

Estudo de linfonodos por espectroscopia Raman confocal

Lymph node study by confocal Raman spectroscopy

Juliana dos Santos Corrêa*
Lázaro Pinto Medeiros Neto**
Maurílio José Chagas**
Aline Priscila Campos Ferreira**
Vinícius de Almeida Loddi**
Claudio Alberto Tellez Soto***
Airton Abrahão Martin***

30

Resumo

Dentre os órgãos linfóides encontram-se os linfonodos. Também conhecidos como nódulos linfáticos, os quais são considerados como filtros da linfa por serem ricos em linfócitos e outras células de defesa. Entre os fatores que contribuem para o seu comprometimento temos a invasão de sua estrutura por células neoplásicas. A citologia constitui o exame padrão ouro no diagnóstico sendo, a PAAF a técnica mais utilizada para a obtenção do material a ser analisado. Entretanto, alguns estudos questionam a sua utilização, devido à perda da arquitetura celular. A espectroscopia Raman confocal por meio da sua capacidade em utilizar as diferenças bioquímicas de tecidos e células vem se destacando cada vez mais neste tipo de diagnóstico. O estudo teve por objetivo identificar as principais características bioquímicas em linfonodos normais, comprometidos e lesão cervical utilizando a espectroscopia Raman confocal. Foram analisadas 12 amostras de linfonodos normais e alterados de pacientes com indicação cirúrgica para linfadenectomia pela espectroscopia seguida pela análise estatística de componentes principais (PCA) e análise de discriminante linear (LDA). Após as análises observou-se que a técnica utilizada conseguiu discriminar os tecidos com valores de especificidade, sensibilidade e acurácia de 83%. Portanto, a espectroscopia Raman confocal se mostrou uma importante ferramenta na caracterização de linfonodos podendo futuramente auxiliar no diagnóstico de lesões linfonodais.

Palavras-chave: Tecido Linfoide. Espectroscopia Raman confocal. Linfoma.

Abstract

Among the lymphoid organs there are lymph nodes,, which are considered as lymph filters because they are rich in lymphocytes and other defense cells. Among the factors that contribute to their impairment we note the invasion of its structure by neoplastic cells. Cytology is the gold-standard diagnostic test, and FNA is the technique most used to obtain the material to be analyzed. However, some studies question its use, due to the loss of cellular architecture. Confocal Raman spectroscopy, through its ability to utilize biochemical differences in tissues and cells, has been increasingly prominent in this type of diagnosis. The study aimed to identify the main biochemical characteristics in normal and compromised lymph nodes and cervical lesion using confocal Raman spectroscopy. We analyzed 12 normal and altered lymph node samples from patients with medical indications for a lymphadenectomy by spectroscopy, followed by statistical analysis of the main components (PCA) and linear discriminant analysis (LDA). After the analysis, it was observed that this technique was able to discriminate the tissues with values of specificity, sensitivity and accuracy of up to 83%. Therefore, confocal Raman spectroscopy has been shown to be an important tool in the characterization of lymph nodes, and may help in the diagnosis of lymph node lesions in the future.

Keywords: Lymphoid Tissue. Confocal Raman spectroscopy. Lymphoma.

DOI: 10.15343/0104-7809.201741013039

*Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos/SP, Brasil. E-mail: julianasantocorrea@gmail.com

**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

***Biomedical Engineering Innovation Center - Biomedical Vibrational Spectroscopy Group. Universidade Brasil (UnBr). São Paulo/SP, Brasil.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

INTRODUÇÃO

Os linfonodos, assim como o baço, o timo e as amídalas fazem parte do tecido linfoide presente no sistema linfático. Estes linfonodos são estruturas que se dispõem ao longo dos vasos do sistema linfático em número de 600 a 700 nódulos em todo o organismo. São importantes órgãos filtradores e estão envoltos por uma cápsula fibrosa¹. Morfologicamente, em seu interior, nota-se a presença de diversos tipos celulares, tais como linfócitos T, macrófagos, células foliculares dendríticas e linfócitos B em sua maioria².

Em casos de indução de uma resposta imunitária provocada por invasão de células inflamatórias ou neoplásicas, a proliferação de linfócitos B e macrófagos provoca o aumento de seu tamanho, se tornando palpável ao toque³, facilitando a suspeita de possíveis patologias.

O desenvolvimento de neoplasias linfonodais ocorre quando sua estrutura é invadida por células metastáticas ou, podem se iniciar no próprio tecido, como em casos de linfoma⁴. Além dos linfomas, podemos encontrar em linfonodos neoplasias como: Linfoepiteliomas, metástases de carcinoma papilífero de tireoide e processos inflamatórios como a linfadenite.

A citopatologia, através da análise celular de materiais puncionados do interior dos linfonodos, constitui o exame padrão ouro

no diagnóstico destas lesões⁵. Por ser menos invasiva, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é a técnica mais utilizada para a obtenção do tecido nodular.

Porém, estudos questionam a eficácia em sua utilização, devido à perda de arquitetura celular durante o procedimento de coleta do material⁶.

Além disso, a presença concomitante de necrose nodular, de outra patologia e de esclerose/fibrose, pode impedir a recolha de uma amostra significativa influenciando na sensibilidade e especificidade da técnica⁷.

Devido a estes possíveis interferentes e, afim de auxiliar o diagnóstico realizado pela histologia em lesões linfonodais, novas técnicas de diagnóstico mais precisas devem ser desenvolvidas. Estudos^{8,9,10,11,12,13,14,15} mostram que a espectroscopia Raman vem sendo amplamente empregada neste contexto, uma vez que esta técnica é capaz de avaliar as alterações bioquímicas que sabidamente antecedem as morfológicas, observadas pela histologia. Sendo assim, com este estudo buscou-se identificar as principais características bioquímicas em linfonodos normais, comprometidos e em uma lesão cervical utilizando a espectroscopia Raman confocal.

METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sob o número 1.301.833/CEP/2015. Analisamos um total de 12 amostras de linfonodos, sendo 4 linfomas, 1 linfoepitelioma, 1 metástase de CPT, 1 schwannoma e 5 linfonodos normais provenientes de pacientes com massas cervicais visíveis ao exame clínico e com indicação cirúrgica para suspeita de linfomas ou de outros procedimentos com linfadenectomias.

Apesar de o *schwannoma* não ser uma neoplasia maligna e com isso não ter a capacidade de comprometer um linfonodo, ele foi inserido no estudo por clinicamente

ser semelhante a linfonodos acometidos, apresentando massa cervical. A coleta destes materiais foi por meio de biópsias excisionais, após o paciente ter assinado o termo de consentimento. Neste momento, foi passado ao paciente todo o procedimento e qualquer dúvida foi esclarecida. Após a coleta as amostras foram identificadas e armazenadas em tubos criogênicos e guardadas em freezer -80°C até o momento da obtenção de espectros.

A aquisição dos espectros e a análise dos mesmos foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba em São José

dos Campos. No momento da análise espectral, os tecidos foram colocados sobre janelas de CaF₂ (fluoreto de Cálcio). O sistema Raman utilizado é composto por um espectrômetro Raman confocal modelo 3510 Rivers Skin Analyzer (Holanda). O laser aplicado sobre as amostras teve um comprimento de onda de 785 nm, compreendendo a faixa espectral de 400 a 1800 cm⁻¹, cuja potência utilizada foi de 21 mW, profundidade de 0-40 microns, tempo de integração 10 segundos com 1 acumulação e passo de 2 microns, o sinal Raman foi coletado por um detector CCD resfriado a -95°C (Andor iDus 416 CCD).

Apesar do laser compreender a faixa espectral de 400 a 1800 cm⁻¹, foi escolhido para a análise a região de 900 a 1800 cm⁻¹ pois, nesta região que conseguimos observar as diferenças espectrais entre os grupos. Terminamos a aquisição dos espectros com um total de 120 espectros sendo, 10 por amostra. Os dados foram então submetidos ao cálculo da linha de base pelo *software* Labspec 5, este procedimento foi realizado com a finalidade de subtrair a fluorescência. Depois foi realizado a normalização entre 0-1, no intervalo espectral

de 900 a 1800 cm⁻¹ pelo *software* Minitab 1.6. Após a análise de loading plot de todo o intervalo espectral foi possível escolher as melhores regiões discriminantes. Essa análise ocorreu por meio do gráfico da quinta componente principal (PC5), onde podemos observar as regiões que englobam a maior quantidade de variações entre os tecidos.

Na análise estatística, primeiramente foi utilizado o programa OriginPro 8 para obtenção dos espectros médio e do desvio padrão para todas as amostras na região de 900 a 1800 cm⁻¹. As seguintes etapas foram realizadas pelo *software* Minitab® onde, foi feita a classificação dos espectros, através da Análise de Componentes Principais (PCA), método matemático que separa as variáveis originais de um grupo de acordo com as suas semelhanças através da análise do scatterplot associado ao loading plot e métodos supervisionados como a Análise de Discriminante Linear (LDA). Também, foram determinados os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia do teste através de uma matriz de contingência baseado nos valores encontrados pela análise de PCA associado aos resultados histopatológicos.

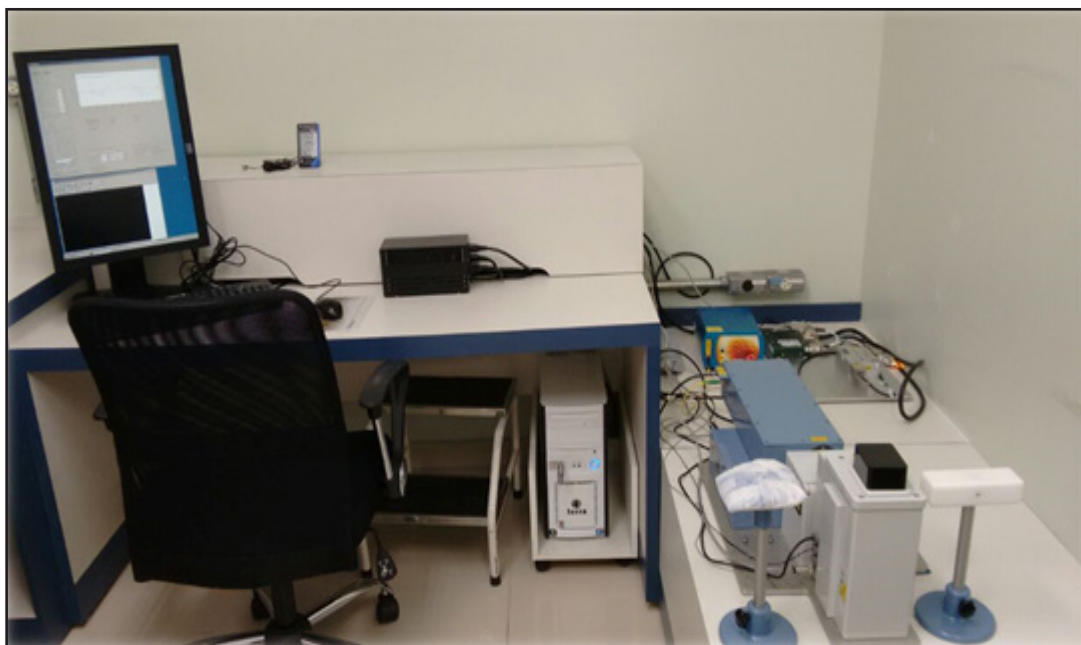


Figura 1 – Sistema Raman utilizado, espectrômetro Raman confocal modelo 3510 Rivers Skin Analyzer (Holanda). Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Nov. 2016.

RESULTADOS

Na figura 2, pode ser observado o espectro médio das amostras normalizadas entre 0-1 para cada tipo histológico analisado.

Através das médias, podemos verificar variações em algumas regiões espectrais como: 900 a 1100, 1100 a 1300, 1300 a 1600 cm^{-1} . Essas regiões poderiam ser utilizadas para realizar a discriminação entre os espectros, além da região total, 900-1800 cm^{-1} .

Pela observação dos desvios padrão, foi possível concluir que as amostras normais apresentaram um maior desvio padrão por apresentar maior variabilidade (Figura 3).

Os resultados estatísticos por meio da técnica de PCA apresentaram uma melhor separação entre os grupos de linfonodos benignos em relação aos linfonodos comprometidos por lesões através da avaliação da PC5 em relação a PC4.

Embora a primeira componente principal (PC1) englobe a maior parte da variação amostral, como observado no *scree plot*, em nosso estudo a PC5 foi a componente responsável pela separação dos grupos.

Associado ao *scatterplot*, foi gerado o *loading plot* da PC5 e PC4 para identificar os principais picos além das regiões de maior variação entre os grupos (Figura 4).

Após a análise de PCA, foi aplicado a técnica estatística supervisionada de LDA, utilizando a análise linear com crossvalidation. Para esta análise foram utilizadas as mesmas PCs da análise de PCA, PC4 e PC5. O percentual de separação entre os grupos obtidos pela técnica de LDA com crossvalidation foi de 83%.

Por último, foi gerado uma matriz de contingência sobre os resultados obtidos a partir do *scatterplot* associado aos resultados histopatológicos, onde foi possível estabelecer os resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do teste. O teste apresentou 83% de sensibilidade, ou seja, capacidade de determinar que as amostras analisadas eram linfonodos comprometidos. O valor de especificidade, capacidade de determinar um linfonodo normal, foi de 83%, e a acurácia do teste na determinação do diagnóstico verdadeiro foi de 83%.

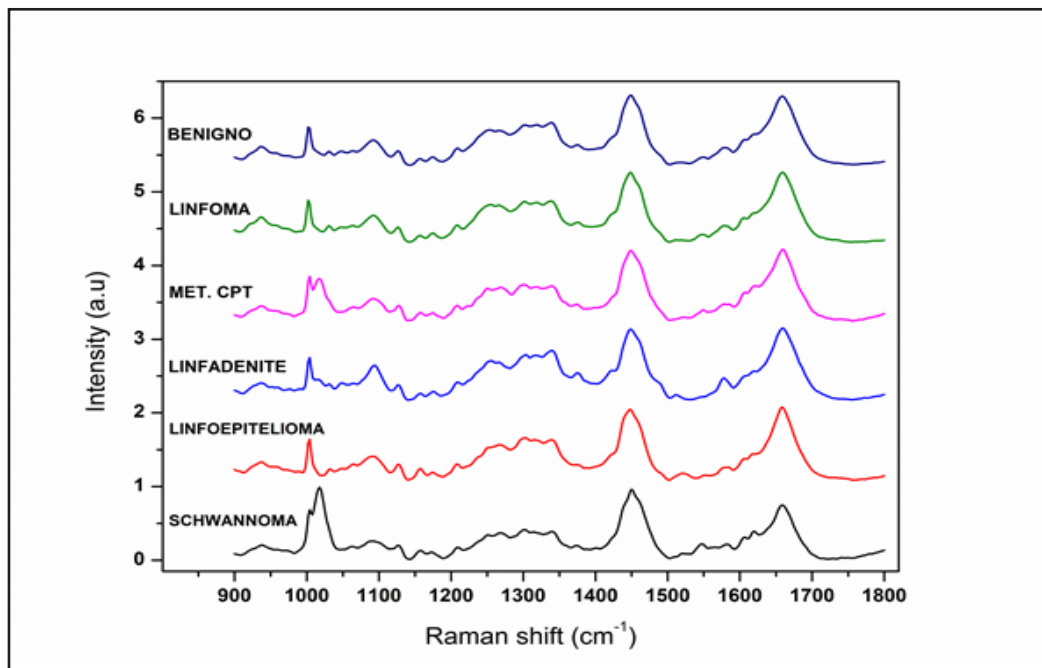


Figura 2 – Espectros médio das lesões estudadas. Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Nov. 2016.

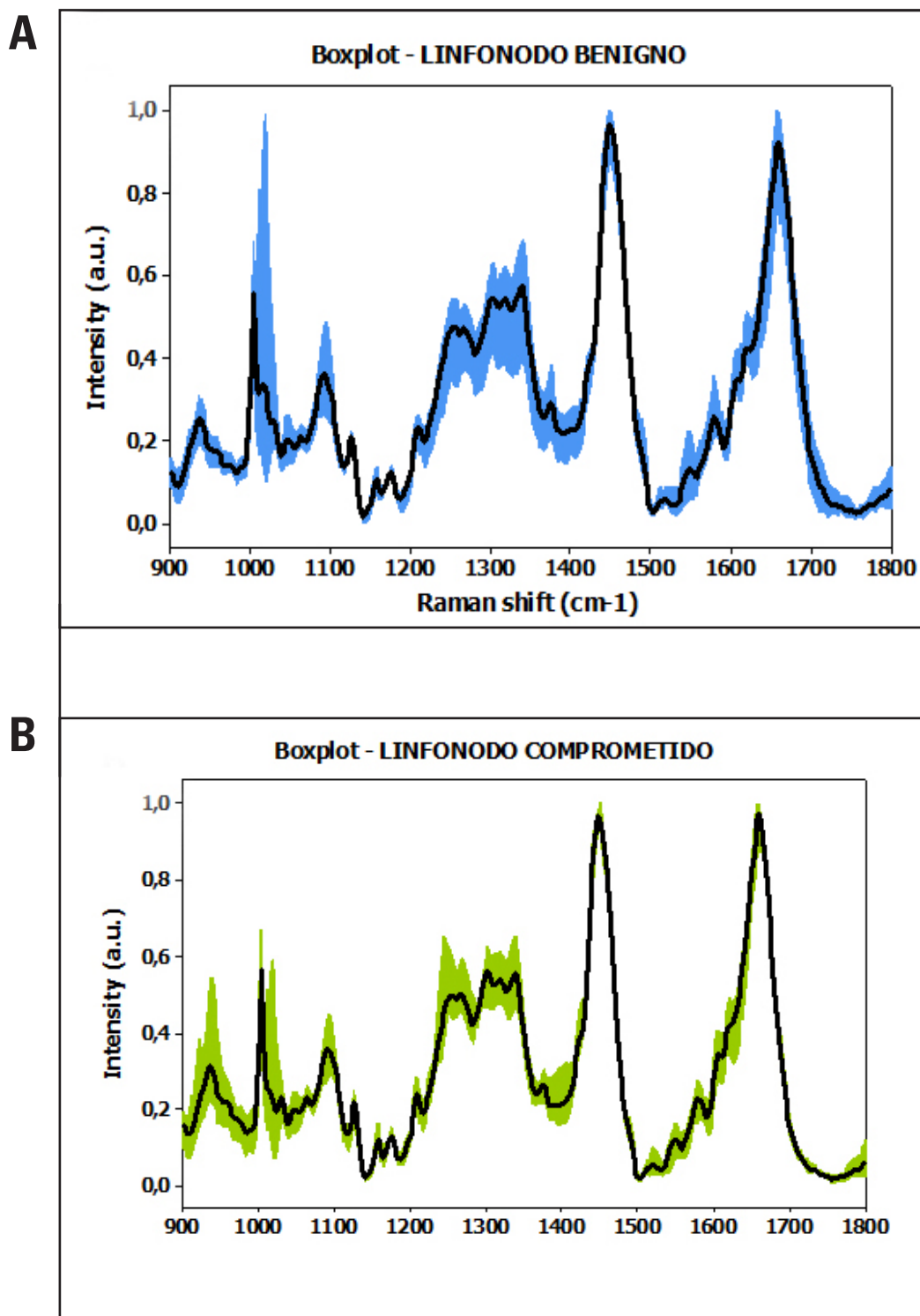


Figura 3 – Espectro médio com desvio padrão para os grupos analisados. A: Grupo linfonodo normal; B: Grupo linfonodo comprometido. Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Nov. 2016.

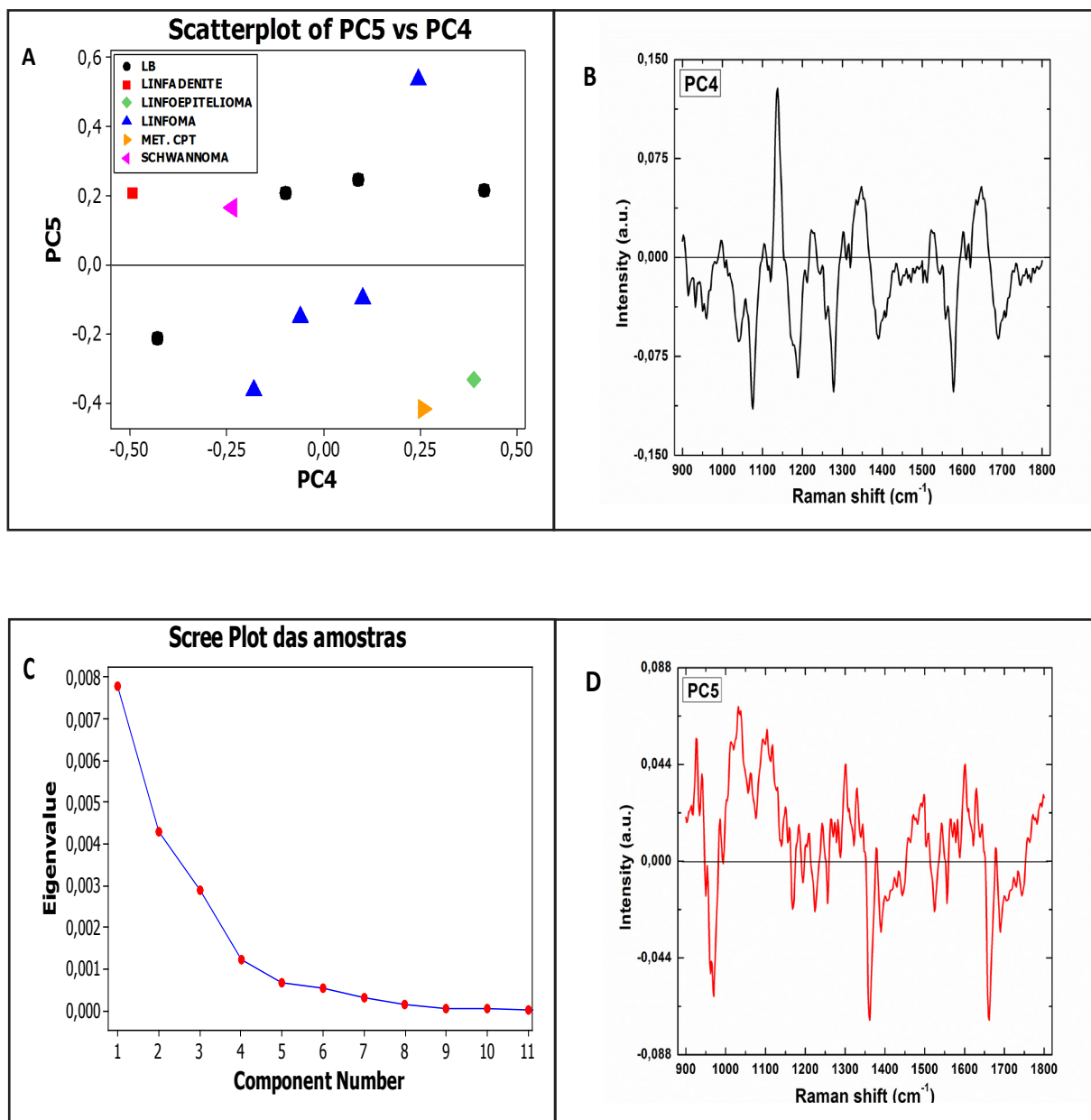


Figura 4 – Resultados observados a partir da análise de PCA A: Scatterplot com a separação das amostras provenientes do grupo de linfonodos benignos em relação a linfonodos comprometidos [• LB (linfonodo benigno), ■ (Linfadenite), ◆ (Linfoepitelioma), ▲ Linfoma), ► (Metástase PTC), ◀ (Schwannoma)]; B: Loading plot da PC4, componente utilizada no estudo para separação dos grupos junto com a PC5; C: Scree plot a partir da PCA demonstrando que a PC1 engloba a maior variabilidade amostral em relação a PC2, cuja variação foi maior que a PC3 e assim por diante; D: Loading plot PC5, componente responsável pela separação dos grupos, onde observamos as regiões de maior variação e os principais picos referentes as amostras de linfonodos benignos e comprometidos. Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Nov. 2016.

Tabela 1 – Principais picos e atribuições identificados para os grupos linfonodo normal e comprometidos a partir do loading plot. Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica. Nov. 2016.

Linfonodo Normal	
Picos (cm-1)	Atribuição
928	v (C-C), alongamento - provavelmente em aminoácidos prolina e valina (banda proteica)
1032	CH ² CH ³ modos de torção de colágeno e fosfolípidos, estiramento C-C, Fenilalanina de colágeno
1104	Fenilalanina
1150	Glicogênio
1184	Vibrações de fosfato
1210	Modo de estiramento C-C6H5 em tirosina e fenilalanina
1302	Colágeno, fosfolípidos, lipídios, amida III
1330	Fosfolípidos típicos, região de DNA, colágeno, ácidos nucleicos e fosfatos
1498	Estiramento C=C em anel benzênico
1630	Amida I
Linfonodo Comprometido	
Picos (cm-1)	Atribuição
970	Proteínas e ácidos nucleicos celulares
1168	Lípidos
1224	Proteínas, incluindo o colágeno tipo I, amida III
1256	DNA / RNA, amida III
1362	Triptofano, guanina
1524	Carotenóides (ausentes nos tecidos normais)
1556	Triptofano, amida II, tirosina
1662	Lipídios e ácidos nucleicos

v: vibrações stretching. Comprimento de onda com um intervalo de confiança de $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Fonte: Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues, **Applied Spectroscopy Reviews**, 42:5, 493-541, 2007.

DISCUSSÃO

Este estudo realizado através da espectroscopia Raman confocal é importante pois, as características bioquímicas contidas em cada tecido contribuem na sua caracterização. Na Figura 2, podemos visualizar os espectros médios de cada tipo histológico demonstrando que embora diversas regiões do espectro

sejam semelhantes entre linfonodos normais e comprometidos, ainda há diferenças que ajudam na discriminação e consequentemente na caracterização dos mesmos.

Na Figura 2 contendo o gráfico da média e do desvio padrão foi demonstrado um maior desvio para o grupo de linfonodos normais. Tal

fato é explicado, uma vez que o tecido normal apresenta uma maior variabilidade em relação ao comprometido.

Na técnica de PCA, observamos que as principais PCs que contribuíram para a separação entre os grupos foram a PC4 e a PC5, apesar de a PC1 e a PC2 serem as PCs que englobam a maior parte da variação amostral¹⁶. O *scatterplot* gerado com estas PCs (Figura 4) demonstrou uma importante separação entre as amostras estudadas, sendo que de 6 amostras caracterizadas histologicamente como linfonodos normais, apenas 1 foi agrupada com o grupo linfonodo comprometido e de 5 amostras classificadas como linfonodos comprometidos, apenas 1 foram classificadas pela técnica como linfonodos normais.

A amostra denominada linfadenite, apesar de ser uma forma de comprometimento de linfonodo não se separou no grupo de linfonodos comprometidos pois, trata-se de um quadro infeccioso sem aspecto histológico de malignidade. Desta forma, concluímos que a mesma foi classificada no grupo linfonodo normal por não ser um linfonodo proveniente de um tecido neoplásico. Da mesma forma justifica-se a classificação de um linfonodo comprometido com schwannoma no grupo linfonodo normal. O schwannoma, tumor que se desenvolve a partir das células de Schwann é histologicamente classificado como benigno¹⁷, ou seja, não possui características malignas como os linfomas e o linfonodo acometido por metástase de CPT.

Associado ao *scatterplot* foi gerado um *loading plot* a partir da PC5, responsável por separar as amostras no *scatterplot*, onde foram evidenciados os principais picos representativos para o grupo normal e para o grupo comprometido (Tabela 1).

Dentre os picos presentes para o grupo normal podemos ressaltar o pico de 1302 cm^{-1} , também encontrado por Malini et al.¹⁸, que avaliou tecidos normais, inflamatórios, pré-malignos e malignos da região oral. O pico 1.104 cm^{-1} , atribuído a fenilalanina, também encontrado por Neto 17 em um estudo onde foi feita a caracterização bioquímica de lesões da tireoide. Pujary et al.¹⁹, analisando tecidos normais e tumorais de hipofaringe, também observou o pico 1302 cm^{-1} , atribuindo a

presença de lipídeos em tecidos normais.

Outros importantes picos referentes ao linfonodo normal é o de 1330 cm^{-1} atribuído ao DNA, resultado também observado por Chan et al.²⁰, em um estudo sobre comparação de células normais e transformadas e o pico 1150 cm^{-1} atribuído ao glicogênio, resultado também observado por Kamemoto et al.²¹, o qual determinou que o mesmo está associado a maturação celular, processo que se altera em neoplasias.

Já entre os picos para o grupo linfonodo comprometido, vale considerar o pico de 1662 cm^{-1} , referentes ao componente de lipídios e, quando presente em tecidos neoplásicos, sugerem um maior grau de agressividade do tumor, atribuído a perturbações da membrana de células cancerígenas²² e, o pico de 970 cm^{-1} , atribuído a DNA/RNA, que sabidamente estão presentes em maior quantidade em tecidos acometidos por câncer²³.

Além da análise de PCA, o teste de LDA através do método linear com *cross validation*, apresentou um importante valor discriminante de $\approx 83,3\%$, ou seja, a técnica conseguiu classificar os dois grupos com eficácia. Associado aos valores de discriminação obtidos pela técnica de LDA, os resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia do teste encontrados através da matriz de contingência nos permitem classificar a espectroscopia Raman como uma importante técnica na diferenciação de linfonodos.

O teste, baseado nos resultados classificatórios a partir do *scatterplot* associado ao diagnóstico histopatológico apresentou um valor de sensibilidade de 83%, com uma especificidade de 83% e uma acurácia de 83%.

Ao compararmos os valores obtidos por Corrêa et al.²⁴ utilizando Raman dispersivo para caracterizar linfonodos observamos que os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram menores. Isto pode ter acontecido, pois enquanto que no Raman dispersivo a análise é possível apenas superficialmente, o Raman confocal nos permitiu avaliar a amostra em diferentes profundidades.

Resultados semelhantes foram obtidos por Horsnell et al.²⁵, os quais diferenciaram linfonodos cervicais normais de acometidos por metástases de câncer de mama no momento

intra-operatório, com uma sensibilidade de 81%.

Portanto, a técnica de espectroscopia Raman por meio das características bioquímicas

conseguiu separar com eficiência os diversos tipos de linfonodos, normais e acometidos por patologias além de estruturas cervicais comprometidas.

CONCLUSÃO

O processo de caracterização bioquímica permitido pela espectroscopia sobre linfonodos foi importante, pois com as informações bioquímicas obtidas foi estabelecido um padrão bioquímico característico para linfonodos normais e alterados, possibilitando possíveis estudos *in vivo*.

Após este estudo podemos comprovar a

eficiência da espectroscopia Raman confocal quando utilizada para a caracterização de tecidos biológicos, a qual foi capaz de diferenciar linfonodos normais de comprometidos. Levando em consideração a precisão e rapidez, desta técnica, ela pode ser uma importante ferramenta no auxílio do diagnóstico dessas lesões.

REFERÊNCIAS

1. Guirro ECO, Guirro RR. Fisioterapia Dermato-funcional: fundamentos, recursos e patologias. 3. ed. São Paulo: Manole; 2002.
2. Lowe JS, Anderson PG. Human Histology. 4. ed. Estados Unidos: Ed. Elsevier Helth Scie; 2014.
3. Dourado LBK, Boueri FMV. Adenomegalia. In: Nunes MPT, Lin CN, Martins MA, Augusto KL, Pavanelli MC, Souza MRB, et al. Clínica médica: grandes temas na prática. São Paulo: Atheneu; 2010. p181-94.
4. Instituto oncoguia. Linfonodos e câncer. 2015. [Acesso em 30 ago 2016]. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/linfonodos-e-cancer/6814/1/>
5. Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, et al. Hodgkin Lymphoma. Wintrobe's Clinical Hematology. 12 ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
6. Morris-Stiff G, Cheang P, Key S, Verghese A, Havard TJ. Does the surgeon still have a role to play in the diagnosis and management of lymphomas? World J Surg Oncol 2008;6:1-4.
7. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, Mckinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. Clin Cancer Res 2008;14:1368-76.
8. Pereira MJ, Antonio DS, Oliveira TD. Utilização da espectroscopia Raman em sistemas orgânicos. 2014 [acesso em 2017 abr 2]; 6: 6-1. Disponível em: <https://anaisonline.uems.br/index.php/enic/article/view/2543>
9. Sharma N, Takeshita N, Yu Ho k. Raman spectroscopy for the endoscopic diagnosis of esophageal, gastric and colonic diases. Clin Endosc 2016;49:404-407.
10. Chaturvedi D, Balagi SA, Bn VK, Ariese F, Umaphathy S, Rangarajan A. Different phases of breast cancer cells: Raman study of immortalized, transformed, and invasive cells. Biosensors 2016;6(4):57.
11. Jermyn M, Desroches J, Mercier J, St-Arnaud K, Guiot MC, Leblond F, et al. Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans. Biomed Opt Express 2016;7:5129-5137.
12. Anand S, Cicchi R, Giordano F, Conti V, Buccoliero AM, Guerrini R, et al. Multinodal fiber-probe spectroscopy allows detecting epileptogenic focal cortical dysplasia in children. J. Biophotonics 2017 Jan: 1-9.
13. Huang CC, Isidoro C. Raman spectrometric detection methods for early and non-invasive diagnosis of Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease 2017 fev: 1-12.
14. Pence IJ, Beaulieu DB, Horst SN, Xiaohong BI, Herline AJ, Schwartz DA, et al. Clinical characterization of in vivo inflammatory bowel disease with Raman spectroscopy. Biomedical Optics Express 2017;8:524-535.
15. Han B, Du Y, Fu T, Fan Z, Xu S, Hu C, et al. Differences and relationships between normal and atypical ductal hyperplasia, ductal carcinoma in situ, and invasive ductal carcinoma tissues in the breast based on Raman spectroscopy. Applied Spectroscopy 2017;7:300-307.
16. Kelly JG, Trevisan J, Scott AD, Carmichael PL, Pollock HM, Martin-Hirsch PL, et al. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: a multistage approach linking computational analysis with biomarkers. J Proteome Res 2011;10:1437-1448.
17. Medeiros-Neto LP, Chagas MJ, Carvalho LFCS, Ferreira I, Santos L, Haddad M, et al. Raman spectroscopy and immunohistochemistry for schwannoma characterization: a case study. [acesso em 28 set 2016]. Disponível em: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=2501711>
18. Malini O, Venkatakrishna K, Kurien J, Keerthithatha MP, Rao L, Kartha VB, et al. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study. Biopolymers 2006;81:179-93.
19. Pujary P, Maheedhar K, Murali Krishna C, Pujary K. Raman spectroscopic methods for classification of normal and malignant

hypopharyngeal tissues: an exploratory study. *Patholog Res Int* 2011;2011:1-9.

20. Chan Kai MA, Shaw RM, Cameron DR, Underwood EC, Daily GC. Conservation planning for ecosystem services. *PLoS Biol* 2006;4:379-11.

21. Kamemoto LE, Misra AK, Sharma SK, Goodman MT, Luk H, Dykes AC, et al. Near-infrared micro-Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical cancer. *Appl Spectrosc* 2010;64:255-261.

22. Le TT, Huff T, Cheng JX. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer* 2009;9:1-12.

23. Harris AT, Garg M, Yang XB, Fisher S, Kirkham J, Smith DA, et al. Raman spectroscopy and advanced mathematical modelling in the discrimination of human thyroid cell lines. *Head Neck Oncol* 2009;1:38.

24. Corrêa JS, Medeiros-Neto LP, Santos L, Carvalho LFCS, Loddi VA, Soto CAT, et al. Caracterização bioquímica de linfonodos normais, comprometidos e lesões cervicais por espectroscopia Raman. *Rev Univap* 2016; 22:40.

25. Horsnell JD, Smith JA, Sattlecker M, Sammon A, Christinie-Brown J, Kendall C, et al. Raman spectroscopy e A potential new method for the intra-operative assessment of axillary lymph nodes. *The Surgeon* 2012;10:123-127.