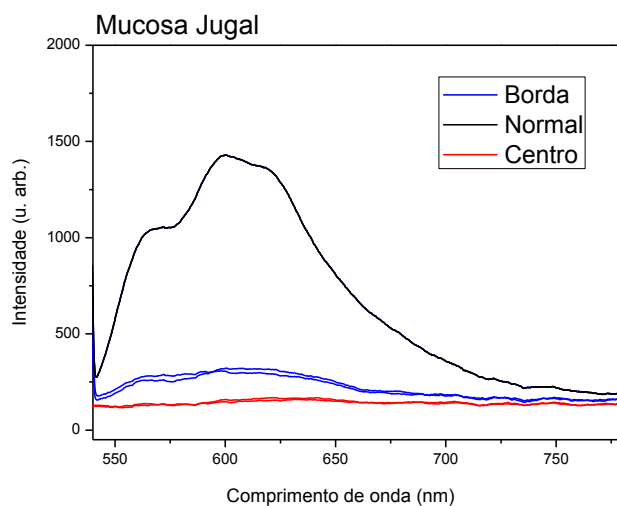


Figura 44 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre indivíduos com carcinoma epidermóide e mucosa contralateral normal, região de mucosa jugal.



Houve diferença qualitativa nos espectros apresentados. Podemos observar que o centro da lesão cancerosa não emite muita luz, as bordas das lesões re-emitem alguma luz dada as características presentes na lesão há variações e a mucosa normal segue o mesmo padrão das curvas mostradas nas figuras 15 a 20.

O centro da lesão é, geralmente, ulcerado havendo destruição das fibras colágenas, células inflamatórias e uma pseudomembrana fibrinopurulenta que absorvem luz. Como exame de espectroscopia capta somente alterações superficiais o mesmo não consegue avaliar invasão, ele avalia as alterações superficiais das lesões e/ou mucosas. A figura 45 é um carcinoma epidermóide invadindo superficialmente a musculatura, esse dado é possível de ser analisado pelo exame histopatológico, mas não pelo sistema de espectroscopia de fluorescência.

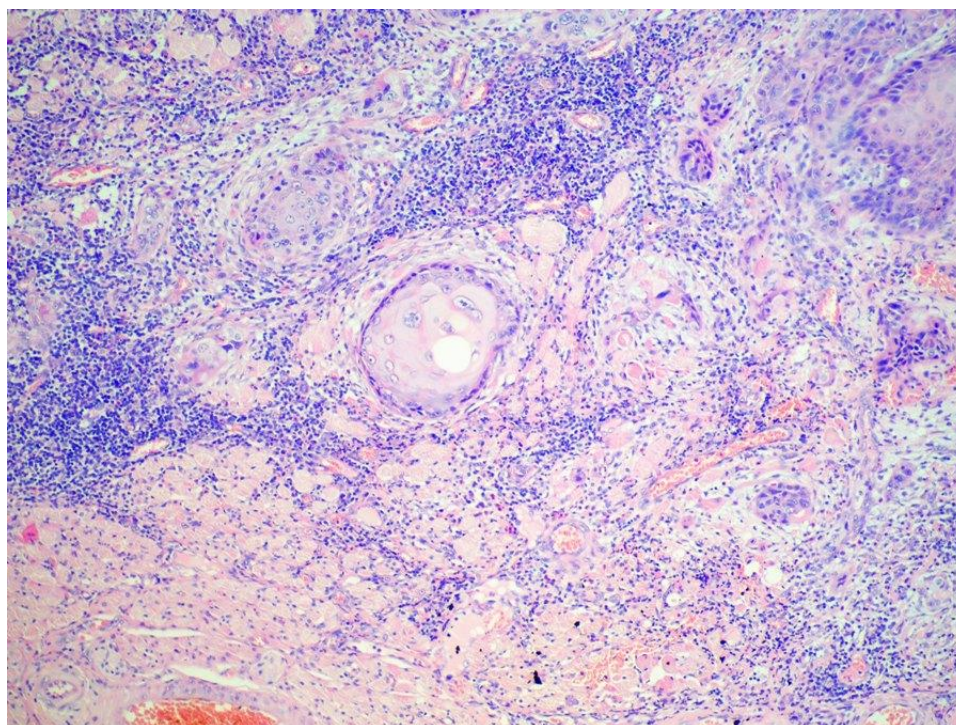


Figura 45 – Carcinoma epidermóide invasão superficial da musculatura.



O sítio borda de língua é o que mais mostra diferenças espectrais no formato e intensidade das curvas, isso pode ocorrer pelo posicionamento da fibra mais próxima ao dorso de língua. O dorso de língua apresenta características bem distintas devido à presença das papilas e grande acúmulo de bactérias que liberam porfirina, com isso os espectros coletados apresentaram-se com grande influência da emissão na região vermelha do espectro e foram excluídos dessa análise inicial.

#### **5.2.4 Análise dos espectros comparando mucosa normal de pacientes com lesões malignas, de pacientes com lesões potencialmente malignas e de voluntários de mucosa normal**

Sempre que possível a mucosa normal contralateral dos pacientes com lesões clinicamente visíveis foi analisada para primeiramente compararmos com a própria mucosa alterada do paciente, como mostrado anteriormente, e para posterior comparação com a mucosa normal de voluntários. A seguir os gráficos (Figura 46 a 51) são de análise das diferenças dos espectros de mucosa normal dos indivíduos com lesões malignas, dos indivíduos com lesões potencialmente malignas e com voluntários de mucosa normal, nas regiões mais prevalentes de acometimento das lesões.

Todos os espectros apresentados nas curvas azuis e vermelhas, mucosa normal de indivíduos com lesões, mostram-se alterados em relação as curvas pretas, mucosa normal de voluntários, seja em intensidade ou na forma.

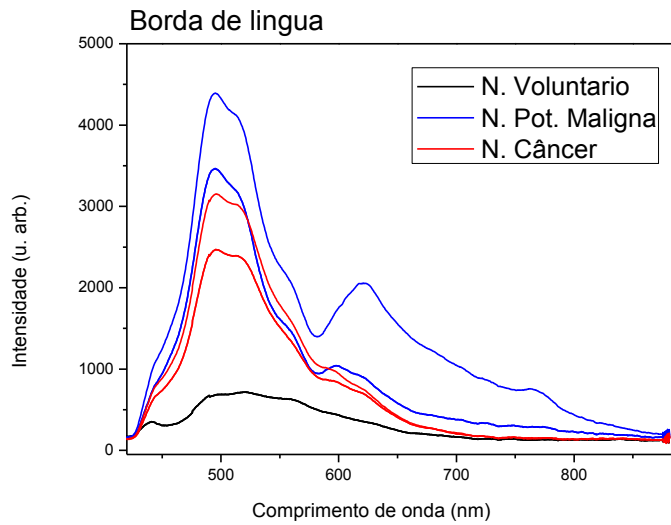


Figura 46 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre mucosa contralateral normal de indivíduos com lesões malignas e potencialmente malignas e mucosa normal de voluntários, região de borda de língua.

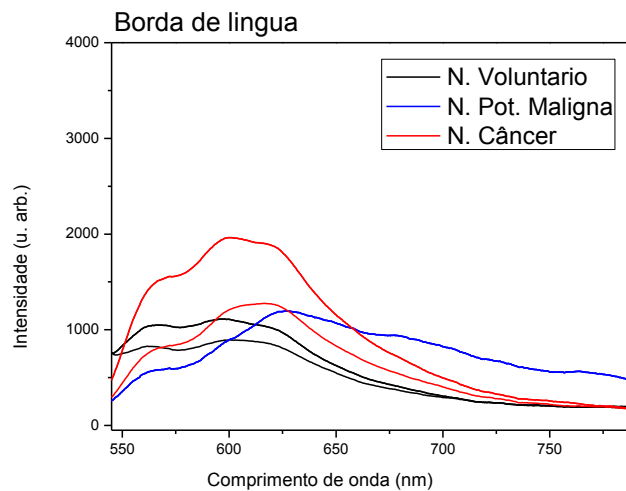


Figura 47 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre mucosa contralateral normal de indivíduos com lesões malignas e potencialmente malignas e mucosa normal de voluntários, região de borda de língua.

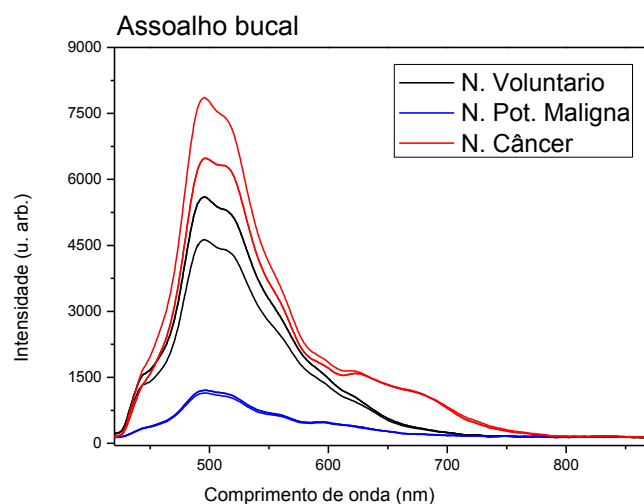


Figura 48 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre mucosa contralateral normal de indivíduos com lesões malignas e potencialmente malignas e mucosa normal de voluntários, região de assoalho bucal.

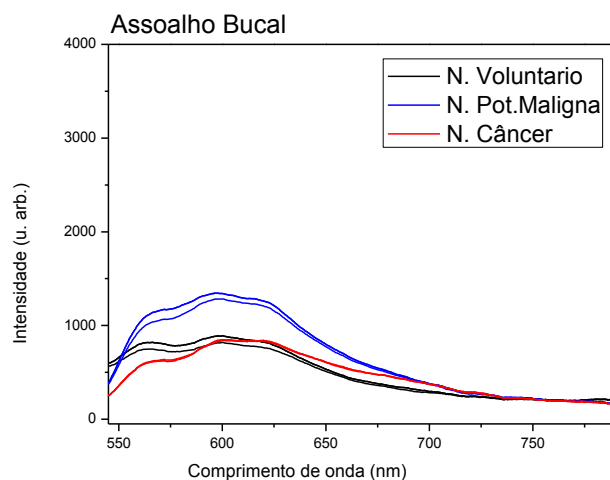


Figura 49 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre mucosa contralateral normal de indivíduos com lesões malignas e potencialmente malignas e mucosa normal de voluntários, região de assoalho bucal.

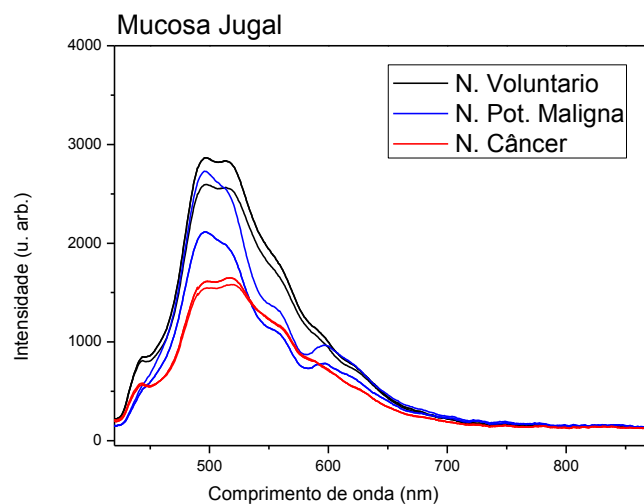


Figura 50 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre mucosa contralateral normal de indivíduos com lesões malignas e potencialmente malignas e mucosa normal de voluntários, região de mucosa jugal.

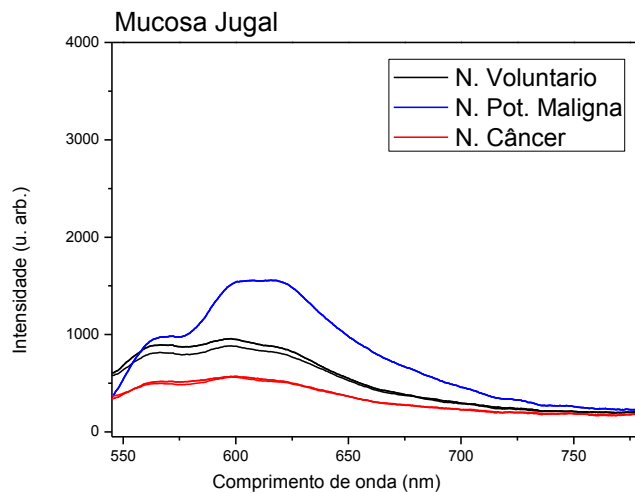


Figura 51 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre mucosa contralateral normal de indivíduos com lesões malignas e potencialmente malignas e mucosa normal de voluntários, região de mucosa jugal.

Nas figuras 46, 48 e 50 de excitação em 406 nm há a formação de nova banda e/ou uma tendência a formação de nova banda, na região em 600 a 650 nm. Essa característica é decorrente da presença de ceratina que parece exercer influência nos fenômenos de espalhamento e absorção e conseqüentemente na fluorescência dessa região.

Nas figuras 47, 49 e 51 de excitação em 532 nm as curvas em azul e vermelho apresentam uma subida mais acentuada na formação da banda principal, na região em 545 a 575 nm.

### **5.2.5 Análise comparando mucosa de voluntários saudáveis com lesões potencialmente malignas com lesões malignas**

As lesões de câncer apresentadas a seguir na forma de gráficos são de carcinoma epidermóide, no entanto, as características clínicas, assim como as histológicas, são variáveis, podendo haver comportamento distinto na fluorescência. Os pontos de coleta das lesões cancerosas levadas em consideração foram os das bordas das lesões porque os pontos no interior das úlceras não trouxeram informações devido a não re-emissão de fluorescência.

A lesão potencialmente maligna escolhida para representação das figuras 52 e 53 foi uma lesão leucoplásica de um indivíduo escolhido aleatoriamente. A ceratina, presente nas leucoplasias, é um dos principais emissores de luz e essa característica é bem observada nas figuras a seguir. A figura 52 mostra ainda uma nova banda de emissão na região em 600 nm de excitação que pode corresponder à presença de porfirinas sendo liberadas de bactérias.

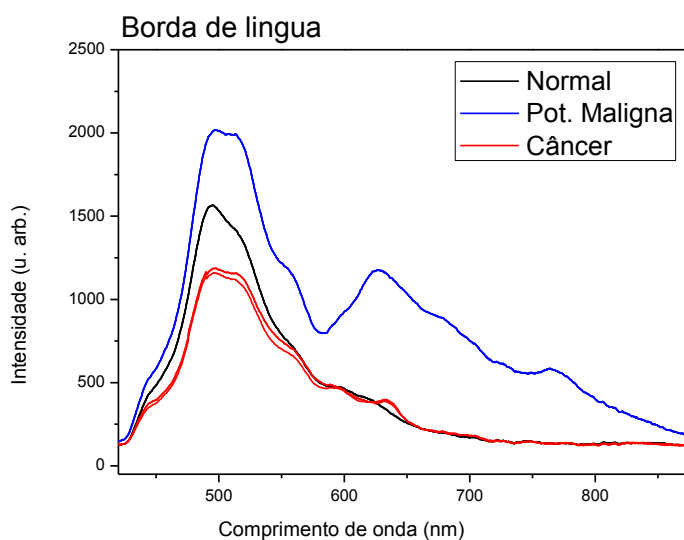


Figura 52 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre mucosa normal de voluntário, lesão leucoplásica e lesão maligna, região de borda de língua.

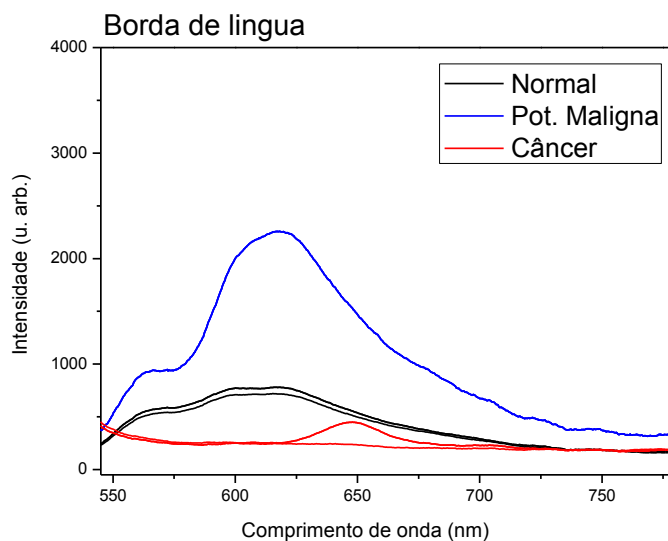


Figura 53 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre mucosa normal de voluntário, lesão leucoplásica e lesão maligna, região de borda de língua.

A lesão potencialmente maligna escolhida para representação das figuras 54 e 55, em mucosa jugal, foi uma lesão eritroplásica de um indivíduo escolhido aleatoriamente. A tendência das curvas mostrarem menor intensidade que a mucosa normal é pela falta de ceratinização da mucosa e pela maior proximidade com os vasos sanguíneos, possuidores de hemoglobina, que é um dos principais absorvedores de luz.

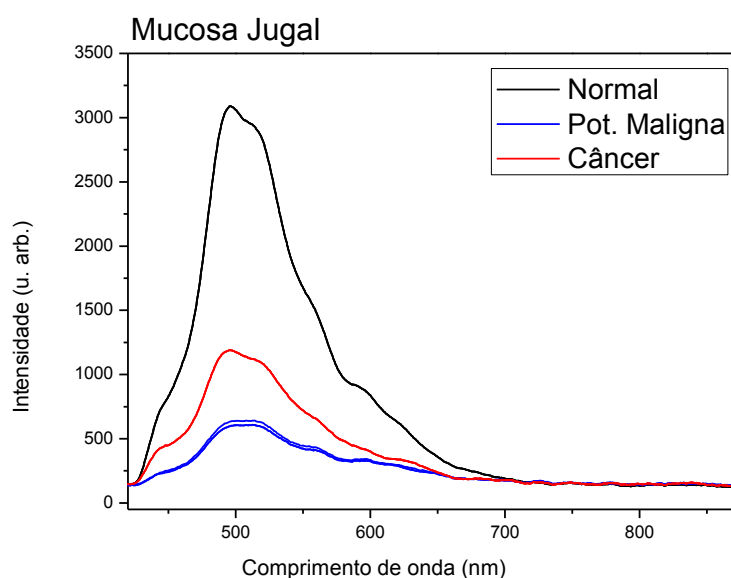


Figura 54 – Espectros de fluorescência com excitação em 406 nm coletados e comparados entre mucosa normal de voluntário, lesão eritroplásica e lesão maligna, região de mucosa jugal.

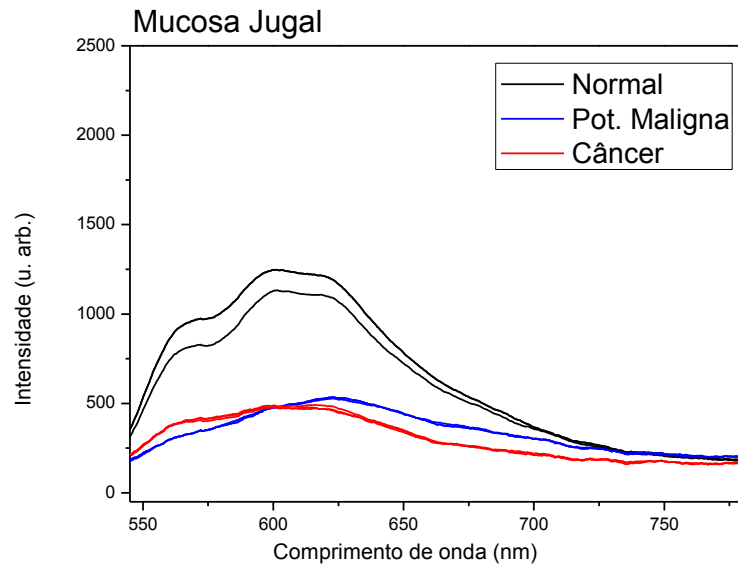


Figura 55 – Espectros de fluorescência com excitação em 532 nm coletados e comparados entre mucosa normal de voluntário, lesão eritroplásica e lesão maligna, região de mucosa jugal.

Todos os gráficos de excitação violeta, em 406 nm foram os que proporcionaram a melhor diferenciação entre as áreas analisadas. Isso pode ter ocorrido devido a uma investigação das camadas mais superficiais do tecido e ter sofrido influência do microambiente. A excitação verde, em 532 nm apresenta maior profundidade de penetração, no entanto os fluoróforos endógenos envolvidos nas lesões carcinomatosas são mais estimulados na região do ultravioleta e as alterações iniciais do tecido epitelial tendem a começar nas zonas mais superficiais.



### **5.3 Análise do *Principal Component Analysis* (PCA)**

A PCA é um processamento matemático que usa uma transformação ortogonal para reduzir a dimensionalidade de variáveis possivelmente correlacionadas em um conjunto de valores de variáveis não dependentes chamado de componentes principais. Quando o processamento da padronização é feito pelos comprimentos de onda, embora seja um método largamente empregado em análises estatísticas, levou aos piores resultados. Os espectros tenderam a ficar “desfigurados” após a padronização dos comprimentos de onda. Cada ponto apresentado em um gráfico de PCA é um espectro coletado.

A primeira análise com o PCA foi feita discriminando somente os espectros de lesões potencialmente malignas, de mucosa normal contralateral de lesões potencialmente malignas e de mucosa normal de voluntários, sem discriminação por sítio anatômico. Foram realizados vários processamentos e, tanto em 406 nm quanto em 532 nm, houve uma tendência de agrupamento dos espectros de mucosa normal contralateral de lesões potencialmente malignas e de mucosa normal de voluntários, mas nem com a normalização pelo máximo foi obtido um resultado satisfatório (Figura 56 e 57).

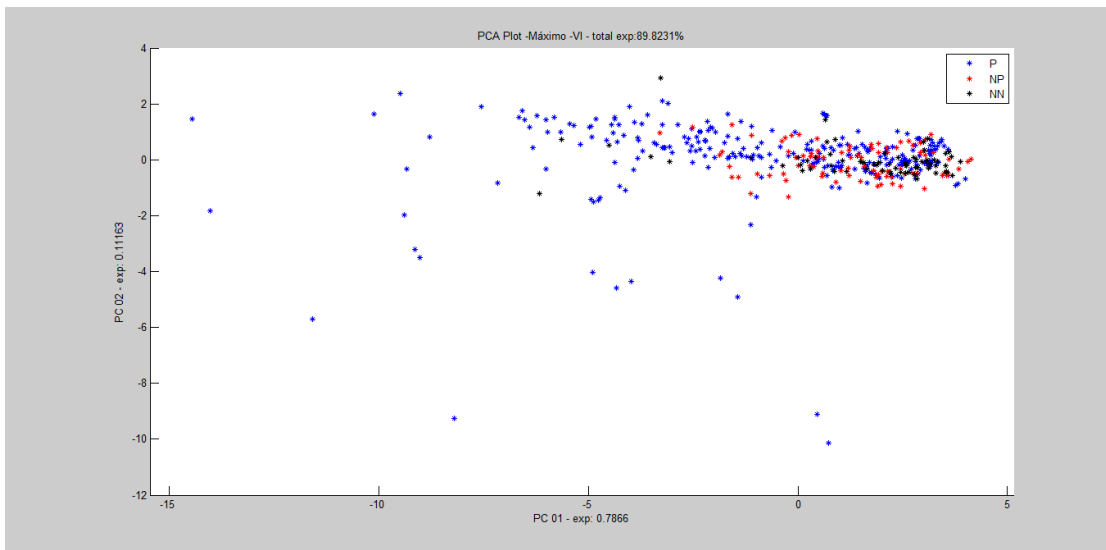


Figura 56 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas (P), mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas (NP) e mucosa normal de voluntários (NN) com excitação em 406 nm e normalização pelo máximo.

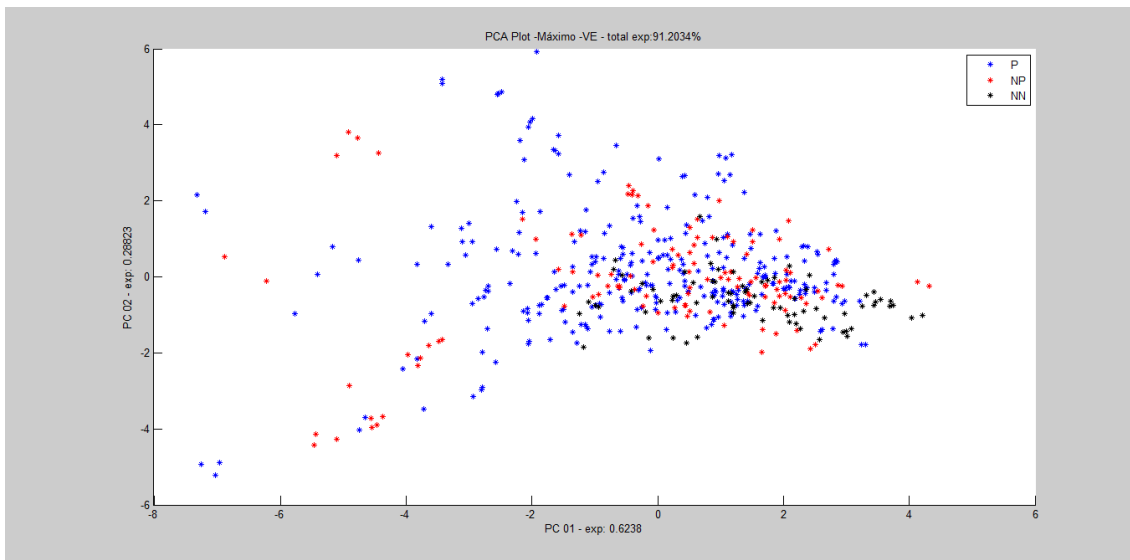


Figura 57 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas (P), mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas (NP) e mucosa normal de voluntários (NN) com excitação em 532 nm e normalização pelo máximo.

Depois foi feita uma análise com o PCA tentando ver a discriminação entre espectros de lesões potencialmente malignas em indivíduos sem lesões de carcinoma epidermóide e regiões de aspecto de lesões potencialmente malignas em indivíduos com lesões de carcinoma epidermóide. Tanto em 406 nm quanto em 532 nm e com a normalização pelo máximo também não foi obtido um resultado satisfatório (Figura 58 e 59).

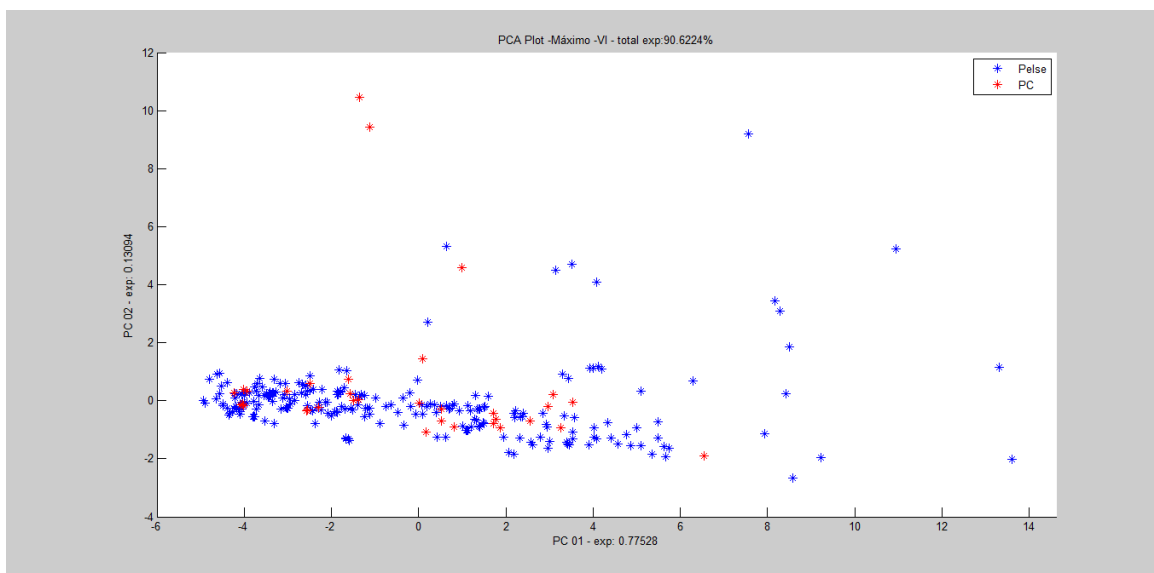


Figura 58 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas em indivíduos sem lesões de carcinoma epidermóide (Pelse) e regiões de aspecto de lesões potencialmente malignas em indivíduos com lesões de carcinoma epidermóide (PC) com excitação em 406 nm e normalização pelo máximo.

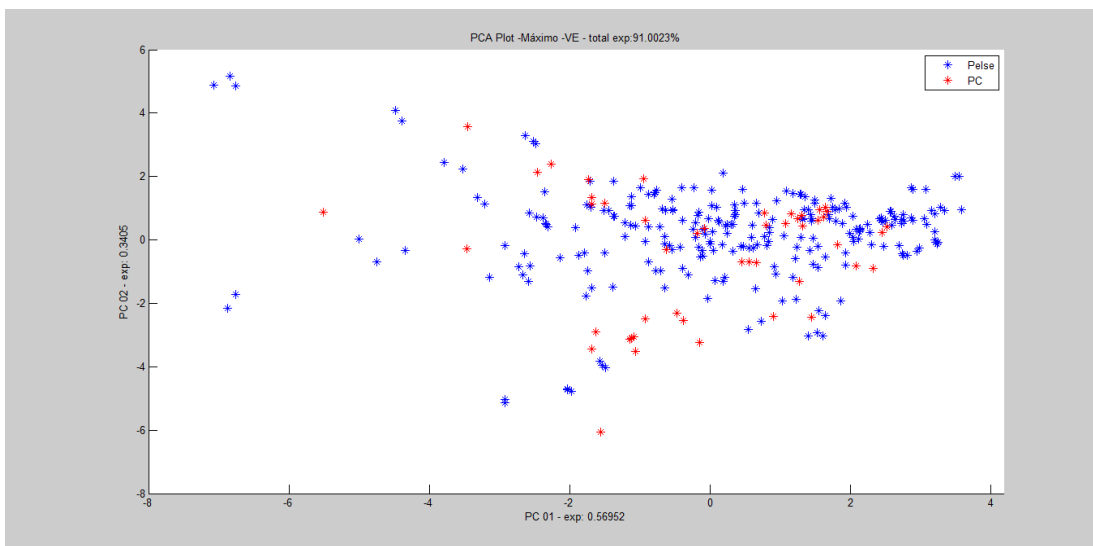


Figura 59 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas em indivíduos sem lesões de carcinoma epidermóide (Pelse) e regiões de aspecto de lesões potencialmente malignas em indivíduos com lesões de carcinoma epidermóide (PC) com excitação em 532 nm e normalização pelo máximo.

Após uma análise global, sem separação por sítio anatômico, foi processada uma PCA dividindo os espectros conforme o sítio anatômico ao qual pertenciam com diversos processamentos. As figuras 60 a 63 são exemplos desses processamentos, também com normalização pelo máximo, na tentativa de discriminar espectros de lesões potencialmente malignas, espectros de mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas e espectros de mucosa normal de voluntários nas regiões de borda de língua e assoalho bucal, nas excitações em 406 nm e 532 nm, respectivamente.

Assim como nas análises globais, houve uma tendência ao agrupamento dos espectros de mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas e espectros de mucosa normal de voluntários, em ambas excitações, e quase em nenhuma circunstância a PCA permitiu a distinção entre os grupos apenas através da análise visual. Duas componentes expressaram 98%

da variância do conjunto de dados, mas mesmo assim incapazes de distinguir visualmente entre os grupos no gráfico de componentes principais.

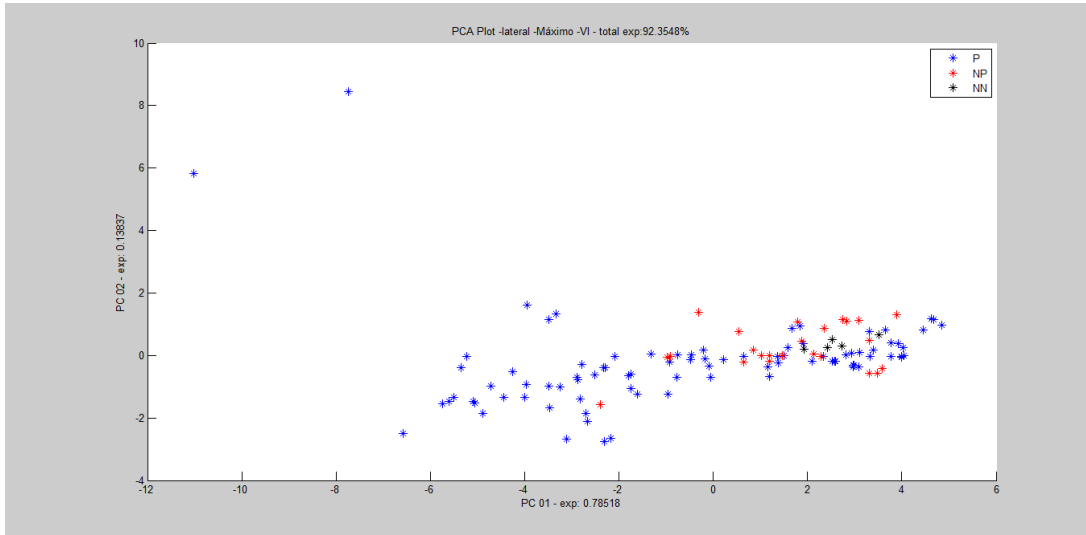


Figura 60 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas (P), mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas (NP) e mucosa normal de voluntários (NN) com excitação em 406 nm e normalização pelo máximo, do sítio borda de língua.

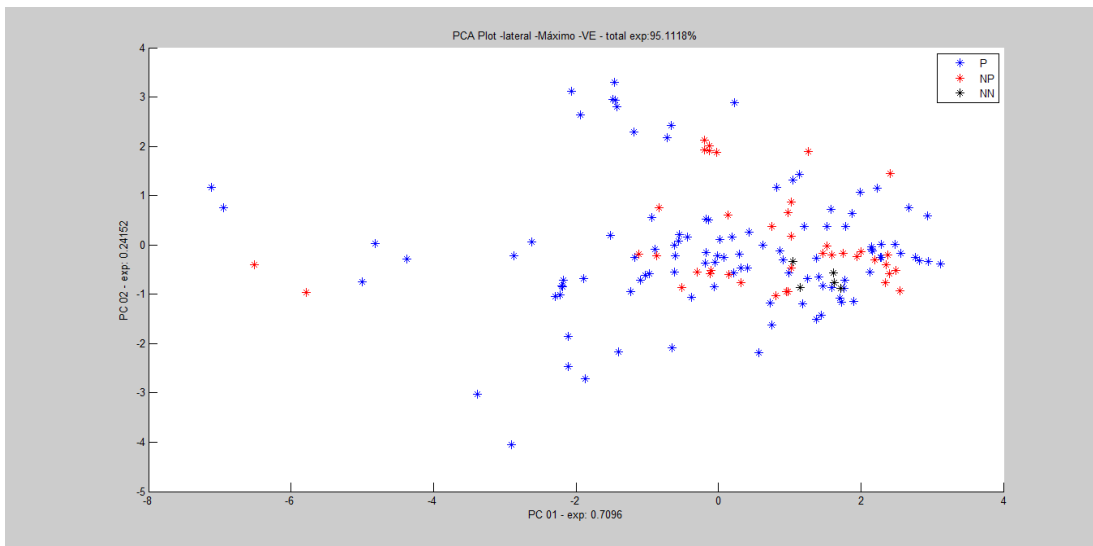


Figura 61 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas (P), mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas (NP) e mucosa normal de voluntários (NN) com excitação em 532 nm e normalização pelo máximo, do sítio borda de língua.

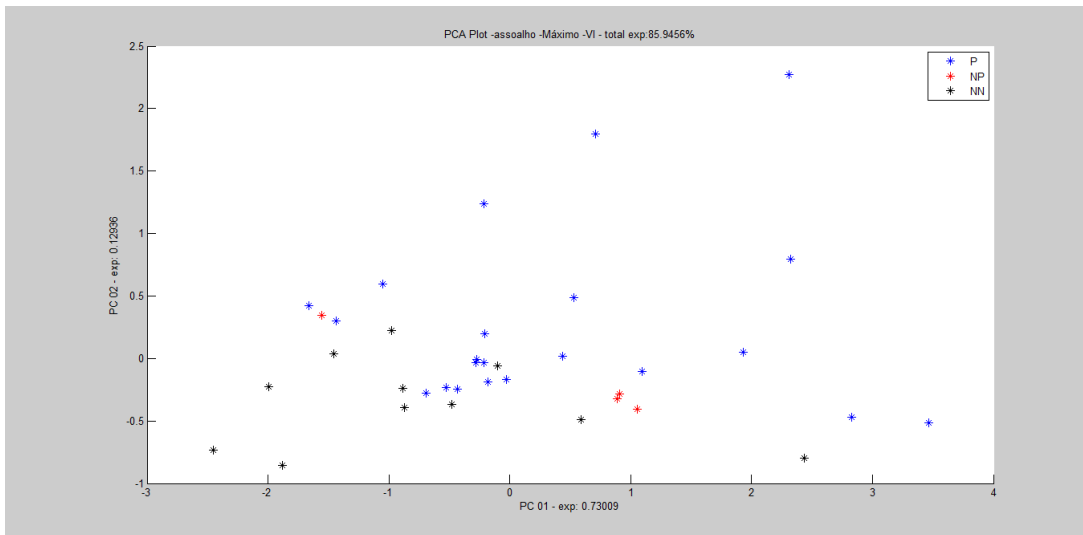


Figura 62 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas (P), mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas (NP) e mucosa normal de voluntários (NN) com excitação em 406 nm e normalização pelo máximo, do sítio assoalho bucal.

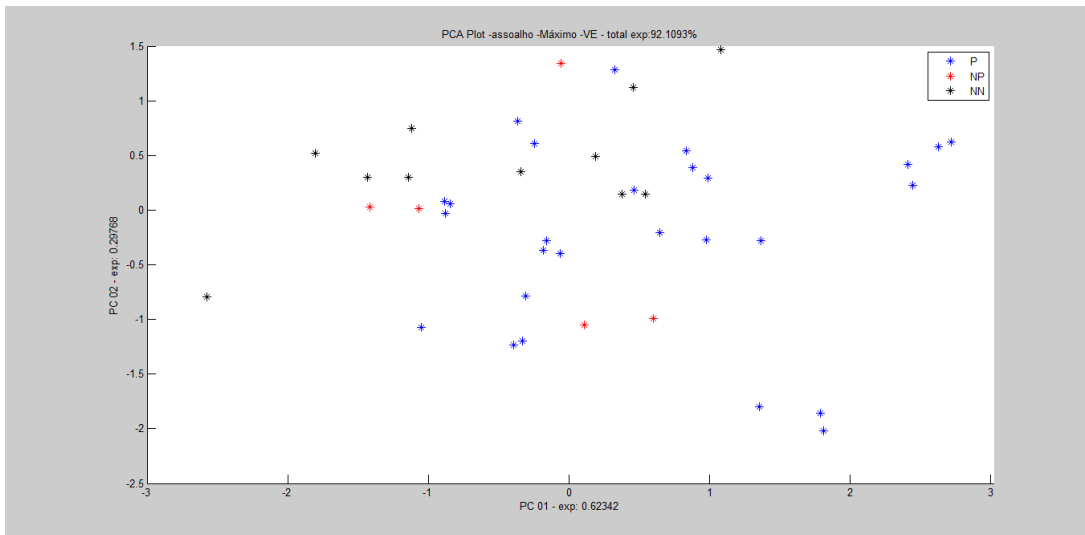


Figura 63 – PCA de discriminação de lesões potencialmente malignas (P), mucosa normal contralateral de indivíduos com lesões potencialmente malignas (NP) e mucosa normal de voluntários (NN) com excitação em 532 nm e normalização pelo máximo, do sítio assoalho bucal.

## 5.4 Índices espectrais

Foram observadas algumas alterações nos espectros de tecidos de lesões potencialmente malignas quando comparados com de tecidos saudáveis, seja na intensidade da luz re-emitida ou no formato da curva do espectro, sendo possível, em alguns casos, observar a formação de uma nova banda. Frente a isso foram estabelecidos índices para verificar se seriam capazes de distinguir entre os grupos das quatro análises distintas: normal de voluntários saudáveis (NN) *versus* normal contralateral de lesões potencialmente malignas (NP), normal de voluntários saudáveis (NN) *versus* lesões potencialmente malignas (P), normal de voluntários saudáveis (NN) *versus* lesões potencialmente malignas (P) *versus*

lesões malignas (C) e lesões potencialmente malignas (P) *versus* lesões potencialmente malignas concomitantes a lesões malignas (PC).

Não houve distinção clara apenas com o uso destes índices para análise global. Entretanto houve ‘separação’ entre alguns grupos em determinados sítios, embora o número de espectros seja muito limitado para determinados sítios.

## 5.5 Classificadores computacionais

Para a segunda análise proposta (P vs NN) foi utilizado o classificador computacional *k-Nearest Neighbor*, o kNN, que é um método de previsão de dados com base em exemplos mais próximos de formação e tem como principal vantagem sua simplicidade e aplicabilidade em classificar um dado pela maioria de seus vizinhos (k), e com o qual obtivemos o seguinte resultado (Tabela 5):

Tabela 5: *Matriz de confusão*

<i>Classe real</i> ↓	<i>P</i>	<i>NN</i>
<i>P</i>	403	40
<i>NN</i>	61	89

*Taxa de verdadeiro positivo: 0.91*

*Taxa de falso positivo: 0.407*

*Precisão: 0.869*

*Recall: 0.91*

*Medida F: 0.889*



Número de vizinhos: 10. Usada distância euclidiana com voto ponderado pelo inverso da distância e desconsiderados objetos que tinham mesma posição do objeto alvo (distância=0). Os valores 403, 40, 61 e 89 presentes na Matriz de confusão são as quantidades de espectros considerados.

Após foram utilizados mais dois algoritmos, o J48, usado para gerar uma árvore de decisão, e o Bayes, usado para demonstrar a relação entre uma probabilidade condicional e a sua inversa.

Os valores faltantes na tabela seguinte (Tabela 6), marcados como (\*\*\*), são de algoritmos que levaram muito tempo para dar resultado e, este, foi inexpressivo. A árvore de decisão J48 foi que apresentou melhor resultado tanto na excitação em verde, 532 nm, como na excitação em violeta, 406 nm. Os valores destacados em vermelho podem ser considerados os melhores classificadores, já que leva a uma acurácia global grande e uma baixa taxa de FP, não levando em consideração informações sobre a intensidade já que foi normalizado pelo máximo.

Tabela 6: Representação dos processamentos matemáticos realizados para análise de acurácia do sistema de espectroscopia de fluorescência.

	VE		VI		
	Accuracy	FP rate	Accuracy	FP rate	
Com normalização pelo máximo	Bayes	0,513	0,200	0,618	0,256
	J48	0,829	0,112	0,887	0,064
	kNN k=3	0,647	0,226	0,769	0,131
	kNN k=7	0,641	0,234	0,760	0,137
	kNN k=11	0,638	0,238	0,768	0,141
	kNN k=15	0,641	0,231	0,750	0,155
	kNN k=19	0,636	0,235	0,748	0,157
	Bayes + ReliefF(10%)	0,515	0,229	***	***
	J48 + ReliefF(10%)	0,834	0,111	<b>0,885</b>	<b>0,066</b>
	Best kNN + ReliefF(10%)	0,630	0,239	***	***
	Bayes + CFS	0,567	0,181	0,626	0,241
	J48 + CFS	<b>0,870</b>	<b>0,088</b>	<b>0,885</b>	<b>0,062</b>
	kNN + CFS	0,672	0,215	***	***

Para a excitação em 406 nm o algoritmo J48+CFS mostrou valores de sensibilidade igual a 88,5% e de especificidade igual a 93,8%; já para excitação em 532 nm o algoritmo J48+CFS obteve valores de sensibilidade igual a 87% e de especificidade igual a 91,2%, ambos com normalização pelo máximo (Tabela 7).

Tabela 7: Representação dos processamentos matemáticos realizados para análise de acurácia do sistema de espectroscopia de fluorescência

	VE		VI			
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade		
Sem normalização	Bayes	0,487	0,777	0,673	0,793	
	J48	0,808	0,878	0,9	0,942	
	kNN k=3	0,65	0,781	0,714	0,832	
	kNN k=7	0,683	0,794	0,727	0,826	
	kNN k=11	0,667	0,772	0,738	0,831	
	kNN k=15	0,667	0,772	0,743	0,827	
	kNN k=19	0,653	0,756	0,741	0,824	
	Bayes + ReliefF(10%)	0,568	0,709	0,687	0,816	
	J48 + ReliefF(10%)	0,834	0,889	0,88	0,934	
	Best kNN + ReliefF(10%)	0,606	0,735	0,679	0,799	
	Bayes + CFS	0,58	0,59	0,676	0,801	
	J48 + CFS	0,825	0,888	0,903	0,94	
	kNN + CFS	0,62	0,746	0,715	0,821	
	Com normalização pelo máximo	Bayes	0,513	0,8	0,618	0,744
		J48	0,829	0,888	0,887	0,936
kNN k=3		0,647	0,774	0,769	0,869	
kNN k=7		0,641	0,766	0,76	0,863	
kNN k=11		0,638	0,762	0,768	0,859	
kNN k=15		0,641	0,769	0,75	0,845	
kNN k=19		0,636	0,765	0,748	0,843	
Bayes + ReliefF(10%)		0,515	0,771	***	***	
J48 + ReliefF(10%)		0,834	0,889	0,885	0,934	
Best kNN + ReliefF(10%)		0,63	0,761	***	***	
Bayes + CFS		0,567	0,819	0,626	0,759	
J48 + CFS		<b>0,87</b>	<b>0,912</b>	<b>0,885</b>	<b>0,938</b>	
kNN + CFS		0,672	0,785	***	***	

## 5.6 Análise Cruzada

Foram selecionados aproximadamente 50 pacientes e 75 sítios (alguns indivíduos apresentavam carcinoma epidermóide (C) em mais de um sítio ou apresentaram recidiva). Entretanto apenas 36 casos apresentaram contra-lateral normal (NC). Foi calculado o seguinte índice: a razão da área sob a curva entre 623,1 e 643,2 nm e a área sob a curva entre 485,4 e 506,6 nm; ou seja, a razão entre integrais. Este índice foi calculado tanto para espectros dos sítios com câncer como das contralaterais normais.

1 – média dos valores:

NC =  $0,35 \pm 0,58$  → média  $\pm$  desvio padrão dos sítios contra-laterais;

C =  $0,83 \pm 1,23$  → média  $\pm$  desvio padrão dos sítios com carcinoma epidermóide.

2 – Variações dentro do paciente:

C-NC=  $0,68 \pm 1,60$  → valor médio e desvio padrão da diferença do índice para o carcinoma epidermóide e contralateral;

C/NC=  $4,14 \pm 7,70$  → valor médio e desvio padrão da razão do índice para o carcinoma epidermóide e contralateral.

Foi notável a alta variabilidade dos valores do índice para C e NC. Se o desvio padrão fosse menor poderíamos inferir que o câncer possui o índice muito mais elevado do que a região normal. Entretanto o número reduzido de pontos e a variabilidade entre os espectros não possibilita conclusões definitivas.

Dados os tipos de processamentos rodados para tentar distinguir curvas espectrais de indivíduos saudáveis *versus* indivíduos com lesões potencialmente

malignas *versus* indivíduos com lesões malignas nem todos os espectros coletados foram analisados. Os espectros das margens de segurança da lesão e os espectros na peça cirúrgica, *ex vivo*, assim como os espectros dos indivíduos sem lesão com história prévia de neoplasia oral e em acompanhamento ambulatorial, ainda estão em fase de processamento.



## 5 DISCUSSÃO

A variação da arquitetura tecidual modifica o padrão do espectro de fluorescência coletado, pois o acoplamento da luz de excitação e o caminho óptico dos fótons (distribuição da luz) em diferentes comprimentos de onda são influenciados pela organização das biomoléculas. A composição bioquímica, especialmente a concentração de biomoléculas absorvedoras, espalhadoras e fluorescentes, define o padrão de fluorescência final coletado pelo sistema. A monocromaticidade da luz empregada possibilita uma maior seletividade de excitação de fluoróforos, absorvedores ou espalhadores, tornando o método mais eficiente (Welch AJ *et al.*, 1997; Kurachi C *et al.*, 2008). A análise de cada espectro foi realizada em função do diagnóstico histopatológico.

Tanto patologia como na clínica a distinção do tecido normal para o alterado só é possível se o profissional souber reconhecer o que é o normal ou uma variação da normalidade para distinção do alterado, do mesmo modo a espectroscopia de fluorescência só pode vir a mostrar o que é alterado se soubermos antes o padrão do que é normal. A busca da definição de padrões justifica a coleta realizada de espectros de indivíduos de mucosa normal como grupo controle.

Apesar dos vários sítios analisados inicialmente serem de mucosa normal de voluntários houve uma grande variabilidade nos espectros de um sítio para o outro, isso ocorreu devido as diferenças na composição bioquímica e na arquitetura do tecido (Ramanujam, 2000; Chu *et al.*, 2006).

A avaliação utilizando a técnica de espectroscopia pontual investiga apenas uma pequena área de tecido, o volume de tecido interagindo com o laser é pequeno, somente no ponto alvo, a profundidade de penetração do laser na região entre violeta e verde se restringe a camadas superficiais do tecido e a intensidade de fluorescência emitida pelo tecido é inferior ao espalhamento no mesmo dificultando a coleta, sendo estas limitações da técnica. Poh CF *et al.* (2006)

utilizando a técnica de autofluorescência por campo de imagem mostram a eficácia de uma simples luz de mão (excitação em 400-460 nm) para delinear a verdadeira extensão de um tumor o que, por sua vez, pode ser útil para guiar a remoção completa do câncer bucal na sala de operação. Mudanças ópticas, especificamente, a perda de fluorescência, no epitélio e em torno de câncer bucal foi usada para mapear o campo de extensão do câncer. A correlação de características histopatológicas e alterações genéticas específicas indicam que a visualização de fluorescência é muito superior ao julgamento clínico sozinho em medir o tamanho, extensão e distribuição do campo acometido por câncer (Poh CF *et al.*, 2006; Westra WH *et al.*, 2006).

A vantagem do diagnóstico óptico por imagem é a possibilidade de análise de um campo de investigação de alguns centímetros quadrados permitindo a identificação de heterogeneidades superficiais da lesão ou de lesões ocultas. Já a técnica de espectroscopia pontual, mediada por sonda de leitura com fibras ópticas, fornece uma informação mais detalhada da luz coletada e possibilita a quantificação relativa de fótons emitidos em cada comprimento de onda em alterações sub-celulares de arquitetura, tais como o tamanho nuclear e relação núcleo/citoplasma, tamanho mitocondrial e densidade entre outros, que se correlaciona com características, muitas vezes utilizadas pelos patologistas na realização de avaliação histológica (Xin-Hua Hu *et al.*, 2005; Westra WH *et al.*, 2006; Upile T *et al.*, 2009).

É constatado que espectros de fluorescência coletados no mesmo tecido mostram formas diferentes dependendo da excitação utilizada. Esta variação ocorre devido a profundidade de penetração e aos fluoróforos excitados em cada comprimento de onda. Comparativamente a excitação em 532 nm apresenta uma maior profundidade de penetração em relação à excitação em 406 nm (Kurachi, C. *et al.*, 2008). Além disso, as características do tecido em que os fluoróforos endógenos estão presentes têm grande influência. A hemoglobina, que está presente nos espaços vasculares na camada do estroma absorve uma parcela da fluorescência emitida, esta constatação é particularmente visível na excitação em



406 nm. Fluoróforos epiteliais como NADH também desempenham um papel nas características dos espectros de profundidades rasas e fluoróforos estromais, como o colágeno contribuem para o sinal medido a partir de regiões mais profundas (Heintzelman DL *et al.*, 2000; Pavlova I *et al.*, 2008; Schwarz RA *et al.*, 2008).

Schwarz RA *et al.* (2008) sugerem que os comprimentos de onda curtos podem ser mais sensíveis do que os profundos na captação de alterações nas propriedades de espalhamento óptico, onde as mudanças iniciais detectadas no epitélio, como tamanho nuclear e à relação núcleo/citoplasma, e na região superficial do estroma ocorrem. No tecido não ceratinizado, o desempenho do diagnóstico óptico foi conseguido usando apenas espectros profundidades curto e médio. A discriminação dos espectros de sítios normais e alterados é um pouco melhor quando utilizado excitações de menores alcances, que é fortemente inclinado para a camada epitelial e minimiza os efeitos da absorção de hemoglobina.

A fluorescência de alta resolução e a microscopia confocal de tecido oral variável têm elucidado a autofluorescência e as características de dispersão das camadas do epitélio e do estroma em condições de tecidos normais, benignos e displásicos (Pavlova I *et al.*, 2008; Pavlova I *et al.*, 2008). Pavlova I *et al.* (2008) sugerem que o epitélio oral pode ser dividido em três camadas com diferentes propriedades ópticas. O epitélio bucal superficial é composto por uma camada de ceratina, que varia em espessura, dependendo da localização anatômica. O fluoróforo principal do epitélio superficial é a queratina, sendo que logo abaixo há uma camada de epitélio não ceratinizado e é ocupado por células intermediárias e basais metabolicamente ativas e com menor dispersão. A fluorescência a partir do epitélio não ceratinizado está associada com os indicadores metabólicos NADH e FAD, que aumentam nas amostras de displasias orais.

O processo de carcinogênese envolve uma sinalização bioquímica entre o epitélio e a matriz extracelular, são esperadas alterações nas propriedades ópticas do estroma superficial com a progressão da doença mais do que as do estroma

profundo. A fluorescência relacionada ao colágeno, elastina e a angiogênese é significativamente reduzida em lesões orais displásicas e inflamatória, especialmente na camada do estroma logo abaixo do epitélio displásico. A progressão da mucosa oral normal em displasia resulta numa diminuição da fração do volume colágeno, diminuição da dispersão do estroma bem como a angiogênese que também pode ser mais proeminente no estroma superficial (Pavlova I *et al.*, 2008).

A presença de inflamação pode ser um outro fator complicador de diagnóstico espectroscópico de lesões orais; autofluorescência reduzida devido a inflamação pode ser difícil de distinguir de autofluorescência reduzida devido a neoplasia. Como a inflamação afeta principalmente o estroma enquanto ocorrem mudanças displásicas no epitélio, dados espectrais sensíveis a profundidade, particularmente obtidos a partir de camadas mais superficiais, podem fornecer mais informações úteis para discriminar lesões benignas inflamatórias de lesões displásicas ou malignas (Schwarz RA *et al.*, 2008)

Lesões eritematosas apresentam uma menor intensidade de fluorescência, em comparação às lesões leucoplásicas, provavelmente pela maior presença de hemoglobina, cromóforo endógeno que absorve tanto luz de excitação na região do violeta e do verde, como a fluorescência que está sendo emitida pelo tecido. Já as lesões leucoplásicas têm um comportamento diferente na re-emissão da luz porque são ricas em ceratina, a qual que tem um papel de destaque nos fenômenos de espalhamento e absorção e na intensidade da fluorescência re-emitida (van Staveren, *et al.*, 2000).

As lesões leucoplásicas foram, na maioria das vezes, lesões hiperacetatóticas (sem atipia) ou displasias leve e moderada, que produziram espectros de fluorescência semelhantes aos do tecido normal, no entanto um maior retroespalhamento pode ser observado, semelhantemente encontrado em outros estudos (Sharwani A *et al.*, 2006; Rahman MS *et al.*, 2010). Já as mucosas eritroplásicas foram diagnosticadas com um grau mais avançado de atipia e até um

carcinoma microinvasor, estas, produziram espectros de fluorescência mais alterados em comparação com o normal e houve uma tendência a terem menor re-emissão de luz. Estes resultados corroboram com estudo de Ebihara A *et al.* (2003).

A mucosa quando em estado normal apresenta coloração mais rósea clara, o que contribui para uma maior reflexão da luz do que a mucosa eritroplásica. A figura 33 fugiu desse padrão vindo a apresentar os espectros coletados da região eritroplásica mais intensos do que os da mucosa contralateral normal. Isso pode ter ocorrido pela presença de vasos sanguíneos mais superficiais na região normal ou pressão exercida no ato da coleta ou, também, devido aos fluoróforos endógenos presentes na lesão, bem como o mau posicionamento da ponteira e a conseqüente entrada de luz ambiente ou uma associação desses fatores. Sendo esta é uma deficiência da técnica pontual e por isso os resultados foram analisados com normalização pelo máximo.

A fluorescência emitida será diferente dependendo das características do tecido investigado (van Staveren *et al.*, 2000). Clinicamente podemos confirmar está observação tendo como exemplo a figura 21(C) que é uma eritroleucoplasia com regiões eritematosas, regiões esbranquiçadas e regiões acastanhadas, e apresenta uma interação da luz com o tecido. As diferentes alterações presentes no tecido, por exemplo, uma pigmentação acastanhada só é possível de visualização quando uma luz emitida é absorvida, espalhada e refletida do mesmo. Pavlova I *et al.* (2008), usando um modelo de Monte Carlo, viram que 43% a 66% do total de luz detectada com uma sonda de profundidade seletiva, variando de 280 nm a 420 nm, originava-se da espessura do epitélio não queratinizado.

Frente a uma lesão ulcerada com invasão dos tecidos vizinhos e mucosa com bordas elevadas e endurecidas, uma característica clínica importante para interação luz/tecido biológico é a presença de tecido necrótico no centro da lesão e um maior grau de contaminação por microorganismos orais. No caso a

contaminação bacteriana é importante porque algumas bactérias produzem porfirina, e esta, pode alterar o resultado da fluorescência intrínseca do tecido. Saindo do local de contaminação por microorganismos orais a discriminação óptica vem sendo principalmente associada a um decréscimo da intensidade de fluorescência emitida na região tumoral em comparação com a região sadia. Este fato vem sendo correlacionado com a diminuição das ligações cruzadas de colágeno e das fibras componentes da matriz (Heintzelman *et al.*, 2000; Staveren *et al.*, 2000; Kurachi C, 2008).

Resultados similares têm sido relatados previamente em outros estudos clínicos sobre detecção de câncer bucal. De Veld *et al.* (2005) observaram que sítios displásicos e tumorais são acompanhados por uma queda progressiva da intensidade de fluorescência, enquanto que Lane *et al.* (2006) relataram uma perda do sinal de autofluorescência em imagens de lesões orais potencialmente malignas e malignas em comparação a mucosa normal ao redor da lesão. Os resultados desses estudos indicam que a fluorescência dos espectros pode ser composta por dois componentes espectrais: células epiteliais (NADH) e estroma (colágeno), e que o epitélio aumenta a contribuição, enquanto que a contribuição do estroma diminui com a transformação maligna. A fluorescência reduzida associados com neoplasia foi observada em uma ampla gama de excitação comprimentos de onda de 330 nm até 470 nm no estudo de Schwarz RA *et al.* (2008).

Com resultados semelhantes a este estudo Kurachi *et al.* (2008) estudaram lesões cancerosas induzidas em borda de língua de hamsters e alcançaram vários tipos clínico de câncer, como lesões exofíticas, ulceradas, mostrando os diferentes níveis de invasão, associada ou não com leucoplasia e eritroplasia; e cada característica das lesões apresentaram diferentes características espectrais. Para algumas lesões de câncer, a excitação azul foi mais eficiente e para os outros a excitação verde foi melhor. Isso ilustrou a interação de luz distintas em diferentes tipos de lesão, desde a bioquímica e características estruturais.

Observou-se também que a diferença nos espectros medidos clinicamente em 500 nm a 560 nm na região é causada por superestimar a contribuição de FAD (presumida como fluoróforo no epitélio intermediário) para o total detectado por fluorescência. Contudo, também é possível que esta camada tenha contribuições de ambas as FAD e NADH, o que melhoraria a predição e medição da média de espectros. Assim, nota-se que uma técnica direta para estimar as características espectrais das subcamadas epiteliais, tal como medir os espectros de fluorescência diretamente das imagens confocal de fatias de tecido por meio de imagem espectral, poderia melhorar significativamente a precisão das medições.

Pavlova I *et al.* (2009) estudaram a excitação UV a partir de quatro locais diferentes na língua de um único paciente. Um dos quatro locais foi clínica e histologicamente normal, os outros três locais foram lesões orais que foram diagnosticados histologicamente como inflamação, displasia e câncer, respectivamente. O tecido oral normal foi caracterizado por forte autofluorescência epiteliais e estromais. Em contrapartida, a lesão diagnosticada com uma grave inflamação apresentava uma grande queda na fluorescência tanto do epitélio quanto do estroma. Além disso, enquanto a fluorescência do estroma do tecido normal originava-se a partir de fibras de colágeno, a fluorescência do estroma inflamado teve origem predominantemente de células inflamatórias. A lesão oral com diagnóstico de displasia foi caracterizada por aumento da espessura epitelial com células fluorescentes em todo o epitélio e uma queda na fluorescência do estroma superficial. Imagens confocal de uma lesão maligna diagnosticados como

McGee S *et al.* (2009) viram que a camadas típica do desenvolvimento do câncer.

discriminação de lesões displásicas *versus* maligna foi mais bem sucedida quando algoritmos foram desenhados para sítios individuais. Semelhante resultado foi obtido neste estudo. A combinação de sítios com as mesmas propriedades espectrais (assoalho de boca e borda lateral da língua) produziram uma

discriminação mais exata e consistente desempenho do que algoritmos desenvolvidos para todos os sítios.

O comportamento de dispersão de fluorescência observada para diferentes estágios de desenvolvimento de carcinoma foi confirmado de acordo com índices definidos. Embora os mecanismos exatos não sejam bem entendidos, as mudanças na atividade metabólica da superfície de células epiteliais induzem mudanças espectrais que conferem “assinaturas” de fluorescência do tecido. Em certos comprimentos de onda, lesões potencialmente malignas da cavidade oral mostram menos fluorescência do que a mucosa oral normal circundante. Dada esta maior capacidade para visualizar lesões potencialmente malignas diretamente, o emprego de visualização por fluorescência foi usado em algumas populações de risco para o desenvolvimento carcinoma de células escamosas do pulmão, cavidade oral e outros sítios em outros estudos (Pavlova I *et al.*, 2008).

A semelhança entre as formas dos espectros dos tecidos normais e cancerosos significativamente reduz a confiabilidade desta técnica para o câncer detecção. Vários métodos têm sido investigados para resolver este problema por uma análise estatística dos dados espectrais para diminuir o “barulho” ou o emprego de excitação em múltiplos comprimentos. Métodos de análise multivariada com base no Principal components analyses (PCA) e no vetor da sustentação máquinas foram introduzidas para identificar as características espectrais que podem ser correlacionadas com a condição de patologia dos tecidos. O PCA é um método estatístico de tratamento de dados bastante empregado para a análise de espectros, mas existem diversos tipos de procedimentos matemáticos que podem ser realizados para a melhor discriminação (classificação) das amostras. (Xin-Hua Hu *et al.*, 2005).

O alto nível de sensibilidade e especificidade obtidos com um procedimento não invasivo demonstra o poder da espectroscopia de fluorescência como uma ferramenta de diagnóstico para detecção de carcinoma, especialmente considerando que o grupo carcinoma apresentaram grande variabilidade. Uma

técnica de diagnóstico, com resposta rápida pode fornecer informações importantes para o clínico, ajudar na classificação da lesão, a digitalização de extensas áreas, a delimitação da margem da lesão, e também na escolha do local da biópsia (Kurachi C *et al.*, 2008).

As características clínicas distintas foram observadas em diferentes comportamentos de espectros de fluorescência. A excitação violeta mostrou melhores níveis de sensibilidade e de especificidade para discriminação do normal *versus* carcinoma em comparação com excitação em 532 nm. A análise com o algoritmo J48 apresentou resultado superior para excitação violeta em comparação com a verde.

Nossos resultados demonstram o potencial do diagnóstico de espectroscopia de fluorescência de forma objetiva e não invasiva, distinguindo sítios displásicos e cancerosos de mucosa oral normal. Além disso, estes resultados apoiam a utilização de um sistema de espectroscopia óptica de profundidade sensíveis para melhorar o desempenho no diagnóstico.





## 7 CONCLUSÕES

A espectroscopia de fluorescência tem sensibilidade e especificidade significativa para diagnosticar tecido neoplásico, tanto na excitação em 406 nm como em 532 nm, sendo que a excitação em 406 nm foi mais eficiente, podendo ser utilizada como uma ferramenta auxiliar de diagnóstico clínico na discriminação de mucosa normal *versus* mucosa potencialmente maligna *versus* câncer.



## REFERÊNCIAS

1. Alexander RE, Wright JM, Thiebaud S. Evaluation, documenting and following up oral pathological conditions: A suggested protocol. *J Am Dent Assoc (JADA)*. 2001; 132: 329-335.
2. Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Br Cancerol*. 2007; 53: 63-69.
3. Chu SC, Hsiao T-CR, Lin JK, Wang C-Y, Chiang HK. Comparison of performance of linear multivariate analysis methods for normal and dysplasia tissues differentiation using autofluorescence spectroscopy. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2006; 53: 2265-73.
4. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 8ª Ed., Ed. Elsevier, 2010.
5. Cruz MCFN, Almeida KGB, Lopes FF, Bastos EG, Freitas RA. Levantamento das biópsias da cavidade oral realizadas no Hospital Universitário – Unidade Presidente Dutra / UFMA, da cidade de São Luís - MA, no período de 1992 a 2002. *Rev. Bras. Patol. Oral*. 2005; 4(3): 185-188.
6. Deepak Kademani, Oral Cancer. *Mayo Clin Proc.*; July 2007; 82(7): 878-887.
7. Döbróssy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*. 2005; 24(1): 9-17.
8. Ebihara A, Krasieva TB, Liaw LLH, Fago S, Messadi D, Osann K *et al*. Detection and diagnosis of oral cancer by light-induced fluorescence. *Lasers in Surg and Medicine*. 2003; 32: 17-24.
9. Fryen A, Glanz H, Lohmann W, Dreyer T, Bohle RM. Significance of autofluorescence for the optical demarcation of field cancerisation in the upper aerodigestive tract. *Acta Otolaryngol* 1997; 117: 316-319.

10. Ganesan S, Sacks PG, Yang Y, Katz A, Al-Rawi M, Savage HE *et al.* Native fluorescence spectroscopy of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Biochem Biophys* 1998; 16: 365-373.
11. Georgakoudi I, Jacobson BC, Müller MG, Sheets EE, Badizadegan K, Carr-Locke DL *et al.* NAD(P)H and collagen as *in vivo* quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer Res.* 2002; 62: 682-87.
12. Gillenwater A, Jacob R, Ganeshappa R, Kemp B, El-Naggar AK, Palmer L *et al.* Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and native tissue autofluorescence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124: 1251-58.
13. Gorsky RD, Schwartz E, Dennis D. The morbidity, mortality, and economic costs of cigarette smoking in New Hampshire. *J Community Health.* 1990; 15(3): 175-83.
14. Hamada GS, Bos AJ, Kasuga H, Hirayama T. Comparative epidemiology of oral cancer in Brazil and India. *Tokai J Exp Clin Med.* 1991; 16(1): 63-72.
15. Harris DM, Werkhaven J. Endogenous porphyrin fluorescence in tumors. *Lasers Surg Med* 1987; 7: 467-472.
16. Heintzelman DL, Utzinger U, Fuchs H, Zuluaga A, Gossage K, Gillenwater AM *et al.* Optimal excitation wavelengths for *in vivo* detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy. *Photochem Photobiol.* 2000; 72: 103-13.
17. Hosni ES, Salum FG, Cherubini K, Yurgel LS, Zancanaro MA. Oral Erythroplakia and Speckled Leukoplakia: retrospective analysis of 13 cases. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009; 75(2): 295-9.
18. Inaguma M, Hashimoto K. Porphirin-like fluorescence in oral cancer. *In vivo* fluorescence spectral characterization of lesions by use of a near ultraviolet excited autofluorescence diagnosis system and separation of fluorescent extracts by capillary electrophoresis. *Cancer* 1999; 86:2201-2211.
19. Ingrams DR, Dhingra JK, Roy K, Perrault DF Jr, Bottrill ID, Kabani S *et al.* Autofluorescence characteristics of oral mucosa. *Head Neck.* 1997; 19(1): 27-32.

20. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Brasil. 2010. [acesso 2010 Dez 28]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.
21. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN, 2010. [acesso 2010 Out 29]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/>.
22. Jameson MJ, Levine PA. Neoplasms of the oral cavity. In: Bailey BJ, Johnson JT; editors. Head and Neck Surgery Otolaryngology. 4 ed. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, USA; 2006. v.2.p.1551-68.
23. Johnson NW. Aetiology and risk factors for oral cancer, with special reference to tobacco and alcohol use] Magy Onkol. 2001; 45(2): 115-122.
24. Kowalski LP, Parise O, Lehn C. Diagnóstico e tratamento - Câncer de Cabeça e Pescoço. 1. ed. revisada. Ed. Âmbito: São Paulo, Brasil; 2008. Parte II. P.93-141.
25. Kurachi C, Fontana CR, Melo CAS, Rosa LEB, Bagnato VS. Optical biopsy of chemical-induced tongue lesions in Golden Syrian hamsters: na *in vivo* study. Laser Physics. 2004; 14(4): 502-06.
26. Kurachi C, Fontana CR, Rosa LEB, Bagnato VS. Fluorescence spectroscopy for the detection of tongue carcinoma – validation in an animal model. J Biomed Optics. 2008; 13(3): 1-6.
27. Lane PM, Gilhuly T, Whitehead P, Zeng H, Poh CF, Ng S *et al*. Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. J Biomed Optics. 2006; 11: 1-7.
28. McGee S, Mardirossian V, Elackattu A, Mirkovic J, Pistey R, Gallagher G *et al*. Anatomy-Based Algorithms for Detecting Oral Cancer Using Reflectance and Fluorescence Spectroscopy. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2009; 118(11): 817–826.
29. Müller MG, Valdez TA, Georgakoudi I, Backman V, Fuentes C, Kabani S. Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma. Cancer. 2003; 97: 1681-92.
30. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin. 2002; 52:195-215.

31. Neville BW, Damm DD. Patologia oral e maxillofacial. 5ª ed., Ed. Elsevier 2009.
32. Owen AJ. Uses of derivative spectroscopy – Application Note. Germany, 1995. [acesso 2011 Jan 10]. Disponível em <http://www.youngjin.com/application/AN-0608-0115EN.pdf>.
33. Palmer GM, Marshek CL, Vrotsos KM, Ramanujam N. Optimal methods for fluorescence and diffuse reflectance measurements of tissue biopsy samples. *Lasers Surg Med* 2002; 30:191-200.
34. Pavlova I, Weber CR, Schwarz RA, Williams M, Gillenwater A, Richards-Kortum R. Fluorescence Spectroscopy of Oral Tissue: Monte Carlo Modeling with Site-Specific Tissue Properties. *J Biomed Optical*. 2009; 14(1): 014009.
35. Pavlova I, Williams M, El-Naggar A, Richards-Kortum R, Gillenwater A. Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: high-resolution fluorescence microscopy in viable tissue. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 2396-2404.
36. Pavlova I, Weber CR, Schwarz RA, Williams M, El-Naggar A, Gillenwater A et al. Monte Carlo model to describe depth selective fluorescence spectra of epithelial tissue: applications for diagnosis of oral precancer. *J Biomed Opt*. 2008; 13(6): 064012.
37. Pindborg, JJ. Câncer e pré-câncer bucal. 1. ed., São Paulo, Ed. Panamericana, 1981.
38. Poh CF, Zhang L, Anderson DW, Durham JS, Williams PM, Priddy RW *et al*. Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients *Clin Cancer Res* 2006; 12:6716-6722.
39. Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*. 2000; 2: 89-117.
40. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Thomsen S, Malpica A, Wright T *et al*. Development of a multivariate statistical algorithm to analyze human cervical tissue fluorescence spectra acquired *in vivo*. *Lasers Surg Med*. 1996; 19: 46-62.

41. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia: a review. *Oral Oncol.* 2005; 41(6): 551-61.
42. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Investig.* 2001; 5(4): 207-13.
43. Sauk, JJ; Reynolds, MA; Coletta, RD. Pathogenesis and progression of oral cancer. In: Ord, RA; Blanchaert Jr., RH. *Oral cancer: the dentist's role in diagnosis, management, rehabilitation, and prevention.* Carol Stream, Quintessence Publishing Co. 2000; Cap.2: 9-19.
44. Schwarz RA, Gao W, Weber CR, Kurachi C, Lee JJ, El-Naggar AK *et al.* Noninvasive Evaluation of Oral Lesions Using Depth-sensitive Optical Spectroscopy. *Cancer.* 2009; 15: 1669-79.
45. Sharwani A, Jerjes W, Salih V, Swinson B, Bigio IJ, El-Maaytah M *et al.* Assessment of oral premalignant using elastic scattering spectroscopy. *Oral Oncology.* 2006; 42: 343-349.
46. Silverman, S. Early diagnosis of oral cancer. *Cancer.* 1988; 62: 1796-99,
47. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 1984; 53: 563-568.
48. Silverman S Jr. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *J Am Dent Assoc.* 1968; 76: 772-777.
49. Sonis, ST; Fazio, RC; Fang, L. *Princípios e prática de medicina oral.* 2. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1995.
50. Tan PN, Steinbach M, Kumar V. *Introduction to data mining.* Addison-Wesley Companion Book Site. 2006. [acesso 2011 Jan 10]. Disponível em <http://www-users.cs.umn.edu/~kumar/dmbook/index.php>.
51. Union for International Cancer Control (UICC). 2009. [acesso 2010 Dez 28]. Disponível em <http://www.uicc.org/tobaccom>.

52. Upile T, Jerjes W, Sterenborg JCM, El-Naggar A, Sandison A, Witjes MJH et al. Head and Neck optical diagnosis: vision of the future of surgery. *Head and Neck Oncology*. 2009; 1: 25.
53. van der Waal I, Schepman KP, van der Meij, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncology*. 1997; 33(5): 291-301.
54. van Staveren HJ, van Veen RLP, Speelman OC, Witjes MJH, Star WM, Roodenburg JLN. Classification of clinical autofluorescence spectra of oral leukoplakia using an artificial neural network: a pilot study. *Oral Oncol*. 2000; 36: 286-293.
55. Veld DCG, Skurichina M, Witjes MJH, Duin RPW, Sterenborg DJCM, Star WM. Autofluorescence characteristics of healthy oral mucosa at different anatomical sites. *Lasers Surg Med* 2003; 32: 367-376.
56. Xin-Hua Hu, Ju Quin Lu. Optical Detection of Cancers. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. Ed. Taylor & Francis. 2005.
57. Welch AJ, Gardner C, Richards-Kortum R, Chan E, Criswell G, Pfefer J *et al*. Propagation of Fluorescent Light Lasers in Surgery and Medicine. 1997; 21: 166–178.
58. Westra WH, Sidransky D. Fluorescence Visualization in Oral Neoplasia: Shedding Light on an Old Problem. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(22): 6594-97.
59. Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ*. 2001; 65(4): 306-12.
60. World Health Organization. 2010. [acesso 2010 Dez 28]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>.



## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(portador de mucosa normal)

Título da Pesquisa: “ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE NEOPLASIA BUCAL”

- I- **Justificativa:** O câncer bucal é uma doença perfeitamente curável se detectado precocemente.
- II- **Objetivo:** Nessa pesquisa, pretende-se visualizar, por meio da aplicação de luz, alterações nos tecidos bucais, para se tentar detectar precocemente o câncer bucal.
- III- **Procedimento de coleta:** O (A) Sr.(a) será submetido (a) a um exame clínico de sua boca e após, será aplicado um aparelho desinfetado que emite uma fonte de luz em alguns locais de sua boca. Será realizada coleta de material de sua boca, para análise das células da mucosa. O procedimento será realizado com o auxílio de uma pequena escova que será friccionada, com leve pressão, em sua mucosa, por alguns segundos.
- IV- **Desconforto ou riscos:** Os procedimentos de aplicação da luz e coleta de material de sua boca não trarão prejuízos a sua boca e a sua saúde. Na aplicação da luz, o (a) Sr. (a) sentirá apenas um leve toque da ponta do aparelho que desaparecerá imediatamente após o exame, que será de alguns minutos. Na coleta do material da boca, o (a) Sr. (a) vai sentir apenas um pequeno desconforto, no momento do procedimento, que cessará após o mesmo, sem nenhum risco a sua saúde.
- V- **Benefícios:** O (a) Sr. (a) não terá nenhum benefício imediato com a participação no estudo. O estudo poderá trazer informações relevantes para o posterior estabelecimento da técnica de espectroscopia de fluorescência para o diagnóstico precoce do câncer bucal.
- VI- **Ficha de coleta e privacidade:** Os dados referentes à sua identificação, saúde e tratamento serão anotados em uma ficha de coleta que ficará sob responsabilidade do pesquisador responsável, com a garantia de que haverá sigilo quanto a sua identidade. A coleta será identificada apenas por um número.
- VII- **Dúvidas:** Qualquer dúvida, não receie em perguntar quantas vezes necessário, e o (a) Sr. (a) será esclarecido em qualquer momento da pesquisa.
- VIII- **Abandono:** Caso não deseje participar dessa pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, poderá fazê-lo em qualquer momento.
- IX- **Despesas:** A participação nesta pesquisa não implicará em qualquer despesa ao Sr. (a).
- X- **Indenização/ressarcimento:** Não há nenhum tipo de ressarcimento previsto, pois não haverá nenhum risco potencial ao (à) Sr. (a) decorrente desta pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, RG número \_\_\_\_\_, abaixo assinado, declaro que busco participar no Trabalho intitulado “ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE NEOPLASIA BUCAL”, declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa sem que isso implique em prejuízo ao meu tratamento e que não preciso apresentar justificativas para isso. Sei também de todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos na pesquisa só serão utilizados para divulgação científica em reuniões e revistas científicas. Serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato desses poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa. Concordo também em responder às questões contidas no formulário que me foi apresentado. Qualquer dúvida, contatarei um dos pesquisadores envolvidos na pesquisa, Luiz Paulo Kowalski pelo telefone (11) 2189-5172, ou Cristina Kurachi pelo telefone (16) 3373-9810, para questões sobre os direitos e/ou danos relacionados à pesquisa. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo – SP, pelo telefone (11) 2189-5020. Assim, concordo em participar da pesquisa em questão. Declaro ainda que uma via do presente Termo de Consentimento me foi entregue.

São Paulo, \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Este formulário foi lido enquanto eu estava presente.

Nome da testemunha 1 \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Nome da testemunha 2 \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(portador de mucosa alterada)

Título da Pesquisa: “ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE NEOPLASIA BUCAL”

- I- **Justificativa:** O câncer bucal é uma doença perfeitamente curável se detectado precocemente.
- II- **Objetivo:** Nessa pesquisa, pretende-se visualizar, por meio da aplicação de luz, alterações nos tecidos bucais, para se tentar detectar precocemente o câncer bucal.
- III- **Procedimento de coleta:** O (A) Sr.(a) será submetido (a) a um exame clínico de sua boca e, caso haja a presença de área alterada na sua boca, será aplicado um aparelho desinfetado que emite uma fonte de luz. Na região alterada e próxima a ela, serão realizadas biópsias (remoções de pequenos fragmentos), para se avaliar o tecido utilizando um microscópio. As biópsias serão realizadas no local onde será feita a remoção do tumor.
- IV- **Desconforto ou riscos:** O procedimento de aplicação da luz não trará prejuízos a sua boca, ao seu tratamento e a sua saúde. O (a) Sr. (a) sentirá apenas um leve toque da ponta do aparelho que desaparecerá imediatamente após o exame, que será de alguns minutos. A realização da biópsia será feita sob anestesia.
- V- **Benefícios:** O (a) Sr. (a) não terá nenhum benefício direto imediato com a participação no estudo. O estudo poderá trazer informações relevantes para o posterior estabelecimento da técnica de espectroscopia de fluorescência para o diagnóstico precoce do câncer bucal.
- VI- **Ficha de coleta e privacidade:** Os dados referentes à sua identificação, saúde e tratamento serão anotados em uma ficha de coleta que ficará sob responsabilidade do pesquisador responsável, com a garantia de que haverá sigilo quanto a sua identidade. A coleta será identificada apenas por um número.
- VII- **Dúvidas:** Qualquer dúvida, não receie em perguntar quantas vezes necessário, e o (a) Sr. (a) será esclarecido em qualquer momento da pesquisa.
- VIII- **Abandono:** Caso não deseje participar dessa pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, em nada mudará o tratamento a que está se submetendo e não haverá penalização alguma. Caso a aplicação da luz ou as biópsias sejam realizadas e o (a) Sr. (a) quiser desistir da pesquisa, poderá fazê-lo em qualquer momento.
- IX- **Despesas:** A participação nesta pesquisa não implicará em qualquer despesa ao Sr. (a). Se houver a necessidade de mais de uma consulta, o (a) Sr. (a) receberá os vales-transporte para sua locomoção.
- X- **Indenização/ressarcimento:** Não há nenhum tipo de ressarcimento previsto, pois não haverá nenhum risco potencial ao (à) Sr. (a) decorrente desta pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, RG número \_\_\_\_\_, abaixo assinado, declaro que consinto participar no Trabalho intitulado “ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE NEOPLASIA BUCAL”, declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa sem que isso implique em prejuízo ao meu tratamento e que não preciso apresentar justificativas para isso. Sei também de todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos na pesquisa só serão utilizados para divulgação científica em reuniões e revistas científicas. Serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato desses poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa. Concordo também em responder às questões contidas no formulário que me foi apresentado. Qualquer dúvida, contatarei um dos pesquisadores envolvidos na pesquisa, Luiz Paulo Kowalski pelo telefone (11) 2189-5172, ou Cristina Kurachi pelo telefone (16) 3373-9810, para questões sobre os direitos e/ou danos relacionados à pesquisa. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo – SP, pelo telefone (11) 2189-5020. Assim, concordo em participar da pesquisa em questão. Declaro ainda que uma via do presente Termo de Consentimento me foi entregue.

São Paulo, \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Este formulário foi lido enquanto eu estava presente.

Nome da testemunha 1 \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Nome da testemunha 2 \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

### ANEXO 3

#### ANAMNESE

Nome: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Sexo: (F) (M) Idade: \_\_\_\_\_ anos

Cidade/Estado: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Histórico Médico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Medicação: \_\_\_\_\_

Fumo: \_\_\_\_\_ Alcool: \_\_\_\_\_

Histórico Odontológico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Exame Extra-Oral: \_\_\_\_\_

Exame Intra-Oral: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

#### ANAMNESE

Nome: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Sexo: (F) (M) Idade: \_\_\_\_\_ anos

Cidade/Estado: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Histórico Médico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Medicação: \_\_\_\_\_

Fumo: \_\_\_\_\_ Alcool: \_\_\_\_\_

Histórico Odontológico: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Exame Extra-Oral: \_\_\_\_\_

Exame Intra-Oral: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Nº do pac. no estudo: \_\_\_\_\_

**Anexo 4**

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Nº do pac. no hospital/faculdade: \_\_\_\_\_

Região anatômica: \_\_\_\_\_

Hipótese de diagnóstico clínico: \_\_\_\_\_

Características clínicas da lesão: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Lesão	R1:			R2:			R3:			R4:			R5:			R6:			R7:		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
M1																					
M2																					
M3																					
M4																					
M5																					

## ANEXO 5



Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

São Paulo, 14 de Dezembro de 2007.

Ao  
Dr. Luiz Paulo Kowalski

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº 979/07**  
**“Espectroscopia de fluorescência para detecção de neoplasia bucal”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 11/12/2007, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 25/09/2007, **aprovaram** a realização do estudo em referência (versão 2), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Portador de Mucosa Normal (versão 2), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Portador de Mucosa Alterada (versão 1), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Portador de Mucosa Normal-Doador (versão 1) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções CNS;
- Declaração sobre o plano de recrutamento dos sujeitos de pesquisa, circunstâncias e responsáveis pela obtenção do TCLE;
- Declaração sobre uso e destino do material biológico, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração sobre os dados coletados, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração de infra-estrutura e instalações;
- Orçamento financeiro detalhado;
- Carta do Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica referente concessão de empréstimo de material, datada de 8/11/2007;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 6 meses.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Gilles Lindman**  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa