

## DETECÇÃO DE LESÕES NEOPLÁSICAS INDUZIDAS EM MUCOSA ORAL DE HAMSTER UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

LANDULFO SILVEIRA JUNIOR\*, LAURA GUIMARÃES PAGLIUSO PALECKIS, RENATA AMADEI NICOLAU, GRAZIELLE VILELA NOGUEIRA, ROSANE ZÉLIA BUSANELLO, DANIELA APARECIDA MARDEGAN, SONIA MARIA FONSECA, RENATO AMARO ZANGARO, MARCOS TADEU T. PACHECO

Trabalho realizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP.

**RESUMO – OBJETIVO.** Este trabalho teve por objetivo a utilização da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida por laser para a caracterização de tecido normal e neoplásico em mucosa jugal de hamster, visando diagnosticar tecidos neoplásicos *in vivo*.

**MÉTODOS.** O carcinógeno DMBA foi aplicado na bochecha direita de 31 hamsters com  $150 \pm 10$ g, três vezes por semana durante 12 semanas. Um animal foi mantido como controle (sem aplicação da droga). Após este período, os animais foram submetidos à espectroscopia de fluorescência induzida por laser de argônio (488nm), acoplado a um cabo de fibras ópticas. A autofluorescência do tecido foi guiada pelo cabo de fibras e analisada por um espectrógrafo e uma câmera CCD 1024X256 pixels, cobrindo a faixa espectral de 550nm a 700nm. Os espectros foram coletados na área da lesão induzida e na bochecha contralateral (normal) de todos os animais, além do animal de controle. Subseqüente à espectroscopia, foi realizada a biópsia da lesão para a análise

histopatológica. Dois algoritmos de diagnóstico dos espectros de tecido neoplásico, baseados na razão entre regiões espectrais e na técnica de análise das componentes principais (PCA) foram implementados.

**RESULTADOS.** Foi demonstrada a existência de um pico intenso na região de 630nm nos tecidos neoplásicos (atribuído à protoporfirina IX), quando comparados com o tecido normal. O algoritmo baseado na razão entre regiões espectrais obteve 100% de sensibilidade e especificidade. O algoritmo baseado na PCA obteve 94% e 100% de sensibilidade e especificidade, respectivamente.

**CONCLUSÕES.** Este trabalho indica que a autofluorescência de tecidos da mucosa oral poderá ser utilizada como uma técnica não-invasiva de diagnóstico, com alta sensibilidade e especificidade.

**UNITERMOS:** Espectrofluorometria. Análise discriminante. Mucosa bucal. Neoplasias. Diagnóstico.

### INTRODUÇÃO

O câncer constitui-se como a terceira maior causa de mortes no Brasil, atrás apenas das doenças do aparelho circulatório e das causas externas, representando 14,1% das mortes em toda a população<sup>1</sup>. Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2002 foram registrados 11.260 novos casos de câncer bucal e 3.415 óbitos em todo o Brasil<sup>2</sup>. As neoplasias na região bucal são de muita relevância por envolver aspectos estéticos e funcionais, e cuja incidência aumenta principalmente entre tabagistas e usuários de álcool, drogas socialmente aceitas<sup>3</sup>.

A espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL) é uma técnica que tem se mostrado promissora no diagnóstico precoce de uma grande variedade de neoplasias, sendo capaz de distinguir com precisão tecido

neoplásico de tecido normal<sup>4</sup>. Isto é possível devido às diferenças espectrais encontradas no decaimento fluorescente dos diferentes tecidos<sup>5</sup>. Com esta técnica é possível acessar os tecidos através de cabos de fibras ópticas, mapear a área da lesão, demarcando as margens do tumor para uma melhor preservação da área normal circunjacentes e identificar e quantificar possíveis componentes bioquímicos presentes, inclusive a perfusão sanguínea<sup>6</sup>.

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados em diversos tipos de tumores, visando desenvolver algoritmos de diagnóstico utilizando os padrões de autofluorescência dos tecidos<sup>7-10</sup>. Estes algoritmos de diagnóstico baseiam-se usualmente na razão entre regiões espectrais e na presença de determinadas bandas proeminentes em certos tecidos.

Para a interpretação e análise dos dados espectrais os métodos multivariados são os mais adequados, pois não dependem do conhecimento da constituição dos tecidos e permitem um estudo onde variáveis não correla-

cionadas possam estar ocorrendo. A análise das componentes principais - PCA (Principal components analysis) consiste em uma manipulação da matriz de dados visando representar as variações presentes no conjunto de dados em um número menor de variáveis ("fatores")<sup>11</sup> baseados na variância espectral. Os escores de cada "fator" ou componente principal relacionam o "peso" que cada componente apresenta na intensidade original dos espectros e são usados como parâmetro de diagnóstico.

Jagdish et al.<sup>12</sup> aplicaram a técnica de espectroscopia de fluorescência com excitação em 410nm visando diagnosticar lesões pré-malignas e malignas induzidas quimicamente na mucosa oral de hamster. Leunig et al.<sup>13</sup> estudaram a indução de protoporfirina IX (PpIX) em mucosa oral humana através da aplicação 5-ácido aminolevulinico (5-ALA) visando o estudo da lesão tumoral em fase inicial. Trabalho semelhante foi realizado por Vijay et al.<sup>14</sup> objetivando estudar a síntese da PpIX sob diversas doses de 5-ALA (5, 25, 50, 75 e

#### \*Correspondência:

Av. Shishima Hifumi, 2911  
CEP: 12244-000 – São José dos Campos – SP  
landulfo@univap.br

100mg/kg) em cavidade oral canina. Douglas et al.<sup>15</sup> realizaram um estudo para determinar qual a combinação ótima de comprimentos de onda de excitação que discrimine o tecido normal, pré-canceroso e canceroso da cavidade oral humana baseado na análise dos espectros de fluorescência no visível (400 a 700nm).

Este estudo tem como objetivo aplicar a EFIL no diagnóstico de lesões malignas induzidas quimicamente em mucosa oral de hamster, identificando as características espectrais principais de emissão de cada tipo de tecido. Foram implementados algoritmos de diagnóstico, baseados na razão entre dois picos presentes nos espectros e na técnica PCA, comparando o resultado entre os dois algoritmos. A técnica EFIL, associada aos algoritmos implementados, possibilita uma poderosa ferramenta de diagnóstico das lesões neoplásicas na cavidade oral.

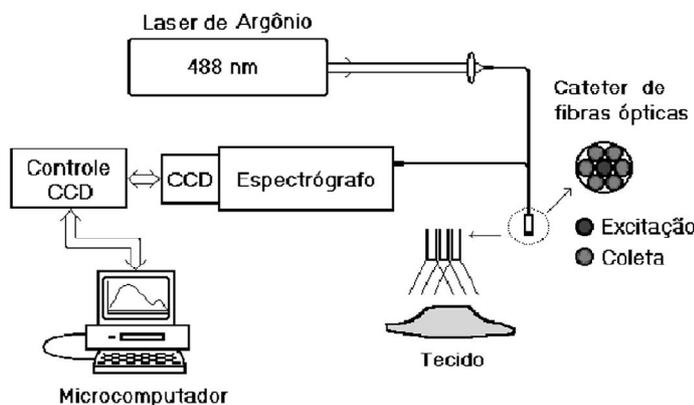
## MÉTODOS

Foram utilizados 32 hamsters machos da espécie *Mesocricetus auratus* (sírrio), com idade de 10 semanas ao início do experimento, obtidos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. Após um período de ambientação de 15 dias no biotério do IP&D, UNIVAP, os animais foram agrupados em seis gaiolas. Um animal foi isolado e mantido como controle. Os animais foram alimentados com ração Labina (Purina®) e água à vontade.

As lesões foram induzidas pelo carcinógeno DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene - Lab Sigma-Aldrich), diluído à concentração de 0,5% em acetona, aplicado por meio de um pincel de cerdas de área de 0,7X0,7cm na parede mesial e fundo da bolsa da bochecha direita dos animais. A bochecha esquerda foi preservada para não prejudicar a alimentação dos animais e também serviu como controle. Antes de cada aplicação, cada animal foi anestesiado com 0,05mg de Zoletil 50® (Cloridrato de tiletamina e Cloridrato de zolazepam - Laboratório Virbac) via intramuscular (dose de curta sedação, suficiente para a aplicação do carcinógeno).

Foi construído um aparato para a contenção do animal que facilitou o procedimento de aplicação do carcinógeno e padronização da área induzida. Uma vez imobilizado, a mucosa a ser aplicada a droga foi exposta, limpa e seca com hastes flexíveis de algodão. O pincel foi embebido na solução de DMBA e o excesso foi

**Figura 1 - Diagrama esquemático do espectrofluorímetro utilizando laser de argônio (488nm) para coleta dos espectros de autofluorescência da mucosa jugal de hamster *in vivo***



eliminado por pressão na parede do frasco. Em seguida, a solução foi aplicada à mucosa da parede medial e fundo da bolsa da bochecha, em suaves movimentos do pincel. A acetona foi volatilizada por jatos de ar, deixando o carcinógeno aderido à mucosa. Após o procedimento, o animal retornou à gaiola. Todo o procedimento foi realizado em capela de exaustão, diminuindo o risco de contaminação do operador pela droga. A frequência de aplicação foi de três vezes por semana, por períodos que variaram de 12 a 15 semanas.

Após o desenvolvimento dos tumores, que ocorreu após aproximadamente 13 semanas do início das aplicações, foram obtidos os espectros de autofluorescência da parte superior do tumor em três pontos, e da bochecha contralateral supostamente normal em um ponto. Logo em seguida, foram realizadas biópsias em todos os animais para identificação histopatológica das lesões. Para tal, os animais foram anestesiados como anteriormente descrito e as lesões removidas por bisturi, sendo imediatamente fixadas em formol 10%. A análise histopatológica foi realizada por um patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Complexo Hospitalar Heliópolis. As peças foram incluídas em bloco de parafina e foram realizados cortes de 3 a 5mm de espessura, sendo corados por hematoxilina e eosina.

O diagrama em blocos do espectrofluorímetro utilizado no experimento é mostrado na Figura 1. O sistema apresenta como fonte de excitação um laser de argônio emitindo em 488nm. O sistema de detecção é composto

por um espectrógrafo e uma câmera CCD de 1024X256 pixels refrigerada por nitrogênio líquido. Um microcomputador controla o tempo de exposição do detetor e o armazenamento dos espectros. O tempo de exposição utilizado foi de 5s e a potência do laser foi de 20mW para todas as amostras.

Os espectros foram calibrados em comprimento de onda e resposta espectral, utilizando lâmpadas com espectros conhecidos (lâmpada de argônio e mercúrio para calibração em comprimento de onda e lâmpada de filamento de tungstênio para calibração em resposta espectral), conforme descritos em Zângaro et al<sup>7</sup>.

Após a calibração, a intensidade dos picos e vales mais relevantes dos espectros foi determinada e a razão entre estes foi calculada, visando obter um algoritmo de classificação dos espectros de acordo com o tipo de tecido analisado.

A técnica de análise espectral baseada na PCA foi também aplicada nos mesmos espectros, visando determinar um algoritmo de diagnóstico que utilize toda a informação espectral, ao invés apenas da razão entre alguns pontos. A comparação entre estes dois algoritmos também foi efetuada, calculando-se a sensibilidade e especificidade de cada algoritmo.

Os espectros dos 32 animais analisados foram separados em dois grupos, o primeiro denominado grupo de treinamento com 16 animais e o segundo denominado grupo de teste prospectivo do algoritmo, também com 16 ani-

mais. Esta separação é necessária para que se possa desenvolver a rotina de classificação com um grupo de espectros e testá-la de maneira independente com outro grupo de espectros.

**RESULTADOS**

Os espectros de autofluorescência da bochecha de hamster obtidos in vivo com comprimento de onda de excitação de 488nm são apresentados na Figura 2. Observou-se que o espectro da bochecha contralateral ao tumor do animal induzido (Figura 2.a) é semelhante ao espectro da bochecha do animal controle (Figura 2.b).

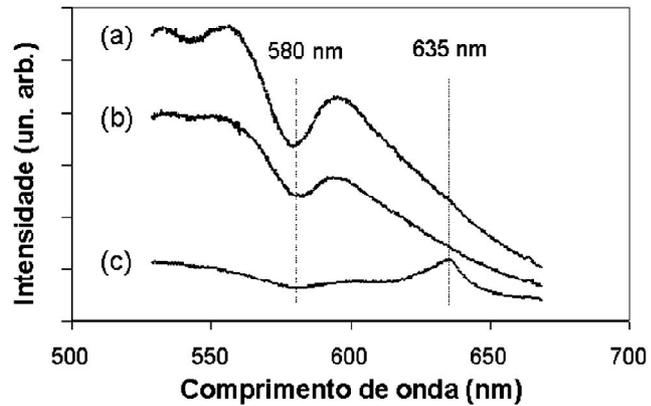
A intensidade relativa dos espectros de tecido normal é de ordem três vezes maior que a dos espectros de tecido tumoral. Esta característica pode ser atribuída à maior absorção pelas moléculas do sangue da luz emitida pelos fluoróforos, pois os tecidos neoplásicos apresentam maior vascularização<sup>8</sup>.

Todos os espectros apresentam uma banda de absorção bastante intensa em 580nm e outra menos intensa em 540nm, bandas estas atribuídas à absorção da hemoglobina do sangue (bandas Soret). O espectro de tecido com desenvolvimento de tumor também apresenta a banda de absorção Soret bastante intensa, e uma banda de emissão em 635nm que é atribuída ao fluoróforo PpIX, que vem sendo descrito como indicador da presença de tecido neoplásico. Esta banda não é predominante ou não existe em tecido normal.

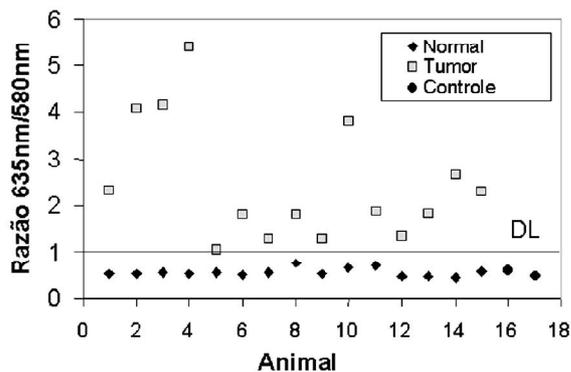
Foi implementado um algoritmo de diagnóstico baseado na razão entre o vale em 580nm (banda Soret da hemoglobina) e o pico em 630nm (presença de PpIX). Esta razão leva em conta a maior absorção do sangue que ocorre em tumores e a maior concentração da PpIX dos tumores, comparativamente aos tecidos normais. A Figura 3 apresenta o resultado da aplicação do algoritmo nos 32 espectros do grupo de treinamento (16 animais). A razão menor que 1 (linha de diagnóstico - DL) indica tecido normal, enquanto que a razão maior que 1 indica tecido neoplásico. A Figura 4 apresenta o resultado da aplicação do algoritmo da razão nos 32 espectros do grupo de teste prospectivo, mantendo a mesma linha de separação.

Os índices de sensibilidade e especificidade de diagnóstico das lesões neoplásicas foram calculados para o algoritmo baseado na razão nos grupos de treinamento e

**Figura 2 – Espectros de autofluorescência de bochecha de hamster com excitação em 488nm obtidos da: (a) bochecha contralateral ao tumor (esquerda); (b) bochecha do animal de controle (esquerda); (c) bochecha com tumor induzido (direita)**



**Figura 3 – Razão entre as intensidades do vale em 580nm e pico em 635nm para o grupo de espectros de treino do algoritmo. A linha de diagnóstico DL foi empiricamente determinada na razão igual a 1 e separa o grupo de espectros de tecido contralateral (normal) e controle do grupo tumor**



prospectivo. Tanto para o grupo treinamento como para o grupo de teste prospectivo verificou-se que o algoritmo apresentou a máxima sensibilidade e especificidade (100%).

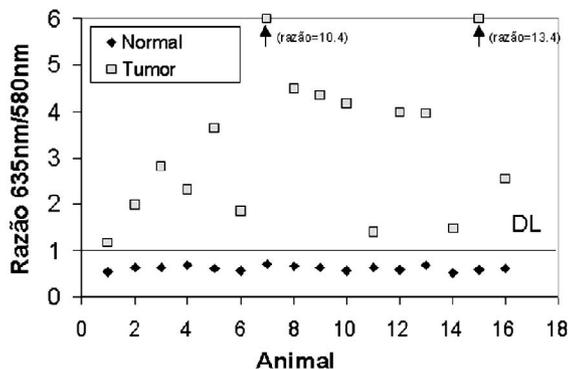
Foi implementado um segundo algoritmo de classificação dos espectros, baseado nas duas primeiras componentes principais (PC1 X PC2). Estas são as componentes principais que apresentam maior variância dos espectros (> 90%). A Figura 5 mostra o gráfico de dispersão dos escores da PC1 e PC2, calculados a partir dos espectros de fluorescência do grupo treino. Como pode ser visto, há uma total separação dos escores nas duas categorias propostas, normal (contralateral) e tumor.

Com o objetivo de testar o algoritmo de

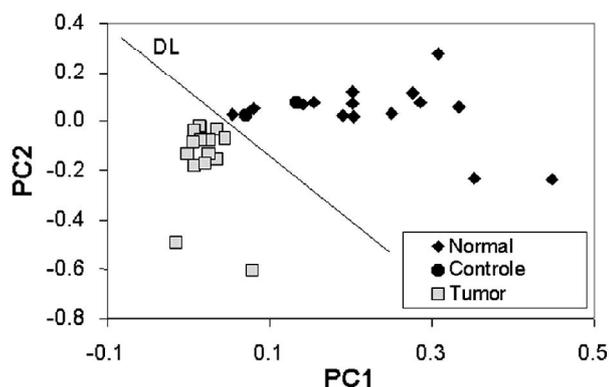
diagnóstico prospectivamente, os escores dos 32 espectros do grupo de análise prospectiva foram obtidos pela projeção de cada PC previamente calculado no grupo de treinamento em cada um dos espectros prospectivos. Estes escores foram apresentados também na forma de gráfico de dispersão, mantendo-se as mesmas linhas de diagnóstico que foram obtidas para o grupo de treinamento, como mostra a Figura 6.

Os índices de sensibilidade e especificidade foram também calculados para o algoritmo de diagnóstico baseado na PCA para os grupos de treinamento e prospectivo. Para o diagnóstico do grupo treinamento, verificou-se que o algoritmo apresentou a máxima sensibilidade e especificidade (100%) e para o

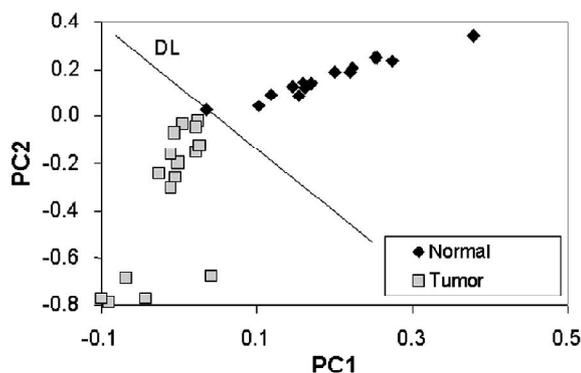
**Figura 4 – Razão entre as intensidades do vale em 580nm e pico em 635nm para o grupo de espectros de análise prospectiva do algoritmo. A linha de diagnóstico utilizada é a mesma determinada no grupo de treino e separa os espectros de tecido contralateral (normal) do grupo tumor**



**Figura 5 – Gráfico do 1º componente principal (PC1) versus o 2º componente principal (PC2) calculados utilizando o grupo de 32 espectros de treinamento do algoritmo baseado na PCA. A linha de diagnóstico separa os dois grupos de tecidos, contralateral (normal) e controle do grupo de tecido tumoral**



**Figura 6 – Gráfico do 1º componente principal (PC1) versus o 2º componente principal (PC2) calculados utilizando o grupo de 32 espectros de teste prospectivo do algoritmo baseado na PCA. A mesma linha de diagnóstico obtida no grupo de treinamento foi aqui utilizada**



grupo teste prospectivo o algoritmo apresentou sensibilidade alta de 94% e especificidade máxima de 100%.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os espectros de autofluorescência vêm sendo utilizados para a discriminação entre tecidos normais e neoplásicos em diversos tecidos, onde a utilização de excitação em comprimentos de onda na faixa de 400 a 500nm é favorável para a excitação de fluoróforos endógenos como a PpIX. Observa-se também nesta região espectral a presença da banda de absorção Soret do sangue, mais intensa em tecidos neoplásicos. Estas características espectrais relevantes facilitam a implementação de algoritmos de identificação baseados em reconhecimentos de picos e vales, tais como os descritos neste trabalho.

Jagdish et al.<sup>12</sup>, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência com excitação em 410nm, diagnosticaram lesões pré-malignas e malignas na mucosa oral de hamster induzidas quimicamente. Os resultados demonstraram que é possível, através da análise de bandas de emissão, diagnosticar 45 de 49 lesões estudadas, sugerindo que a espectroscopia de fluorescência através do laser, além de ser uma técnica capaz de diagnosticar precocemente uma lesão, é também uma técnica não invasiva.

Já em 2000, Ienigetal<sup>3</sup> estudaram a indução de PpIX endógena na mucosa oral de pacientes através da aplicação 5-ácido aminolevulínico (5-ALA) objetivando facilitar o diagnóstico precoce da lesão, visto que a PpIX apresentou-se em maiores concentrações em tecido tumoral. A maior produção de PpIX possibilitaria um mecanismo de análise quantitativa e qualitativa da fluorescência e, conseqüentemente, da lesão.

Estudo semelhante foi realizado por Vijay et al.<sup>14</sup> utilizando várias doses de 5-ALA (5, 25, 50, 75 e 100 mg/kg) aplicados em cavidade oral canina, buscando avaliar quantitativamente a síntese da PpIX. Foi observado que o pico da substância apareceu entre 2 e 6h após a aplicação do 5-ALA e a síntese retornou à linha de base entre 24 e 31h.

Douglas et al.<sup>15</sup> realizaram um estudo in vivo para determinar qual a combinação ótima de comprimentos de onda de excitação para discriminar o tecido normal, pré-canceroso e canceroso da cavidade oral humana, baseado na espectroscopia de fluorescência, e observaram

que a melhor combinação de excitação para diagnosticar lesões neoplásicas na cavidade oral foi 350, 380 e 400nm.

Neste trabalho, a espectroscopia de fluorescência foi utilizada como uma ferramenta de diagnóstico de tecidos neoplásicos in vivo em mucosa oral de hamsters, onde os espectros de fluorescência obtidos com excitação em 488nm foram analisados através da razão entre regiões espectrais de 580 e 635nm e da Análise dos Componentes Principais 1 e 2, com alta sensibilidade e especificidade.

A observação dos espectros demonstrou ser possível detectar a presença da PpIX endógena e que a mesma caracteriza-se por alta intensidade em tecidos tumorais. Nos tecidos normais, a alta fluorescência na região em 500nm deve-se à presença de fluoróforos, tais como o colágeno, e à baixa absorção desta fluorescência pela hemoglobina. Nos tecidos neoplásicos, a maior vascularização é responsável pela diminuição da intensidade geral do espectro emitido e pelas bandas que ocorrem em 540 e 580nm (banda Soret).

O algoritmo baseado na razão da banda 580/630nm apresentou sensibilidade e especificidade máximas, enquanto que o algoritmo baseado na PCA apresentou sensibilidade de 94% e especificidade de 100% para o grupo prospectivo. O algoritmo baseado na razão apresenta simplicidade e facilidade de implementação, não necessitando de cálculos computacionais como os demandados pela técnica PCA. Já a técnica PCA é útil em situações onde os espectros tenham muito ruído ou onde existam variáveis interferindo nos espectros, como fluoróforos que não sejam comuns na maioria dos tecidos.

A utilização de cabos de fibras ópticas facilitou a padronização da área irradiada para a coleta dos espectros, além da grande vantagem que é a possibilidade de realização dos experimentos in vivo sem a necessidade de remoção do tecido, visto que o cabo de fibras ópticas permite o acesso remoto às regiões de interesse.

Estudos com casuística maior, em diferentes órgãos e em tecidos humanos in vivo permitirão determinar como a espectroscopia de fluorescência poderá tornar-se, no futuro, um método de diagnóstico de lesões neoplásicas, auxiliando no diagnóstico precoce, no acompanhamento da evolução da doença e como um possível método de acompanhamento cirúrgico de retirada de tumor.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PADCT e à FAPESP pelo auxílio financeiro, bem como a Dra. Marilene P. Rosa, do complexo hospitalar Heliópolis, pela análise anatomopatológica.

**Conflito de interesse:** não há.

## SUMMARY

### DETECTION OF INDUCED NEOPLASTIC LESIONS IN THE ORAL MUCOSA OF HAMSTERS USING FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

**OBJECTIVE.** This work analyzes use of the Laser Induced Fluorescence Spectroscopy technique for characterization of normal and neoplastic tissue in the oral mucosa of hamsters, with potential to diagnose neoplastic tissue in vivo.

**METHODS.** Carcinogen DMBA was applied to the right cheek of 31 hamsters weighing  $150 \pm 10$ g, three times per week during 12 weeks. One animal was kept as a control (without application of the drug). At the end of this period, the animals were submitted to fluorescence spectroscopy excited by an argon laser (488nm) connected to an optical fiber cable. Tissue autofluorescence was analyzed by a spectrograph and a CCD camera with 1024X256 pixels covering the spectral range of 550nm to 700nm. Fluorescence emission spectra were collected in the induced region and normal counter side cheek of all the animals and also in the control animal. After spectroscopy, biopsy was carried out for histopathological analysis. Two diagnosis algorithms, one based on the ratio of spectral regions and another based on Principal Components Analysis (PCA) were implemented.

**RESULTS.** Spectral analysis had demonstrated existence of an intense peak in the region of 630nm in neoplastic tissues (attributed to protoporphyrin IX) when compared to the normal tissue. The algorithm based on the ratio of two spectral regions had 100% of sensitivity and specificity. The algorithm based on the PCA had 94% and 100% of specificity and sensitivity, respectively.

**CONCLUSIONS.** This work indicates that tissue autofluorescence may be used as a non-invasive technique for diagnosis of the neoplastic oral mucosa. [Rev Assoc Med Bras 2004; 50(3): 297-301]

**KEY WORDS:** Spectrometry fluorescence. Discriminant analysis. Mouth mucosa. Neoplasms diagnosis.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Mortalidade 1998 [online]. Disponível em: [http://www.funasa.gov.br/sis/pdfs/mortalidade\\_1998](http://www.funasa.gov.br/sis/pdfs/mortalidade_1998). Acesso em: 26 nov 2002.
2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil [online]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa2002/brasil.html>. Acesso em: 26 nov 2002.
3. Carrau RL, Pou A, Eibling DE, Murry T, Ferguson BJ. Laryngeal Framework surgery for the management of aspiration Head Neck 1999; 21:139-45.
4. Engels AS, Andersson-Engels S, Johansson J, Svanberg K, Svanberg S. Fluorescence imaging and point measurements of tissue: applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesions from normal tissue. Photochem Photobiol. 1991; 53: 807-14.
5. Wagnieres GA; Studzinski AP, Vanden Bergh HE. The endoscopic fluorescence imaging system for simultaneous visual examination and photo detection of cancers. Rev Sci Instrum 1997; 68:203-12.
6. Vo-Dinh, T Panjehpour M, Overholt BF, Farris C, Buckley FP 3<sup>rd</sup>, Sneed R. In vivo cancer diagnosis of the esophagus using Differential Normalized Fluorescence (DNF) indices. Lasers Surg Med 1995; 16:41-7.
7. Zângaro RA, Silveira L Jr, Manoharan R, Zonios G, Itzkan I, Dasari RR; et al. Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for in vivo tissue diagnosis. Appl Optics 1996; 35:5211-9.
8. Orth K, Russ D, Steiner R, Beger HG. Fluorescence detection of small gastrointestinal tumours: principles, technique, fist clinical experience. Langenbecks Arch Surg. 2000; 385:488-94.
9. Johansson J, Berg R, Svanberg K, Svanberg S. Laser-induced fluorescence studies of normal and malignant tumour tissue of rat following intravenous injection of delta-levulinic acid. Lasers Surg Med 1997; 20:272-9.
10. Kusunoki Y, Imamura F, Uda H, Mano M, Horai T. Early detection of lung cancer with laser-induced fluorescence endoscopy and spectrofluorometry. Chest 2000; 118:1776-82.
11. Ferreira MMC, Antunes AM, Melgo MS, Vope PLO. Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial. Quim Nova 1999; 22:724-31.
12. Jagdish KD, Xia Z; Katheleem M, Sadru K, Ramasamy M, Inving I, Michaer SF, Stanley MS. Diagnosis of head and neck precancerous lesions in the animal model using fluorescence spectroscopy. Laryngoscope 1998; 108:471-5.
13. Leunig A, Betz CS, Mehlmann M, Stepp H, Arbogast S, Grevers B, et al. Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence. Laryngoscope 2000; 110:78-83.
14. Vaidyanathan VV, Rastegar S, Fossum TW, Flores P, Egger NG, Jaques SL, et al. A study of aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence kinetics in the canine oral cavity. Lasers Surg Med 2000; 26:405-14.
15. Douglas LH, Heintzelman DL, Utinger U, Fuchs H, Zuluaga A, Gossage K, Gillenwater AM, et al. Optimal excitation wavelengths for in vivo detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy. Photochem Photobiol 2000; 72:103-13.

Artigo recebido: 30/05/2003  
Aceito para publicação: 19/08/2003