



ANA LUCIA NORONHA FRANCISCO

**“SYSTEM OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN THE
EVALUATION OF SURGICAL MARGINS FOR SQUAMOUS CELL
CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY IN MOMENTS *IN SITU* AND *EX
VIVO*”**

**“SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA NA
AVALIAÇÃO DE MARGENS CIRÚRGICAS DE CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL NOS MOMENTOS *IN
SITU* E *EX VIVO*”**

PIRACICABA

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

ANA LUCIA NORONHA FRANCISCO

**“SYSTEM OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN THE EVALUATION OF
SURGICAL MARGINS FOR SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE ORAL
CAVITY IN MOMENTS *IN SITU* AND *EX VIVO*”**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Kurachi

**“SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA NA AVALIAÇÃO DE
MARGENS CIRÚRGICAS DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA
CAVIDADE ORAL NOS MOMENTOS *IN SITU* E *EX VIVO*”**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para obtenção do título de Doutora em Estomatopatologia, área de Estomatologia

Doctorate thesis presented to the Estomatopatologia Postgraduation Programme of the School of Dentistry of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Estomatopatologia, area of Stomatology

Este exemplar corresponde à versão final
da Tese defendida pela aluna Ana Lucia Noronha Francisco
e orientada pelo Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Assinatura do orientador:

PIRACICABA

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Josidelma Francisca Costa de Souza - CRB 8/5894

F847s Francisco, Ana Lucia Noronha, 1982-
Sistema de espectroscopia de fluorescência na avaliação de margens cirúrgicas de carcinoma de células escamosas da cavidade oral nos momentos in situ e ex vivo / Ana Lucia Noronha Francisco. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski.
Coorientador: Cristina Kurachi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Espectroscopia de fluorescência. 3. Diagnóstico precoce. 4. Boca. I. Kowalski, Luiz Paulo. II. Kurachi, Cristina. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: System of fluorescence spectroscopy in the evaluation of surgical margins for squamous cell carcinoma of the oral cavity in moments in situ and ex vivo

Palavras-chave em inglês:

Squamous cell carcinoma

Fluorescence spectroscopy

Early diagnosis

Oral cavity

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Luiz Paulo Kowalski [Orientador]

Luciano Bachmann

Clóvis Antônio Lopes Pinto

João Gonçalves Filho

Márcio Ajudarte Lopes

Data de defesa: 06-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 06 de Agosto de 2013, considerou a candidata ANA LUCIA NORONHA FRANCISCO aprovada.

Prof. Dr. LUIZ PAULO KOWALSKI

Prof. Dr. LUCIANO BACHMANN

Prof. Dr. CLÓVIS ANTÔNIO LOPES PINTO

Prof. Dr. JOÃO GONÇALVES FILHO

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

À minha família, pela compreensão dos momentos ausentes e pelo apoio em todas as horas, principalmente à minha irmã Fatima por ser minha mãe, irmã e mais fiel amiga.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e pela contribuição que deram à minha vida, principalmente ao meu pai e à minha irmã Fatima, pelos exemplos de caráter, princípios e valores de vida, e por me suportarem nos momentos mais difíceis, me escutarem, me apoiarem e me entenderem quando eu mais precisei.

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, minha co-orientadora, agradeço a paciência, o tempo dispendido, a didática, o apoio, as correções e orientações.

Ao Dr. Clóvis A. Lopes Pinto, médico titular do AC Camargo Cancer Center e patologista desta pesquisa, pela notável colaboração, incentivo e orientações na execução deste trabalho.

Ao Wagner R. Correr pela paciência em me ensinar estatística, por processar matematicamente os espectros e pelo tempo dispendido. E à Inês Nishimoto por ser um ombro amigo e por dispor seu tempo me ajudando e ensinando estatística.

Aos doutores Mauro Kasuo Ikeda e João Gonçalves Filho, que devo muito mais que milhões de “obrigado”, agradeço os ensinamentos, o apoio, a consideração, confiança e o carinho. Para mim, exemplos a serem seguidos.

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

A enfermeira Julia M. Toyota pela amizade, apoio, companhia nos momentos de captação de pacientes e por ser um exemplo de dedicação e caráter.

Aos médicos, titulares do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do AC Camargo Cancer Center pela paciência, confiança, apoio e bons momentos proporcionados, os quais foram fundamentais para realização deste trabalho.

À todos residentes do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, Thiago Chulam e Gustavo Saraiva, Wladir Bastos e Samuel Lima, Renan Lira e Phelipe Cunha, Aline Viana e André Raposo, e Marcus Furlan e Mario Jorge pela amizade, ajuda e incentivo.

À todos residentes da Cirurgia Oncológica que passaram pela CP desde o início de 2009 até hoje, julho de 2013, em especial aos amigos Eron Cobe, Rafael Sodrê, Renata Takarashi, Rodrigo Ghiggi, Gustavo Mendes, Patrícia Camara, Carolina Baraúna e, principalmente, ao Roger K. de Lima pelo companheirismo, retidão de caráter, exemplo de valores e coragem, alegria, amizade e orações.

Aos demais médicos dermatologistas, anestesistas, endocrinologistas, neurologistas, otorrinolaringologistas, cirurgiões plásticos, patologistas e demais especialidades e ao Departamento de Estomatologia, em especial as doutoras Gisele G. Rezze, Maria Dirlei Begnani, Cynthia Aparecida B. de Toledo, Joilma R. de Lima, Paula Angélica Lorenzon e Mônica Lúcia Rodrigues e aos residentes da estomatologia Nilson Coelho, Gustavo Rodrigues, Gabriela Rodrigues, André Guollo e Juliana Verone.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, titulares, residentes, técnicos e assistentes que de forma direta ou indireta contribuíram com a minha pesquisa. E aos funcionários José Ivanildo, Liliane Afonso, Fábio, Willian, Márcia e Emidia.

À equipe de enfermagem do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia – enfermeiras Rosangela, Soraya, Francisca e Lucimara, técnicas e estagiárias. E um agradecimento especial a Patrícia e a Sylvania pelos momentos proporcionados, pelos puxões de orelha, por me escutarem, por se

preocuparem comigo, por dividirem seus problemas, por me deixarem dar aulas para elas, por serem exemplos de força de vontade, enfim, por tudo que vivemos juntas e pela amizade conquistada. Admiro muito vocês!

Aos funcionários da recepção do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia pelos bons momentos, amizade e ajuda, Departamento de Estomatologia, Setor de Internação, equipe do Centro Cirúrgico Ambulatorial e do Centro Cirúrgico, às instrumentadoras do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, equipe da Campanha de Prevenção de Câncer e funcionários do SAME (Odirlei, André, Alexandre e Ueli), por sempre estarem à disposição e me ajudarem em todos os momentos. À todos funcionários do AC Camargo Cancer Center, os rapazes da TI pelas dúvidas tiradas, os seguranças por facilitarem minha vida e me deixarem passar sempre, as moças da limpeza por me deixarem usar uma sala, me fazerem companhia e não me trancarem no departamento à noite e aos finais de semana.

Aos pacientes e voluntários que aceitaram participar da pesquisa, muito obrigada pela compreensão, participação e ajuda no meu desenvolvimento científico, sem os quais jamais teria concretizado esta pesquisa.

Aos professores da pós graduação da FOP / UNICAMP do Departamento de Estomatopatologia pelo acolhimento, ensinamentos e pelo incentivo ao ensino e pesquisa.

Aos meus colegas de pós graduação da FOP / UNICAMP, principalmente a minha turma de mestrado e doutorado, Tânia, Katya, Rogério, Wilfredo, Marco Aurélio, Juliana, Sibebe, Rose, Sabrina, Lucas, Camilla, Marcondes, Luciana, Lara e Marisol. E demais colegas da FOP Adriele Gouvêa, Bruno, Isadora, Patrícia Feio, Fernanda Mariano, Rodrigo e Juscelino, pela amizade e momentos compartilhados.

As funcionárias e dentistas do OROCENTRO, Jeane, Daniele, Aparecida (Cida), Érica, Valéria e Rogério, pelos momentos alegres, ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do CEP, secretaria de pós-graduação e biblioteca do AC Camargo Cancer Center, da FOP / UNICAMP e da USP.

Aos demais alunos de pós graduação com que convivi em São Paulo, Laura Manarini, Neyller Montovani, Simone Claudino, Andrew Thomaz, Douglas Barboza, Carolina Mozzini, Silvia Hanna, Luis Quiroa, Diogo Patrão, Natalie Kelner, Ivete F Rodrigues e Mayara Gonçalves, pelos momentos vivenciados, pelo árduo aprendizado e pela sincera amizade de alguns.

À todos os amigos do Sul: Valmir Dorneles, Ricardo Cunha, Paula Flores, Simone Bênia, Cristina Bênia, Bianca Menna, Rômulo Arbo, Adriana Blaskesi, Alan Tafuri, Lucas Andrade, Felipe Fröner, Gabriel Trevizan, Renata Steyer, Luisa Torres, Veridiana Freitas, Aécio Freitas e demais por sempre me apoiarem, torcerem por mim, compreenderem meu “chá de sumiço” e por estarem, de certa forma, sempre presente nos melhores e piores momentos.

Aos meus amigos de São Paulo e aos espalhados por ai, Michele Fernandes, Vitor Figueiredo, Jamile Chaban, Viviane Danelon, Margareth Andrade, Felipe Martins, Moisés Rodrigues, Pedro Gustavo, Marcus Carvalho, Theófilo, Carolina Muniz, Edilaine Lucio, Lidia Sella, Liliane Tubino, Caio Henrique Correa, Thais Vargas, Erika Vargas, Cintia, Isabel e Astolfo e outros, obrigada pelo apoio, compreensão e amizade.

À FAPESP, ao Cnpq 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. E as funcionárias do CIPE, Gilmara, Carla e Kelly, que tanto perturbei, obrigada pela paciência e ajuda.

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.

À Deus, muito obrigada, por ter me dado a oportunidade de fazer o doutorado e por ter me dado coragem, força de vontade, persistência, paciência, saúde, amigos e fé para concluí-lo.

EPÍGRAFE

“Não tentes ser bem sucedido,
tenta antes ser um homem de valor.”

Albert Einsten

RESUMO

O tratamento mais empregado para os carcinomas de células escamosas da boca é a ressecção cirúrgica, sendo ou não acompanhada de radio e/ou quimioterapia. O tratamento é simplificado, diminuindo número de recidivas e aumentando a sobrevida, quando as lesões encontram-se em estadios iniciais, conforme localização anatômica e diagnóstico de margens cirúrgicas livres. Frente a isto, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para um diagnóstico precoce, assim como de uma acurada definição das margens cirúrgicas livres e correta delimitação da extensão do câncer boca, com o intuito de melhorar a qualidade de vida e a taxa de sobrevida desses pacientes, tornam-se de grande importância. 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 um feixe 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 avaliando as margens ressecadas cirurgicamente. As avaliações ocorreram nos pacientes do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do AC Camargo Câncer Center. O estudo obteve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições participantes. A amostra consistiu de 75 indivíduos nos quais se realizou a espectroscopia de fluorescência dos quais 45 pacientes eram portadores de carcinoma oral e 30 voluntários com mucosa oral clinicamente normal. 29 casos (64.4%) do sexo masculino e a média de idade foi de 61.3 anos. Foram realizadas biópsias e os resultados destas duas metodologias foram comparados, usando o diagnóstico

histopatológico como padrão ouro, para identificar características espectrais de entre tecidos clinicamente não alterados das margens cirúrgicas da mucosa de voluntários. Os espectros foram classificados e comparados com a histopatologia para determinação da eficiência na discriminação diagnóstica empregando-se a fluorescência. A análise inicial foi qualitativa e após consistiu de processamentos matemáticos dos espectros com excitação nos comprimentos de 532 e 406nm. Observou-se a variabilidade entre os indivíduos, entre os sítios anatômicos, entre regiões da mesma lesão e entre tecido clinicamente normal de voluntários e tecido das margens cirúrgicas em momentos *in situ*. Foram observadas também grandes diferenças entre espectros *in situ* e *ex vivo*, em concordância com resultados de outros estudos. A acurácia da técnica variou em função do tipo de análise empregada, mas pode-se constatar o seu potencial de uso como instrumento auxiliar para avaliar margens cirúrgicas no câncer de boca.

Palavras-chave:

carcinoma de células escamosas, margem cirúrgica, espectroscopia de fluorescência, diagnóstico precoce, neoplasia, boca.

ABSTRACT

The most widely used treatment for squamous cell carcinoma of the mouth is surgical resection, whether or not accompanied by radiation and/or chemotherapy. The treatment is simplified, reducing the number of recurrences and increasing survival when the lesions are in the early stages, according to anatomical site and diagnosis of disease-free surgical margins. The development and improvement of techniques for early diagnosis, as well as an accurate definition of disease-free surgical margins and correct delineation of the extent of the mouth cancer, is an important part of improving the quality of life and survival rate for these patients. Fluorescence spectroscopy is a noninvasive diagnostic tool that can aid in real-time cancer detection, with the potential to provide similar sensitivity and specificity to that of the clinical diagnoses of experienced professionals. It is a relatively simple, fast and accurate technique that assesses the biochemical composition and structure of the tissue by the fluorescence spectrum emitted after the application of a beam of light. When there is progression from a normal state to an altered state, this is reflected in the spectral characteristics of the fluorescence of the tissues, which may be correlated with the histopathological examination of these tissues. The aim of this study was to discriminate, in oral mucosa, healthy tissue through fluorescence spectroscopy by evaluating surgically resected margins. Assessments occurred in patients of the Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology Department of A.C. Camargo Cancer Center. The study was approved by the Research Ethics Committee of the institution. The sample consisted of 75 individuals who underwent fluorescence spectroscopy, of which there were 45 individuals with oral carcinoma and 30 healthy volunteers with normal oral mucosa. Twenty-nine cases (64.4%) were male and the mean age was 61.3 years. Biopsies were performed and the results of these two methods were compared using histopathology as the gold standard to identify spectral characteristics from clinically unchanged tissues to surgical margins of the mucosa of volunteers. The spectra were classified and compared with histopathology for determining the efficiency of diagnostic discrimination of employing

fluorescence. The initial analysis was qualitative and consisted of following mathematical processing of the spectra with excitation in lengths of 532 and 406 nm. Variability was observed among individuals, anatomical sites, regions of the same lesion and clinically normal tissue of volunteers and the tissue of surgical margins *in situ*. Also observed were large differences between spectra *in situ* and *ex vivo*, in agreement with results of other studies. The accuracy of the technique varied according to the type of analysis used, but its potential use is noted as an aid to evaluated surgical margins in oral cancer.

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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVO.....	13
CAPÍTULO 1: Analysis of surgical margins in oral cancer using <i>in situ</i> fluorescence spectroscopy.....	14
CAPÍTULO 2: Analysis of the surgical margins of the oral cancer using <i>in situ</i> and <i>ex vivo</i> fluorescence spectroscopy.....	35
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO 1.....	57
ANEXO 2.....	58
ANEXO 3.....	60
ANEXO 4.....	62
ANEXO 5.....	63
ANEXO 6.....	65
ANEXO 7.....	67

INTRODUÇÃO

O câncer da boca e orofaringe é responsável por 6% dos casos de todos os tumores malignos diagnosticados no mundo anualmente, sendo o tipo histológico do carcinoma de células escamosas, o observado em mais de 90% dos casos (Silverman, 1988; Gorsky, 1990; INCA, 2013). No Brasil, a boca representa a quinta localização de maior incidência de câncer em homens, com estimativa, para 2012, de 9.990 novos casos e a sétima localização de maior incidência em mulheres, com 4.180 novos casos (INCA, 2013).

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

O uso disseminado de álcool e tabaco nas últimas décadas contribuiu para a elevada incidência da doença no Brasil (Hamada *et al.*, 1991). Todas as formas de consumir o tabaco representam risco para o câncer bucal; o fumo, porém, é a forma mais consumida (Johnson, 2001; Döbrössy, 2005). O risco do tabagismo para o câncer de boca é cumulativo em relação à duração e a intensidade do hábito, segundo Winn *et al.* (2001). Estudos coorte apontaram de duas a cinco vezes mais risco de câncer de boca e orofaringe para indivíduos que consomem bebidas alcoólicas em excesso, do que para os indivíduos que consomem álcool eventualmente (UICC, 2013). O consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas associado aumenta consideravelmente o risco para desenvolver câncer de boca (INCA, 2013).

As lesões orais são comuns, mas prever quais irão sofrer alterações clínicas e histológicas se transformando em carcinoma invasivo e quais permanecerão estáveis e apresentar 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 somente na apresentação clínica. A maioria das desordens 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 (Rogers *et al.*, 2009; Kademani D, 2007).

O carcinoma epidermóide pode se apresentar de forma endofítica ou exofítica que clinicamente pode ter o aspecto leucoplásico, eritroplásico, eritroleucoplásico, ulcerado, granulomatoso ou combinações. A lesão ulcerada é a mais freqüente, normalmente assintomática, não cicatriza nem regride, de longa duração, apresenta bordas elevadas, firmes, endurecidas e irregulares e o centro pode ser necrótico, irregular, granular ou verrucoso (Pindborg, 1981; Silverman, 1988; Sonis, 1995; Kowalski LP, 2008).

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, angiogenese, 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 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; Robbins SL *et al.*, 2008; 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, seu tratamento resulta em menor mutilação do paciente e melhor prognóstico (Pindborg, 1981; Silverman, 1988; Neville, 2002).

Atualmente o paciente apresenta-se para o tratamento tardiamente, com a doença em estadio avançado, o tratamento torna-se mais agressivo, desfigurante e debilitante, com conseqüente diminuição da taxa de sobrevida (INCA, 2013, Gillenwater *et al.*, 1998). O tratamento mais empregado para os carcinomas de

células escamosas da boca 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, 2013; IARC, 2012). Mesmo com os avanços nas técnicas reconstrutivas tem havido apenas 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). Frente a isto, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para um diagnóstico precoce, assim como de uma acurada definição das margens cirúrgicas livres e correta delimitação da extensão do câncer boca, com o intuito de melhorar a qualidade de vida e a taxa de sobrevida desses pacientes, tornam-se de grande importância (Badizadegan K *et al.*; 2003; Poh CF *et al.*, 2006; Pavlova I *et al.*, 2008; Hinni ML *et al.*, 2012).

Um dos problemas mais difíceis e controversos no que diz respeito ao tratamento de cânceres orais envolve a decisão sobre a extensão do tecido clinicamente normal, que deve ser removido para além do tumor, a denominada margem de segurança. Na melhor tentativa para remover a alteração no campo de alto risco oculto, os cirurgiões frequentemente estabelecem arbitrariamente 10 milímetros ou mais de margem de mucosa de aspecto normal quando ressecam a lesão de câncer bucal, se anatomicamente possível. Infelizmente, esta abordagem ainda não é sensível para remover completamente as mudanças ocultas, resultando em uma alta taxa de recorrência do tumor (Poh CF *et al.*, 2006; Hughes OR *et al.*, 2010; Bydlon TM *et al.*, 2010). O desenvolvimento de metodologias que aumentem o poder de discriminação das alterações clínicas da mucosa normal e do câncer visa aumentar a resolução do diagnóstico. Técnicas ópticas baseadas nas modificações da fluorescência tecidual vêm sendo propostas com resultados bastante promissores para o diagnóstico do câncer de boca (Swinson, 2005; Westra WH, 2006; Pavlova I, 2008; McGee S, 2009; Farwell DG, 2010; Lue N, 2012).

Poh CF *et al.* (2006) realizaram 122 biópsias utilizando *punch* em 20 pacientes portadores de neoplasia oral mostraram que alterações ocultas nos limites cirúrgicos

é um evento frequente, e que a largura desta extensão subclínica varia consideravelmente de 4-25 mm, frequentemente estendendo-se em pelo menos uma direção por mais que 10mm. Dado uma folga de 10 mm do tumor clinicamente visível neste conjunto de amostras, metade dos tumores no estudo apresentou câncer ou displasia na margem cirúrgica, com seis casos (30%) mostrando displasia severa ou carcinoma in situ (CIS). Ao avaliarem essas regiões 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 por remoção inadequada.

Na prática da cirurgia do câncer em cabeça e pescoço é frequente o uso de congelação transoperatória para avaliação das margens cirúrgicas. Este procedimento envolve uma estreita interação entre os cirurgiões e patologistas. A secção de congelação transoperatória é realizada em áreas selecionadas pontuais e analisa as margens específicas que são relatadas pelo cirurgião, fornecendo de imediato um diagnóstico ou informações importantes. Dependendo do resultado o cirurgião pode modificar a conduta cirúrgica, ampliando a ressecção inicial ou realizando uma cirurgia radical, ou pode se certificar de que o material retirado foi suficiente do ponto de vista qualitativo e quantitativo (Wick MR, 2002; Black C *et al.*, 2006; Jackel MC, 2007).

Além do elevado custo, prolongamento do tempo de anestesia geral, nem toda extensão da margem é avaliada e um relatório final da patologia deve ser emitido dias após a cirurgia, o material congelado sofre alterações morfológicas irreversíveis que podem ser observados no material posteriormente parafinado. (Wick MR *et al.*, 2002; Black C *et al.*, 2006). Outra desvantagem da técnica é a alteração da sensibilidade nas pesquisas de antígenos através de procedimentos imuno histoquímicos (Ananian V, 2011; Groenen, 2011).

Há um grande interesse no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais objetivas e rápidas, sendo uma tendência atual e de grande relevância na tentativa de minimizar o grau de subjetividade, guiar as áreas a serem congeladas e diminuir o tempo de espera do resultado da técnica convencional. Com base nas propriedades ópticas e na sensibilidade dessas técnicas em captar a fluorescência emitida por fluoróforos endógenos e diferenciar as variações teciduais (Georgakoudi *et al.*, 2002; Kurachi *et al.*, 2004). Assim, as técnicas de biópsia óptica vêm sendo apresentadas como ferramentas para a detecção de lesões, e, portanto, auxiliar no diagnóstico de desordens potencialmente malignas e malignas na mucosa oral (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, os denominados cromóforos; dependendo do tipo de interação observada elas podem ser denominadas como absorvedores, espalhadores e fluoróforos. O tipo de interação observado depende do comprimento de onda de excitação, assim como do microambiente no qual o cromóforo se encontra, i.e. as condições físico-químicas do tecido biológico (Pavlova *et al.*, 2008).

Foi visto 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 é particularmente visível na excitação em 406 nm, já 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).

A espectroscopia de fluorescência ocorre devido à presença de fluoróforos endógenos intracelulares, como as 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 dos 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 físico-químicas 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 espalhamento tecidual modificam a intensidade e distribuição espectral da fluorescência detectada. Alterações bioquímicas do colágeno ocorrem devido à quebra de ligações cruzadas entre as fibras. As alterações que acompanham a progressão displásica também afetam as propriedades de absorção e espalhamento dos tecidos, as quais, por sua vez, modificam o caminho óptico dos fótons emitidos e, conseqüentemente da fluorescência tecidual coletada. 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 o espalhamento aumentado no epitélio, espessura epitelial e diminuição da concentração de FAD (Müller *et al.*, 2003; Lane *et al.*, 2006; Poh *et al.*, 2006).

O processo de carcinogênese na boca resulta em alterações bioquímicas e estruturais no tecido epitelial e no estroma que alteram 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 (Schwarz *et al.*, 2009).

Em estudo com 78 carcinomas orais iluminados com 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, incluindo 15 leucoplasias, 40 delas (93%) não apresentaram o espectro bimodal. Foi extraído 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. A fluorescência dos carcinomas no espectro vermelho foi atribuída às porfirinas, e não à contaminação microbiana (Inaguma e Hashimoto, 1999).

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 significativa 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.

As técnicas de fluorescência também permitem melhorar a detecção de lesões clinicamente ocultas, podem 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, aumentam o potencial do tratamento curativo, além de reduzir complicações e custos do tratamento. Podem também monitorar a resposta dos tecidos às várias intervenções terapêuticas (Ramanujam, 2000). A espectroscopia de fluorescência técnica objetiva que suplementa o diagnóstico clínico (Gillenwater *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003).

O sistema utilizado consiste em 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 componente óptico promove a dispersão e separa a luz emitida em seus respectivos comprimentos de onda; um detector mede a intensidade para cada comprimento de onda de emissão; e a fluorescência pode ser detectada e visualizada diretamente ou gravada e visualizada indiretamente (Ramanujam, 2000; Lane *et al.*, 2006).

Nesse estudo, todos indivíduos foram submetidos à espectroscopia de fluorescência, nos 2 comprimentos de onda, 406 e 532 nm de excitação. 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 pacientes 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 cirúrgicas das lesões foram realizadas as medidas espectroscópicas, de forma pontual e concêntrica, usando as horas do relógio para orientação (3, 6, 9 e 12 horas), de modo que foram realizadas no mínimo 5 medidas em cada linha de orientação, se afastando da lesão até o limite cirúrgico previamente informado pelo médico cirurgião responsável. As aferições foram realizadas no Centro Cirúrgico do AC Camargo Cancer Center, após indução da anestesia geral, momentos antes da remoção total das lesões, *in situ*, e, no segundo momento, *ex vivo*, na peça cirúrgica recém excisada. No segundo exame de varredura pontual seguimos os mesmos pontos de investigação *in situ*, avaliando centro e bordas da lesão e margens cirúrgicas da peça (Figuras 1 e 2).

Os exames clínico, de fluorescência e anatomopatológico foram realizados a partir do centro da lesão para as bordas da lesão, seguindo as heterogeneidades clínicas, e nas margens cirúrgicas (Figura 3).

Figura 1: A – Lesão em borda de língua de difícil visualização e delimitação e B – Delimitação da extensão da ressecção definida pelo médico responsável.

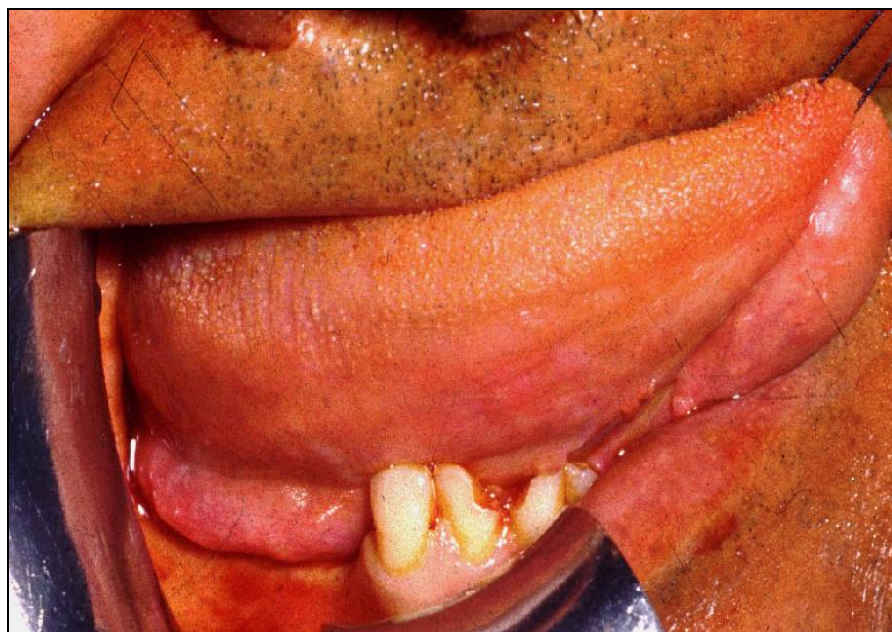
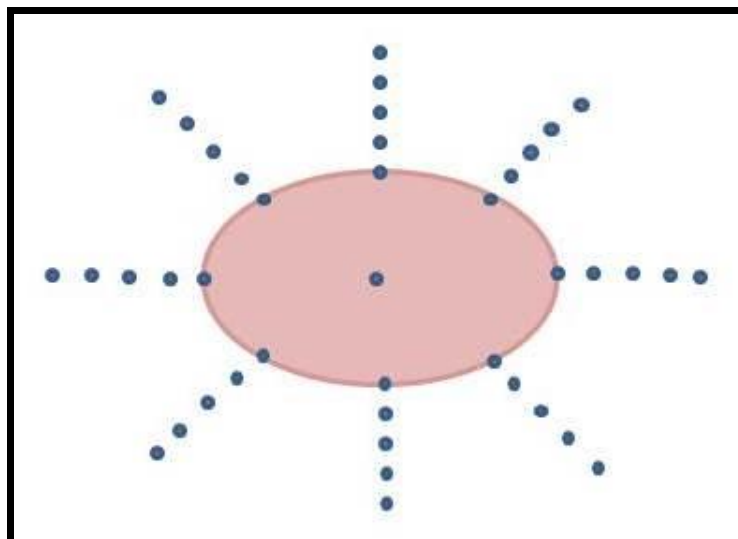


Figura 2: Peça cirúrgica de uma lesão em borda de língua.



Figura 3: 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 no centro, bordas e margens cirúrgicas.



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).

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). O potencial de diagnóstico da espectroscopia de fluorescência de forma objetiva e não invasiva, distinguindo ora sítios displásicos, ora cancerosos e ora normal apoiam estudos e futura utilização de sistemas ópticos de profundidade sensíveis para melhorar o desempenho no diagnóstico.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo consistiu em discriminar, na mucosa bucal, tecido sadio de neoplásico, por meio de espectroscopia de fluorescência avaliando as lesões, margens ressecadas cirurgicamente e mucosa normal de voluntários.

CAPÍTULO 1

Artigo 1

Analysis of surgical margins in oral cancer using *in situ* fluorescence spectroscopy

Ana Lucia Noronha Francisco, DDS, PhD student, Wagner Rafael Correr, Clóvis Antônio Lopes Pinto, MD, PhD, Thiago Celestino Chulam, MD, PhD, João Gonçalves Filho, MD, PhD, Cristina Kurachi, DDS, PhD, Luiz Paulo Kowalski, MD, PhD

Submetido à Revista Oral Oncology.

Abstract

Oral cancer is a public health problem with high prevalence in the population. Local tumor control is best achieved by complete surgical resection with adequate margins. A disease-free surgical margin correlates with a lower rate of local recurrence and a higher rate of disease-free survival. Fluorescence spectroscopy is a noninvasive diagnostic tool that can aid in real-time cancer detection. The technique, which evaluates the biochemical composition and structure of tissue fluorescence, is relatively simple, fast and accurate. This study aimed to compare oral squamous cell carcinoma lesions to surgical margins and the mucosa of healthy volunteers by fluorescence spectroscopy. The sample consisted of 56 individuals, 28 with oral squamous cell carcinoma and 28 healthy volunteers with normal oral mucosa. Thirty-six cases (64.3%) were male and the mean age was 60.9 years old. The spectra were classified and compared to histopathology to determine fluorescence efficiency

for diagnostic discrimination of tumors. In the analysis of the other cases, we observed discrimination between normal mucosa, injury and margins. At two-year follow up, three individuals had local recurrence, and in two cases investigation fluorescence in the corresponding area showed qualitative differences in spectra between the recurrence area and the area without recurrence at the same anatomical site in the same patient. *In situ* analysis of oral mucosa showed the potential of fluorescence spectroscopy as a diagnostic tool that can aid in discrimination of altered mucosa and normal mucosa.

Keywords: squamous cell carcinoma, fluorescence spectroscopy, surgical margins, diagnosis, oral cavity.

Introduction

The options for curative treatment of oral cavity squamous cell carcinoma have not changed significantly in the last decades¹, and include surgery, radiation therapy, chemotherapy, or combinations of these modalities². The choice of treatment depends mainly on the site and size of the primary lesion, in addition to the patient's age and general health³. Local tumor control is best achieved by complete surgical resection with adequate margins⁴. Moreover, several studies have shown the significance of positive surgical margins⁵. The clear margins status during resection is an important predictor to reduce the risk of local recurrence and a higher rate of survival^{6,7}. Some conflicting results may have been due to lack of standardization of the acceptable margin distance and different clinical discrimination between margins containing small alterations or dysplasia or carcinoma *in situ*⁷. A better standardization is important because the rate of five-year overall survival of oral squamous cell carcinoma (OSCC) ranges from 50–60%^{7,8}.

Intraoperative frozen-section pathology evaluation of surgical margins in head and neck cancer resection is a common procedure that involves a close interaction between the operating room and pathologist⁹. The procedure is performed at

localized selected areas and the specific margins reported by the surgeon are considered. However, in addition to its high cost, the entire margin extension is not evaluated¹⁰.

Fluorescence spectra superficially collected differ depending on the excitation wavelength, investigated oral site, biochemical composition, and tissue architecture. The excitation wavelength affects the final fluorescence spectrum, as various endogenous fluorophores may be excited. The oral mucosa presents distinct structural characteristics according to the anatomic sites investigated. More keratinized areas, as gingival and hard palate, show distinct fluorescence spectra when compared to buccal mucosa and inner lower lip, for example. Also, the tongue shows different fluorescence patterns depending on its interrogated site, lateral border, ventral or dorsum. Indeed, the use of optical techniques for analysis of biological tissues has shown good results in the diagnosis and evaluation of cellular changes by anatomical sites^{11,12,13}. Additionally, optical tools are fast, accurate, and noninvasive procedures¹⁴. Using fluorescence spectroscopy, we compared OSCC lesions to surgical margins and the mucosa of healthy volunteers, with the aim to investigate whether the optical technique could provide information similar to that obtained with the pathologist report and being a diagnostic aid *in situ*.

Patients and methods

A total of 56 subjects were enrolled in the study, 20 (35.7%) women and 36 (64.3%) men. The average age was 60.9 years (range 34–82); the average age of women was 62.8 years and that of men was 59.9 years. Seventeen subjects (60.7%) were smokers and 19 (67.8%) reported either chronic or social alcohol consumption.

All subjects were interviewed and filled in a standardized anamnesis form regarding habits associated with the risk of oral cancer (tobacco and alcohol) and family history. A clinical examination was performed and participants signed an informed consent form.

Twenty-eight healthy volunteers with normal oral mucosa and no signs of airway and upper digestive tract tumors and 28 patients with OSCC at various stages of development were investigated. The patients with OSCC underwent surgery under general anesthesia and had at least one safety margin area in the same oral site of the tumor.

Patients were identified by a numerical code and underwent biopsy of the oral cavity with histopathology diagnosis, which is considered the gold standard for diagnosis of OSCC. Qualitative fluorescence patterns were determined to identify potential spectroscopic signatures for each mucosal class evaluated: OSCC (B), margin (M), and normal mucosa (N). The spectra were mathematically processed to, whenever possible, define discrimination algorithms to establish the difference from normal *versus* carcinoma.

In healthy volunteers, fluorescence examination was performed in the seven most prevalent anatomical sites of oral cancer and a cytology sample was collected from these areas. In individuals with cancer of the oral cavity, site interrogation was performed in the operating room at A.C. Camargo Cancer Center in São Paulo, Brazil. Surgical margins were defined by the head and neck surgeon after induction of general anesthesia.

A homemade fluorescence spectroscopy system composed of excitation light, investigation probe, portable USB 2000 spectrophotometer (Ocean Optics, USA), and laptop computer was assembled and a solid-state laser diode emitting at 406 nm was employed. A Y-type probe with one end connected to the laser and the other to the spectrophotometer was used. Two optical fibers of 600 μm diameter were positioned side by side, one to conduct the excitation light and the other to collect the re-emitted light from the tissue. The interrogation area diameter was 1.6 mm and the overall diameter of the area in contact with the tissue surface was 3.2 mm.

The clinical characteristics, oral cancer site, and lesion measurements from OSCC patients were recorded. The spectroscopic measurements were carried out at the border of the lesion; superficial heterogeneities were identified and representative

regions were chosen to correlate with different clinical patterns; necrotic areas were avoided. At least five spectroscopic measurements were performed in each chosen area at a wavelength of 406 nm. Surgical margins were analyzed in a concentric manner in clockwise direction (3, 6, 9, and 12 o'clock). All subjects with OSCC had at least one border of the lesion and the surgical margin analyzed in the same anatomical site.

A 3 mm punch biopsy was performed in OSCC patients at the time of surgery. All biopsies were performed on sites that had spectroscopic measurements taken according to the heterogeneity of the border of the lesion, and in four margin points. The specimens were placed in plastic vials containing 10% formalin for later processing.

The spectra collected were analyzed according to the different tumor site locations and the spectra of the altered tissue injury compared to that of normal tissue and surgical margins. The results of the spectra were correlated with the histopathological diagnosis and we conducted descriptive analyzes to better discriminate between normal tissue and neoplastic tissue.

The spectral processing was performed using MATLAB. An algorithm was developed to import the data from the data sheet. Some spectral data were excluded due to saturated emission intensity and/or detected outliers. All data from the dorsum of the tongue were excluded due to variable fluorescence emission, mainly resulting from the presence of porphyrins produced by bacteria present in this region.

The groups proposed for classification of spectra were: normal (N), squamous cell carcinoma (B), and surgical margins (M). The margins were numbered, in ascending order from 1 to 5, from the border of the lesion until surgical margin determined clinically free of disease. First, an overall assessment was performed regardless of oral tumor site. Then, a subsequent analysis was performed according to group and anatomical site.

Results

In this study, we found that the most affected oral site was the border of the tongue (BOT) with 10 lesions (35.7%) followed by the floor of the mouth (FOM) and retromolar region (RM), with four cases (14.3%) each. The predominant pathology was invasive carcinoma (25 cases, 89.3%), and grade 2 tumors were the most prevalent ones (15 cases, 53.6%). There were 12 T3 (42.8%), nine T2 (32.1%), and four T4 cases (14.3%), and of these, 11 (39.3%) patients had positive neck lymph nodes.

A total of 1024 spectra at 406 nm excitation were evaluated: 610 spectra of normal mucosa from healthy volunteers, 214 spectra of tumor margins from OSCC lesions, and 200 spectra of (clinically normal) surgical margins from OSCC lesions.

In healthy volunteers, oral mucosa at gingiva, BOT, and FOM showed low spectra intensity at 406 nm excitation. The tongue and FOM are highly vascularized tissues, and hemoglobin is the main absorber component. The spectra of normal mucosa from healthy volunteers followed a similar pattern in each oral site variation that could be observed from the emission intensities.

The cancer interrogation sites collected were in the clinically detected borders. The central region of the lesions was not interrogated to avoid necrotic tissue commonly present at ulcerated tumors.

Initially, the spectral analysis was based on qualitative differences between spectra of the border of OSCC tumors, surgical margins, and/or normal mucosa at the same anatomical site. In general, the margins of the tumor showed fluorescence emission patterns ranging from the tumor border to normal mucosa.

Of the 28 subjects with OSCC that had been operated on, three patients exhibited two-year local recurrence, and only two of them exhibited local recurrence where fluorescence measurements were taken. The spectra were investigated in each patient to check if there were detectable changes in the fluorescence pattern.

Two patterns were observed in margins clinically defined as normal. The spectra of the anterior margins were qualitatively similar to the spectra of normal

mucosa whereas the spectra of the posterior margins were more similar to the spectra of the border of the tumor. We also observed changes in the red region (600–650 nm) of posterior margins and lesions (Figs. 1 and 2).

Spectral analysis could not be performed in samples from the third individual with local recurrence in the hard palate because there was no fluorescence interrogation in the same area of recurrence. In this case, no margins were taken from the hard palate in the primary resected tumor.

The qualitative analysis of the spectra showed major differences between the border of the cancerous lesion and normal mucosa and surgical margins.

The box plot was used for data visualization. This type of graph is used in descriptive statistics for side-by-side visualization of data from different experiments or distinct groups in same experiment. In this study, we used box plot to observe the differences between normal group (N), border of lesion (B), and margins (M1 to M5). The whiskers extend to the most variable data point, and the outliers are plotted individually as asterisks.

The ratio parameter of the spectra for each group (Normal, Border, and Margins) was calculated according to the following equation and diagram (Fig. 3):

$$R = \frac{A_1}{A_2} = \frac{\int_{491}^{501} Id\lambda}{\int_{511}^{521} Id\lambda}$$

The box plot in Figure 4 shows a clear differentiation in the ratio of spectra between B and N and/or M. For instance, there were differences in spectra of the floor of the mouth between B and N and M, but no difference between M and N or N and M5 measurements ($p = 0.276$) (Fig. 4A). Conversely, there were no differences between equidistant points M1, M2, M3, M4 and M5.

After normalization by the maximum, mean of the degree of similarity of the spectra were calculated for each patient compared with a volunteer, in each anatomical site, using the comparison by calculating the Euclidean distance. The

graph in Figure 5 is the calculations similarity between the spectra of B and N, n1, n2, n3, n4 and n5 are the calculations between N and M, B1, B2, B3, B4 and B5 are the calculations between spectra M and C.

It was expected that the values of n series were lower and b values were higher, but this was not observed in all patients, which can be justified by the presence of subclinical changes in the oral mucosa of surgical margins.

Global survival of patients with T1–T2 and T3–T4 stage tumors after two-year follow-up was 91% and 78%, respectively, and specific disease-free survival after two years was 91.7% for T1–T2 and 66% for T3–T4 stages. In addition, individuals under primary treatment for lymph node metastasis had 44.5% of specific disease-free survival after two years ($p = 0.008$).

Of the 28 cases, six (21.4%) cases had recurrence within two years, three (10.7%) cases had local recurrence specifically in the primary site, and the other three cases were lymph node or distant metastasis. In all three cases of local recurrence, fluorescence had previously identified spectra that were similar to the primary tumor (Fig. 6).

Discussion

The definition of surgical margins is a critical step in radical surgery for OSCC because there is no consensus on the surgical extension, which strongly depends on surgeon's and pathologist's decisions⁴. Ideally, the definition of safety margin resection should consider several factors about the tumor and oral site, and the three-dimensional aspects of tumor extension and pathological factors, such as the pattern of invasion, should be analyzed^{8,15,16}.

Frozen section of surgical margins is an accepted practice in OSCC surgery and a pathological method for providing rapid consultation during surgery⁹. The accuracy of frozen section diagnosis is very close to the final diagnosis (> 90%) and the usefulness of the procedure is well established^{10,17}. The report of negative surgical margins is a prognostic factor of extreme importance. The retreatment for

positive margins after initial surgery is an effective form of treatment, but it is undesirable, and often not possible. Moreover, frozen sections are high priority, costly procedures that require multiple well-trained professionals¹⁰.

Evidence suggests that an occult disease often extends beyond the extent of the visible tumor and is responsible for the high rate of recurrence of carcinoma at the primary site (~10-30%)¹⁸. There is great need to develop new approaches that can be easily used in clinical practice to facilitate detection of this field cancerization, and optical techniques represent an attractive tool to assess tissue changes^{11,19,20,21}. These optical techniques are advantageous due to their fast response and use of noninvasive and *in situ* interrogation. Moreover, patient investigation can usually be performed in preoperative and intraoperative settings for better delineation of tissue changes. This study did not aim to exclude the conventional procedure of frozen section and pathologic evaluation, but test the fluorescence spectroscopy as an auxiliary tool for better delineation of surgical margins *in situ* in an attempt to prevent a rapprochement.

Some studies have shown an association between the loss of fluorescence cancer development and in normal tissues corroborating with the present study. For instance, direct fluorescence visualization has been used in different tissues and organs and successfully distinguished premalignant and malignant lesions that cannot be detected by the naked eye^{22,23,24,25,26}. In our study, spectroscopy satisfactorily discriminated normal tissue and slightly altered mucosa from cancerous lesions. However, discrimination between normal and altered mucosa showed low accuracy.

Several studies have demonstrated that the analysis of the light/tissue interaction can result in the discrimination of changes in tissue structure and metabolic activity such as the breakdown of the collagen matrix and the change in concentration of nicotinamide adenine dinucleotide in its reduced form (NADH), tryptophan, tyrosine, phenylalanine, and flavin adenine dinucleotide (FAD)^{27,28,29,30}. In addition, some of the epithelium of the oral cavity is covered with a layer of keratin,

which scatters some of the incoming excitation light and reduces its penetration depth. It has also been shown that collagenase enzymes responsible for the degradation of collagen are usually present in tissue areas undergoing significant architectural changes, resulting in the observed changes in NADH and collagen contributions to the tissue fluorescence spectrum with progression of disease³¹.

In an *in vitro* study, Ingrams *et al.* (1997)¹¹ showed that the differences between normal and abnormal mucosa were most marked at 410 nm excitation and observed increased fluorescence above 600 nm in the dysplastic tissue comparable to histopathology¹¹. Similarly, Gillenwater *et al.* (1998) used autofluorescence at neoplastic and non-neoplastic oral mucosa and showed that the alterations in areas of disease were seen more in the ratio of 600 nm to 455-490 nm³². These results are different from our study, which uses the technique of fluorescence spectroscopy for *in situ* evaluation.

De Veld *et al.* (2005)³³ reported that several studies using autofluorescence spectroscopy and imaging successfully distinguished normal and altered oral mucosa (dysplasia and cancer). Thus, autofluorescence spectroscopy and imaging are helpful in the diagnosis of lesions of the oral mucosa. These studies assessed whether the limits of the lesions are clinically visible or not, however, few studies have evaluated the surgical margins of cancer lesions of the oral cavity, different than our study.

The decision on the length of clinically normal tissue that should be removed beyond the tumor is highly controversial. Typically, surgeons arbitrarily remove 10 mm or more of normal mucosal margin if anatomically feasible. However, this approach does not completely remove all the abnormal tissue in all individuals. Poh *et al.* (2006)²⁶ and Svistun *et al.* (2004)²³ showed that most tumors have occult changes and that the width for subclinical extension ranges between 4–25 mm, often extending in at least one direction by over 10 mm with some potentially malignant disorder, thus increasing the chance of tumor recurrence.

Fluorescence techniques are advantageous over frozen section histopathology because they are noninvasive and provide information with correlation to microscopic

diagnosis and lesion margins. In fact, some studies using fluorescence techniques have reported high sensitivity and specificity in the diagnosis of dysplasia and invasive carcinoma during surgery^{4,21,34}.

The risk of recurrence or development of a new primary tumor warrant long-term follow-up for all patients treated for cancer of the oral cavity, and regular monitoring is indicated for a minimum five years. Finally, high-risk patients should be monitored more frequently than low-risk ones^{1,8,35}.

Conclusion

Our results demonstrate the potential of the system to detect tissue changes. Fluorescence spectroscopy is a noninvasive method that must be further explored as a tool for detection of surgical margins. The accuracy of this technique for the detection of positive margins and field cancerization should be investigated in a large number of patients.

Acknowledgments

The authors thank FAPESP (CEPOF-CEPID Program, proc. n° 98/14270-8, aid research proc. n° 07/57126-5 and n° 11/10802-1), CNPq (proc. n° 477439/2007-1 and ALNF scholarship n° 140493/2011-5), and INCITO for financial support.

References

1. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP, Haigentz M Jr, Stoeckli SJ, Shaha AR, Rapidis AD, Rodrigo JP, Rinaldo A. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2010) 267:1001-1017.
2. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Jay A, Sandison A, Thomas GJ, Kalavrezos N, Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant

- metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010 Apr 20;2:9.
3. El-Husseiny G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2000, 38:193-199.
 4. Hinni ML, Ferlito A, Brandwein-Gensler MS, Takes RP, Silver CE, Westra WH, Seethala RR, Rodrigo JP, Corry J, Bradford CR, Hunt JL, Strojan P, Devaney KO, Gnepp DR, Hartl DM, Kowalski LP, Rinaldo A, Barnes L et al. Surgical margins in head and neck cancer: A contemporary review. *Head and Neck* 2012.
 5. Looser KG, Shah JP, Strong EW. The significance of "positive" margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg* 1978;1:107-111.
 6. Batsakis JG. Surgical excision margins: a pathologist's perspective. *Adv Anat Pathol* 1999;6:140-148.
 7. Meier JD, Oliver DA, Varvares MA. Surgical Margin determination in head and neck oncology: current clinical practice. The results of an international American head and neck society member survey. *Head and Neck* 2005;27:952-958.
 8. Kademani D, Bell RB, Bagheri S et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1599-1605
 9. Wick MR, Mills SE. Evaluation of margins in anatomic pathology: technical, conceptual and clinical considerations. *Semin Diagn Pathol.* 2002; 19: 207-218.
 10. Black C, Marotti J, Zarovnya E, Paydarfar J. Critical Evaluation of Frozen Section Margins in Head and Neck Cancer Resections. *Cancer* 2006;107:2792-800.
 11. 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.

12. de Veld DCG, Skurichina M, Witjes MJH, Duin RPW, Sterenberg DJCM, Star WM. Autofluorescence characteristics of healthy oral mucosa at different anatomical sites. *Lasers Surg Med* 2003;32:367-376.
13. 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.
14. 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.
15. Beitler JJ, Smith RV, Silver CE et al. Close or positive margins after surgical resection for the head and neck cancer patient: the addition of brachytherapy improves local control. *Int J Radiation Oncology Biol. Phys.* 1998;40(2):313-317.
16. Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodanis C, Weber R. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131:472-476
17. Zarbo RJ, Hoffman GG, Howanitz PJ. Interinstitutional comparison of frozen section consultation. *Arch Pathol Lab Med*. 1991; 115:1187–1194
18. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994;73:187-90.
19. Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, Palcic B. Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:1035–40.
20. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, et al. In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10193-7.
21. Poh CF, Zhang L, Anderson DW, Durham JS, Williams PM, Priddy RW, Berean KW, Ng S, Tseng OL, MacAulay C, Rosin MP. Fluorescence

- visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. Clin Cancer Res. 2006 Nov 15;12(22):6716-22.
22. 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.
 23. Svistun E, Alizadeh-Naderi R, El-Naggar A, Jacob R, Gillenwater A, Richards-Kortum R. Vision enhancement system for detection of oral cavity neoplasia based on autofluorescence. Head Neck 2004;26:205-15.
 24. Meyer LE and Lademann J. Application of laser spectroscopic methods for in vivo diagnostics in dermatology. Laser Phys. Lett. 2007;4:754-760.
 25. AlSalhi MS, Masilamani V, Atif M, Farhat K, Rabah D and Al Turki MR. Fluorescence spectra of benign and malignant prostate tissues Laser Phys. Lett. 2012;9:631-635.
 26. Poh CF, Ng SP, Williams PM, *et al.* Direct Fluorescence visualization of clinically occult high-risk oral premalignant disease using a simple hand-held device. Head Neck 2006 Sept. 18 on-line publication.
 27. 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.
 28. Schantz SP, Kolli V, Savage HE, *et al.* In vivo native cellular fluorescence and histological characteristics of head and neck cancer. Clin Cancer Res 1998;4: 1177-82.
 29. 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.
 30. Swinson B, Jerjes W, El-Maaytah M, Norris P, Hopper C. Optical techniques in diagnosis of head and neck Malignancy. Oral Oncology 2006;42:221-228.
 31. Badizadegan K, Backman V, Boone CW, Crum CP, Dasari RR, Georgakoudi I, Keefe K, Munger K, Shapshay SM, Sheets EE, Feld MS. Spectroscopic

- diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. *Faraday Discuss* 2004;126:265-79.
32. Gillenwater A, Jacob R, Richards-Kortum R. Fluorescence spectroscopy; a technique with potential to improve the early detection of aerodigestive tract neoplasia. *Head Neck* 1998;20(6):556–62.
33. De Veld DCG, Witjes MJH, Sterenborg HJCM, Roodenburg JLN. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncology* 2005;41:117-131.
34. Hughes OR, Stone N, Kraft M, Arens C, Birchall MA. Optical and molecular techniques to identify tumor margins within the larynx. *Head Neck*. 2010 Nov;32(11):1544-53.
35. Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Apr;113(4):518-25.

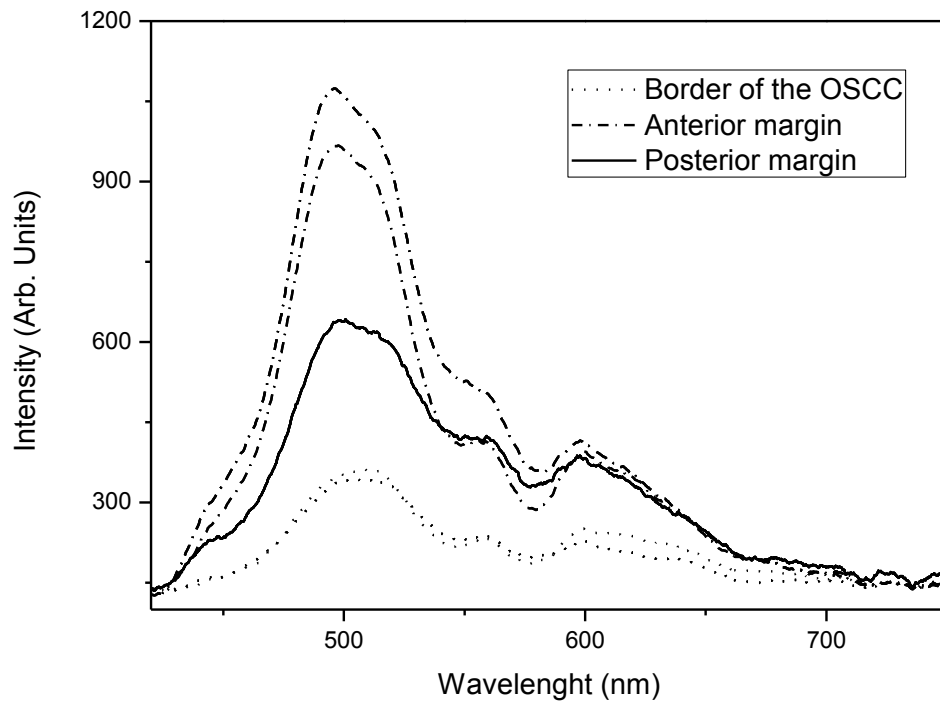


Figure 1. Qualitative analysis of spectra of the border of the tongue from subject 1, who had local recurrence in the posterior limit.

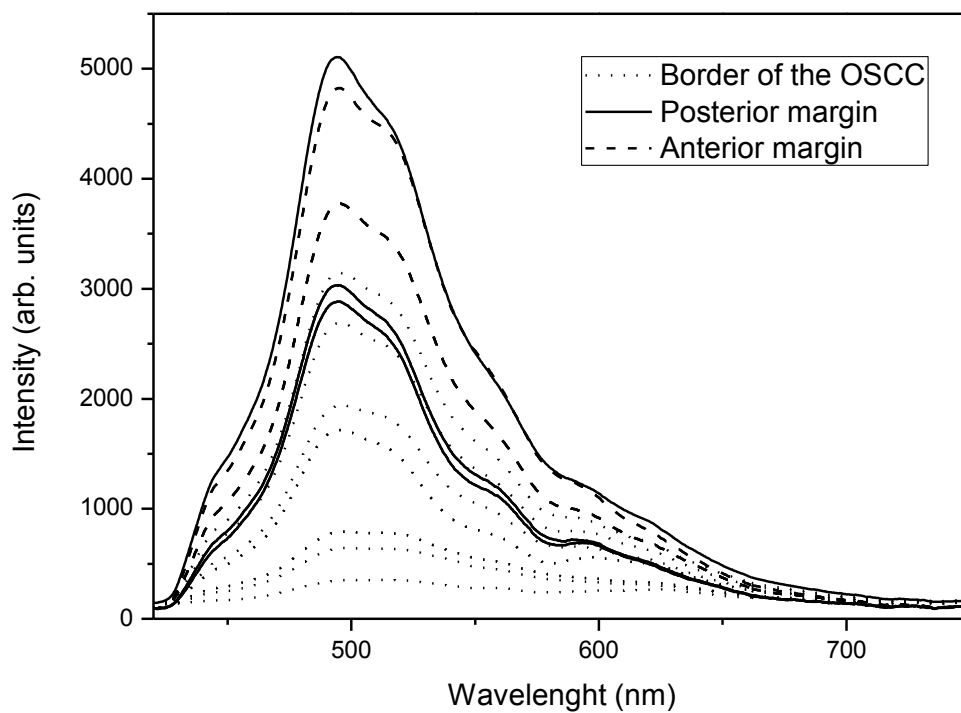


Figure 2. Qualitative analysis of spectra of the border of the tongue from subject 2, who had local recurrence in the posterior margin.

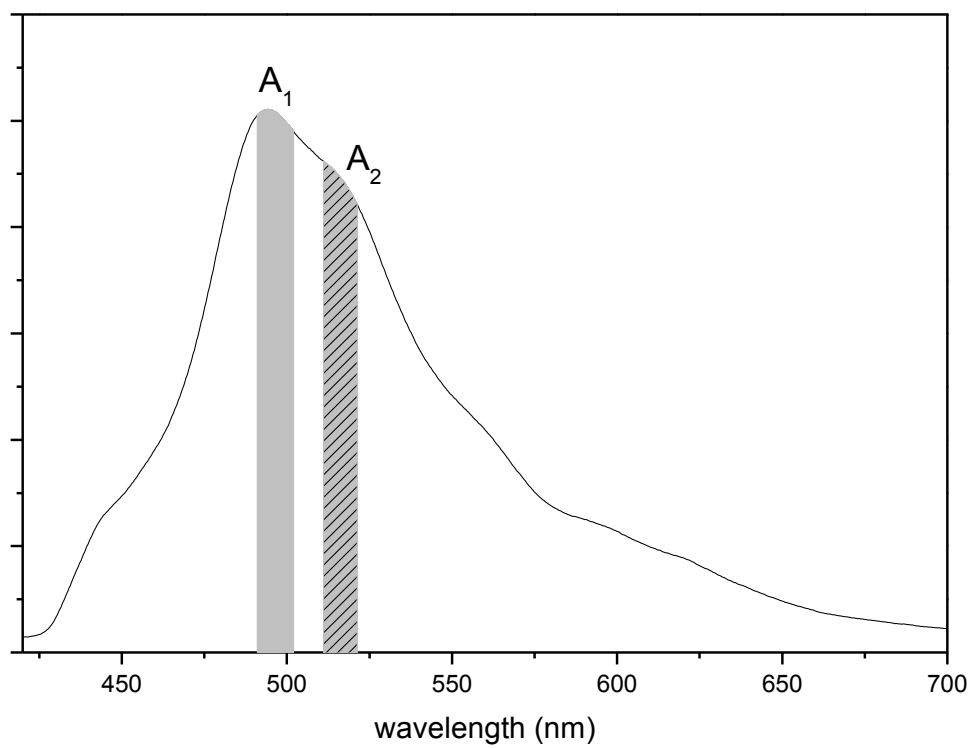


Figure 3. The ratio parameter was calculated according to the above diagram.

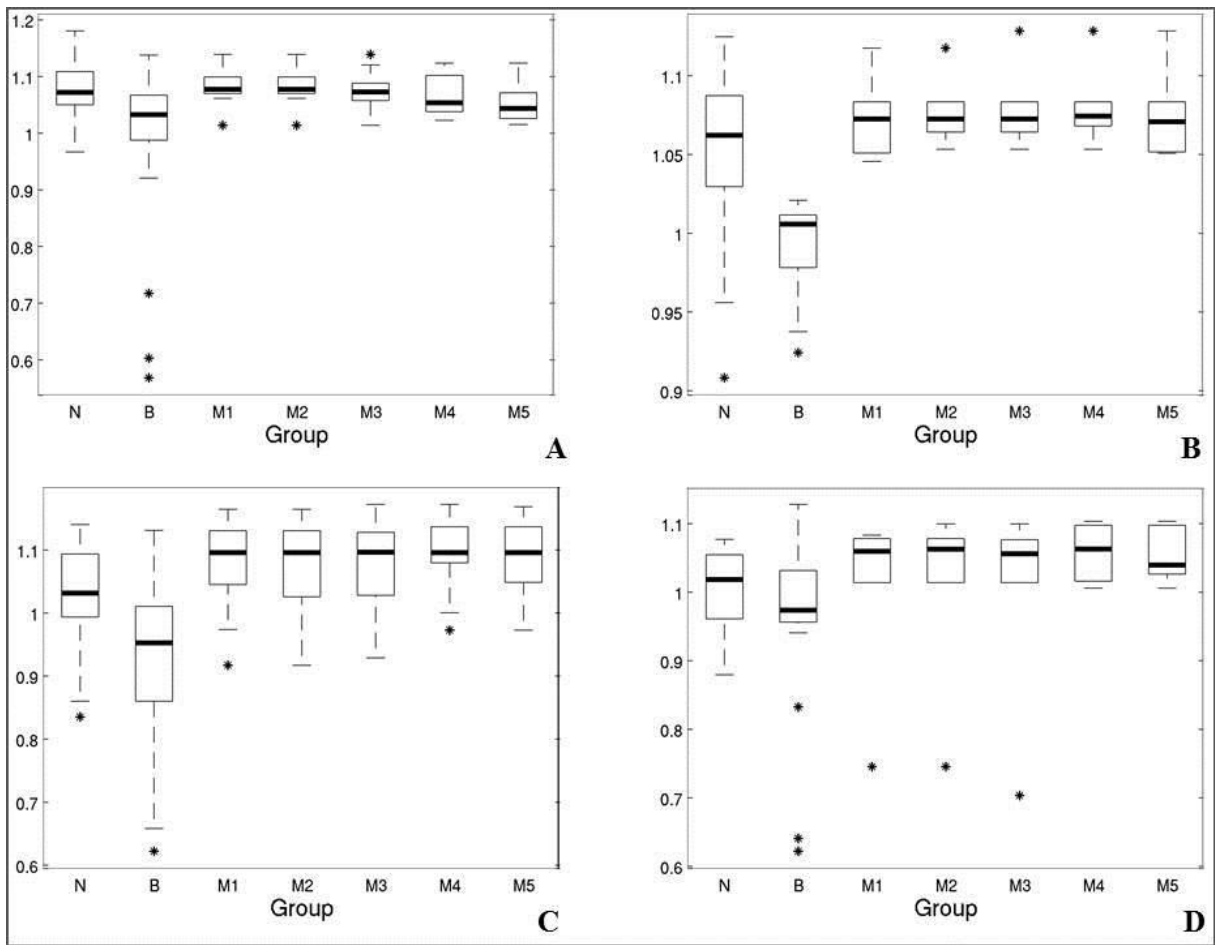


Figure 4. Box plots of the ratio of spectra mensuration in normal mucosa (N), border of lesion (B) and surgical margins (M) of the different anatomical sites. A- floor of the mouth; B - buccal mucosa; C -border of the tongue; and D - lip.

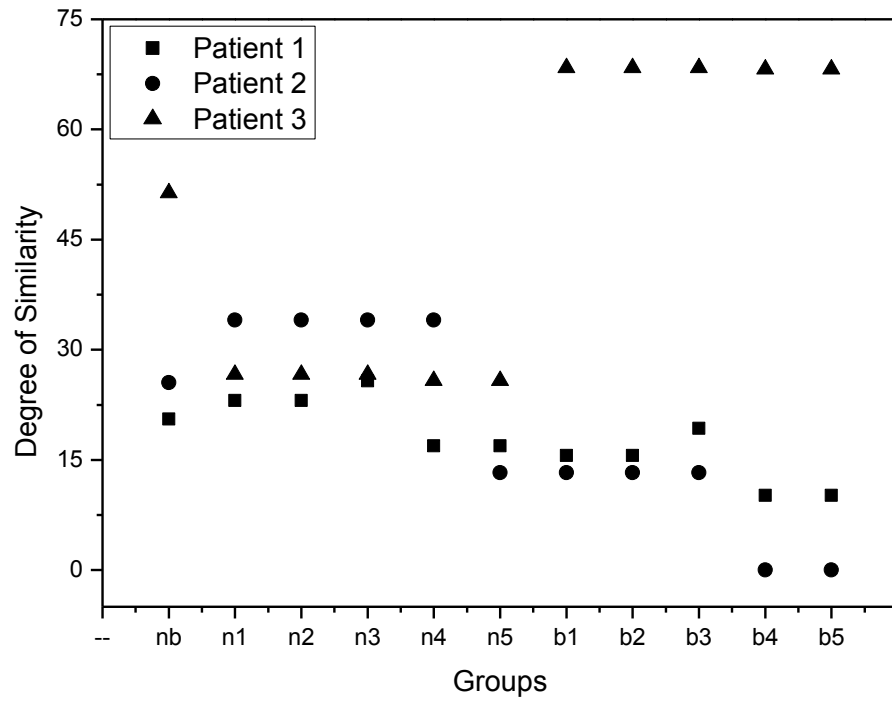


Figure 5. Analysis of degree of similarity of three patients with OSCC in floor of the mouth

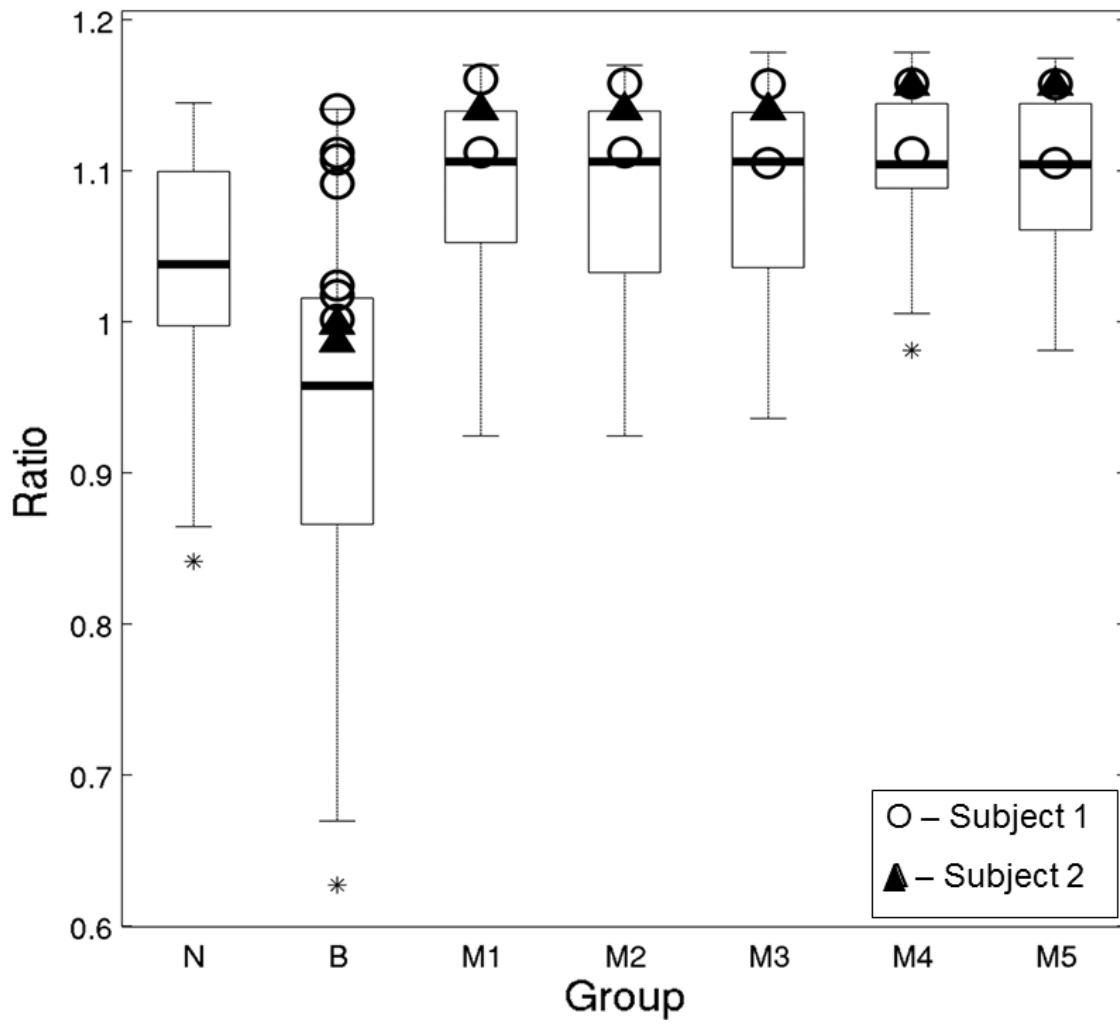


Figure 6. Box plot with recurrence patients highlighted.

N - normal mucosa, B – mucosa of the border of OSCC and M – mucosa of the surgical margins of OSCC.

CAPÍTULO 2

Artigo 2

Analysis of the surgical margins of the oral cancer using *in situ* and *ex vivo* fluorescence spectroscopy

Ana Lucia Noronha Francisco, DDS, PhD student, Wagner Rafael Correr, Clóvis Antônio Lopes Pinto, MD, PhD, João Gonçalves Filho, MD, PhD, Cristina Kurachi, DDS, PhD, Luiz Paulo Kowalski, MD, PhD

Submetido à Head and Neck

Abstract

Background: Fluorescence spectroscopy (FS) has been studied for the early detection and classification of tissues alterations of the oral mucosa. In the present study we investigate tissue changes using FS, at 532 nm excitation, in oral cancer *in situ* and immediate *ex vivo* resected specimen with particular attention to the surgical margins.

Methods: FS with 532 nm excitation was used in the exam of the healthy and with oral cancer (lesions and surgical margins) subjects. All analyzes were correlated with the pathological diagnosis.

Results: In twenty-two patients, we observed differences in the spectra of the border of the lesions versus surgical margins versus normal mucosa and the degree of similarity was calculated by anatomic site. Differences were also observed in the moments *in situ* and *ex vivo* from the same patient.

Conclusions: We saw the usefulness of FS to discriminate tissue changes in surgical margins.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, fluorescence spectroscopy, surgical margins, *in situ*, *ex vivo*, oral cavity.

Introduction

Oral cancer is a complex disease where its development and progression is a result of cumulative cellular changes in molecular pathways. The most frequently used treatment for oral squamous cell carcinoma (OSCC) is surgical resection with adjuvant radiation or chemoradiation in high risk patients. The greater the extent of the lesion, the more extensive, difficult and debilitating the treatment is, a fact that impacts the quality of life of the patients and the cost of the therapy. The treatment is simpler and survival increases when the lesions are diagnosed at early stages, in addition to the achievement of adequate surgery with tumor-free margins^{1,2,3,4}.

“Field cancerization” describes the multifocal development of oral cancer and it has become apparent that gene alterations within an affected field may be diffusely present at the patient oral mucosa. This altered mucosa can contribute to the risk of local disease recurrence or the development of second primary tumors. Clinically occult fields and areas of oral potentially malignant disorders (OPMDs), represent a heterogeneous group of lesions that can widely vary in their potential for malignant transformation and metastasis. Moreover, many OPMDs and early staged OSCCs are undetectable by standard white light examination and naked eye. Even where OPMDs and OSCCs can be clinically detected, disease may extend beyond the margins currently defined using visual examination. These clinically normal mucosas adjacent to the cancer can already present molecular alterations that may later be the site for recurrent disease^{5,6,7}.

Recent advances in optical technology have provided a means for simple, cost-effective, and discriminating visualization of diseased mucosa with different auxiliary tools. Fluorescence spectroscopy (FS), has been reported to aid in the

identification of OPMDs, and early oral cancers, as well as to guide the decision of site for biopsy, and of delimitation surgical margins^{7,8,9,10}.

The purpose of this study was to determine spectral characteristics to discriminate and correlate tissue changes obtained in *in situ* and *ex vivo* measurement at the normal mucosa of volunteers and at surgical tumor with pathology diagnostics.

Materials and Patients

Patients with OSCC and healthy volunteers were evaluated with clinical examination, FS measurement, and tissue or cell pathology. All subjects were over 18 years old, both genders, smokers and nonsmokers. The biopsy site was chosen based only on clinical examination. All study subjects were investigated at A.C. Camargo Cancer Center and gave signed informed consent. A homemade FS system was used in this study. The system was composed by excitation laser of 532nm frequency-doubled Nd:YAG, a Y-type probe (Ocean Optics, USA), a USB-spectrometer (USB-4000 - Ocean Optics, USA) and a laptop. The Y-type probe with two 600 μ m optical fibers was connected on one end to the excitation laser and the other to the spectrometer, and the investigation tip was enclosed in a handpiece. The external diameter of the interrogation tip was 2.5mm.

All participants underwent an anamnestic form containing information about the habits associated with the etiology of cancer. A thorough clinical examination was carried out, resulting in a clinical diagnosis. A mouth washing with saline was performed just before optical measurements to minimize possible contaminants in the mucosa, such as food scraps. The volunteers had fasted for at least 1 hour before optical interrogation to prevent dye intake modifying the fluorescence pattern of the investigated mucosa. Patients had fasted at least 8 hours before surgery.

Each measurement site was assessed using 532 nm excitation just before the surgical procedure. In patients with heterogeneous lesions, representative regions were chosen to correlate with different clinical aspects, avoiding any area of necrosis.

In each chosen site, at least 5 spectra were taken to check the variability on operator/system performance, and in surgical margins the measurements were taken in a concentric form at clockwise positions of 3, 6, 9 and 12 o'clock. All optical measurements were taken by the same operator (ALNF).

The second interrogation was performed at the resected tissue, within 10 minutes after resection, following the same protocol of the first examination. Three-mm punch biopsies were performed after clinical impression and the correlated fluorescence spectrum identified. Tissue sample was stained for HE analysis and the slides were evaluated by a single pathologist (CALP) who was blinded to the clinical impression and fluorescence data.

Normal volunteers were investigated at several oral sites: border of the tongue, floor of the mouth, lower lip mucosa, buccal mucosa, gingiva and palate, with 5 optical measurements per site. Cytological material was collected from all investigated sites using OralCDx brush and fixed with 95% ethanol for smear slide. The analysis under optical microscope was performed by same certified pathologist.

Fluorescence spectra were classified according to histopathology, the gold standard for diagnosis. Normal volunteers, clinical impression and cytological result were used for classification. First, a qualitative spectral analysis was performed by pathology, by patient and by oral site. Second, the overall spectral data was analyzed in an attempt to find spectral signatures. Finally, a classifying algorithm, using Euclidean distance, was performed to obtain the similarity degree between cancer and surgical margins, and between surgical margins and normal mucosa.

Results

Twenty-two patients, 9 female and 13 male, with a mean age of 59.23 (range 32 – 82 years), 17 smokers (77.3%) were investigated in the period from May 2009 to June 2010. The most prevalent oral sites were border of the tongue and floor of the mouth.

In this study, 20 volunteers with normal mucosa and without history of cancer in the upper aerodigestive tract were included. Only 5 oral sites were included in the analysis.

With the normal volunteers, a total of 691 spectra were analyzed only *in situ*, and with the OSCC patients, a total of 343 *in situ* spectra, and of 363 *ex vivo* spectra taken at the border of cancer and at surgical margins, were analyzed .

Spectral comparison was performed between normal mucosa of volunteers (N), border of the cancer (C) and surgical margins (M). For the *ex vivo* data, the analysis compared the (C) and (M). The data were evaluated considering pathology, oral site, inter- and intra-subject, and *in situ* and *ex vivo* classes on the spectral differences.

Fluorescence spectra showed distinct behaviors regarding the form and intensity considering different oral sites, clinical diagnosis, pathological findings (Figure 1) and according to the measurement moment, *in situ* or *ex vivo* (Figure 2). Figure 1A shows the area of the border of well-differentiated OSCC and Figure 1B shows the area of the surgical margin with acanthosis and mild inflammatory infiltrate where were made the spectral measurements.

For the analysis of similarity degree, the spectra were normalized by the wavelength of maximal response in normal tissue. Thus, for excitation at 532 nm, each spectrum was divided by the response 598 nm.

After normalization, for each patient, the spectra of the margins of the lesions were compared to the average spectrum of the border of the lesions and the average spectrum of healthy tissue volunteer, all without exception in the same anatomical site. The comparison was made by calculating the Euclidean distance between the spectra. This is a conventional measure of similarity and when its value is higher, the more distinct are the spectra compared. Spectra were normalized Euclidean distance between them due to changes in its shape as a result of tissue alterations.

In the graphs shown in Figure 3, n_b is the mean of similarity calculated between spectra N and C, n_1 , n_2 , n_3 , n_4 and n_5 are mean of similarity calculated between spectra N and M, and b_1 , b_2 , b_3 , b_4 and b_5 are mean of similarity calculated between spectra M and C.

It was expected that the values of the n were lower and the values of the b were higher, but this was not observed in all anatomical sites and the same results were not always corresponded with the histopathological results. The alterations may

be justified due to the fact that most individuals with OSCC already show subclinical alteration in all oral mucosa, including areas of surgical margins, by harmful habits like smoking.

The Wilcoxon paired test was the statistical analysis performed to verify association between two measures of different anatomical sites. The 5% significance level was considered for all statistical tests. There were not statistical significant difference between nb and each n. Also no difference was observed between nb e each b.

Discussion

The variation of tissue architecture modifies the pattern of fluorescence spectrum collected. The biochemical composition, particularly the concentration of biomolecules absorbers, fluorophores and scatters, defines the final tissue emission. The monochromaticity of the light employed enables a greater selective of excitation of fluorophores, scatters or absorbers, making the most efficient method^{6,11,12,13}.

FS is a sensitive technique for discrimination of tissues, oral mucosa from distinct sites, as gingival, buccal mucosa, or tongue, present different fluorescence emissions^{8,12,14}.

The process of carcinogenesis involves biochemical changes in the epithelium and the extracellular matrix, modification in optical properties of these tissues is expected. The fluorescence related to collagen, and elastin, as well as increased absorbance due to angiogenesis, results in significantly reduced emission in oral dysplastic and inflammatory lesions^{15,16}.

The presence of inflammation may be a complicating factor for fluorescence diagnosis of oral lesions, since it is difficult to distinguish when the reduced autofluorescence is due to inflammation or to neoplasia. As the inflammation affects mainly the stroma and changes occur in the dysplastic epithelium, the evaluation should take into account the excitation wavelength, or individualized collection from the different tissue depths, to be able to distinguish the inflammatory benign lesions from dysplastic or malignant lesions¹⁷.

Bacterial contamination is another important factor because some bacteria produce porphyrins, and this may change the result of the intrinsic fluorescence of the

tissue. Disregarding the increased red emission, the optical discrimination has been mainly associated with a decrease in the intensity of fluorescence emitted tumor region as compared to the healthy region. This fact has been correlated with reduction of cross-linked collagen fibers and the matrix components^{18,19}.

Also observed is that the difference in clinically measured spectra at 500 nm to 560 nm emission is caused by a contribution of FAD to the total detected by fluorescence. However, it is also possible that this layer has contributions from both, the NADH and FAD, which would improve the prediction and measurement of average spectra. Thus, a direct technique for estimating the spectral characteristics of epithelial sublayers could significantly improve the accuracy of the measurements^{8,13}.

The spectroscopy technique investigates only a small volume of tissue, only the target point and the penetration depth of the laser in the green region is restricted to superficial layers of the tissue, this being limitation of the technique. Poh CF *et al.* (2006)⁶ using the technique of autofluorescence widefield image showed the effectiveness of a single hand light (excitation 400-460 nm) for delineating the true extent of a tumor which, in turn, can be useful for guiding the complete removal of oral cancer in the operating room^{20,21,22}.

An adequate delimitation of the tumor for resection is not always precisely achieved, and the specimen shrinkage, pathological processing artifacts and difficult anatomy are negative points of the process. Other parameters pathologic as anatomic site, tumor size, depth of invasion, degree of cell differentiation, bone involvement, vascular and/or nervous and/or lymphatic invasion and presence of PMD complicate the problem^{1,23,24}.

Positive or close margins are associated with an increase in local recurrence rate and have a negative effect on survival rate. In pathological analysis both mucosal and deep margins of 5 mm or more are clear, 1-5 mm as close and less than 1 mm as involved, taking into consideration the shrinkage effect post-surgical which can be at least 30%. So, in order to achieve a 5 mm pathological clearance, 8-10 mm *in situ* surgical margin needs to be taken. Furthermore, several studies have shown that local recurrence and overall survival rate benefit from achieving negative resection

margins^{1,2,24,25}. Uniform criteria that define adequate surgical margins are lacking among head and neck surgeons.

The use of intraoperative frozen-section evaluation of surgical margins is an accepted and frequent practice in head and neck cancer resections, being a method of providing a rapid intraoperative pathology consultation. The accuracy of the frozen-section diagnosis is greater than 90% in the hands of a certified pathologist and the utility of the procedure has been well established. Re-surgery for positive margins after initial surgery is an effective treatment but it is undesirable and often not possible, beyond the fact that frozen sections are costly procedures that require multiple personnel and changes the macroscopic resected tissue^{26,27,28}. These are all facts that show the importance of a better delineation of the lesion in the surgical room.

In the literature, results are found of fluorescence intensity tissue maintained *in vivo* and *ex vivo*, over a long period in biopsies or small tissues^{29,30,31}. However our result, by analyzing these two moments, showed differences in fluorescence intensity and has kept only the shape of the spectra. An important observation to be discussed and studied better by the fact that in our study the *ex vivo* examination was performed immediately, after surgical removal of the specimen; at this time, the specimen is found in a state of ischemia-reperfusion and with alterations from metabolic cofactors when viewed in other tissues^{29,32,33,34}.

In the present study, using a single wavelength and a simple analysis of the Euclidian distance, it was not possible to discriminate the tumor margins that would potentially result in recurrence. Several methods have been investigated to resolve this problem by statistical analysis of the spectral data to reduce the noise or the use in multiple wavelengths excitation. Multivariate analysis based on Principal Components Analyzes (PCA) and support vector machines were introduced to identify spectral characteristics that can be correlated with the pathology condition tissues. There are several types of mathematical procedures that have been tested for a better discrimination (classification) of the samples²⁰.

The results demonstrate the potential of the system of the FS to detect tissue changes in surgical margins, as a noninvasive method. More studies should be done

with a large number of patients for the detection of positive margins and field cancerization.

Acknowledgments

The authors thank FAPESP (CEPOF-CEPID Program, proc. n° 98/14270-8, aid research proc. n° 07/57126-5 and n° 11/10802-1), CNPq (proc. n° 477439/2007-1 and ALNF scholarship n° 140493/2011-5), and INCITO for financial support.

References

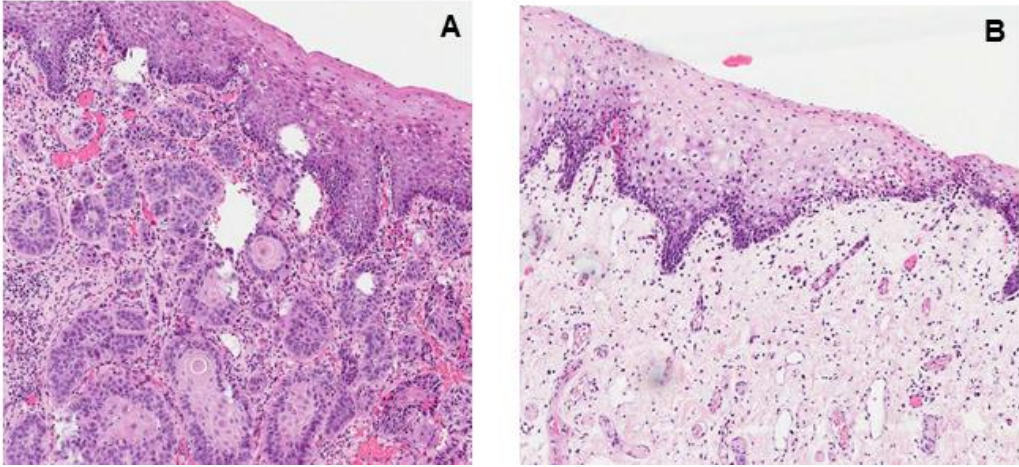
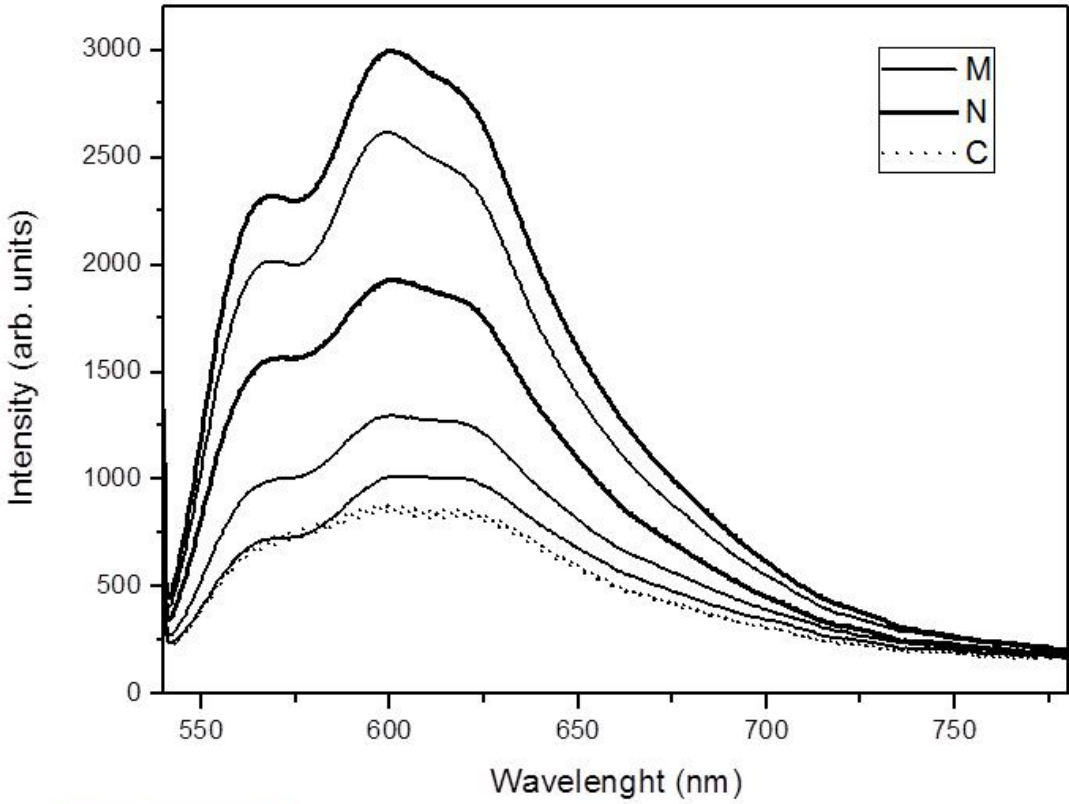
1. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Jay A, Sandison A, Thomas GJ, Kalavrezos N, Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010 Apr 20;2:9.
2. Hinni ML, Ferlito A, Brandwein-Gensler MS, Takes RP, Silver CE, Westra WH, Seethala RR, Rodrigo JP, Corry J, Bradford CR, Hunt JL, Strojan P, Devaney KO, Gnepp DR, Hartl DM, Kowalski LP, Rinaldo A, Barnes L et al. Surgical margins in head and neck cancer: A contemporary review. *Head and Neck* 2012.
3. Looser KG, Shah JP, Strong EW. The significance of "positive" margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg* 1978;1:107-11.
4. Watanabe A, Taniguchi M, Tsujie H, Hosokawa M, Fujita M, Sasaki S. Clinical impact of iodine staining for diagnosis of carcinoma in situ in the floor of mouth, and decision of adequate surgical margin. *Auris Nasus Larynx.* 2012 Apr;39(2):193-7
5. 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.
6. Poh CF, Zhang L, Anderson DW, Durham JS, Williams PM, Priddy RW, Berean KW, Ng S, Tseng OL, MacAulay C, Rosin MP. Fluorescence

- visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006 Nov 15;12(22):6716-22.
7. Tsui IFL, Garnis C, Poh CF. A dynamic oral cancer field --unraveling the underlying biology and its clinical implication *Am J Surg Pathol*. 2009 November; 33(11): 1732–1738.
 8. Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*. 2000; 2: 89-117.
 9. Badizadegan K, Backman V, Boone CW, Crum CP, Dasari RR, Georgakoudi I, Keefe K, Munger K, Shapshay SM, Sheets EE, Feld MS. Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. *Faraday Discuss* 2004;126:265-79.
 10. Bydlon TM, Kennedy SA, Richards LM, Brown JQ, Yu B, Junker MK, Gallagher J, Geradts J, Wilke LG, Ramanujam N. Performance metrics of an optical spectral imaging system for intra-operative assessment of breast tumor margins. *Opt Express*. 2010 Apr 12;18(8):8058-76.
 11. 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.
 12. De Veld DCG, Witjes MJH, Sterenborg HJCM, Roodenburg JLN. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncology* 2005;41:117-131.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
16. 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.
 17. 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. 2008; 15: 1669-79.
 18. 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.
 19. van Staveren HJ, van Veen RL, Speelman OC, Witjes MJ, Star WM, Roodenburg JL. Classification of clinical autofluorescence spectra of oral leukoplakia using an artificial neural network: a pilot study. Oral Oncol. 2000 May;36(3):286-93.
 20. Xin-Hua Hu, Jun Qing Lu. Optical Detection of Cancers. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Ed. Taylor & Francis. 2005.
 21. Westra WH, Sidransky D. Fluorescence Visualization in Oral Neoplasia: Shedding Light on an Old Problem. Clin Cancer Res. 2006; 12(22): 6594-97.
 22. 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.
 23. Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. Am J Surg. 1990 Oct;160(4):410-4.
 24. Beitler JJ, Smith RV, Silver CE *et al.* Close or positive margins after surgical resection for the head and neck cancer patient: the addition of brachytherapy improves local control. Int J Radiation Oncology Biol. Phys. 1998;40(2):313-317.
 25. Jackel MC, Ambrosch P, Martin A, Steiner W. Impact of re-resection for inadequate margins on the prognosis of upper aerodigestive tract cancer treated by laser microsurgery. The laryngoscope 2007; 117:350-356.

26. Zarbo RJ, Hoffman GG, Howanitz PJ. Interinstitutional comparison of frozen section consultation. *Arch Pathol Lab Med.* 1991; 115:1187–1194
27. Wick MR, Mills SE. Evaluation of margins in anatomic pathology: technical, conceptual and clinical considerations. *Semin Diagn Pathol.* 2002; 19: 207-218.
28. Black C, Marotti J, Zarovnyaya E, Paydarfar J. Critical Evaluation of Frozen Section Margins in Head and neck Cancer Resections. *Cancer* 2006;107:2792-800.
29. Svistun E, Alizadeh-Naderi R, El-Naggar A, Jacob R, Gillenwater A, Richards-Kortum R. Vision enhancement system for detection of oral cavity neoplasia based on autofluorescence. *Head Neck* 2004;26:205-15.
30. I. Pavlova, C. R. Weber, R. A. Schwarz, M. D. Williams, A. M. Gillenwater, R. Richards-Kortum, Fluorescence spectroscopy of oral tissue: Monte Carlo modeling with site-specific tissue properties, *J. Biomed. Opt.* 2009;14:014009.
31. AlSalhi AM, Masilamani V, Atif M, Farhat K, Rabah D, Al Turki MR. Fluorescence spectra of benign and malignant prostate tissue. *Laser Phys. Lett.* 2012; 9(9):631-635.
32. Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF. Ultra-violet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Laser Surg Med* 1992;12:63-78.
33. Ananian V, Tozzo P, Ponzano E, Nitti D, Rodriguez D, Caenazzo L. Tumoural specimens for forensic purposes: comparison of genetic alterations in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int J Legal Med.* 2011 May;125(3):327-32.
34. Groenen PJ, Blokx WA, Diepenbroek C, Burgers L, Visinoni F, Wesseling P, van Krieken JH. Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the pre-analytical phase. *Histopathology.* 2011;59(1):1-7.

Figure 1: Comparative analysis of the spectra collected *in situ* with the pathology, at border of the lesion, surgical margin and normal mucosa of the volunteer in the anatomical site border of tongue.



A – Well differentiated OSCC at the border of the lesion and B – one of the free margins with epithelium with acanthosis and mild inflammatory infiltrate.

Figure 2: Comparative analysis of the spectra of surgical margins in times *in vivo* and *ex vivo* of an individual with OSCC randomly chosen in site floor of the mouth.

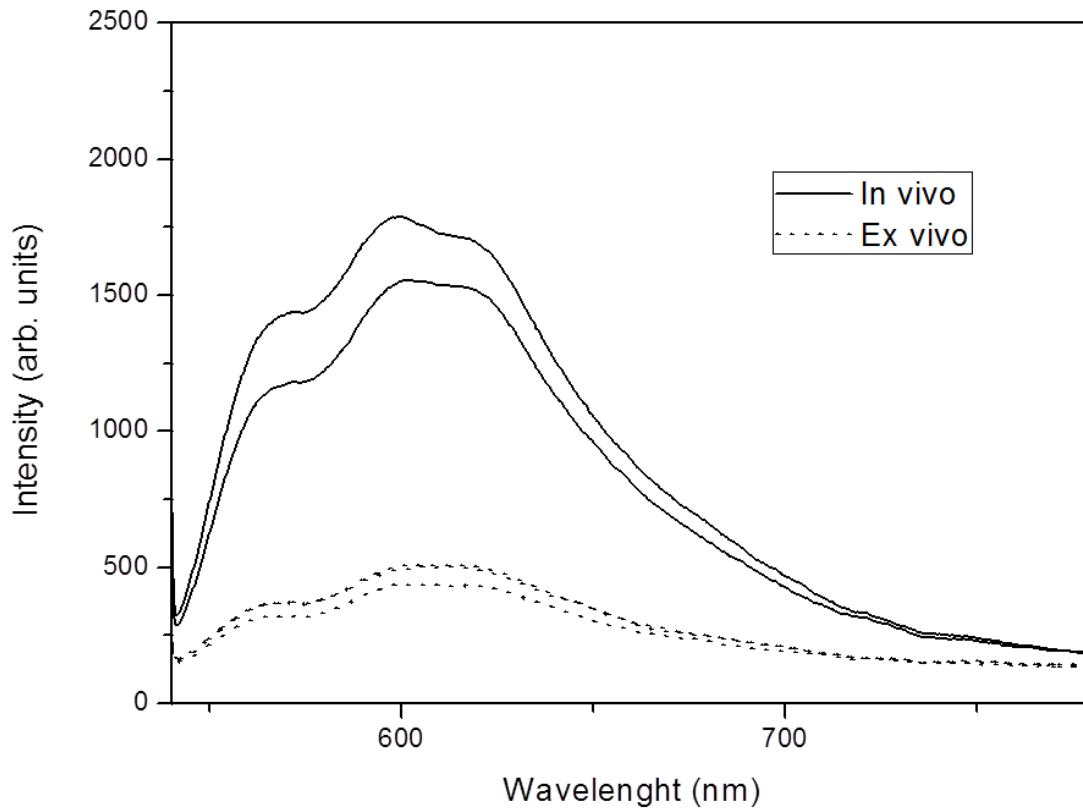
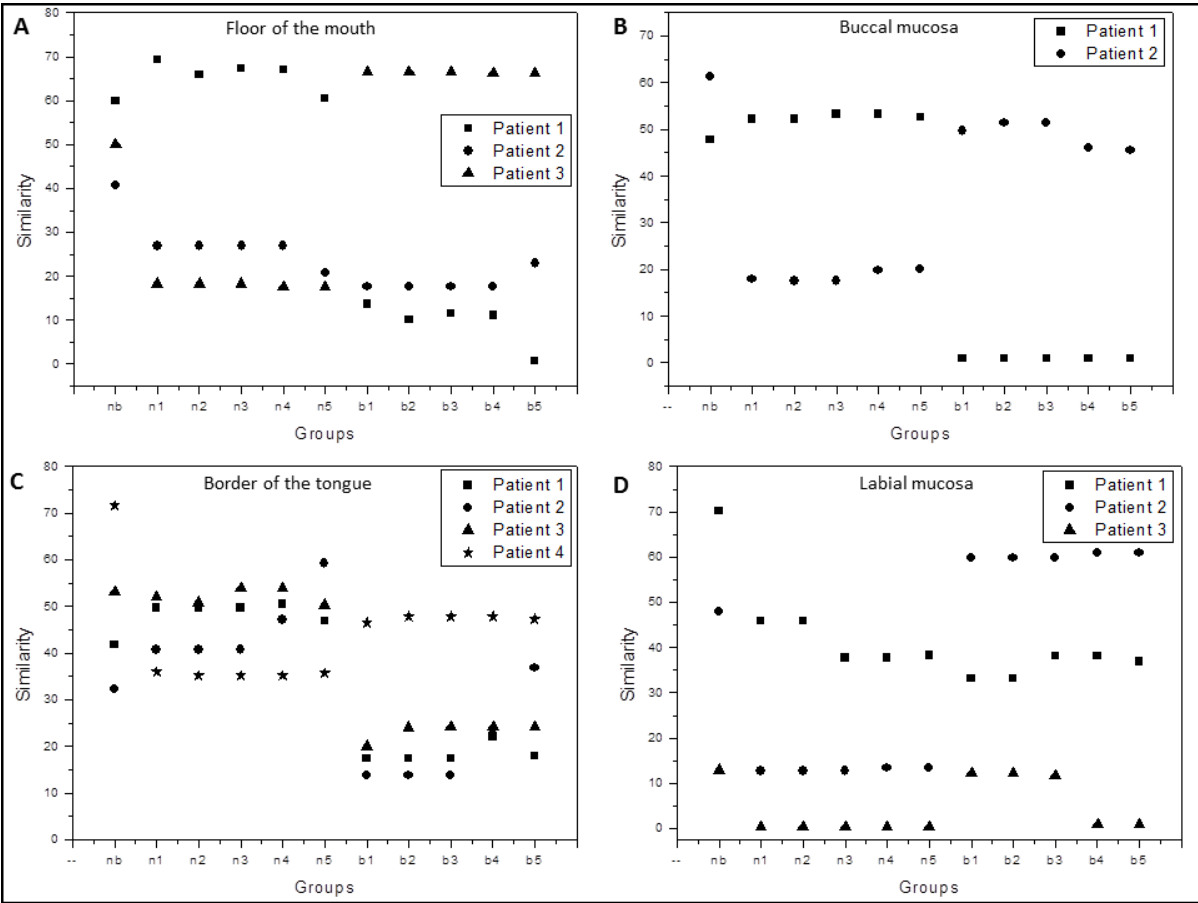


Figure 3: Analysis of the grade of similarity in different anatomical sites.



CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram o potencial do diagnóstico por espectroscopia de fluorescência de forma objetiva e não invasiva, distinguindo sítios de lesão (carcinoma de células escamosas), mucosa com alteração subclínica e mucosa oral normal. Além disso, a excitação em 406 nm foi mais eficiente *in situ* apoiando a utilização de um sistema de espectroscopia óptica para melhorar o desempenho no diagnóstico clínico. Na análise *ex vivo* imediata a excitação em 532 nm apresentou melhores resultados, mas ainda são necessários mais estudos.

REFERÊNCIAS

1. Ananian V, Tozzo P, Ponzano E, Nitti D, Rodriguez D, Caenazzo L. Tumoural specimens for forensic purposes: comparison of genetic alterations in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int J Legal Med.* 2011 May;125(3):327-32.
2. Badizadegan K, Backman V, Boone CW, Crum CP, Dasari RR, Georgakoudi I, Keefe K, Munger K, Shapshay SM, Sheets EE, Feld MS. Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. *Faraday Discuss* 2004;126:265-79.
3. Black C, Marotti J, Zarovnaya E, Paydarfar J. Critical Evaluation of Frozen Section Margins in Head and neck Cancer Resections. *Cancer* 2006;107:2792-800.
35. Bydlon TM, Kennedy SA, Richards LM, Brown JQ, Yu B, Junker MK, Gallagher J, Geradts J, Wilke LG, Ramanujam N. Performance metrics of an optical spectral imaging system for intra-operative assessment of breast tumor margins. *Opt Express.* 2010 Apr 12;18(8):8058-76.
4. 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.
5. Döbrössy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24(1):9-17.
6. 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.
7. Farwell DG, Meier JD, Park J, Sun Y, Coffman H, Poirier B, Phipps J, Tinling S, Enepekides DJ, Marcu L. Time-resolved fluorescence spectroscopy as a

diagnostic technique of oral carcinoma: Validation in the hamster buccal pouch model. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Feb;136(2):126-33.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Groenen PJ, Blokx WA, Diepenbroek C, Burgers L, Visinoni F, Wesseling P, van Krieken JH. Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the pre-analytical phase. Histopathology. 2011;59(1):1-7.
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. Hinni ML, Ferlito A, Brandwein-Gensler MS, Takes RP, Silver CE, Westra WH, Seethala RR, Rodrigo JP, Corry J, Bradford CR, Hunt JL, Stojan P, Devaney KO, Gnepp DR, Hartl DM, Kowalski LP, Rinaldo A, Barnes L *et al.* Surgical

margins in head and neck cancer: A contemporary review. *Head and Neck* 2012.

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.
36. Hughes OR, Stone N, Kraft M, Arens C, Birchall MA. Optical and molecular techniques to identify tumor margins within the larynx. *Head Neck.* 2010 Nov;32(11):1544-53..
17. 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.
18. 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.
19. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Brasil. 2013. [acesso 2013 Jun 15]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>.
20. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN, 2012. [acesso 2013 Jun 09]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/>.
21. Jäckel MC, Ambrosch P, Martin A, Steiner W. Impact of re-resection for inadequate margins on the prognosis of upper aerodigestive tract cancer treated by laser microsurgery. *Laryngoscope.* 2007 Feb;117(2):350-6.
22. Johnson NW. Aetiology and risk factors for oral cancer, with special reference to tobacco and alcohol use] *Magy Onkol.* 2001; 45(2):115-122.
23. Kademani D, Oral Cancer. *Mayo Clin Proc.*; July 2007; 82(7): 878-887.

24. Kurachi C, Fontana CR, Melo CAS, Rosa LEB, Bagnato VS. Optical biopsy of chemical-induced tongue lesions in Golden Syrian hamsters: an *in vivo* study. *Laser Physics*. 2004; 14(4): 502-06.
25. 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.
26. 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.
27. Lue N, Kang JW, Yu CC, Barman I, Dingari NC, Feld MS, Dasari RR, Fitzmaurice M. Portable optical fiber probe-based spectroscopic scanner for rapid cancer diagnosis: a new tool for intraoperative margin assessment. *PLoS One*. 2012;7(1):e30887.
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. 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.
32. 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.
33. Pindborg, JJ. *Câncer e pré-câncer bucal*. 1. ed., São Paulo, Ed. Panamericana, 1981.
34. 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.
35. Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*. 2000; 2: 89-117.
36. 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.
37. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Investig.* 2001; 5(4):207-13.
38. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, Som PM, Day TA; Committee for Neck Dissection Classification, American Head and Neck Society. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 May;134(5):536-8.
39. Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Magennis P, Shaw RJ, *et al.* Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncol* 2009;45:201-11.
40. 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.

41. 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*. 2008; 15: 1669-79.
42. Silverman, S. Early diagnosis of oral cancer. *Cancer*. 1988;62:1796-99.
43. Sonis, ST; Fazio, RC; Fang, L. *Princípios e prática de medicina oral*. 2. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1995.
44. Swinson B, Jerjes W, El-Maaytah M, Norris P, Hopper C. Optical techniques in diagnosis of head and neck Malignancy. *Oral Oncology* 2006;42:221-228.
45. Union for International Cancer Control (UICC). 2013. [acesso 2013 Jun 08]. Disponível em <http://www.uicc.org/tobaccom>.
46. Xin-Hua Hu, Ju Quin Lu. *Optical Detection of Cancers*. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Ed. Taylor & Francis. 2005.
47. Westra WH, Sidransky D. Fluorescence Visualization in Oral Neoplasia: Shedding Light on an Old Problem. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(22): 6594-97.
48. Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ*. 2001; 65(4):306-12.
49. Wick MR, Mills SE. Evaluation of margins in anatomic pathology: technical, conceptual and clinical considerations. *Semin Diagn Pathol*. 2002; 19: 207-218.

ANEXO 1



**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

ANEXO 2

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 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

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 4

ANAMNESE

Nome: _____ Nº: _____

Sexo: (F) (M) Idade: _____ anos

Cidade/Estado: _____ Telefone: _____

Histórico Médico: _____

Medicação: _____

Fumo: _____ Alcool: _____

Histórico Odontológico: _____

Exame Extra-Oral: _____

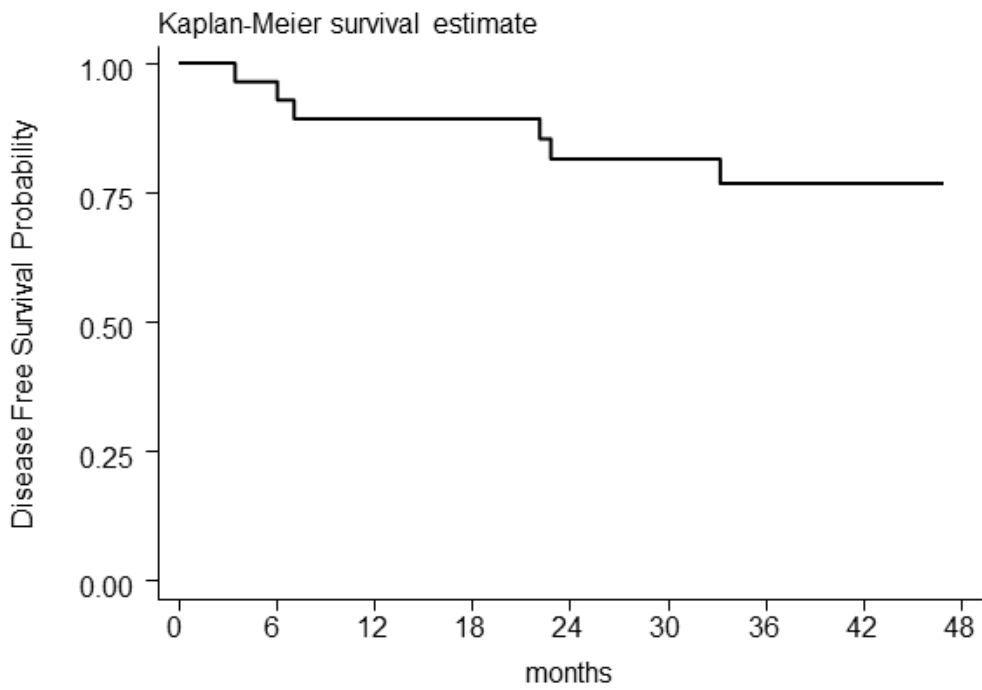
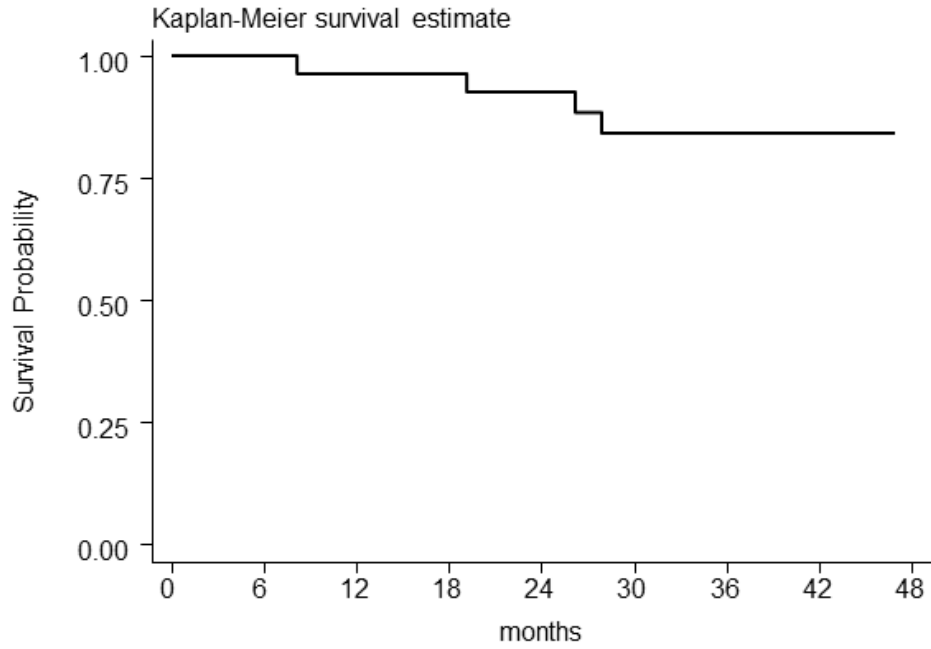
Exame Intra-Oral: _____

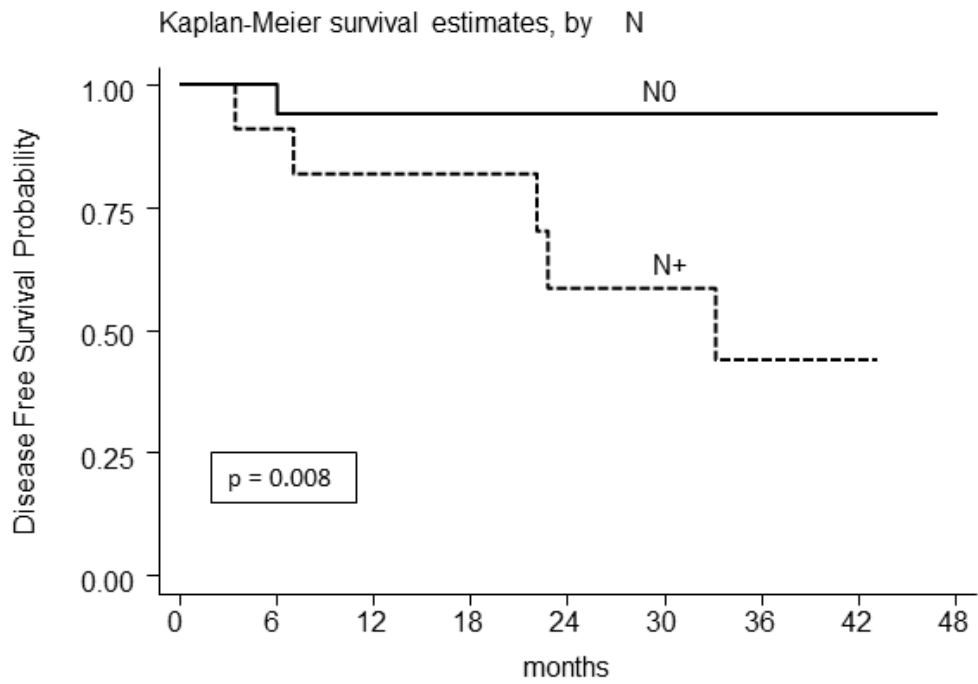
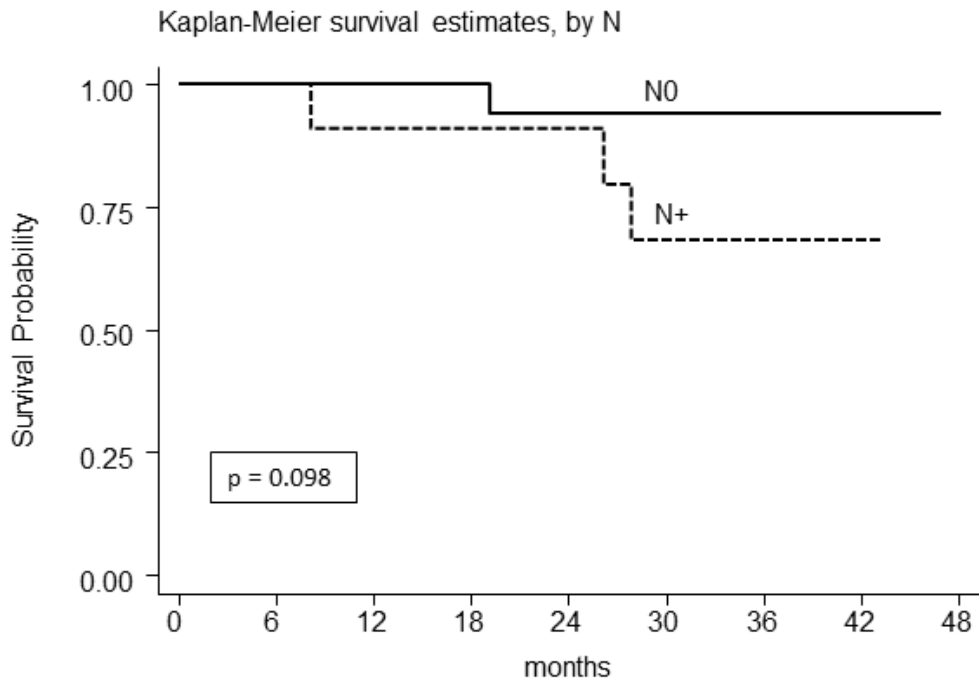
História da doença: _____

Diagnóstico:

ANEXO 5

Gráficos de sobrevivida Capítulo 1





ANEXO 6

Tabelas do Capítulo 2

Table 1. Comparison of the medians between nb and each n1, n2, n3, n4 e n5 and b1, b2, b3, b4 e b5 in anatomical site floor of the mouth.

Variable	Range	Median	p-value
Nb	40665 – 59949	49955	
N1	18285 – 69348	26870	0.285
N2	18285 – 65930	26870	0.285
N3	18285 – 67381	26870	0.285
N4	17678 – 67007	26870	0.285
N5	17678 – 60387	20803	0.285
B1	13651 - 66573	17697	
B2	10176 - 66573	17697	0.317
B3	11576 - 66573	17697	0.317
B4	11100 – 66310	17697	0.166
B5	0.6689 - 66310	22913	0.593

p-value obtained by paired Wilcoxon signed- rank test

A Tabela 1 mostra a comparação entre as medianas de nb e cada medida dos ns, no sítio assoalho da boca. Não houve diferença estatística significativa entre a média de nb e cada n. Também não foi observada diferença significativa entre a média de nb e cada b.

Table 2. Comparison of the medians between nb and each n1, n2, n3, n4 e n5 and b1, b2, b3, b4 e b5 in anatomical site border of the tongue.

Variable	Range	Median	p-value
Nb	32387 – 229106	53194	
N1	33089 - 129152	45094	0.066
N2	24813 - 129152	41047	0.173
N3	15972 - 129152	40713	0.172
N4	15972 - 203905	47149	0.213
N5	21489 - 203905	42957	0.139
B1	0.579 - 157149	20102	
B2	0.626 - 159674	24051	0.202
B3	0.700 - 159775	24142	0.202
B4	0.716 - 159775	24142	0.515
B5	0.612 - 157734	32326	0.441

p-value obtained by paired Wilcoxon signed- rank test

A Tabela 2 mostra a comparação entre as medianas de nb e cada medida dos ns, no sítio borda de língua. Não houve diferença estatística significativa entre a média de nb e cada n. Também não foi observada diferença significativa entre a média de nb e cada b.

ANEXO 7

Análise das lesões de câncer de boca com a patologia, nos pontos nos quais foram realizadas medidas espectroscópicas previamente.

Paciente	Anatomopatológico	Borda	M1	M2	M3	M4	M5
1	IS	9	-	-	0	-	34
2	G2	8	-	-	3	-	34
3	IS	9	-	-	2	-	2
4	G1	8	-	-	24	-	2
5	G3	8	-	-	34	-	4
6	G2	8	-	-	24	-	34
7	G2	8	-	-	2	-	2
8	G1	8	-	-	24	-	0
9	G1	8	-	-	4	-	0
10	G2	8	-	-	3	-	3
11	G2	8	-	-	34	-	0
12	G2	8	-	-	3	-	0
13	G2	8	-	-	3	-	0
14	G2	9	-	-	34	-	1
15	G2	8	-	-	24	-	0
16	G2	8	-	-	4	-	1
17	G2	8	-	-	2	-	1
18	G2	8	-	-	34	-	1
19	G1	8	-	-	34	-	34
20	G2	8	-	-	2	-	2
21	G2	8	-	-	3	-	0
22	G2	8	-	-	34	-	0
23	G2	8	-	-	34	-	3
24	G2	8	-	-	4	-	0
25	G2	8	-	-	3	-	0
26	G2	8	-	-	3	-	1
27	G2	8	-	-	3	-	1
28	G2	8	-	-	34	-	0
29	G2	8	-	-	34	-	1
30	G2	8	-	-	34	-	0
31	G2	8	-	-	34	-	0
32	G2	8	-	-	4	-	34
33	G2	8	-	-	4	-	34
34	G2	8	-	-	3	-	3
35	G2	8	-	-	3	-	3

36	G1	8	-	-	1	-	0
37	G1	8	-	-	3	-	3
38	G3	8	-	-	3	-	3
39	G3	8	-	-	34	-	3
40	G3	8	-	-	34	-	3
41	G3	8	-	-	34	-	3
42	G2	8	-	-	34	-	34
43	G2	8	-	-	34	-	3
44	G2	8	-	-	2	-	34
45	G2	8	-	-	34	-	3

Descrição: Sem particularidades 0; Hiperkeratose 1; Hiperkeratose e acantose 2; Hiperplasia epitelial 3; Infiltrado inflamatório 4; Displasia leve 5; Displasia moderada 6; Displasia intensa 7; Carcinoma epidermóide 8; e Carcinoma *in situ* 9.