

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LARISSA CAROLINE MÜLLER

ANÁLISE MOLECULAR PELA ESPECTROSCOPIA RAMAN DE AMOSTRAS DE  
TECIDO BUCAL DE RATOS WISTAR SOB DIFERENTES MÉTODOS DE  
ARMAZENAMENTO

Porto Alegre

2016

LARISSA CAROLINE MÜLLER

ANÁLISE PELA ESPECTROSCOPIA RAMAN DE AMOSTRA DE TECIDO  
BUCAL DE RATOS WISTAR EM DIFERENTES MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação de Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho.

Porto Alegre

2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Müller, Larissa Caroline

Análise molecular pela Espectroscopia Raman de amostras de tecido bucal de ratos Wistar sob diferentes métodos de armazenamento / Larissa Caroline Müller. -- 2016.  
35 f.

Orientador: Manoel Sant'Ana Filho.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Análise espectral Raman. 2. Formol. 3. Tecido bucal. I. Sant'Ana Filho, Manoel, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.*

*Não possuo palavras suficientes que possam expressar verdadeiramente a minha profunda gratidão, aos meus pais, Silvana e Heini, agradeço pela educação que me deram e por não medirem esforços em investir na minha formação. Agradeço por me estimularem a estudar, agradeço pelo apoio, pela paciência, pelos conselhos e pelo amor incondicional. Vocês são meus exemplos e meus heróis!*

*A minha irmã, Laura, agradeço pelo carinho, pela amizade, pelo companheirismo e pelo amor.*

*Ao meu amor, Paulo, agradeço pela compreensão, paciência e companheirismo*

*A doutora Thaíse Gomes e Nóbrega, agradeço por poder fazer parte de suas pesquisas de doutorado, e me proporcionar oportunidades de aquisição de conhecimento, pela paciência e aprendizado.*

*Aos técnicos e alunas de pós-graduação da Patologia e LAMAD, agradeço ao apoio e auxílio nesta caminhada.*

*A minha família, amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constante.*

*Aos professores Vicente Castelo Branco Leitune e Fabrício Mezzomo Collares, agradeço por abrirem as portas do LAMAD para realizar o trabalho e me auxiliarem e resolver inúmeras dúvidas, sendo sempre muito prestativos e atenciosos.*

*Ao meu professor orientador Manoel Sant'Ana Filho, agradeço pelo aprendizado constante que me proporcionou, pela paciência, por tornar este trabalho tão gratificante e importante para minha formação.*

*À CAPES, pelo financiamento do presente projeto.*

*“Frequentemente a imaginação nos transporta a mundos que nunca existiram, mas sem ela não vamos a parte alguma”*

*(Carl Sagan)*

## RESUMO

MÜLLER, Larissa Caroline. **Análise molecular pela Espectroscopia Raman de amostras de tecido bucal de ratos Wistar sob diferentes métodos de armazenamento.** 2016. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

A Espectroscopia Raman é uma tecnologia ótica que vem sendo estudada na área da saúde para uso em diagnóstico, devido a sua capacidade de fornecer informações sobre a composição bioquímica da amostra. O método de condicionamento de amostras que são analisados no espectro Raman com o objetivo de diagnóstico, varia entre os estudos. O objetivo deste trabalho foi verificar se há diferenças moleculares pela espectroscopia Raman (ER) de amostras de tecido analisadas antes e após a fixação com formol a 10%. Foram avaliadas 5 (cinco) línguas de ratos do tipo Wistar armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estas amostras foram descongeladas e submetidas a ER. Em seguida, foram fixadas em formalina tamponada neutra e após 72h um novo espectro Raman foi obtido. De cada amostra foi selecionada 2 áreas distintas, uma de epitélio de superfície, outra de tecido conjuntivo. Os espectros de Raman foram obtidos num espectrômetro Raman (Senterra, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). A região espectral analisada foi de 500 a  $1500\text{ cm}^{-1}$ , sendo que o espectro resultante de média da leitura de 10 pontos, uma em epitélio e uma em conjuntivo. Os resultados da análise dos picos espectrais das médias de cada grupo mostram uma menor alteração molecular do tecido epitelial após a fixação pelo formol, já em relação ao tecido conjuntivo houve grandes alterações no tecido após a fixação. As conclusões são de que este estudo sugere que a ER pode ser usada em diagnóstico em tecido epitelial independente da fixação, mas em tecido conjuntivo deve-se cuidar qual o tipo de fixação do tecido que será analisado, pois ele sofre mais alterações no processo de fixação com formol.

Palavras chave: Análise espectral Raman. Formol. Tecido bucal.

## ABSTRACT

MÜLLER, Larissa Caroline. **Molecular analysis by Raman spectroscopy oral tissue of Wistar rats under different storage methods.** 2016. 35 p. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Raman Spectroscopy is an optical technology that has been studied in the health area for diagnostic use due to its ability to provide information about the biochemical composition of the sample. The method of samples conditioning that are analyzed in the Raman spectrum with the objective of diagnosis, varies between the studies. The objective of this work was to verify if there are molecular differences by Raman spectroscopy (ER) of tissue samples analyzed before and after the fixation with 10% formalin. Five (5) tongues of Wistar rats were evaluated stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . These samples were unfrozen and subjected to ER. Then, they were fixed in neutral buffered formalin and after 72 hours a new Raman spectrum was obtained. From each sample was selected 2 distinct areas, one of surface epithelium, the other of connective tissue. Raman spectra were obtained on a Raman spectrometer (Senterra, Bruker Optics, Ettlingen, Germany). The spectral region analyzed was  $500$  to  $1500\text{ cm}^{-1}$ , the resulting spectrum of 10 point reading average, one in epithelium and one in conjunctiva. The results of the analysis of the spectral peaks from the averages of each group show a smaller molecular alteration of the epithelial tissue after the fixation by the formalin, however in relation to the connective tissue there were great alterations in the tissue after the fixation. In conclusion this study suggests that ER can be used for the diagnosis in epithelial tissue independent of fixation, but in connective tissue one must take care with the type of tissue fixation that will be analyzed, since it undergoes more changes in the fixation process with formaldehyde.

Keywords: Raman spectral analysis. Formaldehyde. Oral tissue.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>08</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A ER Raman é uma tecnologia ótica que vem sendo estudada para uso em diagnóstico, devido a sua característica de técnica não invasiva, não destrutiva e (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007; SU et al., 2012) sem necessidade de um preparo prévio das amostras (CALS et al., 2015), sua grande sensibilidade e especificidade (GUZE et al., 2015; HAKA et al., 2005; KINIPFER et al., 2014; KRISHNA et al., 2004; NÓBREGA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2006; SU et al., 2012; ZHOU et al., 2015) e tolerância a amostras aquosas e o curto período de aquisição das análises espectrais. (HANLON et al., 2000; KNIPFER et al., 2014; LI; YANG; LIN, 2011). Além disso outra vantagem da ER, é que o resultado independe da experiência do patologista. (SU et al., 2012) Vários estudos já verificaram a utilidade da ER em tecidos com alterações pré-malignas e malignas, realizando estudos em uma gama anatômica de locais como cérebro (JERMYN et al., 2015; ZHOU et al., 2012), mama (HAKA et al., 2005; HAKA et al., 2006; MATTHEWS et al., 2011) , trato gastrointestinal (SHIM et al., 2000; YAN et al., 2005), nasofaringe (LAU et al., 2003), pele (GNIADOCKA et al., 2004; HUANG et al., 2004; LIEBER et al., 2008; LUI et al., 2012), pulmão (HUANG et al., 2003a; HUANG et al., 2003b; KAMINAKA et al., 2001; LI; YANG; LIN, 2012; MATTHEWS et al., 2011; OSHIMA et al., 2010; SHORT et al., 2008), colo do útero (JESS et al., 2007; LYNG et al., 2007; ROBICHAUX-VIEHOEVER et al., 2007), próstata (CROW et al., 2005; MATTHEWS et al., 2011) e cavidade oral (DESHMUKH et al., 2011; GUZE et al., 2009; GUZE et al., 2014; KNIPFER et al., 2014; KRISHNA et al., 2004; MALINI et al., 2006; NÓBREGA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2006; SU et al., 2012).

O câncer bucal é um dos tipos mais comuns de câncer no mundo, sendo o tipo histopatológico mais comum o carcinoma Espinocelular (CEC). Foram estimados em 2012, cerca de 300 mil casos novos no mundo, sendo que, desses, aproximadamente dois terços são no sexo masculino. Em relação a mortalidade, foram esperados cerca de 145 mil óbitos por câncer no mundo, em 2012, com cerca de 80% ocorrendo em regiões subdesenvolvidas. (FERLAY et al., 2015). Foi previsto que no Brasil, no ano de 2016, haverá a ocorrência de 15.490 novos casos novos de câncer de boca e 5.401 óbitos decorrentes da doença. O diagnóstico precoce é o meio mais eficaz para melhorar o prognóstico do câncer e conseqüentemente aumentar a taxa de sobrevivência (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR

GOMES DA SILVA, 2015). A Espectroscopia Raman (ER) tem a capacidade de fornecer informação molecular específica sobre células e tecidos. Assim, ela pode apresentar a capacidade de detectar alterações bioquímicas nos tecidos antes que a patologia esteja estabelecida morfológicamente, podendo ter características inflamatórias ou neoplásicas (CAL S et al., 2013; KELLER; KANTER; MAHADEVAN-JANSEN, 2006; NOTINGHER et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2006; VENKATAKRISHNA et al., 2001).

A ER é uma tecnologia óptica baseada no efeito Raman que é o espalhamento inelástico da radiação eletromagnética monocromática que interage com as moléculas. Sendo a frequência de radiação espalhada diferente da radiação incidente (LYNG et al., 2007; RAMAN; KRISHNAN, 1928; SINGH, 2002). A amostra é irradiada com uma luz monocromática, atualmente emitida por um laser, e a interação de energia entre os fótons e as moléculas da amostra resultam na dispersão de luz. A energia necessária para gerar uma vibração molecular depende da massa dos átomos envolvidos e o tipo de ligações químicas entre os mesmos. O espalhamento inelástico ou efeito Raman é detectado pelo espectrômetro e estas alterações de energia fornecem informações sobre a composição molecular da amostra que é expressa através de espectros, permitindo obter informações detalhadas sobre a composição molecular da amostra (HANLON et al., 2000; SÓCRATES, 2004).

O efeito Raman foi confirmado experimentalmente por Raman e Krishnan (1928). O equipamento empregado 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. A hipótese era que a radiação visível poderia interagir com a matéria de tal maneira 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; KRISHNAN, 1928). Tal descoberta fez com que Raman ganhasse o Prêmio Nobel da Física de 1930. (Sir Chandrasekhara Venkata Raman, 1965)

A maioria dos estudos atuais em espectroscopia Raman foram realizados com amostras congeladas após a biópsia ou fixadas em formalina (HUANG et al., 2003). Não há um padrão nos estudos em sobre tipo de condicionamento de amostras nas pesquisas, mas é esperado que o armazenamento por congelamento de amostras logo após a biópsia, tenha pequenos efeitos na análise Raman, (SHIM; WILSON,

1996), pois o congelamento imediato do tecido após a biópsia é o padrão ouro de condicionamento para uso em estudos proteômicos, pois preserva as proteínas com muita qualidade (KOTHMAIER et al., 2011).

A ER já foi utilizada em tecido oral, para fazer diagnósticos em pacientes em tempo real (GUZE et al., 2009; GUZE et al., 2014), outros estudos utilizaram a técnica de congelamento da amostra analisada, devido sua capacidade de maior conservação molecular ou utilização de tecido sem fixação (DESHMUKH et al., 2011; KNIPFER et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2006; SU et al., 2012), também há estudos que utilizaram tecidos fixados em formalina (KRISHNA et al., 2004; NÓBREGA et al., 2015), que segundo Krishna (2004), é um método de condicionamento adequado para a análise da ER. A maioria dos estudos em cavidade Oral realizou análise em tecidos normais (DESHMUKH et al., 2011; GUZE et al., 2009; GUZE et al., 2015; KRISHNA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; SU et al., 2012) e com lesões inflamatórias e malignas, especialmente o CEC. (GUZE et al., 2015; KNIPFER et al., 2014; KRISHNA, et al., 2004; NÓBREGA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2006; SU et al., 2012). Os trabalhos obtiveram como resultado, alta sensibilidade e especificidade da ER para diferenciar tecido normal de tecido de CEC. (GUZE et al., 2015; KNIPFER et al., 2014; KRISHNA et al., 2004; NÓBREGA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2006; SU et al., 2012) Segundo Krishna (2004), as alterações moleculares induzidas por malignidade são observadas principalmente em espectros de regiões de tecido epitelial. Mas, as alterações patológicas ocorrem com a interação entre os componentes de tecido conjuntivo e tecido epitelial, assim, é indicado analisar os dois tecidos juntos para auxiliar no diagnóstico. (DESHMIKH et al., 2011)

A análise histopatológica de tecido biopsiado, é uma técnica de diagnóstico morfológico de padrão ouro para uso em grande parte das doenças da cavidade oral, incluindo alterações malignas e autoimunes. Essa técnica diferentemente da ER, necessita de uma fixação prévia das amostras biológicas sendo o agente de condicionamento mais comum a formalina. (GUZE et al., 2009). A fixação em formalina evita a degradação do tecido, além de estabilizar a estrutura morfológica do tecido. (HUANG et al., 2003). No entanto, a formalina gera ligações cruzadas de pontes de metileno nas proteínas, aminas, amidas, anéis aromáticos, hidroxilo, guanina, grupos sulfidríla, e átomos de hidrogênio reativos da amostra. (GALLI et al., 2014; MOELANS et al., 2011) A formalina causa também a degradação de proteínas,

DNA, RNA e ácidos nucléicos. (GALLI et al., 2014; KNIGGENDORF; GAUL; MEINHARDT-WOLLWEBER, 2011; KOTHMAIER et al., 2011; SRINIVASAN; SEDMAK; JEWELL, 2002), que sugere que este tipo de condicionamento tenha influência nas análises moleculares do tecido, gerando erros de interpretação, suprimindo informações ou criando artefatos de fixação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi avaliar se há diferenças moleculares pela análise da espectroscopia Raman, entre amostras de tecido sem fixação e com fixação em formalina tamponada 10% por 72h, e qual a implicação no uso diagnóstico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar, se as informações fornecidas pela espectroscopia Raman, são capazes de determinar as características do tecido quanto ao tipo de tecido e fixação.

Verificar por meio de análise dos picos espectrais das amostras.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

**Artigo apresentado de acordo com as normas do Journal Raman Spectroscopy (Qualis Odontologia B1 – Ano base 2014 e Fator de impacto 2.395)**

**Análise molecular pela Espectroscopia Raman de amostras de tecido bucal de ratos Wistar sob diferentes métodos de armazenamento.**

**Resumo.** A Espectroscopia Raman é uma tecnologia ótica que vem sendo estudada na área da saúde para uso em diagnóstico, devido a sua capacidade de fornecer informações sobre a composição bioquímica da amostra. O método de condicionamento de amostras que são analisados no espectro Raman com o finalidade de diagnóstico, varia entre os estudos. O objetivo deste trabalho foi verificar se há diferenças moleculares pela espectroscopia Raman (ER) de amostras de tecido analisadas antes e após a fixação com formol a 10%. Foram avaliadas 5 (cinco) línguas de ratos do tipo Wistar provenientes de material de descarte armazenadas a -80°C. Estas amostras foram descongeladas e submetidas a ER. Em seguida, foram fixadas em formalina tamponada neutra 10% e após 72h um novo espectro Raman foi obtido com os mesmos parâmetros. Os resultados das análises dos picos espectrais, mostram uma menor alteração molecular do tecido epitelial após a fixação pelo formol, já em relação ao tecido conjuntivo houve maiores alterações no tecido após a fixação. As conclusões são de que este estudo sugere que a ER pode ser usada em diagnóstico em tecido epitelial independente da fixação, mas em tecido conjuntivo deve-se cuidar qual o tipo de fixação do tecido que será analisado, pois ele sofre mais alterações no processo de fixação com formol.

**Palavras chave:** Análise espectral Raman. Diagnóstico. Tecido bucal.

### Introdução

O câncer bucal é um dos tipos mais comuns de câncer no mundo, sendo o tipo histopatológico mais comum o carcinoma Espinocelular (CEC). Foram estimados em 2012, cerca de 300 mil casos novos no mundo, sendo que, desses, aproximadamente dois terços são no sexo masculino. Em relação a mortalidade, foram esperados cerca de 145 mil óbitos por câncer no mundo, em 2012, com cerca de 80% ocorrendo em regiões subdesenvolvidas.<sup>1</sup> Foi previsto que no Brasil, no ano de 2016, haverá a ocorrência de 15.490 novos casos novos de câncer de boca e 5.401 óbitos decorrentes da doença. O diagnóstico precoce é o meio mais eficaz para melhorar o prognóstico do câncer e conseqüentemente aumentar a taxa de sobrevida.<sup>2</sup> A Espectroscopia Raman (ER) tem a capacidade de fornecer informação molecular específica sobre células e tecidos. Assim, ela pode apresentar a capacidade de detectar alterações bioquímicas nos tecidos antes que a patologia esteja

estabelecida morfológicamente, podendo ter características inflamatórias ou neoplásicas.<sup>3-7</sup>

A ER é uma tecnologia óptica baseada no efeito Raman que é o espalhamento inelástico da radiação eletromagnética monocromática que interage com as moléculas. Sendo a frequência de radiação espalhada diferente da radiação incidente.<sup>8-10</sup> A amostra é irradiada com uma luz monocromática, atualmente emitida por um laser, e a interação de energia entre os fótons e as moléculas da amostra resultam na dispersão de luz. A energia necessária para gerar uma vibração molecular depende da massa dos átomos envolvidos e o tipo de ligações químicas entre os mesmos. O espalhamento inelástico ou efeito Raman é detectado pelo espectrômetro e estas alterações de energia fornecem informações sobre a composição molecular da amostra que é expressa através de espectros, permitindo obter informações detalhadas sobre a composição molecular da amostra.<sup>11-12</sup> O efeito Raman foi confirmado experimentalmente por Raman e Krishnan (1928) e tal descoberta fez com que Raman ganhasse o Prêmio Nobel da Física de 1930.<sup>13</sup>

Esta tecnologia óptica que vem sendo estudada para uso em diagnóstico, devido a sua característica de técnica não invasiva, não destrutiva<sup>17-18</sup> e sem necessidade de um preparo prévio das amostras<sup>19</sup>, sua grande sensibilidade e especificidade<sup>4,18,20-25</sup> e tolerância a amostras aquosas e o curto período de aquisição das análises espectrais.<sup>12,23,26</sup> Além disso outra vantagem da ER, é que o resultado independe da experiência do patologista.<sup>18</sup> Vários estudos já verificaram a utilidade da ER em tecidos com alterações pré-malignas e malignas, realizando estudos em uma gama anatômica de locais como cérebro<sup>25,27</sup>, mama<sup>21,28-29</sup>, trato gastrointestinal<sup>30-31</sup>, nasofaringe<sup>32</sup>, pele<sup>33-36</sup>, pulmão<sup>14,26,29,37-40</sup>, colo do útero<sup>8,41-42</sup>, próstata<sup>29,43</sup> e cavidade oral.<sup>4,18,20,22-24,44-46</sup>

Em cavidade oral, a ER já foi utilizada para realizar diagnósticos em pacientes em tempo real<sup>22,45</sup>, outros estudos utilizaram a técnica de congelamento da amostra analisada, devido sua capacidade de maior conservação molecular ou utilização de tecido sem fixação<sup>4,18,23,46</sup>, também há estudos que utilizaram tecidos fixados em formalina<sup>20,24</sup>, que segundo Krishna (2004), é um método de condicionamento adequado para a análise da ER. A maioria dos estudos em cavidade Oral realizou análise em tecidos normais<sup>4,18,20,22,45-46</sup> e com lesões inflamatórias e malignas, especialmente o CEC.<sup>4,18,20,22-24</sup> Os trabalhos obtiveram como resultado, alta

sensibilidade e especificidade da ER para diferenciar tecido normal de tecido de CEC.<sup>4,18,20,22-24</sup> Segundo Krishna (2004), as alterações moleculares induzidas por malignidade são observadas principalmente em espectros de regiões de tecido epitelial. Mas, as alterações patológicas ocorrem com a interação entre os componentes de tecido conjuntivo e tecido epitelial, assim, é indicado analisar os dois tecidos juntos para auxiliar no diagnóstico.<sup>46</sup>

A maioria dos estudos atuais em ER foram realizados com amostras congeladas após a biópsia ou fixadas em formalina.<sup>14</sup> Não há um padrão nos estudos em sobre tipo de condicionamento de amostras nas pesquisas, mas é esperado que o armazenamento por congelamento de amostras logo após a biópsia, tenha pequenos efeitos na análise Raman<sup>15</sup>, pois o congelamento imediato do tecido após a biópsia é o padrão ouro de condicionamento para uso em estudos proteômicos, pois preserva as proteínas com muita qualidade.<sup>16</sup>

A análise histopatológica de tecido biopsiado, é uma técnica de diagnóstico morfológico de padrão ouro para uso em grande parte das doenças da cavidade oral, incluindo alterações malignas e autoimunes. Essa técnica diferentemente da ER, necessita de uma fixação prévia das amostras biológicas sendo o agente de condicionamento mais comum a formalina.<sup>45</sup> A fixação em formalina evita a degradação do tecido, além de estabilizar a estrutura morfológica do tecido.<sup>14</sup> No entanto, a formalina gera ligações cruzadas de pontes de metileno nas proteínas, aminas, amidas, anéis aromáticos, hidroxilo, guanina, grupos sulfidrila, e átomos de hidrogênio reativos da amostra.<sup>47-48</sup> A formalina causa também a degradação de proteínas, DNA, RNA e ácidos nucleicos<sup>16,48-50</sup>, que sugere que este tipo de condicionamento tenha influência nas análises moleculares do tecido, gerando erros de interpretação, suprimindo informações ou criando artefatos de fixação. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar se há diferenças moleculares pela análise da ER, entre amostras de tecido sem fixação e com fixação com formalina 10% por 72h.

## **Materiais e métodos**

### **Amostras De Tecido**

Os tecidos analisados foram de 5 línguas de ratos Wistar provenientes de um material de descarte de projeto com aprovação no CEUA no. 26102, que estavam armazenadas a -80°C. Esse material foi descongelado, antes de ser analisado foi



cortado longitudinalmente com o objetivo de expor o tecido conjuntivo. A amostra foi colocada sobre uma lâmina de vidro localizada no espectrômetro Raman com a face de tecido epitelial voltada para cima e uma leitura foi realizada, após se voltava a face de tecido conjuntivo para cima e uma nova análise era realizada. Em seguida, a amostra foi fixada em formalina neutra tamponada (NBF) 10% e após 72h um novo espectro Raman foi obtido.

### **Espectroscopia Raman**

A amostra foi analisada por um espectrômetro Raman (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha), utilizando um laser de diodo de 785 nm com potência de 100 mw, com  $3\text{-}5\text{ cm}^{-1}$  de resolução espectral, 20 vezes por 5 segundos. Foram analisados 10 pontos em cada área, dez em tecido epitelial e dez em tecido conjuntivo, antes e após a fixação por formol. Após as primeiras leituras, a amostra foi fixada em NBF 10% por 72h e uma nova análise na ER foi realizada, utilizando os mesmos parâmetros da primeira análise. Os processamentos espectrais preliminares de normalização, correção da linha de base e corte, foram realizadas no software Opus 7.2 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). A faixa espectral analisada foi de 500 a  $1500\text{cm}^{-1}$ . Os dados obtidos dos espectros foram transferidos para uma planilha eletrônica Microsoft Excel 2007 (Microsoft Redmond, WA, USA) para análise estatística.

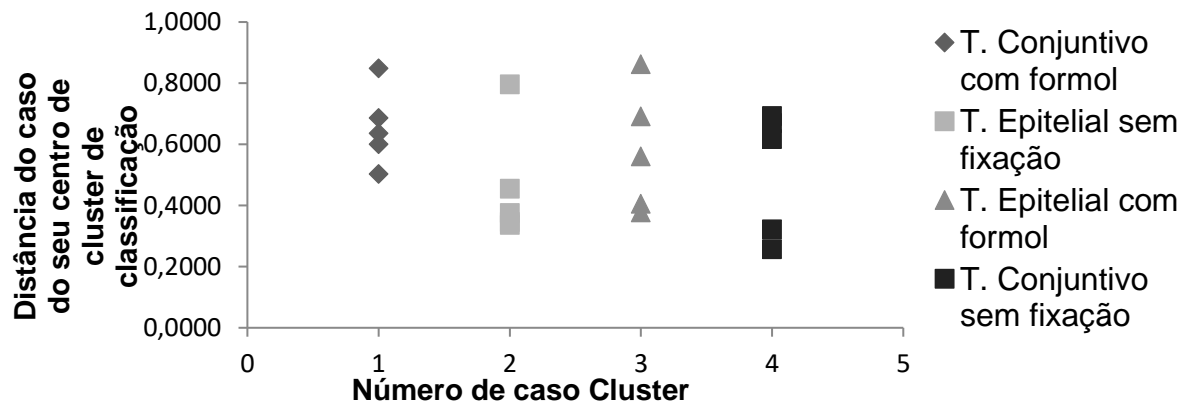
### **Análise estatística dos resultados**

Os dados da média passaram pela Análise de componentes principais (PCA), que buscou reduzir o total de 1001 variáveis em novas variáveis de 10 componentes principais. Os resultados desta análise preliminar foram processados pela Análise de discriminantes lineares (LDA) e análise Cluster k-means. Para o processamento dos dados, em cada análise estatística, utilizou-se o programa SPSS 21 (IBM, Armonk, NY, USA).

Foi realizado a média de 50 espectros de cada um dos 4 grupos, e os picos espectrais das médias foram analisados para avaliar se há alterações significativas para uso em diagnóstico.

## Resultados

Os fatores obtidos da análise dos componentes principais (PCA) de cada média foram processados pela análise Cluster K-means, que determina uma partição dos indivíduos em classes segundo as semelhanças e diferenças entre eles, agrupando as amostras mais semelhantes. Para a realização desta análise, foi limitado o número de classes em 4. Todas as amostras de tecido conjuntivo com formol foram alocadas no cluster 1, todas as amostras de tecido epitelial sem fixação foram alocadas no cluster 2, todas as amostras de tecido epitelial fixado por formol foram alocadas no cluster 3 e todas as amostras de tecido conjuntivo sem fixação foram alocadas no cluster 4 (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Gráfico da análise Cluster k-means.

A Análise de Discriminantes Lineares (LDA) mostrou que todas as amostras do grupo predito corresponderam ao grupo de origem (Tabela 1).

**Tabela 1:** Análise de discriminantes lineares.

Número do caso	Grupo real	Grupo previsto	Grupo mais alto			
			P(D>d   G=g)		P(G=g   D=d)	Distância Mahalanobis ao quadrado para centroide
			P	Df		
1	2	2	,186	3	1,000	4,813
2	1	1	,714	3	1,000	1,366
3	2	2	,722	3	1,000	1,332
4	1	1	,587	3	1,000	1,932
5	2	2	,081	3	,998	6,743
6	1	1	,807	3	1,000	,977
7	2	2	,192	3	1,000	4,736
8	1	1	,171	3	,998	5,012
9	2	2	,913	3	1,000	,444
10	1	1	,540	3	1,000	2,160
11	4	4	,770	3	1,000	1,131
12	3	3	,658	3	1,000	1,605
13	4	4	,864	3	1,000	,739
14	3	3	,833	3	1,000	,867
15	4	4	,447	3	1,000	2,658
16	3	3	,180	3	1,000	4,885
17	4	4	,901	3	1,000	,581
18	3	3	,777	3	1,000	1,099
19	4	4	,820	3	1,000	,924
20	3	3	,262	3	,999	3,996

## Perfil espectral do tecido epitelial de superfície

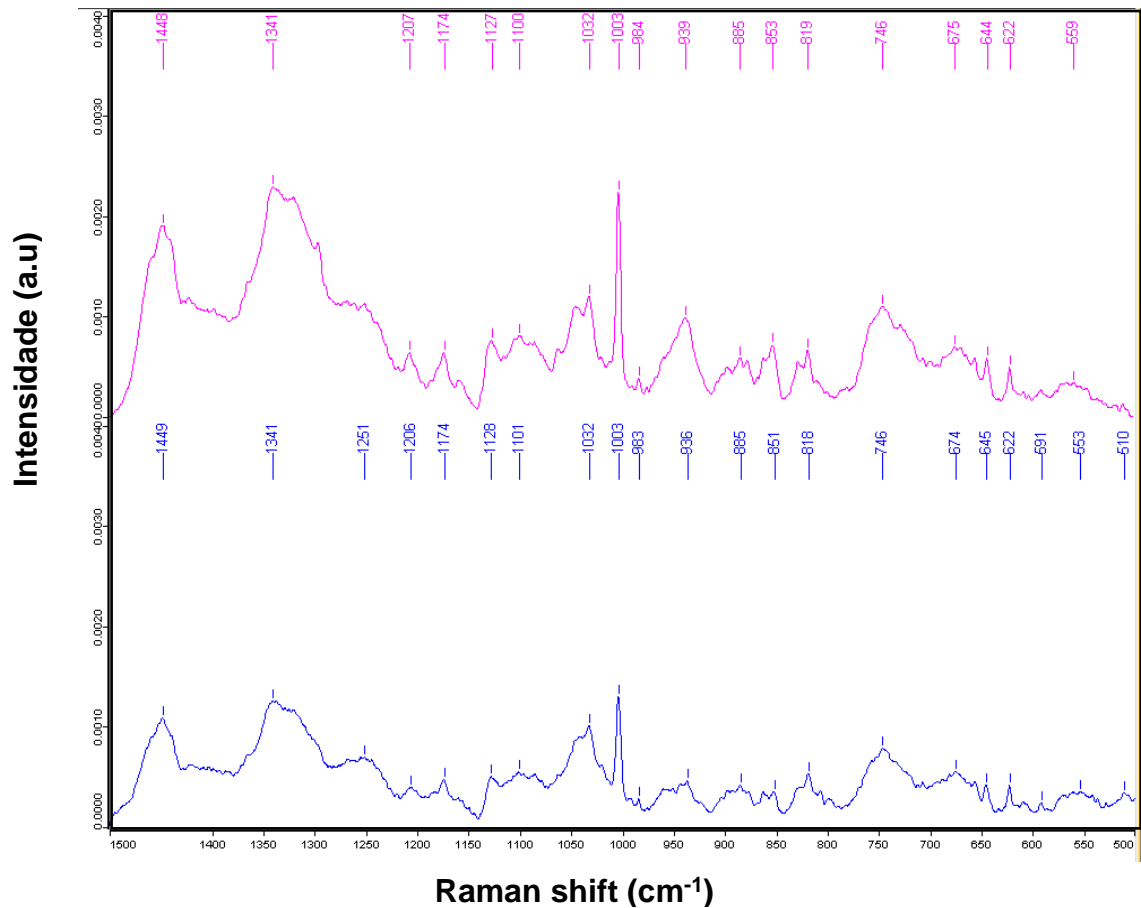
Nas amostras analisadas de tecido epitelial de superfície (Tabela 2), a maioria dos picos da amostra de tecido epitelial sem formol também ocorreram na análise do tecido epitelial com formol, com exceção dos picos  $510\text{ cm}^{-1}$ ,  $591\text{ cm}^{-1}$  e  $1251\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabela 2:** Perfil espectral dos grupos analisados de tecido epitelial de superfície.

Tecido epitelial de superfície sem fixação	Tecido epitelial de superfície com formol	Molécula	Modo vibracional
	510	Cistina <sup>51-22</sup>	Dissulfeto de alongamento de banda de colágeno <i>N</i> S-S e gauche-gauche-gauche
559	553	****	****
	591	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> <sup>51</sup>	Vibração simétrica de alongamento
622	622	Fenilalanina <sup>7,41,45,53-54</sup>	Torção C-C
644	645	Tirosina <sup>7,41,45,53-54</sup>	Torção C-C
675	674	Ácidos nucleicos <sup>55</sup>	****
746	746	DNA/RNA <sup>18,55</sup>	T anel aromático
819	818	Colágeno <sup>18,20,56</sup>	Suporte principal C-C
853	851	Proteína e DNA <sup>20,38,51,53-55</sup>	Respiração do anel C-C
885	885	Dissacarídeo (celobiose) <sup>52</sup>	(C-O-C) Modo esquelético
939	936	Prolina <sup>41,51</sup>	Cadeia principal estiramento C-C
984	983	Fenilalanina <sup>57</sup>	****
1003	1003	Fenilalanina <sup>18,20,38,55,58</sup>	Respiração do anel
1032	1032	Fenilalanina <sup>18,20,38,51</sup>	Dobra C-H
1100	1101	Colágeno <sup>20</sup>	****
1127	1128	Lipídeo <sup>20,41,48</sup>	Alongamento trans C-C
1174	1174	Proteína <sup>18,55</sup>	Dobra C-H
1207	1206	Proteína <sup>38,59</sup>	Alongamento C-C6H5
	1251	Amida III <sup>18,20,41,60</sup>	****
1341	1341	Proteína e ácidos nucleicos <sup>7,18,41,61-63</sup>	****
1448	1449	Proteína e DNA <sup>20,37,51,55,64-66</sup>	Deformação CH

\*\*\*\*Componente desconhecido.

Há uma redução na intensidade das faixas espectrais que é observado na figura 1, em que o tecido epitelial de superfície sem fixação se apresenta mais intenso em comparação com o tecido fixado por formol. O que demonstra a degradação biomolecular que estes tecidos sofrem após a fixação com formol.



**Figura 1:** Espectro das medias de 50 espectros cada de tecido epitelial de superfície sem fixação (rosa) e tecido epitelial com fixação (azul), com a marcação dos picos espectrais.

### Perfil espectral do tecido conjuntivo

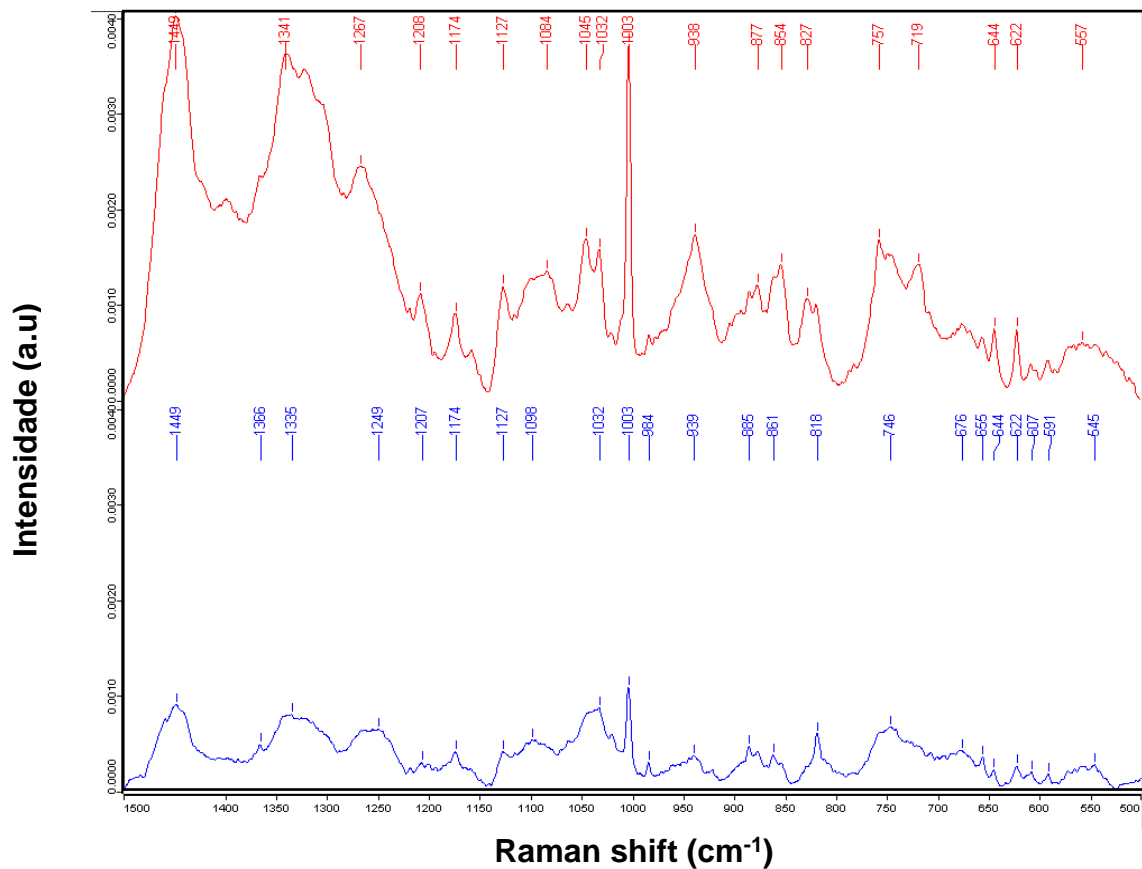
**Tabela 3:** Perfil espectral de grupos analisados de tecido conjuntivo.

Tecido conjuntivo sem fixação	Tecido conjuntivo com formol	Molécula	Modo vibracional
	<b>545</b>	Pontes de dissulfeto <sup>57</sup>	S-S
<b>557</b>		****	****
	<b>591</b>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> <sup>51</sup>	Vibração simétrica de alongamento
	<b>607</b>	Glicerol <sup>67</sup>	****
<b>622</b>	<b>622</b>	Fenilalanina <sup>7,41,45,53-54</sup>	Torção C-C
<b>644</b>	<b>644</b>	Tirosina <sup>7,41,45,53-54</sup>	Torção C-C
	<b>655</b>	Cistina <sup>51,53</sup>	C-S modo de alongamento
	<b>676</b>	Ácidos nucleicos <sup>55</sup>	****
<b>719</b>		Fosfolipídeos <sup>7,41,48,67</sup>	Vibração simétrica estiramento de grupo colina N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
	<b>746</b>	DNA/RNA <sup>18,55</sup>	T anel aromático
<b>757</b>		Triptofano <sup>41,54</sup>	****
	<b>818</b>	Colágeno <sup>18,20,56</sup>	Suporte principal C-C
<b>827</b>		DNA e proteína <sup>20,51</sup>	Cadeia principal
<b>854</b>		Proteína e DNA <sup>20,38,51,53-55</sup>	Respiração do anel C-C
	<b>861</b>	Grupo Fosfato <sup>67</sup>	****
<b>877</b>		Lipídio e carboidrato <sup>7,48</sup>	Estiramento simétrico C-C-N <sup>+</sup> , anel C-O-C
	<b>885</b>	Dissacarídeo (celobiose) <sup>52</sup>	(C-O-C) Modo esquelético
<b>938</b>	<b>939</b>	Prolina <sup>38,41,51</sup>	Cadeia principal estiramento C-C
	<b>984</b>	Fenilalanina <sup>57</sup>	****
<b>1003</b>	<b>1003</b>	Fenilalanina <sup>18,20,38,55,58</sup>	Respiração do anel
<b>1032</b>	<b>1032</b>	Fenilalanina <sup>18,20,38,51</sup>	Dobra C-H
<b>1045</b>		v <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> <sup>51</sup>	Vibrações simétricas de estiramento
<b>1084</b>		Ácidos nucleicos <sup>63</sup>	Grupo de fosfodiéster
<b>1098</b>		**** <sup>51</sup>	v(CN)
<b>1127</b>	<b>1127</b>	Lipídeo <sup>20,41,48</sup>	Alongamento trans C-C
<b>1174</b>	<b>1174</b>	Proteína <sup>18,55</sup>	Dobra C-H
<b>1208</b>	<b>1207</b>	Proteína <sup>38,59</sup>	Alongamento C-C6H5
	<b>1249</b>	Amida III <sup>18,20,41,60</sup>	****
<b>1267</b>		Lipídio <sup>44</sup>	C-H
	<b>1335</b>	Colágeno e ácido nucleico <sup>38,52</sup>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>1341</b>		Proteína e ácidos nucleicos <sup>7,18,41,61-63</sup>	****

	1366	Fosfolípidos <sup>51</sup>	vs (CH <sub>3</sub> )
1449	1449	Proteína e DNA <sup>20,37,51,55,64-66</sup>	Deformação CH

\*\*\*\* Componente desconhecido.

Nas amostras analisadas de tecido conjuntivo (Tabela 3), houve uma maior heterogeneidade entre os picos analisados sem e com fixação por NBF.



**Figura 2:** Espectro das medias de 50 espectros cada de tecido conjuntivo sem fixação (vermelho) e tecido conjuntivo com fixação (azul), com a marcação dos picos espectrais

Há uma redução na intensidade das faixas espectrais que é observado na figura 2, em que o tecido conjuntivo sem fixação se apresenta mais intenso em comparação com o tecido fixado por formol.

## Discussão

A análise Cluster K-means (Gráfico 1) e Análise de discriminantes lineares (LDA) (Tabela 1), separaram as amostras com 100% de concordância com o grupo de origem das amostras. Portanto, a ER foi capaz de discriminar os diferentes tecidos e diferentes métodos de armazenamento.

Em relação a tabela 2, referente aos picos espectrais de tecido epitelial de superfície, a maioria dos picos que ocorreram em tecido epitelial sem fixação também ocorreram em tecido epitelial com fixação, com exceção dos picos  $510\text{ cm}^{-1}$ ,  $591\text{ cm}^{-1}$  e  $1251\text{ cm}^{-1}$ . Os picos  $510\text{ cm}^{-1}$  e  $1251\text{ cm}^{-1}$  só ocorreram na amostra fixada por formol, sugerindo que as amostras de tecido epitelial com ou sem fixação por formol, tem reduzida alterações após a fixação por formalina 10% tamponada. Essa menor alteração dos picos pode ocorrer devido a menor variabilidade de células que ocorre neste tecido ou a uma menor interação e alteração do tecido pela fixação por formol.

O pico espectral  $510\text{ cm}^{-1}$  indica a forma vibracional de pontes de dissulfeto quando a amostra foi fixada, isto pode ser uma indicação de transformação da sulfidril (SH) em dissulfeto (SS) observados pela presença de formalina.<sup>47-48,68</sup> O pico  $1251\text{ cm}^{-1}$  que aparece na amostra fixada por formol corresponde a faixa espectral da amida III. Segundo Faolain (2005), os aldeídos presentes na NBF, formam as ligações cruzadas entre as proteínas que formam um gel, mantendo assim a estrutura do tecido semelhante a estrutura in vivo. As proteínas solúveis se fixam com proteínas estruturais. A maioria das ligações cruzadas são formados entre o átomo de nitrogênio de lisina e o átomo de nitrogênio de uma ligação peptídica. Esta ligação cruzada de pontes de metileno altera a amida, transformando uma amida II em amida III que pode ser observada nos espectros fixados. Além disso, o NBF reage com o DNA e RNA formando uma N-metilol (N-CH<sub>2</sub> OH), seguida de um ataque electrófilico que gera a formação de ponte de metileno entre amino grupos<sup>50,70-71</sup> gerando o encolhimento do volume da amostra, e que resulta na perda da integridade da conformação espacial quaternária, terciária e possivelmente secundária das proteínas<sup>72</sup>, o que gera degradação das proteínas e mudança no seu estado vibracional que será detectado na análise espectral da ER.

Houve uma maior heterogeneidade entre os picos espectrais do tecido conjuntivo, entre os picos das amostras com e sem fixação por formol que é observada

na tabela 3. Isto pode ser devido a maior variabilidade de tipos celulares deste tecido ou a uma maior alteração do tecido pelo uso de formol em relação ao tecido epitelial de superfície. Os picos  $622\text{ cm}^{-1}$ ,  $644\text{ cm}^{-1}$ ,  $938\text{ cm}^{-1}$ ,  $1003\text{ cm}^{-1}$ ,  $1032\text{ cm}^{-1}$ ,  $1127\text{ cm}^{-1}$ ,  $1174\text{ cm}^{-1}$ ,  $1208\text{ cm}^{-1}$  e  $1449\text{ cm}^{-1}$  se mantiveram constantes apesar do tipo de tecido e armazenamento, o que demonstra que não houve alterações bioquímicas relevantes nessas faixas espectrais. O pico espectral  $545\text{ cm}^{-1}$  e  $655\text{ cm}^{-1}$  foi observado na amostra de tecido conjuntivo fixada por formol, essa faixa espectral indica a forma vibracional de pontes de dissulfeto que é observada em amostras fixadas por formalina.<sup>47-48,68</sup> O pico  $1249\text{ cm}^{-1}$  relacionado a amida III, só ocorreram nas amostras fixadas por formol no presente estudo. Os picos  $757\text{ cm}^{-1}$ ,  $827\text{ cm}^{-1}$ ,  $854\text{ cm}^{-1}$ ,  $1084\text{ cm}^{-1}$  e  $1341\text{ cm}^{-1}$  que correspondem a faixas espectrais referentes a proteínas, DNA e aminoácidos apenas ocorreram na amostra sem fixação por formol, o que sugere que o formol causou a degradação destas moléculas no processo de fixação<sup>16,48-50</sup>

Os picos  $676\text{ cm}^{-1}$ ,  $746\text{ cm}^{-1}$ ,  $818\text{ cm}^{-1}$  e  $984\text{ cm}^{-1}$ ,  $1335\text{ cm}^{-1}$  e  $1366\text{ cm}^{-1}$  que correspondem a proteínas e DNA ocorreram apenas em tecido conjuntivo fixado por formol. Isso pode ter ocorrido devido a maior variabilidade de tipos celulares que este tecido apresenta em relação ao tecido epitelial, além da limitação da visão topográfica que não permite que as leituras fossem realizadas exatamente nos mesmos pontos antes e após a fixação. Os picos espectrais  $719\text{ cm}^{-1}$ ,  $877\text{ cm}^{-1}$  e  $1267\text{ cm}^{-1}$  correspondente a classe de lipídeos e ácidos graxos e só ocorreram no tecido conjuntivo sem fixação. Segundo Gazi (2005), existem ajustes devido a fixação por formol na deformação do lipídeo CH, C-N e estiramento C-C, e estiramento do C = O, gerando diferença nos modos de vibração de lipídeos de membrana celular, possivelmente através de uma reação de metileno glicol em formalina com cadeias de hidrocarbonetos insaturados.

Nas figuras 1 e 2, há uma redução geral da intensidade dos picos espectrais após a fixação dos tecidos com NBF. Em tecido epitelial a redução das intensidades dos espectros foi menor se comparada a que ocorreu no tecido conjuntivo, o que sugere que este tecido sofra mais alterações bioquímicas com a fixação por formol que alteram sua estrutura molecular de forma mais significativa. A causa dessa redução geral dos espectros pode ser devido a capacidade da formalina de gerar a degradação de proteínas, DNA, RNA e ácidos nucleicos<sup>16,48-50</sup>, que sugere que este



tipo de condicionamento tenha influência nas análises moleculares do tecido, gerando erros de interpretação, suprimindo informações ou criando artefatos de fixação.

## Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que a ER pode realizar análises de tecido epitelial para uso em diagnóstico independentemente do método de fixação, pois esse tecido apresenta poucas alterações bioquímicas após a fixação por formol. Em tecido conjuntivo é necessário avaliar o tipo de fixação do tecido que será analisado para ER, não sendo muito indicado para uso em diagnóstico, pois a fixação gera relevantes alterações bioquímicas no tecido. A ER possui um grande potencial na área de diagnóstico, e é necessário que haja mais desenvolvimento de tecnologia, na área de programação e engenharia, que possibilite utilizar esta tecnologia como auxiliar de diagnóstico clínicos em tempo real, sem provocar danos à saúde.

## REFERENCIAS

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. Journal Cancer*. 2015; 136(5): E359-E386.
- [2] Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro, 2015.
- [3] Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Valiathan M, Kumar NN, Krishna CM. Optical pathology of oral tissue: a Raman spectroscopy diagnostic method. *Curr. Sci*. 2001; 80(5): 665-669.
- [4] Oliveira AP, Bitar RA, Silveira L, Zângaro RA, Martin AA. Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. *Photomed. Laser. Surg*. 2006; 24(3): 348-353.
- [5] Keller MD, Kanter EM, Mahadevan-jansen A. Raman spectroscopy for cancer diagnosis. *Spectroscopy*. 2006; 21(11): 33.
- [6] Cals FL, Bakker Schut TC, Koljenović S, Puppels GJ, & Jong RJ. B. Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. *J. Raman Spectrosc*. 2013; 44(7): 963-972.
- [7] Notingher I, Green C, Dyer C, Perkins E, Hopkins N, Lindsay C, Hench LL. Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy. *J R Soc Interface*. 2004 Nov 22;1(1):79-90.
- [8] Lyng FM<sup>1</sup>, Faoláin EO, Conroy J, Meade AD, Knief P, Duffy B, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Byrne HJ. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. *Exp Mol Pathol*. 2007 Apr;82(2):121-9. Epub 2007 Jan 12.
- [9] SINGH, R. CV Raman and the Discovery of the Raman Effect. *Phys. Perspect*. 2002; 4(4): 399-420.
- [10] Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature*. 1928; 121: 501-502.

- [11] Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts. 3<sup>o</sup> Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004.
- [12] Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys Med Biol*. 2000 Feb;45(2):R1-59.
- [13] SIR CHANDRASEKHARA Venhata Raman Biographical. Amsterdam: Elsevier, 1965. The Nobel Prize in Physics 1930. Disponível em: <[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1930/raman-bio.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman-bio.html)>. Acesso em 16 nov. 2016.
- [14] Huang Z , McWilliams A , Lam S , English J , McLean DI , Lui H , Zeng H. Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues. *Int. Int J Oncol*. 2003 Sep;23(3):649-55.
- [15] Shim MG, Wilson BC. The Effects of ex vivo Handling Procedures on the Near-Infrared Raman Spectra of Normal Mammalian Tissues. *Photochem. Photochem Photobiol*. 1996 May;63(5):662-71.
- [16] Kothmaier H, Rohrer D, Stacher E, Quehenberger F, Becker KF, Popper HH. Comparison of formalin-free tissue fixatives: a proteomic study testing their application for routine pathology and research. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jun;135(6):744-52.
- [17] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Re*. 2007;42(5): 493-541.
- [18] Su L, Sun YF, Chen Y, Chen P, Shen, AG, Wang XH, et al. Raman spectral properties of squamous cell carcinoma of oral tissues and cells. *Laser Physics*. 2012; 22(1): 311-316.
- [19] Cals FL, Bakker Schut TC, Hardillo JA, Baatenburg de Jong RJ, Koljenović S, Puppels GJ. Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins. *Lab Invest*. 2015 Oct;95(10):1186-96.
- [20] Krishna CM<sup>1</sup>, Sockalingum GD, Kurien J, Rao L, Venteo L, Pluot M, Manfait M, Kartha VB. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. *Appl Spectrosc*. 2004 Sep;58(9):1128-35.
- [21] Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 30; 102(35): 12371–12376.
- [22] Guze K, Pawluk HC, Short M, Zeng H, Lorch J, Norris C, Sonis S. Pilot study: Raman spectroscopy in differentiating premalignant and malignant oral lesions from normal mucosa and benign lesions in humans. *Head Neck*. 2015 Apr;37(4):511-7.
- [23] Christian K, Johanna M, Werner A, Kathrin B, Tesfay GM, Robert H, et al. Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma. *Biomed Opt Express*. 2014 Sep 1; 5(9): 3252–3265.
- [24] Nóbrega TG. Caracterização molecular pela espectroscopia Raman das alterações epiteliais da mucosa bucal. Tese (Doutorado em Odontologia). Porto Alegre Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.
- [25] Zhou Y, Liu CH, Sun Y, Pu Y, Boydston-White S, Liu Y, et al. Human brain cancer studied by resonance Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2012 Nov;17(11):116021.
- [26] Li X, Yang T, Lin J. Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2012 Mar;17(3):037003.

- [27] Jermyn M, Mok K, Mercier J, Desroches J, Pichette J, Saint-Arnaud K, et al. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Sci Transl Med*. 2015 Feb 11;7(274):274ra19.
- [28] Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, Nazemi J, Lyons J, et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):3317-22.
- [29] Matthews Q, Jirasek A, Lum JJ, Brolo AG. Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy. *Phys Med Biol*. 2011 Nov 7;56(21):6839-55.
- [30] Shim MG, Song LM, Marcon NE, Wilson BC. In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy. *Photochem Photobiol*. 2000 Jul;72(1):146-50.
- [31] Yan XL, Dong RX, Zhang L, Zhang XJ, Zhang ZW. Raman spectra of single cell from gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 7;11(21):3290-2.
- [32] Lau DP, Huang Z, Lui H, Man CS, 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.
- [33] Huang Z, Lui H, Chen XK, Alajlan A, McLean DI, Zeng H. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *J Biomed Opt*. 2004 Nov-Dec;9(6):1198-205.
- [34] Gniadecka M, Philipsen PA, Sigurdsson S, Wessel S, Nielsen OF, Christensen 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 Feb;122(2):443-9.
- [35] Lieber CA, Majumder SK, Billheimer D, Ellis DL, Mahadevan-Jansen A. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *J Biomed Opt*. 2008 Mar-Apr;13(2):024013.
- [36] Lui H, Zhao J, McLean D, Zeng H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Res*. 2012 May 15;72(10):2491-500.
- [37] Kaminaka S, Yamazaki H, Ito T, Kohda E, Hamaguchi HO. Near-infrared Raman spectroscopy of human lung tissues: possibility of molecular-level cancer diagnosis. *J Raman Spectrosc*. 2001; 32(2): 139-141.
- [38] Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *Int J Cancer*. 2003 Dec 20;107(6):1047-52.
- [39] Short MA, Lam S, McWilliams A, Zhao J, Lui H, Zeng H. Development and preliminary results of an endoscopic Raman probe for potential in vivo diagnosis of lung cancers. *Opt Lett*. 2008 Apr 1;33(7):711-3.
- [40] Oshima Y, Shinzawa H, Takenaka T, Furihata C, Sato H. Discrimination analysis of human lung cancer cells associated with histological type and malignancy using Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*. 2010 Jan-Feb;15(1):017009
- [41] Jess PR, Smith DD, Mazilu M, Dholakia K, Riches AC, Herrington CS. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *Int J Cancer*. 2007 Dec 15;121(12):2723-8.
- [42] Robichaux-Viehoever A, Kanter E, Shappell H, Billheimer D, Jones H 3rd, Mahadevan-Jansen A. Characterization of Raman spectra measured in vivo for the detection of cervical dysplasia. *Appl Spectrosc*. 2007 Sep;61(9):986-93.
- [43] Crow P, Barrass B, Kendall C, Hart-Prieto M, Wright M, Persad R, et al. The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*. 2005 Jun 20;92(12):2166-70.

- [44] Malini R, Venkatakrishna K, Kurien J, Pai KM, Rao L, Kartha VB, Krishna CM.. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study *Biopolymers*. 2006 Feb 15;81(3):179-93.
- [45] Guze K, Short M, Sonis S, Karimbux N, Chan J, Zeng H. Parameters defining the potential applicability of Raman spectroscopy as a diagnostic tool for oral disease. *J Biomed Opt*. 2009 Jan-Feb;14(1):014016.
- [46] Deshmukh A, Singh SP, Chaturvedi P, Krishna CM. Raman spectroscopy of normal oral buccal mucosa tissues: study on intact and incised biopsies. *J Biomed Opt*. 2011 Dec;16(12):127004.
- [47] Moelans CB, ter Hoeve N, van Ginkel JW, ten Kate FJ, van Diest PJ. Formaldehyde substitute fixatives. *Am J Clin Pathol*. 2011 Oct;136(4):548-56.
- [48] Galli R, Uckermann O, Koch E, Schackert G, Kirsch M, Steiner G. Effects of tissue fixation on coherent anti-Stokes Raman scattering images of brain. *J Biomed Opt*. 2014 Jul;19(7):071402.
- [49] Kniggendorf AK, Gaul TW, Meinhardt-Wollweber M. Effects of ethanol, formaldehyde, and gentle heat fixation in confocal resonance Raman microscopy of purple nonsulfur bacteria. *Microsc Res Tech*. 2011 Feb;74(2):177-83
- [50] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002 Dec; 161(6): 1961–1971.
- [51] Cheng WT, Liu MT, Liu HN, Lin SY. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. *Microsc Res Tech*. 2005 Oct;68(2):75-9.
- [52] Shetty G, Kendall C, Shepherd N, Stone N, Barr H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. *Br J Cancer*. 2006 May 22; 94(10): 1460–1464.
- [53] Stone N, Kendall C, Shepherd N, Crow P, Barr H. Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers. *Journal of Raman spectroscopy*. 2002; 33(7): 564-573.
- [54] Stone N, Kendall C, Smith J, Crow P, Barr H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discuss*. 2004;126:141-57; discussion 169-83.
- [55] Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T, Lane SM, Ihara K, Huser T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophys J*. 2006 Jan 15; 90(2): 648–656.
- [56] Binoy J, Abraham J P, Joe IH, Jayakumar VS, Pettit GR, Nielsen OF. NIR-FT Raman and FT-IR spectral studies and ab initio calculations of the anti-cancer drug combretastatin-A4. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2004; 35 (11): 939-946.
- [57] 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 Mar;387(5):1643-8. Epub 2006 Oct 10.
- [58] de Carvalho LF, Bitar RA, Arisawa EA, Brandão AA, Honório KM, Cabral LA, et al. Spectral region optimization for Raman-based optical biopsy of inflammatory lesions. *Photomed Laser Surg*. 2010 Aug;28 Suppl 1:S111-7.
- [59] Katainen E, Elomaa M, Laakkonen UM, Sippola E, Niemelä P, Suhonen J, et al. Quantification of the amphetamine content in seized street samples by Raman spectroscopy. *J Forensic Sci*. 2007 Jan;52(1):88-92.
- [60] Naumann D. Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology. In: *BiOS'98 International Biomedical Optics Symposium*. International Society for Optics and Photonics, 1998; 245-257.

- [61] Fung MFK, Senterman MK, Mikhael NZ, Lacelle S, Wong PT. Pressure-tuning fourier transform infrared spectroscopic study of carcinogenesis in human endometrium. *Biospectroscopy*. 1996; 2(3): 155-165.
- [62] Mahadevan-Jansen A, Richards-Kortum R. Raman spectroscopy for cancer detection: a review. In: *Engineering in Medicine and Biology Society*, 1997. Proceedings of the 19th Annual International Conference of the IEEE. 1997. 2722-8.
- [63] Dukor RK. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. *Biomedical Applications*. 2002; 5: 3335–3359.
- [64] Frank CJ, McCreery RL, Redd DC. Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues. *Anal Chem*. 1995 Mar 1;67(5):777-83.
- [65] Lakshmi RJ, Kartha VB, Murali Krishna C, R Solomon JG, Ullas G, Uma Devi P. Tissue Raman spectroscopy for the study of radiation damage: brain irradiation of mice. *Radiat Res*. 2002 Feb;157(2):175-82.
- [66] Draux F, Gobinet C, Sulé-Suso J, Trussardi A, Manfait M, Jeannesson P, et al. Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the impact of sample fixation methods. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Aug;397(7):2727-37
- [67] Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2005 May;61(7):1529-35.
- [68] Schyns MW, Huizinga A, Vrensen GF, de Mul FF, Greve J. Paraformaldehyde fixation and some characteristics of lens proteins as measured by Raman microspectroscopy. *Exp Eye Res*. 1990 Mar;50(3):331-3.
- [69] Faoláin EO, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Lambkin HA, Byrne HJ, et al. Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents. *J Histochem Cytochem*. 2005 Jan;53(1):121-9.
- [70] McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure. 3. Equilibrium denaturation of DNA and synthetic polynucleotides. *Biochemistry*. 1977 Jul 26;16(15):3267-76.
- [71] Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*. 1999 Nov 15; 27(22): 4436–4443.
- [72] Meade AD, Clarke C, Draux F, Sockalingum GD, Manfait M, Lyng FM, et al. Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Mar;396(5):1781-91
- [73] Gazi E, Dwyer J, Lockyer NP, Miyan J, Gardner P, Hart C, et al. Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*. 2005; 77(1): 18-30.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectroscopia Raman (ER) é uma tecnologia óptica que vem sendo estudada para uso em diagnóstico, devido a sua característica de técnica não invasiva e (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007) sem necessidade de um preparo prévio das amostras (CAL S et al., 2015), sua sensibilidade, precisão (HAKA et al., 2005; NÓBREGA et al., 2015; ZHOU et al., 2015;) e tolerância a amostras aquosas e o curto período de aquisição das análises espectrais. (HANLON et al., 2000; KNIPFER et al., 2014; LI; YANG; LIN, 2012). O processo patológico gera alterações bioquímicas nos tecidos, podendo ter características inflamatórias ou neoplásicas. A (OLIVEIRA et al., 2006; VENKATAKRISHNA et al., 2001).

Este trabalho foi realizado com o intuito de caracterizar o perfil espectral das amostras de tecido epitelial e conjuntivo, após o descongelamento do tecido que estava armazenado a 80°C e após a fixação do mesmo por formalina tamponada neutra (NBF) 10% por 72 horas, buscando detectar e avaliar as alterações espectrais que estes sofreram devido ao método de condicionamento do tecido. Foram utilizadas 5 línguas de ratos Wistar provenientes de material de descarte com aprovação no CEUA no. 26102. Estas amostras foram descongeladas e submetidas a ER. Em seguida, foram fixadas em formalina e após 72h um novo espectro Raman foi obtido. De cada amostra foi selecionada 2 áreas distintas, uma de epitélio de superfície, outra de tecido conjuntivo. Os espectros de Raman foram obtidos num espectrômetro Raman (Senterra, Bruker Optics, Ettlingen, Alemanha). A região espectral analisada foi de 500 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que o espectro resultante de média da leitura de 10 pontos, uma em epitélio e uma em conjuntivo. Os espectros foram avaliados pela análise dos componentes principais, diminuindo a quantidade de variáveis para 10 fatores que em seguida foram submetidos à análise dos discriminantes lineares e análise cluster k-means que separou as amostras em 4 grupos. Outra avaliação foi realizada, em que a média de 50 espectros de cada um dos quatro grupos (Tecido epitelial com e sem fixação e tecido conjuntivo com e sem fixação) foi realizado uma análise dos picos espectrais. Os resultados estatísticos da Análise de discriminantes lineares e Análise Cluster k-means foi de separação das 20 amostras em 4 grupos que coincidiram com os grupos de origem das amostras em 100% dos casos. O que sugere que a ER fornece informações sobre a composição biomolecular, que nos

permite diferenciar as análises tanto quanto ao tipo de condicionamento quanto ao tipo de tecido que foi analisado. Este achado está em concordância com a literatura (HANLON et al., 2000; LI; YANG; LIN, 2012; MATTHEWS et al., 2011), demonstrando assim a alta sensibilidade e especificidade das análises espectrais fornecidas pela ER.

A análise dos picos espectrais das médias de tecido epitelial de superfície e tecido conjuntivo, antes e após a fixação por NBF 10%. Esta análise obteve como resultado que há uma redução da intensidade dos picos espectrais das amostras após a fixação, devido as alterações bioquímicas que a fixação por NBF gera no tecido. Em tecido epitelial a redução das intensidades dos espectros foi menor se comparada a que ocorreu no tecido conjuntivo, o que sugere que este tecido sofra mais alterações bioquímicas com a fixação por formol que alteram sua estrutura molecular de forma mais significativa. A causa dessa redução geral dos espectros pode ser devido a capacidade da formalina de gerar a degradação de proteína, DNA, RNA e ácidos nucleicos (GALLI et al., 2014; KNIGGENDORF; GAUL; MEINHARDT-WOLLWEBER, 2011; KOTHMAIER et al., 2011; SRINIVASAN; SEDMAK; JEWELL, 2002), que sugere que este tipo de condicionamento tenha influência nas análises moleculares do tecido, gerando erros de interpretação, suprimindo informações ou criando artefatos de fixação.

Assim, os resultados deste estudo sugerem que a ER pode realizar análises de tecido epitelial para uso em diagnóstico independentemente do método de fixação, pois esse tecido apresenta poucas alterações bioquímicas após a fixação por formol. Em tecido conjuntivo é necessário avaliar o tipo de fixação do tecido que será analisado para ER, não sendo muito indicado para uso em diagnóstico, pois a fixação gera relevantes alterações bioquímicas no tecido. Este resultado pode servir para delinear estudos futuros ex-vivo com amostras de tecido que serão analisadas pela ER com relação ao tipo de condicionamento das amostras analisadas. Os resultados deste estudo reforçam o potencial de análise molecular da ER para uso em diagnóstico em tecido epitelial, mesmo que o material seja condicionado em NBF 10%, que é o condicionamento de tecido mais utilizado no mundo em materiais de biópsia. Novos estudos devem ser realizados para determinar os níveis de alterações detectadas pela ER em outros tecidos devido ao método de condicionamento. Além disso, a programação computacional deve evoluir no desenvolvimento de programas

que permitam classificar as alterações moleculares de forma rápida, para que os dados dos estudos na área possam ser usados como auxiliar diagnóstico de rotina e em tempo real.



## REFERENCIAS

- CALS, F. L. J. et al. Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. **J. Raman Spectrosc.**, Chichester v. 44, no. 7, p. 963-972, 2013.
- CALS, F. L. J. et al. Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 95, no. 10, p. 1186-1196, 2015.
- CROW, P. et al. The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines. **Br. J. Cancer**, London, v. 92, no. 12, p. 2166-2170, 2005.
- DESHMUKH, A. et al. Raman spectroscopy of normal oral buccal mucosa tissues: study on intact and incised biopsies. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 16, no. 12, p. 127004, 2011.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, New York, v. 136, no. 5, p. E359-E386, 2015.
- GALLI, R. et al. Effects of tissue fixation on coherent anti-Stokes Raman scattering images of brain. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 19, no. 7, p. 071402, 2014.
- GNIADZECKA, M. et al. Melanoma diagnosis by Raman spectroscopy and neural networks: structure alterations in proteins and lipids in intact cancer tissue. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 122, no. 2, p. 443-449, 2004.
- GUZE, K. et al. Parameters defining the potential applicability of Raman spectroscopy as a diagnostic tool for oral disease. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 14, no. 1, p. 014016, 2009.
- GUZE, K. et al. Pilot study: Raman spectroscopy in differentiating premalignant and malignant oral lesions from normal mucosa and benign lesions in humans. **Head Neck**, New York, v. 37, no. 4, p. 511-517, 2015.
- HAKA, A. S. et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 102, no. 35, p. 12371-12376, 2005.
- HAKA, A. S. et al. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 66, no. 6, p. 3317-3322, 2006.
- HANLON, E. B. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Phys. Med. Biol.**, Bristol, v. 45, no. 2, p. R1, 2000.
- HUANG, Z. et al. Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues. **Int. J. Oncol.**, Athens, v. 23, no. 3, p. 649-656, 2003a.
- HUANG, Z. et al. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v. 107, no. 6, p. 1047-1052, 2003b.

HUANG, Z. et al. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 9, no. 6, p. 1198-1205, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.

JERMYN, M. et al. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. **Sci. Transl. Med.**, Washington, v. 7, no. 274, p. 274ra19, 2015.

JESS, P. R. T. et al. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. **Int. J. Cancer**, New York, v. 121, no. 12, p. 2723-2728, 2007.

KAMINAKA, S. et al. Near-infrared Raman spectroscopy of human lung tissues: possibility of molecular-level cancer diagnosis. **J. Raman Spectrosc.**, Chichester, v. 32, no. 2, p. 139-141, 2001

KELLER, M. D.; KANTER, E. M.; MAHADEVAN-JANSEN, A. Raman spectroscopy for cancer diagnosis. **Spectroscopy**, Springfield, v. 21, no. 11, p. 33, 2006.

KNIGGENDORF, A.; GAUL, T. W.; MEINHARDT-WOLLWEBER, M. Effects of ethanol, formaldehyde, and gentle heat fixation in confocal resonance Raman microscopy of purple nonsulfur bacteria. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 74, no. 2, p. 177-183, 2011.

KNIPFER, C. et al. Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma. **Biomed. Opt. Express**, Washington, v. 5, no. 9, p. 3252-3265, 2014.

KOTHMAIER, H. et al. Comparison of formalin-free tissue fixatives: a proteomic study testing their application for routine pathology and research. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 135, no. 6, p. 744-752, 2011.

KRISHNA, C. M. et al. Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma. **Appl. Spectrosc.**, Plainfield, v. 58, no. 9, p. 1128-1135, 2004.

LAU, D. P. et al. Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx—preliminary findings. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 32, no. 3, p. 210-214, 2003.

LIEBER, C. A. et al. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 13, no. 2, p. 024013, 2008.

LUI, H. et al. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. **Cancer Res.**, Chicago, v. 72, no. 10, p. 2491-2500, 2012.

LI, X.; YANG, T.; LIN, J. Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 17, no. 3, p. 0370031, 2012.

LYNG, F. M. et al. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. **Exp. Mol. Pathol.**, New York, v. 82, no. 2, p. 121-129, 2007.

MALINI, R. et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. **Biopolymers**, New York, v. 81, no. 3, p. 179-193, 2006.

MATTHEWS, Q. et al. Biochemical signatures of in vitro radiation response in human lung, breast and prostate tumour cells observed with Raman spectroscopy. **Phys. Med. Biol.**, Bristol, v. 56, no. 21, p. 6839-6855, 2011.

MOELANS, C. B. et al., Formaldehyde substitute fixatives. **J. Clin. Pathol.**, London v. 136, no. 4, p. 548-556, 2011.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Appl. Spectrosc. Rev.**, New York, v. 42, no. 5, p. 493-541, 2007.

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

NOTINGHER, I. et al. Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy. **J. R. Soc. Interface**, London v. 1, no. 1, p. 79-90, 2004.

OLIVEIRA, A. P. et al. Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 24, no. 3, p. 348-353, 2006.

OSHIMA, Y. et al. Discrimination analysis of human lung cancer cells associated with histological type and malignancy using Raman spectroscopy. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 15, no. 1, p. 017009, 2010.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S.. A new type of secondary radiation. **Nature**, London, v. 121, p. 501-502, 1928.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004.

ROBICHAUX-VIEHOEVER, Amy et al. Characterization of Raman spectra measured in vivo for the detection of cervical dysplasia. **Appl. Spectrosc.**, Plainfield, v. 61, no. 9, p. 986-993, 2007.

SINGH, R. CV Raman and the Discovery of the Raman Effect. **Phys. Perspect.**, Basel, v. 4, no. 4, p. 399-420, 2002.

SIR CHANDRASEKHARA Venkata Raman: biographical. Amsterdam: Elsevier, 1965. The Nobel Prize in Physics 1930. Disponível em: <

[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1930/raman-bio.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman-bio.html) >. Acesso em: 16 nov. 2016.

SHIM, M. G.; WILSON, B. C. The Effects of ex vivo Handling Procedures on the Near-Infrared Raman Spectra of Normal Mammalian Tissues. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v. 63, no. 5, p. 662-671, 1996.

SHIM, M. G. et al. In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy. **Photochem. Photobiol.**, Augusta, v. 72, no. 1, p. 146-150, 2000.

SHORT, M. A. et al. Development and preliminary results of an endoscopic Raman probe for potential in vivo diagnosis of lung cancers. **Opt. Lett.**, New York, v. 33, no. 7, p. 711-713, 2008.

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D.; JEWELL, S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 161, no. 6, p. 1961-1971, 2002.

SU, L. et al. Raman spectral properties of squamous cell carcinoma of oral tissues and cells. **Laser Phys.**, [S. l.], v. 22, no. 1, p. 311-316, 2012.

VENKATAKRISHNA, K. et al. Optical pathology of oral tissue: a Raman spectroscopy diagnostic method. **Curr. Sci.**, Bangalore, v. 80, no. 5, p. 665-669, 2001

YAN, X. et al. Raman spectra of single cell from gastrointestinal cancer patients. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 11, no. 21, p. 3290-3292, 2005.

ZHOU, Yan et al. Human brain cancer studied by resonance Raman spectroscopy. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v. 17, no. 11, p. 116021, 2012.