

LUIS FELIPE DAS CHAGAS E SILVA DE CARVALHO

**ANÁLISE *EX VIVO* DE HIPERPLASIA FIBROSA INFLAMATÓRIA DE
MUCOSA JUGAL POR ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

LUIS FELIPE DAS CHAGAS E SILVA DE CARVALHO

**ANÁLISE *EX VIVO* DE HIPERPLASIA FIBROSA INFLAMATÓRIA DE
MUCOSA JUGAL POR ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janete Dias Almeida

**São José dos Campos
2008**

DEDICATÓRIA

*Ao meu avô paterno, **Pedro Alves de Carvalho**, exemplo de pessoa humilde, determinada a viver dignamente e a construir uma família superando dificuldades. A superação e a força de vontade permitiram que ele obtivesse sucesso nesta empreitada.*

*Ao meu avô materno, **Benedito das Chagas e Silva (in memorian)**, exemplo de inteligência e honestidade. Com certeza deve estar feliz com o caminho que escolhi seguir.*

*Agradeço antes de tudo a **Deus***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À **Profª. Drª Janete Dias Almeida**, minha orientadora, que com muita competência, determinação e paciência orientou-me na realização desta pesquisa. Foi muito importante na minha formação pessoal e profissional nos dois anos de mestrado e no tempo em que ainda era estagiário. Espero que continuemos a caminhada juntos por mais algum tempo.*

*Ao **Prof. Adj. Luiz Antônio Guimarães Cabral**, ao qual considero como orientador, que conseguiu, de forma exemplar, transmitir sua filosofia de trabalho, tanto no ensino quanto na pesquisa. Nesses anos de convivência tornei-me seu amigo e sou eternamente grato pelos ensinamentos transmitidos.*

*À minha amiga **Renata Andrade Bitar**, pessoa fundamental na realização desta pesquisa. Agradeço profunda e eternamente sua colaboração em todas as fases do estudo.*

*À **minha família, meu pai Luiz, minha mãe Elenira, meu irmão Vinícius, minha irmã Ludmilla e minhas avós Odete e Eva** por sempre acreditarem no meu trabalho, e pelo apoio constante nas horas que necessitei.*

*À minha namorada **Carla**, pela companhia em todos os momentos e estímulo para que eu continue meus estudos.*

AGRADECIMENTOS

Ao diretor **Prof. Dr. José Roberto Rodrigues** diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade da realização do Mestrado;

A **Profª. Drª. Cristiane Yumi Koga-Ito**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, da mesma instituição, pela oportunidade e disponibilidade para esclarecimentos no decorrer do curso;

Aos **docentes** do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal pelo crescimento profissional; em especial à **Profª. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho, Profª. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, Profª. Drª. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão** pelo conhecimento transmitido durante o curso;

Aos docentes da Disciplina de Propedêutica Estomatológica, **Prof. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante e Prof. Titular Walter Domingos Niccoli-Filho** pelo convívio;

Ao **Prof. Dr. Airton Abraão Martin** pela co-orientação e por disponibilizar os equipamentos do Laboratório de Espectroscopia Vibracional

Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (Univap);

*À **Profª Drª. Emília Ângela Loschiavo Arisawa (Mirela)**, pelo empenho na realização do convênio que possibilitou o desenvolvimento do presente estudo e pelas discussões enriquecedoras.*

*Ao **Prof. Dr. Herculano da Silva Martinho**, pela orientação no tratamento estatístico e auxílio na interpretação dos dados espectrais.*

*À bibliotecária **Silvana Alvarez** pelo auxílio no esclarecimento de dúvidas relacionadas à apresentação da dissertação;*

*À Técnica de Laboratório **Ana Lourdes**, pelo suporte na confecção das lâminas, seu trabalho foi essencial;*

*À equipe do Serviço Técnico de Informática: **Luciano, André e Nilton**, pelas dúvidas esclarecidas.*

*Ao **Ivan** pela atuação no Ambulatório;*

*Às Secretárias da Pós-Graduação **Rose, Lilian, Erena e Maria Aparecida** pelo auxílio em todos os momentos;*

*Aos amigos de pós-graduação **Fernando, Rogério, Nei, Edson, Flávio, Marta, Ana Paula, Karina, Gisele, Fernando Augusto, Graziela, Márcia, Nívea, Cristina, Luana e Lucas** por tornarem os dias mais descontraídos e pela solidariedade;*

*Aos meus amigos e companheiros de ambulatório **Dárcio, Vítor, Celina, Andréa, Michelle, Alexandra e Érika** pelo aprendizado proporcionado, e pela colaboração na coleta das amostras;*

*Aos amigos da Univap:, **Edinho, Mário, Carlos Eduardo (Heman), Magno, Daiana, Carol e Bianca** pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental e pela amizade;*

*Aos funcionários **Ivoneide e Sérgio** pelo companheirismo e amizade;*

*Aos **pacientes**, pelo consentimento na participação do presente estudo;*

*A **CAPES**, pela concessão da bolsa de Mestrado.*

EPÍGRAFE

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar”.

Chico Science

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carvalho LFCS. Análise *ex vivo* de hiperplasia fibrosa inflamatória de mucosa jugal por Espectroscopia FT-Raman [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, 2008.

São José dos Campos 29 de julho de 2008

Banca examinadora

Prof^a. Adj. Janete Dias Almeida

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof^a. Dr^a. Emília Ângela Loschiavo Arisawa

Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

SUMÁRIO

RESUMO	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Hiperplasia Fibrosa Inflamatória	19
2.2 Espectroscopia Raman	20
2.3 Espectroscopia FT-Raman e tecidos biológicos	23
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Obtenção do material para estudo <i>ex vivo</i>	30
4.1.1 Obtenção das amostras	30
4.1.2 Armazenamento das amostras	31
4.1.3 Transporte das amostras	31
4.2 Obtenção dos espectros Raman.....	32
4.2.1 Espectrômetro FT-Raman.....	32
4.2.1.1 Laser Nd:YAG (Neodímio: Ítrio Alumínio Granada)	32
4.2.1.2 Geometria de Espalhamento	33

4.2.2	Paramêtros do equipamento.....	34
4.2.3	Preparação das amostras para experimento	35
4.3	Análise histopatológica	37
4.4	Análise dos Espectros Raman	37
5	RESULTADOS.....	39
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	52
8	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS.....	59
	ABSTRACT.....	64

Carvalho LFCS. Análise ex vivo de hiperplasia fibrosa inflamatória de mucosa jugal por Espectroscopia FT-Raman [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

RESUMO

A hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) é um processo proliferativo não neoplásico, encontrado em mucosa bucal, geralmente decorrente de traumatismos crônicos. A Espectroscopia Raman fornece informações dos tecidos avaliados através de suas propriedades ópticas. Tem sido empregada em estudos biológicos para a caracterização de alterações neoplásicas. No entanto, são escassos os estudos que envolvam processos inflamatórios. Objetivou-se caracterizar através da Espectroscopia FT-Raman HFI com tecidos bucais normais de mucosa jugal, avaliando a especificidade e a sensibilidade deste método, relacionando os espectros obtidos aos achados histopatológicos. Foram utilizados 19 amostras de HFI e 6 amostras de mucosa normal (MN) que localizavam-se em mucosa jugal, obtendo-se, totalizando 92 espectros de HFI e 27 espectros de MN. Os resultados demonstrados pela análise dos componentes principais revelaram que PC3 e PC5 foram os responsáveis por uma melhor classificação, podendo ser observada no gráfico de loading plots como espectros com picos invertidos. Pela análise de discriminantes linear, foi possível observar que 19 espectros de MN e 85 espectros de HFI foram classificados corretamente, correspondendo, respectivamente, a 70,4 % e 92,4 % do total de dados. A curva de Roc revelou um valor preditivo do modelo de 0,87. Concluiu-se que a análise dos espectros Raman permitiu detectar similaridades e diferenças biológicas e bioquímicas entre HFI e MN de mucosa jugal, demonstrando que a Espectroscopia Raman apresenta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de processos proliferativos não neoplásicos. Observou-se correlação entre os achados histopatológicos e os obtidos pela utilização da técnica.

PALAVRAS-CHAVES: análise espectral Raman; hiperplasia, mucosa bucal

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Demonstração esquemática do espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Raman) da luz.	21
FIGURA 2 - FT-Raman Spectrometer RFS 100, Bruker.....	32
FIGURA 3 - Esquema da atuação do laser de Nd: YAG nos pontos da amostra	33
FIGURA 4 - Geometria de espalhamento e porta-amostra do FT-Raman Spectrometer RFS 100.....	34
FIGURA 5 - Tubo criogênico e instrumentos utilizados na preparação das amostras	36
FIGURA 6 - Porta-amostra evidenciando o local onde a amostra foi colocada	36
FIGURA 7 - Conjunto amostra/porta-amostra/lamínula no equipamento FT-Raman.....	36
FIGURA 8 - Demonstração do feixe de laser guia (HeNe) sobre a amostra.	37
FIGURA 9 - A - Fotomicrografia e Box Plot MN. B - Fotomicrografia e Box Plot HFI.	40
FIGURA 10 - Associação dos picos referentes ao DNA e ao colágeno III	41
FIGURA 11 - Gráfico de Loading Plot dos Componentes Principais (PC3 vs. PC5) dos espectros de MN e HFI.....	42
FIGURA 12 - Gráfico de espalhamento: análise de discriminantes com validação cruzada entre os grupos MN e HFI.	44
FIGURA 13 - Curva de ROC: área sob a curva revela o valor preditivo do modelo de classificação.	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros de Aquisição dos espectros FT-Raman.....	35
Quadro 2 - Parâmetros Ópticos de aquisição dos espectros FT-Raman	35
Quadro 3 - Modos Vibracionais referentes às diferenças espectrais encontradas entre as amostras de MN e HFI. (MOVASAGHI et al, 2007; LYNG et al, 2006).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

CLA = Cluster Analysis

DMBA = Dimetilbenzoic acid

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

FT = Fourier transform

HFI = hiperplasia fibrosa inflamatória

IP&D = Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

LEVB = Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica

Nd: YAG = Neodímio: Ítrio Alumínio Granada

MN = mucosa normal

PCs = componentes principais

PCA = principal components analysis

ROC = Receive Operator Characteristic

UNESP = Universidade Estadual Paulista

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos métodos de diagnóstico de lesões bucais tem proporcionado o desenvolvimento de pesquisas visando à detecção de alterações em sua fase inicial. Muitos casos são diagnosticados em uma fase tardia, tornando o tratamento mais difícil e dispendioso, comprometendo o prognóstico. O exame histopatológico, realizado através da análise tecidual, obtido por biópsia excisional ou incisional, ainda é considerado por muitos autores como sendo o padrão-ouro do diagnóstico (TOMMASI³⁶, 2002). Além do exame histopatológico, exames complementares podem ser requisitados no momento do processo diagnóstico, para auxiliar a elaboração das hipóteses diagnósticas, entre esses citam-se os exames imaginológicos (radiografias, tomografia computadorizada, ressonância magnética), os exames laboratoriais (sorológicos, bioquímicos, microbiológicos), entre outros (TOMMASI³⁸, 2002; REGEZI e SCIUBBA³², 2000).

Para Holmstrup et al.¹⁴ (2007) muitas características presentes nas interações moleculares da célula ou do tecido avaliado não podem ser demonstradas pelo exame histopatológico. Assim, outras ferramentas para auxiliar o diagnóstico dos diversos tipos de lesões devem ser pesquisadas.

Considerando as técnicas não invasivas de diagnóstico em desenvolvimento, destaca-se a Espectroscopia Raman. A aplicação da técnica em amostras *ex vivo* possibilita a caracterização dos constituintes bioquímicos e moleculares das mesmas, baseado na análise vibracional da estrutura química, após estimulação pela luz laser (SALA³⁴, 1995).

A Espectroscopia Raman, considerada uma técnica analítica não invasiva (KRISHNA et al.¹⁸, 2006; CHENG et al.⁵, 2005, KRISHNA et al.¹⁷, 2005) pode ser muito útil no diagnóstico precoce de várias lesões (LAU et al.¹⁹, 2003), pois alterações na composição molecular dos tecidos patológicos podem ser detectadas pelas das reflexões espectrais (CHOO-SMITH et al.⁶, 2002; VENKATAKRISHNA et al.³⁹, 2001). O termo “biópsia óptica” é muito utilizado, pois a espectroscopia analisa o tecido quanto às suas propriedades ópticas, podendo fornecer informações adicionais do tecido avaliado e desta maneira auxiliar no processo diagnóstico.

Dentre as possíveis aplicações da Espectroscopia Raman na área médico-odontológica são citadas: diagnóstico de lesões ou tecidos com potencial de malignização, caracterização de placas ateroscleróticas e rápida identificação de microorganismos patogênicos (CHOO-SMITH et al.⁶ 2002). Entretanto, para aplicação clínica desta técnica é preciso que a mesma seja avaliada e validada em estudos de diferentes grupos de patologias para torná-la acessível, até que seu emprego passe a ser rotineiro. (CHOWDARY et al.⁷, 2006).

Pesquisas demonstraram que a Espectroscopia Raman é capaz de detectar alterações espectrais teciduais e fornecer informações bioquímicas em tecidos de mama, pele e nasofaringe, entre outros (PENTEADO et al.³⁰, 2008; ANDRADE et al.¹ 2007; BITAR et al.⁴, 2006; MALINI et al.²² 2006; OLIVEIRA et al.²⁸, 2006; OSADA et al.²⁹, 2004; LAU et al.¹⁹, 2003; MAHADEVAN-JANSEN et al.²¹, 1998; MANOHARAN²⁴, 1998). A utilização da espectroscopia FT-Raman na caracterização de processos inflamatórios permitirá diferenciá-los de lesões que tenham potencial de transformação neoplásica (ROBICHAUX-VIEHOEVER et al.³³, 2007; LYNNG et al.²⁰, 2007; MALINI et al.²², 2006; CHOO-SMITH et al.⁶, 2003; JACKSON et al.¹⁶, 1997).

Estudos empregando a Espectroscopia Raman relacionada aos processos proliferativos inflamatórios, como a hiperplasia fibrosa inflamatória, são escassos na literatura.

Assim sendo, a presente pesquisa têm como proposição avaliar por meio da Espectroscopia FT-Raman hiperplasias fibrosas inflamatórias localizadas em mucosa jugal, visando padronizar os espectros relacionados às mesmas para formação de um banco de dados para diagnóstico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hiperplasia Fibrosa Inflamatória

A hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) é um processo proliferativo não-neoplásico freqüentemente diagnosticado nos tecidos bucais. De acordo com Firoozmand et al.¹⁰ 2005 ocorre principalmente por traumas crônicos de baixa intensidade, devido a próteses mal adaptadas ou hábitos parafuncionais. Esta lesão pode não ser facilmente diagnosticada por profissionais sem experiência clínica com lesões bucais.

Clinicamente seu tamanho pode variar de 1mm a 5cm de diâmetro dependendo do local e/ou da causa da lesão. A HFI localizada em rebordo alveolar é geralmente uma lesão de grandes proporções, podendo se estender até fundo de saco e apresentar ulcerações. Por outro lado, lesões em mucosa jugal, mucosa labial e língua, apresentam-se como nódulo séssil ou pediculado medindo até 1,5cm de diâmetro (REGEZI e SCIUBBA³², 2000). O tratamento destas lesões é cirúrgico. É importante ressaltar que o trauma relacionado ao aparecimento da lesão deve ser solucionado, caso contrário há recidiva da mesma.

As alterações histopatológicas das hiperplasias fibrosas inflamatórias são observadas em epitélio e tecido conjuntivo. O epitélio da mucosa bucal mostra alterações induzidas pelo processo inflamatório localizado na lâmina própria (WORAWONGSAVU⁴¹, 2007), no qual pode-se observar hiperparaqueratinização, acantose, acantólise, exocitose, hiperplasia dos cones epiteliais e degeneração hidrópica. No tecido conjuntivo, há aumento na quantidade das fibras colágenas e alteração no

padrão de maturação dessas fibras, as quais apresentam-se mais espessas e com disposição aleatória (SEGUIER et al.³⁵, 2000; DUPERRAY et al.⁹, 1995). Observa-se também infiltrado inflamatório que pode ser discreto, moderado ou intenso, frequentemente mononuclear (FIROOZMAND et al.¹⁰, 2005; WANG et al.⁴⁰, 2003), sendo o colágeno a proteína mais alterada em processos hiperplásicos inflamatórios.

2.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia é a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia dos átomos ou moléculas. De maneira direta, são obtidas as diferenças entre estes níveis de energia a partir de medidas que determinam as posições relativas dos níveis energéticos. No caso das moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis energéticos envolvidos: eletrônicos, vibracionais e/ou rotacionais. Assim, as vibrações moleculares podem ser medidas por diferentes técnicas além da Espectroscopia Raman, como a Espectroscopia de Absorção Eletrônica, Espectroscopia de Fluorescência e Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (SALA³⁴, 1995).

O efeito Raman foi confirmado experimentalmente por Chandrasekhara Venkata Raman (1928). O equipamento empregado por Raman para observação desse efeito utilizou como fonte de excitação a luz do sol, como uma luz policromática visível, um espectroscópio de bolso, e o olho humano como detector. Raman imaginou a possibilidade de a radiação visível interagir com a matéria de tal modo que houvesse variação na energia do fóton incidente, sendo que essa transferência de energia seria

dependente da massa e do tipo de ligações das moléculas (RAMAN e KRISHNAN³¹, 1928).

O efeito Raman é definido como espalhamento inelástico de radiação eletromagnética monocromática que interage com as moléculas. Sendo assim, a frequência de radiação espalhada é diferente da radiação incidente (LYNG et al.²⁰, 2007; MOLCKOVSKY et al.²⁵, 2003; SINGH³⁶, 2002; RAMAN e KRISHNAN³¹, 1928).

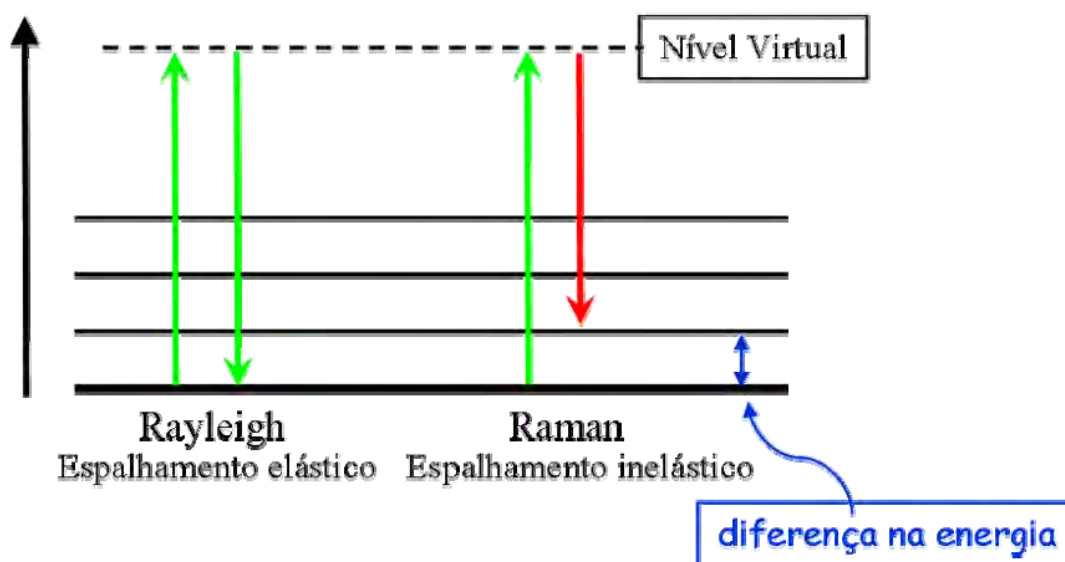


FIGURA 1 - Demonstração esquemática do espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Raman) da luz.

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste em uma série de picos ou faixas, correspondendo cada um ao modo vibracional característico daquela molécula (MOVASAGHI et al.²⁶, 2007). Portanto, cada molécula apresenta um espectro Raman característico fornecendo a “impressão digital” de uma substância. Sua composição molecular pode ser determinada, possibilitando caracterizar a variação interatômica estrutural das moléculas presentes nos tecidos avaliados (LYNG et al.²⁰, 2007; ANGEL et al.², 2000, MAHADEVAN-JANSEN et al.²¹, 1998).

Os espectros Raman são obtidos irradiando-se uma amostra com uma fonte de radiação eletromagnética no visível ou no infravermelho próximo. Durante a irradiação, o espectro da radiação espalhada de modo inelástico é medido em um espectrômetro adequado e corresponde tipicamente 10^{-9} a 10^{-6} de todo espalhamento observado, sendo assim a maioria espalhamento elástico, por essa razão fica difícil observar o espalhamento Raman sem uma intensa fonte de excitação monocromática e um detector sensível (MANOHARAN et al.²³, 1996, ANGEL et al.², 1995).

Quando o tecido é excitado, a fluorescência emitida simultaneamente pelo tecido pode interferir severamente nos discretos sinais de espalhamento Raman (MAHADEVAN-JANSEN et al.²¹, 1998; SALA³⁴, 1995). Esse problema pode ser minimizado utilizando-se fonte de excitação próxima ao infravermelho (entre 700 a 1100 nm) para coleta dos espectros Raman. Nessa faixa a energia de excitação é menor, desfavorecendo a excitação dos níveis de energia eletrônicos, diminuindo assim a fluorescência.

A região de interesse biológico é caracterizada por bandas Raman que se localizam principalmente entre 800 a 1800cm^{-1} relativo ao comprimento de onda da fonte de excitação (MANOHARAN et al.²³, 1996). O laser Nd: YAG (@1064 nm) é atualmente o mais utilizado como fonte de excitação para a espectroscopia FT-Raman (OSADA et al.²⁹, 2004; YAMAZAKI et al.⁴², 2003).

Existem outros tipos de análises espectroscópicas, como a Espectroscopia no Infravermelho (JACKSON et al.¹⁶, 1997) e a Espectroscopia por Fluorescência (DE VELD et al.⁸, 2005). No entanto, a Espectroscopia Raman apresenta muitas vantagens em relação à Espectroscopia por Fluorescência. Diferentemente da fluorescência, os espectros Raman podem ser produzidos quando excitados por qualquer comprimento de onda. É possível obter informações mais detalhadas dos

componentes bioquímicos das amostras analisadas (MALINI et al.²², 2006) e das alterações na composição molecular. (BAKKER-SCHUT et al.³, 2000).

A Espectroscopia Raman tem sido utilizada para uma série de análises, como estudo de pedras preciosas e de solos, entre outros. Há cerca de dez anos passou a ser utilizada na área biomédica para diagnóstico tecidual e em microbiologia (CHOO-SMITH et al.⁶, 2002; NAUMANN²⁷, 2001).

2.3 Espectroscopia FT-Raman e tecidos biológicos

De acordo com Venkatakrishna et al.³⁹ (2001) a Espectroscopia Raman e por Fluorescência podem ser consideradas técnicas complementares para a realização de diagnóstico ou pesquisa clínica de lesões. Diversas investigações foram propostas para a utilização de metodologias capazes de identificar alterações bioquímicas através de suas propriedades ópticas. Estas técnicas, baseadas nas propriedades ópticas dos tecidos mostram-se vantajosas, pois não oferecem riscos de radiação ionizante ao observador e ao paciente, além de possibilitar o diagnóstico final em tempo real (BITAR et al.⁴, 2005).

Alterações bioquímicas observadas nos tecidos patológicos estão associadas ao processo patológico, podendo ter estas características inflamatórias ou neoplásicas. A Espectroscopia Raman, evidencia tais alterações e fornece dados que podem ser utilizados para obtenção de diagnóstico precoce e diferencial de várias lesões (OLIVEIRA et al.²⁸, 2006, VENKATAKRISHNA et al.³⁹, 2001, MANOHARAN et al.²³, 1996), e a histopatologia fornece informações morfológicas do tecido avaliado (MANOHARAN et al.²³, 1996).

Grande parte dos trabalhos de Espectroscopia Raman em tecidos biológicos avaliou tecidos normais relacionados a tecidos acometidos por neoplasia maligna, como: de origem epitelial (STONE et al.³⁷, 2004), bucal (OLIVEIRA et al.²⁸, 2006; VENKATAKRISHNA et al.³⁹ 2001), mama (BITAR et al.⁴, 2007; CHOWDARY et al.⁷, 2006, MANOHARAN²⁴, 1998), cérvix uterino (KRISHNA et al.¹⁸, 2006), pulmão (YAMAZAKI et al.⁴², 2003), melanoma (GNIADOCKA et al.¹¹, 2004), ou mesmo lesões potencialmente cancerizáveis (ROBICHAUX-VIEHOEVER et al.³³, 2007; MAHADEVAN-JANSEN et al.²¹, 1998). Estudos referentes a outros tipos de processos são escassos, porém não menos importantes que os demais trabalhos. Neste sentido, Hata et al.¹³ (2000) avaliaram carotenos em pele e Malini et al.²² (2006) avaliaram tecidos bucais que apresentavam inflamação (gengivite), condição cancerizável (fibrose submucosa), carcinoma epidermóide e tecidos normais. Os autores encontraram diferenças significativas entre os grupos, sendo que as diferenças espectrais mais evidentes foram observadas entre tecidos malignos e normais nas regiões de deslocamento Raman entre 800 e 1800 cm^{-1} . Região esta relacionada a proteínas e lipídios, dentre as outras ligações moleculares.

Nos estudos de tecidos biológicos que apresentavam alterações malignas, a simples observação visual dos espectros Raman obtidos foi suficiente para diferenciar as amostras. Os tecidos com neoplasia maligna demonstraram espectros com mais “ruídos” e mais irregulares do que os relativos ao tecido normal. A análise cuidadosa dos espectros permitiu observar uma grande diferença espectral em algumas regiões. Essas correspondem aos modos vibracionais alterados devido ao processo patológico (VENKATAKRISHNA et al.³⁹, 2001).

Muitos autores avaliaram a espectroscopia Raman para a promoção de diagnóstico em câncer de mama, que é a neoplasia maligna mais frequente no sexo feminino (BITAR et al.⁴, 2006; CHOWDARY et al.⁷,

2006). Chowdary et al.⁷, (2006) afirmaram que a sobrevida e o prognóstico do paciente com câncer de mama está diretamente relacionada ao estágio em que o mesmo se encontra. Por esse motivo, os autores propuseram avaliar neoplasias benignas e malignas de mama por Espectroscopia Raman, observando que os tecidos mamários avaliados (normais, benignos e malignos), apresentaram diferenças espectrais pronunciadas entre normal e patológico. Entre as lesões benignas e malignas essas diferenças espectrais foram discretas, o que evidencia a necessidade de estudos complementares para caracterizar as alterações bioquímicas e moleculares presentes nos diferentes tipos de neoplasias.

Molckovsky et al.²⁵ (2003) avaliaram através da Espectroscopia Raman pólipos localizados em cólon, procurando evidenciar diferenças espectrais entre pólipos adenomatosos e hiperplásicos. Os autores utilizaram 54 espectros Raman *ex vivo*, sendo 20 de tecidos hiperplásicos e 34 de pólipos adenomatosos. Também foram avaliados *in vivo*, 10 pólipos adenomatosos e 9 pólipos hiperplásicos. Foram encontradas diferenças espectrais significativas em ambos os estudos, o que permitiu aos autores concluir que a técnica da Espectroscopia Raman é um potente método de diagnóstico entre pólipos adenomatosos e hiperplásicos localizados em cólon.

Cheng et al.⁵ (2005) avaliaram por Espectroscopia micro-Raman, alterações na composição bioquímica do pilomatrixoma e da pele normal, comparando ao colágeno do tipo 1 isolado e à hidroxiapatita. Os autores observaram que os espectros do colágeno tipo 1 são muito semelhantes aos espectros da pele normal, o que demonstra a relação entre colágeno e outros constituintes do tecido conjuntivo da pele. Outra informação relevante deste estudo foi a similaridade espectral encontrada entre as áreas de calcificação de alguns pilomatrixomas e hidroxiapatita, salientando a especificidade e a sensibilidade da técnica avaliada.

Oliveira et al.²⁸ (2006), avaliaram mudanças vibracionais entre tecidos diagnosticados como normais, displásicos e com carcinoma epidermóide, pela técnica da Espectroscopia FT-Raman. Foram utilizados 21 hamsters machos, que tiveram indução da carcinogênese com aplicação tópica de DMBA (dymetilbenzoic acid). O DMBA foi aplicado na “bolsa” (*pouch*) direita de cada animal, utilizando assim a “bolsa” esquerda como controle. Os animais foram sacrificados após 14 semanas, quando já apresentavam lesões exofíticas e endofíticas. As lesões e a bolsa esquerda foram biopsiadas e divididas em duas partes. A menor parte foi armazenada em nitrogênio líquido para análise por Espectroscopia Raman, e a outra parte foi fixada em formaldeído a 10 % para análise histopatológica. Os cortes histológicos das lesões localizadas em “bolsa” direita resultaram em 19 tecidos com alterações carcinomatosas e dois tecidos com alterações displásicas. Todos os tecidos provenientes da “bolsa” esquerda apresentaram histologicamente, características de normalidade. As amostras armazenadas em nitrogênio líquido foram submetidas à análise espectroscópica, apresentando significantes diferenças entre as amostras normais e as de tecidos alterados. Essas diferenças foram vistas principalmente nas bandas vibracionais 941cm^{-1} , 1007cm^{-1} , e entre 1263 e 1337cm^{-1} , relacionadas respectivamente a polissacarídeos, fenilalanina e proteínas. Desse modo, os autores concluíram que a análise pela técnica de Espectroscopia FT-Raman tem qualidade suficiente para diagnosticar diferenças espectrais entre tecidos normais, displásicos e carcinomatosos. Ressaltaram ainda que é uma técnica analítica, não invasiva e fornece informações sobre a composição bioquímica do tecido investigado.

Lau et al.¹⁹ (2003) avaliaram as diferenças moleculares existentes entre tecidos normais e carcinomas nasofaríngeos por meio da Espectroscopia Raman. As amostras utilizadas foram de seis pacientes com suspeita de câncer nasofaríngeo. No momento da biópsia, parte de cada

um dos tecidos foi congelada para análise em Espectroscopia Raman, e a outra parte enviada para análise histopatológica. A análise histopatológica classificou as amostras em tecidos com características de normalidade e tecidos com alterações carcinomatosas, respectivamente. Os resultados da Espectroscopia Raman demonstraram diferenças entre tecidos normais e carcinomatosos entre as bandas de 1155 a 1175 cm^{-1} e 1320 a 1350 cm^{-1} , referentes, respectivamente, às proteínas e aos ácidos nucleicos. Os autores concluíram que a Espectroscopia Raman permite obter a “impressão digital” da amostra avaliada. Ressaltando que o sinal Raman é “fraco” e precisa de técnicas sofisticadas para ser detectado.

Huang et al.¹⁵ (2003) propuseram avaliar o efeito da fixação de tecidos bronquiais humanos em formalina através da Espectroscopia Raman. Os autores analisaram se o fixador afetava o potencial de diagnóstico da técnica. Para este estudo utilizaram tecidos bronquiais de seis pacientes com suspeita ou diagnóstico de câncer de pulmão. Os resultados mostraram que o tecido bronquial preservado em formalina apresentou progressivo decréscimo nas intensidades espectrais, salientando que a formalina prejudica a obtenção dos espectros.

Venkatakrisna et al.³⁹ (2001) analisaram a Espectroscopia Raman como método de diagnóstico para análise de tecidos bucais, ao qual denominaram “patologia óptica”. Para o estudo, foram utilizadas 37 amostras de carcinoma epidermóide e 12 amostras de tecido normal. A análise espectroscópica deixou evidente a diferença entre tecido normal e tecido com neoplasia maligna. Os dados espectrais dos tecidos normais estavam relacionados aos lipídeos enquanto os dados espectrais dos tecidos malignos às proteínas. Os autores concluíram que a Espectroscopia Raman pode ser utilizada rotineiramente como “patologia óptica” para diagnóstico de tecidos bucais, permitindo a rápida obtenção dos dados espectrais.

A Espectroscopia Raman pode ser utilizada tanto para diagnóstico de alguma patologia, como para fornecer informações quantitativas e qualitativas do tecido patológico avaliado, evidenciando alterações do processo e das margens do mesmo (MANOHARAN²³, 1996). Mahadevan-Jansen et al.²¹ (1998), assim como Naumann²⁷ (2001), concluíram com relação à Espectroscopia Raman em tecidos biológicos que a mesma será muito útil como técnica diagnóstica em um futuro próximo, como exame complementar de maneira rápida, simples e eficaz, estágio este em que a Espectroscopia Raman poderá ser requisitada rotineiramente.

A aplicabilidade da Espectroscopia Raman *in vivo* depende principalmente de um equipamento sensível para que os sinais Raman dos tecidos avaliados sejam coletados, e interpretação dos dados em tempo real (BAKKER-SCHUT et al.³, 2000). Haka et al.¹² (2006), demonstraram pela primeira vez a aplicação da Espectroscopia Raman *in vivo* em tecidos mamários. Os dados foram coletados no transcirúrgico de mastectomia parcial para análise da fidelidade com relação ao comprometimento das margens. Foram estudados 30 espectros de 9 pacientes, cujos resultados mostraram diferenças espectrais significativas entre tecido normal, fibrocístico e carcinoma ductal. Os autores concluíram que a técnica da Espectroscopia Raman apresenta fidelidade para diagnóstico em tempo real. Ressaltaram que estudo com maior número de pacientes é necessário para a validação da técnica para emprego no transcirúrgico, visando margiamento da lesão.

Pela revisão da literatura, é possível notar que os estudos de Espectroscopia Raman em tecidos biológicos relacionam-se mais às neoplasias do que a outros processos patológicos proliferativos decorrentes da resposta inflamatória, sendo pertinente a realização de pesquisas para validar a utilização da técnica para as diversas patologias.

3 PROPOSIÇÃO

Essa pesquisa objetivou caracterizar através da Espectroscopia FT-Raman tecidos bucais normais e com hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) de mucosa jugal, avaliando a especificidade e a sensibilidade deste método, relacionando os espectros obtidos aos achados histopatológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa seguiu os princípios éticos, sendo aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho – UNESP sob o protocolo número 067/2006-PH/CEP (Anexos 1 e 2).

Os pacientes atendidos no ambulatório de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal desta instituição, que foram submetidos à biópsia excisional de HFI localizadas em mucosa jugal foram convidados a participar da pesquisa. Os pacientes receberam informações relacionadas aos procedimentos e objetivos da pesquisa e aqueles que aceitaram participar assinaram o termo de compromisso livre e esclarecido após a leitura do mesmo (Anexo 3).

4.1 Obtenção do material para estudo *ex vivo*

4.1.1 Obtenção das amostras

As amostras de HFI de mucosa jugal foram obtidas de 19 pacientes e as amostras de MN da margem da lesão de seis dos 19 pacientes. O número total de amostras avaliadas pela Espectroscopia FT-Raman foi de 25 amostras.

4.1.2 Armazenamento das amostras

Um fragmento medindo cerca de 2 mm de comprimento foi excisado da peça cirúrgica, lavado com solução fisiológica a 0,9 % (NaCl) Aster®, colocado em tubo criogênico Nalgene® devidamente identificado e numerado, e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido (-196°C). A peça cirúrgica foi então fixada em formol a 10 % para análise histopatológica.

4.1.3 Transporte das amostras

As amostras foram transportadas até o Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) em São José dos Campos, São Paulo. O transporte foi realizado em galões próprios para o transporte em nitrogênio líquido, evitando o descongelamento e a possível degradação das amostras, antes da análise em Espectroscopia FT-Raman.

4.2 Obtenção dos espectros Raman

4.2.1 Espectrômetro FT-Raman

O equipamento utilizado para aquisição dos espectros Raman das amostras foi o equipamento FT-Raman Spectrometer RFS 100 da Bruker[®] Alemanha, instalado no LEVB (Figura 2).



FIGURA 2 - FT-Raman Spectrometer RFS 100, Bruker

4.2.1.1 Laser Nd:YAG (Neodímio: Ítrio Alumínio Granada)

O Espectrômetro FT-Raman utiliza o laser de Nd:YAG, que apresenta o comprimento de onda de 1064 nm. A potência do laser deste equipamento é de no máximo 500 mW, podendo ser eletronicamente ajustada para cada tipo de amostra a ser estudada. Neste experimento, a potência de saída foi ajustada em 300 mW para chegada na amostra de

250 mW. Esta potência foi escolhida para que o sinal Raman obtido fosse o mais intenso possível sem que houvesse aquecimento ou degradação das amostras.

O feixe principal do laser para excitação da amostra foi direcionado em cinco pontos diferentes, permitindo com que o tecido fosse avaliado em sua totalidade (Figura 3). Foram obtidos 119 espectros no total, 92 referentes à HFI e 27 referentes à MN.

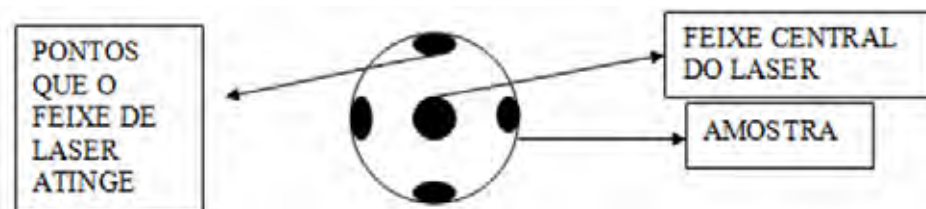


FIGURA 3 - Esquema da atuação do laser de Nd: YAG nos pontos da amostra

4.2.1.2 Geometria de Espalhamento EXPLICAR

Neste estudo, utilizou-se a geometria de espalhamento de 180° (Figura 4), devido ao alto grau de rejeição contra o espalhamento Rayleigh. Para maximizar o sinal Raman fixou-se cada amostra em um espelho de alumínio.



FIGURA 4 - Geometria de espalhamento e porta-amostra do FT-Raman Spectrometer RFS 100

4.2.2 Paramêtros do equipamento

Foi utilizado o software instalado no FT-Raman Spectrometer RFS 100, o OPUS versão 4.2, Copyright © Bruker Optik GmHb 1997-2002, que permite ajustar todos os parâmetros do equipamento, como potência do laser, abertura de feixe, ajuste na transformada de Fourier, auxílio durante a aquisição dos espectros, armazenamento e manipulação dos dados espectrais, gráficos em três dimensões (3D), análises quantitativas e armazenamento dos dados em forma de bibliotecas.

Os parâmetros ajustados no Equipamento FT-Raman, para a aquisição dos espectros para as amostras de HFI e MN, foram os seguintes:

Quadro 1 - Parâmetros de Aquisição dos espectros FT-Raman

Espectrômetro FT-Raman RFS 100	Parâmetros de Aquisição
Espera antes das medidas	10 segundos
Espera para Estabilização	5 segundos
Número de Varreduras	300
Resolução	4 cm ⁻¹
Tempo total de Varreduras (médio)	6 minutos

Quadro 2 - Parâmetros Ópticos de aquisição dos espectros FT-Raman

Espectrômetro FT-Raman RFS 100	Parâmetros Ópticos
Abertura do Feixe	7.0 mm
Potência do Laser Raman	250 mW saída
Potência do Laser na Amostra	230 Mw
Velocidade da Varredura	4; 5.0 KHz

4.2.3 Preparação das amostras para experimento

O descongelamento dos espécimes foi realizado em soro fisiológico a 0,9 % no momento da utilização no experimento, para preservar a amostra. Após o descongelamento, com o auxílio de uma pinça clínica, a amostra foi colocada no porta-amostra e sobre ela foi colocada uma lamínula. O conjunto amostra/porta-amostra/lamínula foi levado ao espectrômetro FT-Raman RFS 100, para obtenção dos espectros Raman (Figuras 5, 6 e 7).



FIGURA 5 - Tubo criogênico e instrumentos utilizados na preparação das amostras



FIGURA 6 - Porta-amostra evidenciando o local onde a amostra foi colocada



FIGURA 7 - Conjunto amostra/porta-amostra/lamínula no equipamento FT-Raman

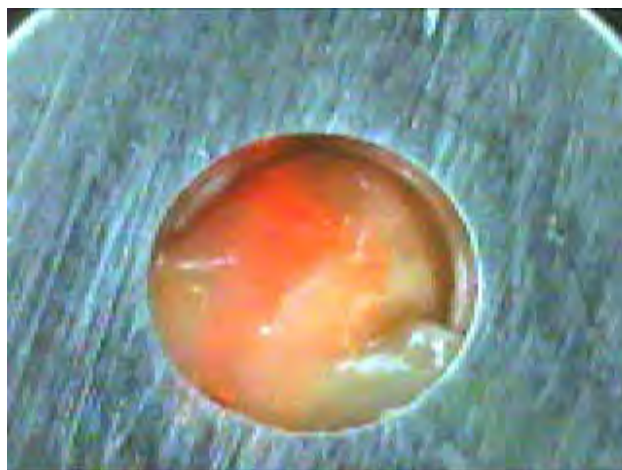


FIGURA 8 - Demonstração do feixe de laser guia (HeNe) sobre a amostra.

4.3 Análise histopatológica

Após a coleta dos espectros FT-Raman, as amostras foram fixadas em solução de formol a 10 % para fixação, devidamente identificadas e enviadas para análise histopatológica no Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP *Campus* de São José dos Campos.

4.4 Análise dos Espectros Raman

Os espectros FT-Raman obtidos e armazenados pelo OPUS[®] (Bruker, Inc., Karlsruhe, Alemanha), foram convertidos para o formato ASCII, para posterior processamento e análise no Minitab 14.20.

Como procedimento de pré-processamento, os espectros tiveram a linha de base ajustada pelo software OPUS[®] do sistema FT-Raman utilizado. Em seguida todos os espectros foram normalizados vetorialmente, para diminuir a interferência dos espectros de fluorescência que foram emitidos simultaneamente, por meio do software Minitab 14.20

Como primeira análise, foram construídos, tanto para MN quanto para HFI, gráficos de *Box Plot* que possibilitaram que os espectros fossem analisados quanto às variações de intensidade e deslocamento com relação ao aparecimento dos picos entre os espectros dos diferentes grupos, o que permitiu a associação entre os espectros de macromoléculas biológicas presentes nos tecidos de HFI e MN

Para classificação estatística dos espectros Raman de MN e HFI, os espectros foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Components Analysis*). Os resultados da PCA foram apresentados por meio do gráfico de *Loading Plot*, que confrontou os PCs (componentes principais) ao deslocamento Raman, favorecendo a identificação das principais bandas que promoveram a classificação entre os espectros das diferentes amostras.

O modelo de diagnóstico foi realizado utilizando análise de discriminantes linear com validação cruzada. Os resultados obtidos por meio desta metodologia de classificação aplicada aos espectros foram validados por meio da Curva de ROC (Receiver Operating Characteristic). Para verificar a sensibilidade e a especificidade do estudo, foi realizado o cálculo da área abaixo da curva ROC, a qual apresenta associação ao poder discriminante do teste diagnóstico. As coordenadas deste gráfico (x e y) representam medidas de probabilidade e, por conseguinte, variam de zero a um, o que possibilita obter o valor preditivo do modelo.

5 RESULTADOS

A análise histológica dos espécimes de MN estudados evidenciou mucosa de revestimento com aspecto de normalidade e lâmina própria com fibras colágenas dispostas em feixes paralelos e componentes celulares residentes característicos (Figura 9A). Neste grupo, o *Box Plot* apresentou regiões em que ocorreram variações intra-grupo nos picos de 574 cm^{-1} , de 1100 cm^{-1} , de $1250\text{ a }1350\text{ cm}^{-1}$, e de 1500 cm^{-1} as quais são referentes respectivamente às vibrações de oscilação de CO_2 , estiramento de CC, Amida III/ torção de CH_3 , CH_2 / flexão de CH_2 e estiramento de $\text{C}=\text{C}$, as quais relacionam-se principalmente às proteínas, como o colágeno (Quadro 3).

Por outro lado a análise histopatológica das amostras do grupo HFI, revelou mucosa de revestimento com alterações epiteliais como: degeneração hidrópica, exocitose, espongirose e hiperplasia dos cones epiteliais. Na lâmina própria, as fibras colágenas apresentavam-se espessadas e com aspecto de maturidade e infiltrado inflamatório difuso variando de discreto, moderado à intenso, predominantemente mononuclear, por vezes com vasos sanguíneos congestos (Figura 9B). Nesse grupo não foram observadas diferenças espectrais intra-grupo entre os espécimes analisados e as regiões 1446 e 1660 cm^{-1} apresentaram picos pronunciados, referentes a deformação em tesoura de CH_2 e Amida I, respectivamente, as quais também estão relacionadas ao colágeno I (Quadro 3).

A análise comparativa entre os espectros obtidos dos grupos MN e HFI pode ser observada na Figura 9. Diferenças foram principalmente evidenciadas nas regiões de 850 a 1000 cm^{-1} (deformação de CCH e $\text{C}-\text{C}$ e

respiração do anel aromático de C-C), 1200 a 1400 cm^{-1} (aromático C-C, Amide III torção de CH_2 e CH_3 , flexão de CH_2). A análise também evidenciou diferenças espectrais na região de 1200cm^{-1} relacionada ao DNA e de 1730cm^{-1} , correspondente ao colágeno III, este pico foi observado nos espectros referentes a mucosa normal, porém não apareceu nos espectros de HFI (Figura 10).

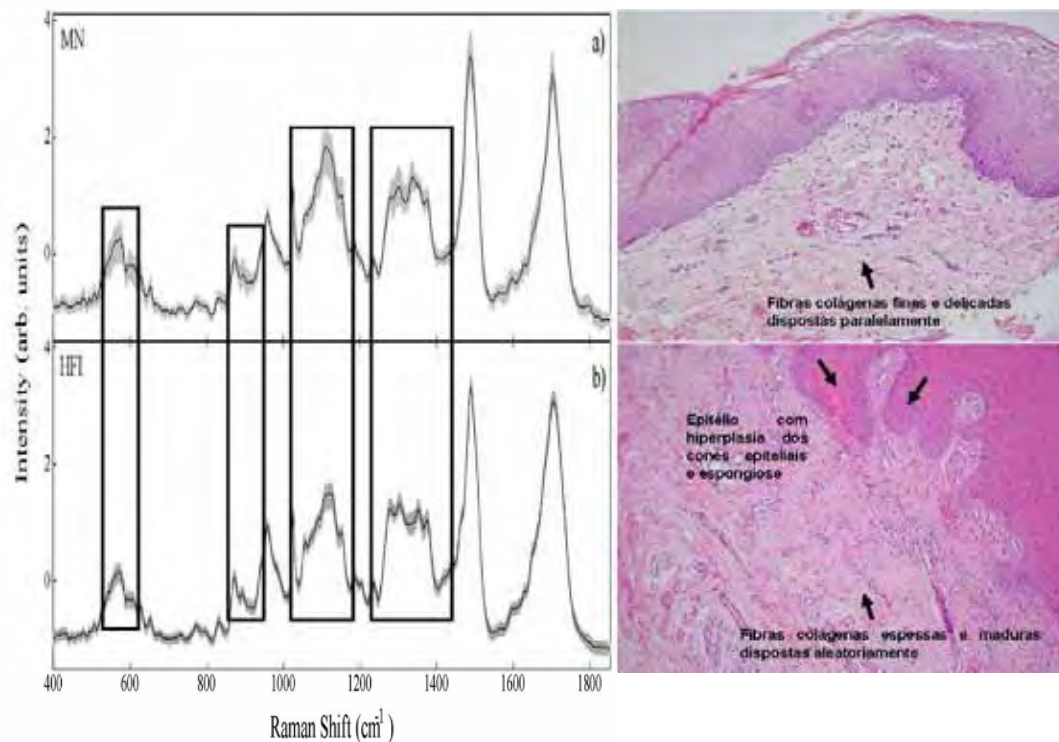


FIGURA 9 - A - Fotomicrografia e Box Plot MN. B - Fotomicrografia e Box Plot HFI.

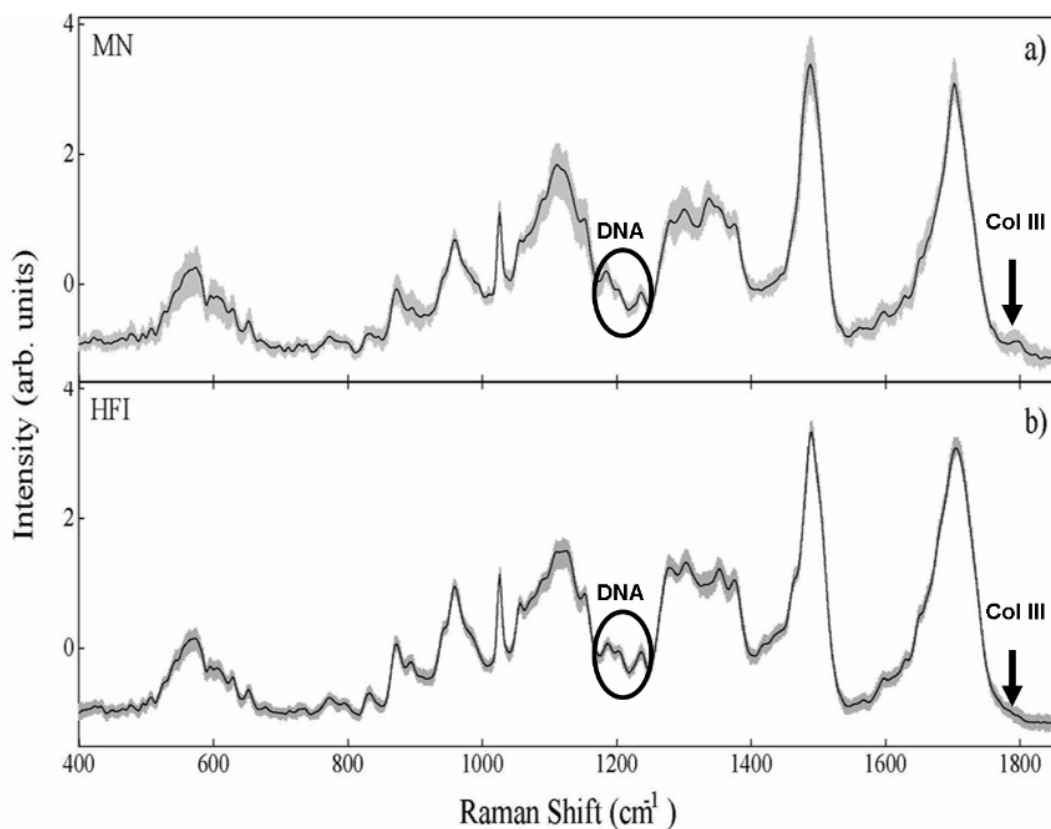


FIGURA 10 - Associação dos picos referentes ao DNA e ao colágeno III

Para a classificação dos espectros Raman foi realizada a Análise dos Componentes Principais (PCA). A análise criteriosa dos PCs demonstrou que PC3 e PC5 foram os responsáveis pela maior variação nos grupos avaliados (MN e HFI), pelos quais foram identificadas diferenças espectrais que promoveram uma melhor classificação (Figura 11).

Para explicar bioquimicamente as diferenças encontradas tanto espectral quanto morfologicamente entre os dados de MN e HFI, foram construídos gráficos de *Loading Plot* (Figura 11), a partir dos dados da PCA (PC3 vs PC5) que contribuíram para classificação espectral.

Pela análise dos PCs foi possível observar que o PC3, apresentou picos invertidos aos picos do PC5 que ficaram evidenciados na região que variava de 500 e 1110 cm^{-1} , correspondendo às seguintes vibrações: oscilação de CO_2 , respiração do anel aromático C-C, deformação de CCH, estiramento da α -*helix* de CC, estiramento do anel aromático C-C e estiramento de C-C. Outras regiões também evidenciaram-se pela análise do Loading Plot, verifica-se que os picos de 1300, 1580 e 1730 cm^{-1} estavam com aspectos de picos invertidos, o que caracteriza a maior variação espectral encontrada. Estes picos correspondem respectivamente às ligações de torção de CH_2 e CH_3 , estiramento de C-C, e colágeno III.

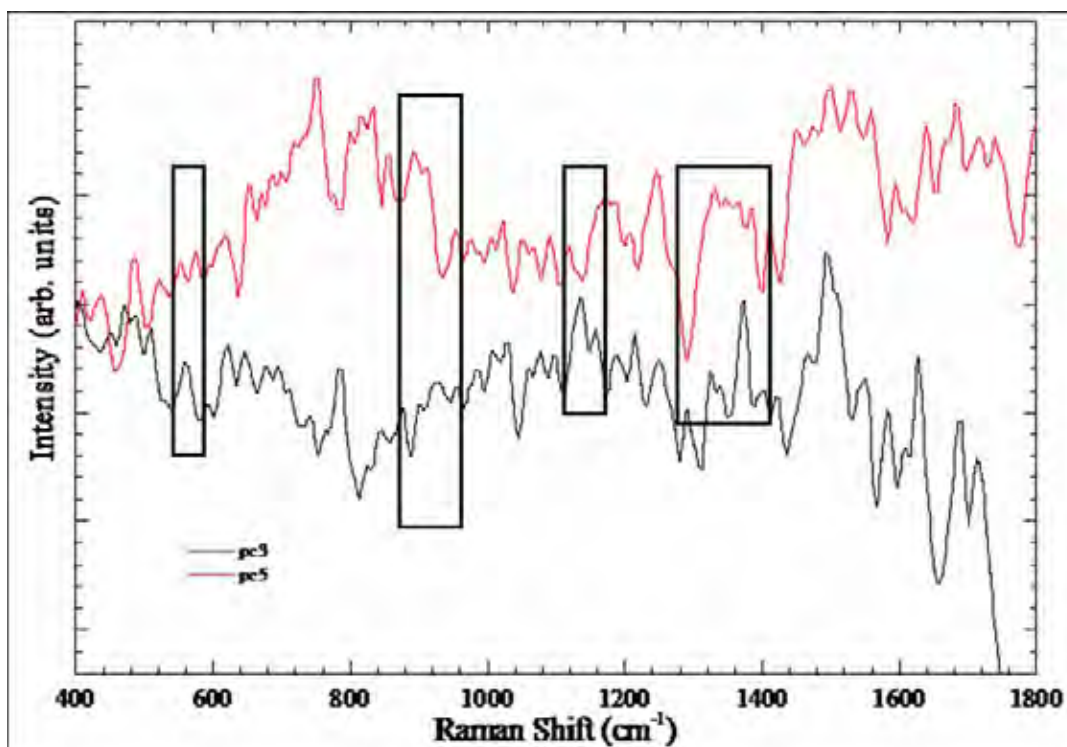


FIGURA 11 - Gráfico de Loading Plot dos Componentes Principais (PC3 vs. PC5) dos espectros de MN e HFI.

Quadro 3 - Modos Vibracionais referentes às diferenças espectrais encontradas entre as amostras de MN e HFI. (MOVASAGHI et al, 2007; LYNG et al, 2006)

BANDAS (cm ⁻¹)	MODOS VIBRACIONAIS	COMPONENTES ESTRUTURAIS
574	oscilação de CO ₂	Aminoácidos
766	respiração anel aromático C-C	Pirimidina
850	deformação CCH	Aminoácidos e polissacarídeos
959	estiramento α -helix CC	Proteínas
1004	estiramento do anel aromático C-C	Fenilalanina (colágeno I)
1100	estiramento CC	Lipídios e proteínas
1200	aromático C-C	Ácidos nucleicos (DNA)
1250	Amida III	Colágeno I
1300	torção CH ₃ , CH ₂	Colágeno I
1350	flexão CH ₂	Colágeno I
1446	deformação em tesoura CH ₂	Lipídios e proteínas
1500	estiramento C=C	Proteínas
1580	estiramento C-C	Ácidos nucleicos
1660	Amida I	Colágeno I
1730	?	Colágeno III

Utilizando o resultado da análise dos componentes principais (PCA), foi realizada análise de discriminantes linear com validação cruzada para promoção de diagnóstico. Para o diagnóstico, o método de resposta utilizado foi o linear por meios dos preditores PC3 e PC5 representado por um gráfico de espalhamento (Figura 12), do qual fazem parte os 27 espectros do grupo MN (preto) e pelos 92 espectros do grupo HFI (vermelho). Observam-se no gráfico de espalhamento duas linhas representando o modelo de classificação linear. As linhas vermelha e preta

($p=1$) indicam a probabilidade de um espectro ser classificado como HFI, sendo a linha vermelha a probabilidade de que os espectros à direita formem um grupo exclusivamente com dados de HFI; entretanto, desta forma deve-se considerar que um grande número de espectros HFI ficam alocados no grupo MN, favorecendo o aumento de falso-negativos no modelo de predição diagnóstica. Por meio do cálculo do modelo de predição diagnóstica, foi possível calcular o valor preditivo do modelo do modelo diagnóstico, a qual está representada pela linha preta ($p=1$) e pelo gráfico da curva de ROC (Figura 13). Desta forma, na análise de discriminantes linear com validação cruzada, 19 espectros de MN e 85 espectros de HFI foram classificados corretamente, que correspondem, respectivamente, a 70,4 % e 92,4 % do total de dados analisados ($n=119$).

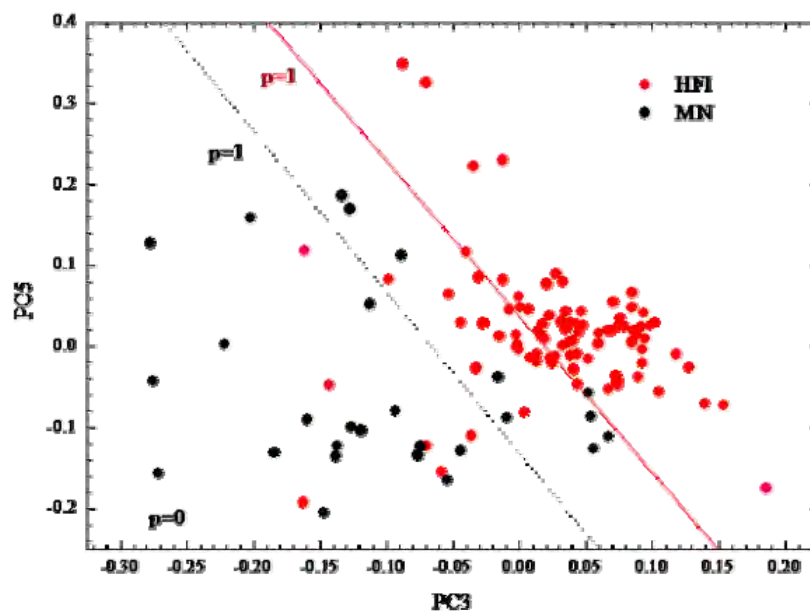


FIGURA 12. Gráfico de espalhamento: análise de discriminantes com validação cruzada entre os grupos MN e HFI.

Com estes resultados, foi calculada a Curva de ROC, onde a área sob a curva revelou o valor preditivo do modelo de classificação. Ao total dos 119 espectros avaliados, 104 espectros foram corretamente classificados. Desta forma, o valor preditivo do modelo demonstrado pela curva de ROC foi de 0,87 (Figura 13).

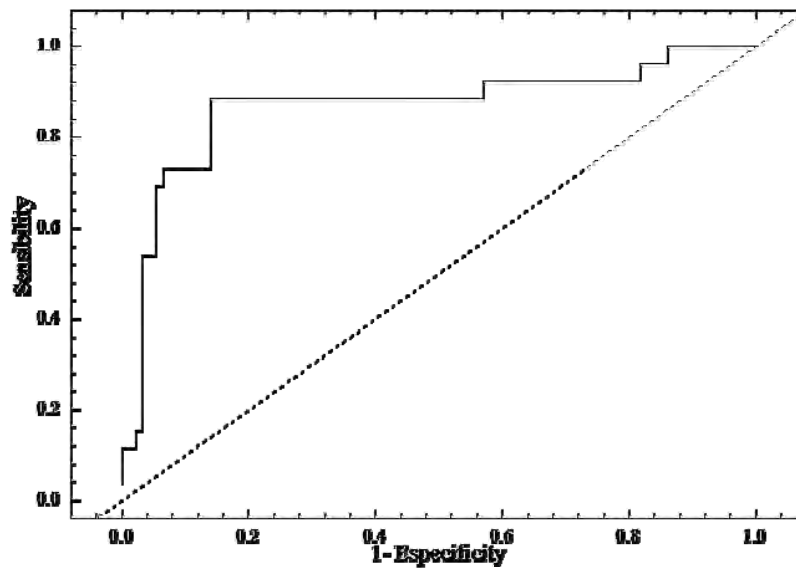


FIGURA 13. Curva de ROC: área sob a curva revela o valor preditivo do modelo de classificação.

6 DISCUSSÃO

Estudos utilizando a Espectroscopia FT-Raman para a análise de tecidos biológicos têm sido realizados (ANDRADE et al.¹, 2007; ROBICHAUX-VIEHOEVER et al.³³, 2007; BITAR et al.⁴, 2006; OLIVEIRA et al.²⁸, 2006; MALINI et al.²², 2006; OSADA et al.²⁹, 2004; LAU et al.¹⁹, 2003; CHOO-SMITH, et al.⁶ 2002; VENKATAKRISHNA et al.³⁹, 2001; MAHADEVAN-JANSEN et al.²¹, 1998; MANOHARAN²⁴, 1998), entretanto, estudos envolvendo tecidos com inflamação são escassos, o que mostra a relevância do presente estudo. A caracterização dos espectros da composição bioquímica de HFI de mucosa jugal pode ser realizada pela análise dos espectros Raman.

A técnica da Espectroscopia FT-Raman possibilitou identificar a relação que existe entre HFI e MN de mucosa jugal através dos PC's, indicando que pode ser utilizada como exame complementar auxiliar do exame histopatológico (LAU et al.¹⁹, 2003).

No presente estudo, para garantir a fidelidade do teste, foi padronizada a avaliação da amostra, na qual todos os espécimes avaliados eram provenientes da mucosa jugal. Ainda a obtenção dos espectros Raman foi padronizada quanto à aquisição, com o feixe de laser excitando o epitélio e consecutivamente o tecido conjuntivo subjacente. A padronização das áreas de aquisição dos espectros foi importante para minimizar diferenças de leituras.

A fonte de excitação utilizada foi o laser de Nd:YAG no comprimento de onda de 1064 nm que favorece a minimização da influência

da fluorescência nos espectros Raman (OSADA et al.²⁹, 2004; YAMAZAKI et al.⁴², 2003).

Amostras previamente armazenadas em formol 10 % contamina os espectros Raman dos tecidos biológicos (HUANG et al.¹⁵, 2003), motivo pelo qual foram utilizadas amostras armazenadas em Nitrogênio líquido (-196° C) imediatamente após a realização da biópsia. Os espécimes foram descongelados em solução fisiológica 0,9 % somente no momento da realização dos experimentos Raman, para garantir que a integridade das amostras fosse preservada. Além disso, foi demonstrado por Andrade et al.¹ (2007) e Bitar et al.⁴ (2006) que a solução fisiológica 0,9 % não possui sinal Raman na região de “impressão digital” dos tecidos avaliados.

As relações existentes principalmente entre as vibrações moleculares e os demais tipos de ligações bioquímicas estão muito relacionadas às características da HFI analisada (MALINI et al.²², 2006). O tecido que apresentava discreto infiltrado inflamatório mostrou uma tendência a classificação como MN. Desta forma, algumas amostras de MN que se agruparam àquelas de HFI podem apresentar transformações bioquímicas, ou até mesmo alterações na estrutura cristalográfica de seus componentes principais (colágeno e elastina), que não são observadas por meio da análise histopatológica, ou seja, histopatologicamente tais amostras são consideradas normais. Porém, pela espectroscopia Raman, alterações bioquímicas e estruturais caracterizaram algumas destas amostras como sendo inflamatórias, mostrando desta maneira que a técnica pode fornecer informações adicionais ao exame histopatológico rotineiro.

A quantidade de pontos de análise que as lesões foram submetidas (5 pontos por amostra) resultou em variação entre os espectros obtidos (ANDRADE et al.¹, 2007; BITAR et al.⁴, 2006; OLIVEIRA et al.²⁸, 2006), ressaltando que a inflamação, observada em determinada lesão pode

apresentar áreas com maior ou menor quantidade de infiltrado inflamatório (WORAWONGVASU⁴¹, 2007; FIROOZMAND et al.¹⁰ 2005).

Considerando a espectroscopia FT-Raman os gráficos *Box Plot* demonstraram grande variação espectral no grupo MN, o que mostra que o padrão de normalidade é variável de paciente para paciente. Variação esta, que pode estar relacionada ao hábito de mordiscar a mucosa jugal o que não leva a um quadro de inflamação, mas uma alteração discreta que foi detectada pela sensibilidade da Espectroscopia Raman. Em contrapartida, os espectros referentes ao grupo de HFI tiveram pouca variação intra-grupo, demonstrando a fidelidade da Espectroscopia FT-Raman quando comparada aos dados histopatológicos. A caracterização dos tecidos biológicos por Espectroscopia FT-Raman, ou melhor, a criação do banco de dados referente às lesões analisadas é pertinente, tendo em vista que foi possível diferenciar MN de HFI localizados em mucosa jugal.

Com o PCA, os espectros dos pontos analisados foram transformados em poucos dados que puderam expressar a característica de cada amostra com relação aos componentes principais (LYNG et al.²⁰, 2006; KRISHNA et al.¹⁷, 2005). A relação observada entre os dados obtidos no tecido normal e do tecido patológico mostrou-se mais evidente quando se observou os Componentes Principais, PC3 vs PC5, obtidos pela Análise dos Componentes Principais (PCA) dos espectros de MN e HFI.

Observando-se a figura 10, pode ser notada a relação do DNA entre as amostras de HFI e MN, tal variação de pico está relacionada ao aumento da proliferação das células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) no local da inflamação (Firoozmand et al.¹⁰, 2005), podendo também estar relacionada ao aumento na produção das fibras colágenas, devido ao aumento do número de fibroblastos no tecido inflamatório ou ao aumento da capacidade de produção de fibras colágenas que é intrínseca a cada fibroblasto (Wang et al.⁴⁰, 2003).

Analisando o *Loading Plot* dos PC's, ficou evidente que os espectros apresentaram picos invertidos, compreendendo extensa região que variava das bandas de 540 a 1030 cm^{-1} , responsáveis principalmente pelas vibrações moleculares de oscilação de CO_2 , respiração do anel aromático C-C, deformação de CCH, estiramento α -*helix* de CC, estiramento do anel aromático C-C, essas vibrações correspondem respectivamente, aos componentes estruturais dos aminoácidos, da pirimidina, dos polissacarídeos, das proteínas e da fenilalanina, podendo esta última estar fortemente relacionada à estrutura cristalográfica do colágeno. Foram também observadas alterações significativas nas regiões de 1300, 1580 e 1730 cm^{-1} , com aspectos de picos invertidos, o que determina a maior variação espectral. Estes picos correspondem respectivamente às ligações de torção CH_2 e CH_3 e estiramento C-C, e colágeno III.

A discreta variação observada na região de 1730 cm^{-1} , correspondente ao colágeno tipo III (PENTEADO et al.³⁰, 2008), ficou evidente pelo fato deste pico ter sido observado nos espectros de mucosa normal, desaparecendo em grande parte dos espectros de HFI. Uma possível explicação para esta diferença relaciona-se aos constituintes teciduais preexistentes nos tecidos bucais normais, colágeno tipo I (abundante) e tipo III (em menor quantidade). Os colágenos tipo III e I são complexos protéicos predominantes no tecido conjuntivo de mucosas bucais. No entanto, histopatologicamente não é possível a distinção entre os diferentes tipos de colágenos presentes, detectados através da Espectroscopia Raman.

O desarranjo tecidual determinado pelo processo inflamatório faz com que as fibras colágenas tanto do tipo I quanto do tipo III apresentem-se desorganizadas. Ao ocorrer o processo inflamatório, as fibras colágenas tipo III, podem sofrer degeneração, decorrente do infiltrado inflamatório e das enzimas liberadas no local, determinando diminuição na intensidade desse

pico, observada nos espectros das amostras de HFI. Esta discussão ressalta a sensibilidade da Espectroscopia Raman para análise de tecidos biológicos.

De acordo com a análise dos gráficos de *loading e box plot*, foi possível observar que as bandas Raman referentes às proteínas e aos lipídios, foram as que tiveram diferenças mais significativas (MALINI et al.²², 2006). É necessário considerar que quanto mais intensa ou aguda for a resposta inflamatória maior a quantidade de mediadores químicos presentes nos tecidos, tais como prostaglandinas, histaminas, ácido araquidônico e leucotrienos, mediadores estes que fazem parte do grupo de lipídios e proteínas. Portanto, as alterações espectrais observadas nas amostras de HFI estavam intimamente relacionadas com o achado histopatológico representado pelo infiltrado inflamatório (Duperray et al.⁹, 1995; Séguier et al.³⁵, 2000; Wang et al.⁴⁰, 2003, Firoozmand et al.¹⁰, 2005). O colágeno é observado como finos e delicados feixes de fibras no tecido normal, enquanto no tecido alterado, apresenta-se sob a forma de feixes de fibras espessas e maduras.

Dos espectros que apresentaram resultados falso positivos, duas observações podem ser feitas: 1) pode relacionar-se a amostras de pacientes com HFI que apresentam histopatologicamente características discretas do processo inflamatório discretas podendo ser considerada *border line*; e 2) pode estar relacionado a espectros referentes às bordas da lesão, cujos espectros fazem parte do tecido normal, ao invés do alterado.

O trabalho realizado demonstrou necessidade de aprofundamento nas pesquisas que utilizam a Espectroscopia Raman em tecidos biológicos que apresentem processos proliferativos, permitindo que os resultados encontrados possam ser validados. É importante ressaltar que a utilização da técnica da Espectroscopia Raman, associada à outras técnicas de biópsia óptica como a Espectroscopia por Fluorescência e o

Dicroísmo Circular, poderá fornecer informações adicionais dos tecidos avaliados, e contribuir na sua implementação como método diagnóstico.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a análise dos espectros Raman permitiu detectar similaridades e diferenças biológicas e bioquímicas entre HFI e MN de mucosa jugal, demonstrando que a Espectroscopia Raman apresenta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de processos proliferativos não neoplásicos. Observou-se correlação entre os achados histopatológicos e os obtidos pela utilização da técnica.

8 REFERÊNCIAS*

1. Andrade PO, Bitar RA, Yassoyama K, Martinho H, Santo AM, Bruno PM, et al. Study of normal colorectal tissue by FT-Raman Spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2007;387(5):1643-8.
2. Angel SM, Carrabba M, Cooney TF. The utilization of diode lasers for Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Spectrosc.* 1995;(51): 1779-99.
3. Baker Shut TC, Witjes MJH, Sterenborg HJCM, Speelman OC, Roodenburg JLN, Marple ET et al. In vivo detection of dysplastic tissue by Raman Spectroscopy. *Anal Chem.* 2000;72:6010-18.
4. Bitar RA, Martinho HS, Tierra-Criollo CJ, Zambelli Ramalho LN, Netto MM, Martin AA. Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2006;11(5).
5. Cheng WT, Liu MT, Liu HN, Lin SY. Micro-raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. *Microsc. Res Tech.* 2005; 68:75-9.
6. Choo-Smith LP, Edwards HG, Endtz HP, Kros JM, Heule F, Barr H et al. Medical applications of Raman Spectroscopy: From proof of principal to clinical implementation. *Biopolymers.* 2002;67(1):1-9.

*Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em : http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Chowdary MVP, Kumar KK, Kurien J, Mathew S, Krishna CM. Discrimination of normal, benign and malignant breast tissues by Raman Spectroscopy *Biopolymers*. 2006;83:556-9.
8. De Veld DC, Bakker Schut TC, Skurichina M, Witjes MJ, Van der Wal JE, Roodenburg JL, et al . Autofluorescence and Raman microspectroscopy of tissue sections of oral lesions. *Lasers Med Sci*. 2005;19(4):203-9.
9. Duperray A, Mantovani A, Introna M, Dejana E. Endothelial cell regulation of leukocyte infiltration in inflammatory tissues. *Mediat Infl*. 1995;4:322-30.
10. Firoozmand ML, Almeida JD, Cabral LAG. Study of denture-induced fibrous hyperplasia cases diagnosed from 1979 to 2001. *Quint Int*. 2005; 38:41-5.
11. Gniadecka M, Philipsen PA, Sigurdsson S, Wessel S, Nielsen OF, Cristensen DH, et al. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: Structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. *J. Invest Dermatol*. 2004;122(2):443-9.
12. Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy . *Cancer Res*. 2006;66(6):3317-22.
13. Hata TR, Scholz TA, Ermakov IV, McClane RW, Khachik F, Gellermann W, et al. Non-invasive Raman spectroscopy detection of carotenoids in human skin. *J Invest Dermatol*. 2000;115:441-8.

14. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J Oral Pathol Med.* 2007;36:262-6.
15. Huang Z, McWilliams A, Lam S, English J, McLean DI, Lui H, et al. Effect of formalin fixation on the near infrared raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues. *Int J Oncol.* 2003;23:649-55.
16. Jackson M, Sowa MG, Manstschh H. Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine. *Biophys Biochem.* 1997;68:109-25.
17. Krishna CM, Sockalingum GD, Kegelear G, Rubin S, Kartha VB, Manfait M. Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. *Vibrational Spectroscopy.* 2005;38:95-100.
18. Krishna CM, Prathima NB, Malini R, Vadhiraja BM, Bhatt RA, Fernandes DJ, et al. Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancer in human uterine cervix. *Vibrational Spectroscopy.* 2006;41:136-141.
19. Lau DP, Huang Z, Lui H, Anderson DW, Berean K, Morrison MD, et al. Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx-preliminary findings. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):210-4.
20. Lyng FM, Faoláin EÓ, Conroy J, Meade AD, Knief P, Duffy B, et al. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. *Exp Mol Path.* 2007;82:121-9.

21. Mahadevan-Jansen A, Mitchell MF, Ramanujam M, Utzinger U, Malpica A, Thomsen S, et al. Near-infrared spectroscopy for in vitro detection of cervical precancers. *Photochem Photobiol.* 1998;68(1):123-32.
22. Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study *Biopolymers.* 2006;81(3):179-93.
23. Manoharan R, Wang Y, Feld MS. Histochemical analysis of biological tissues using Raman Spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A.* 1996;52: 215-49.
24. Manoharan R. Raman spectroscopy and fluorescence photon migration for breast cancer diagnosis and imaging. *Photochem. Photobiol.* 1998;67(1):15-22.
25. Molckovsky A, Song LMWK, Shim MG, Marcon NE, Wilson BC. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. *Gastrointest Endos.* 2003;57(3):396-402.
26. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev.* 2007;42:493-541.
27. Naumann D. FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Appl Spectrosc Rev.* 2001;36(2:3):239-98.

28. Oliveira AP, Bitar RA, Silveira L, Zangaro RA, Martin AA. Near-infrared raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis *Photomed Laser Surg.* 2006;24(3):348-53.
29. Osada M, Gniadecka M, Wulf HC. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic analysis of proteins, water and lipids in intact normal stratum corneum and psoriasis scales *Exp. Dermatol.* 2004;13(6):391-5.
30. Penteado SCG, Fogazza BP, Carvalho CS, Arisawa EAL, Martins MA, Martin AA, et al. Diagnosis of degenerative lesions of supraspinatus rotator cuff tendons by Fourier transform-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2008;13(1):1-10.
31. Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature.* 1928;121:501-2.
32. Regezi JA, Sciubba JJ, Moleri AB, David FP, Moreira LC, Tavares RR. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas.* 3ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 475p.
33. Robichaux-Viehoever A, Kanter E, Shappell H, Billheimer D, Jones H 3rd, Mahadevan-Jansen A. Characterization of Raman spectra measured in vivo for detection of cervical dysplasia. *Appl Spectrosc* 2007;61(9):986-93.
34. Sala O. *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho.* São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista; 1995. 224 p.
35. Segquier S, Godeau G, Brousse N. Collagen fibers and inflammatory cells in healthy and diseased human gingival tissues: a comparative and

- quantitative study by immunohistochemistry and automated image analysis. *J Periodontol.* 2000;71(7):1079-1085.
36. Singh RCV. Raman and the discovery of the Raman effect. *Phys Perspect.* 2002;4:399-420.
37. Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discussions* 2004;126:141-57.
38. Tommasi AF. *Diagnóstico em patologia bucal.* 3ª.ed. São Paulo: Pancast; 2002.
39. Venkatakrishna K, Kurien J, Kerrthilatha MP, Valiatan M, Kumar NN, Krishna CM et al. Optical pathology of oral tissue: a Raman spectroscopy diagnostic method. *Current Sci.* 2001;80(5):665-9.
40. Wang PL, Ohura K, Fujii T, Mori-Oido M, Kowashi Y, Kikuchi M et al. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Research Comm.* 2003;305:970-73.
41. Worawongvasu R. A comparative study of the surfaces of normal oral epithelia and inflammatory hyperplasias by scanning electron microscopy. *Ultrastruct Pathol.* 2007;31(4):283-92.
42. Yamazaki H, Kaminaka S, Kohda E, Mukai M, Hamaguchi H. The diagnosis of lung cancer using 1064nm excited near-infrared multichannel raman spectroscopy. *Radiat Med.* 2003;21(1): 1-6.

ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Al. São Diniz
CEP: 12201-970 - F. (12) 3947-0028
Fax: (12) 3947-0019 / suely@focj.usp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 067/2006-PH/CEP, sobre "Análise *in vitro* de processos proliferativos não neoplásicos por Espectroscopia FT-Raman", sob a responsabilidade de **LUIS FELIPE DAS CHAGAS E SILVA DE CARVALHO** está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 10 de outubro de 2006.



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

ANEXO 2 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA <small>Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - São Dimas - CEP 12201-070 - F. (12) 3047-2000 - FAX (12) 3047-9028 -</small>	
 Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	
São José dos Campos, 13 de março de 2008	
Ofício nº 04/08-CEP	
Prezado(a) Sr.(a)	LUIS FELIPE DAS CHAGAS E SILVA DE CARVALHO
Projeto	Análise in vitro de processos proliferativos não neoplásicos por Espectroscopia FT-Raman
PARECER	
Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a ALTERAÇÃO DO NOME DO PROJETO , passando para "Análise ex vivo de hiperplasia fibrosa inflamatória de mucosa jugal por Espectroscopia FT-Raman". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 067/2006-PH/CEP de 10/10/2006.	

Atenciosamente,



Profa. Dra. **SUELY CARVALHO MÜTTI NARESSI**
 Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Caro (a) Senhor (a)

Eu Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho, portador de RG 33450759-5, aluno de mestrado do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José dos Campos, sob orientação da Professora Doutora Janete Dias Almeida, vou desenvolver uma pesquisa cujo título é “Análise *in vitro* de processos proliferativos não neoplásicos com Espectroscopia FT-Raman”.

O objetivo deste estudo é avaliar a eficiência do uso da Espectroscopia FT-Raman, um método diagnóstico não invasivo, que permite caracterizar a amostra quanto aos constituintes básicos teciduais e as ligações químicas presentes nesses tecidos. A espectroscopia Raman é também chamada de biópsia óptica por permitir a análise da emissão de uma luz laser sobre o tecido retirado. Até o presente momento não é possível a análise *in vivo*. Apenas *in vitro*, isto é, de fragmento de tecido retirado para diagnóstico.

Tendo V. Sa. sido submetido à biópsia de lesão bucal, solicito vossa autorização para retirar um fragmento do tecido que será enviado para análise laboratorial, o qual consiste em cerca de 1mm. A amostra a ser analisada será imediatamente acondicionada em nitrogênio líquido.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. V As. estará contribuindo para a pesquisa que no futuro espera-se estar acessível *in vivo*.

Informo que o Sr (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou

dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, situada na Av. Eng. Francisco José Longo, 777, CEP 12245-000, em São José dos Campos – SP, fone/fax: (12) 3947-9076, e-mail suely@fosjc.unesp.br e comunique-se com a Coordenadora Suely Carvalho Mutti Naressi.

Garantimos que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes.

O Sr (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso seja solicitado, daremos todas as informações que solicitar.

Não existirão despesas, compensações pessoais ou financeiras para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível sua identificação.

Anexo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso aceite participar da pesquisa e não tenha qualquer dúvida.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos esclarecimentos que li ou que foram lidos para mim, descrevendo o estudo “Análise *in vitro* de processos proliferativos não neoplásicos com Espectroscopia FT-Raman”.

Eu discuti com o aluno Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer momento. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data ____/____/____

Assinatura do participante

Nome:

RG:

Data ____/____/____

Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho

Carvalho LFCS. Ex vivo analysis by FT-Raman Spectroscopy of buccal mucosa inflammatory fibrous hyperplasia [dissertation]. São José dos Campos: São José dos Campos dental School, UNESP – São Paulo State University; 2008.

ABSTRACT

Inflammatory fibrous hyperplasia (IFH) is considered a non-neoplastic proliferative process that generally occurs in association to trauma. This pathology has typical histopathological features in both epithelial and conjunctive tissues. Raman spectroscopy of pathological tissues has become a reality that can contribute to knowledge enhancement about biochemical alteration making possible the differential diagnosis of oral pathologies. The objective of the present study was to use FT-Raman Spectroscopy to identify biological and biochemical alterations that exist between oral IFH in buccal mucosa and normal tissue from the same site. Therefore 92 spectra of inflammatory fibrous hyperplasia from 19 patients were compared to 27 spectra of normal tissue from 6 patients. It was observed that the relation between the data of IFH and normal tissue was more evident when the Principal Components Analysis (PCA) of all spectra were calculated and when the Principal Components (PC) PC3 vs. PC5 were analysed. Results of Box Plot show great differences in normal group. This was confirmed by the analysis of the Loading Plot of the PC's that showed great modifications between normal and IFH identified by inverted peaks in Raman band 500 e 1110 cm^{-1} ; 1300, 1580 and 1730 cm^{-1} . These bands correspond mainly to molecular vibrations of lipids, collagens (I and III) and proteins. The predictive value of diagnostic model was calculated by linear discriminates analysis that showed 0,87 ROC curve. Biological and biochemical similarities and differences between IFH and normal tissues were confirmed by Raman Spectroscopy when compared to histopathological analysis.

Keywords: Spectrum analysis, Raman, Hyperplasia, Mouth Mucosa