



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARCELA MARÇAL THEBIT

**NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DE
CÂNCER BUCAL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FTIR EM
AMOSTRAS DE SANGUE E SALIVA**

VITÓRIA, ES

2021

MARCELA MARÇAL THEBIT

**NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DE
CÂNCER BUCAL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FTIR EM
AMOSTRAS DE SANGUE E SALIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Alves Gouvea

VITÓRIA, ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

T375n Thebit, Marcela Marçal, 1984-
Novas abordagens no diagnóstico não invasivo de câncer bucal
utilizando espectroscopia FTIR em amostras de sangue e saliva /
Marcela Marçal Thebit. - 2021.
83 f. : il.

Orientadora: Sonia Alves Gouvea.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Boca - Câncer. 2. Diagnóstico molecular. 3. Espectroscopia
de infravermelho. 4. Ácidos nucleicos. I. Gouvea, Sonia Alves.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

MARCELA MARÇAL THEBIT

**NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DE
CÂNCER BUCAL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FTIR EM
AMOSTRAS DE SANGUE E SALIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 29 de setembro de 2021.

Profª Drª Sonia Alves Gouvea

Instituição UFES

Orientadora

VITÓRIA, ES

2021

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha mãe, Alzira, que sempre se reinventou na vida através do estudo e me ensinou que a busca por conhecimento é o maior ato de rebeldia, liberdade e amor próprio que uma mulher pode ter.

Aos meus amigos que nesta caminhada enxugaram minhas lágrimas, riram meu riso, ampararam minhas quedas e guiaram meus voos. Allyson e Dany, amo vocês.

Aos meus irmãos, Bruna, Mari e KK, e a meu pai, Carlos, que se mantiveram porto seguro. Só foi possível seguir em frente porque eu sabia que por mais duro que fosse o caminho, eu sempre pude voltar para CASA.

As minhas sobrinhas, Gigi, Lili e Valentina. Minhas inesgotáveis injeções de ânimo e esperança.

Aos queridos Elber e Joana, amigos além da profissão. Vocês foram minha força e fizeram meu caminho mais leve.

Aos amigos que o laboratório me deu, Leo, Karine e Vini. Muito obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos nesta minha jornada fora da odontologia.

À minha orientadora, Sonia, que se tornou uma amiga e me acolheu desde o meu primeiro dia na UFES. Obrigada por acreditar em mim.

Aos meus avós, em especial ao meu Papi (Professor Marçal), que fez da educação alicerce fundamental desta família e tanto me inspirou nesta caminhada.

A Deus, que nunca me abandonou, mesmo nos dias mais complicados, obrigada por olhar por mim.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe médica do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) pelo auxílio na coleta dos dados e ao Laboratório de Instrumentação Multiusuário do LabPetro (UFES, Brasil) pela realização de medidas de FTIR (Termo de Cooperação Técnica nº 0050.0022844 .06.4).

Este estudo foi apoiado pela Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior(CAPES).

EPÍGRAFE

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar” (Paulo Freire)

NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DE CÂNCER BUCAL UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FTIR EM AMOSTRAS DE SANGUE E SALIVA

RESUMO

THEBIT, M.M. **Novas abordagens no diagnóstico não invasivo de câncer bucal utilizando espectroscopia FTIR em amostras de sangue e saliva.** 2021. 75f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O câncer bucal é geralmente diagnosticado através de métodos invasivos, pois embora as alterações sistêmicas possam ser facilmente detectadas, ainda não foi identificado um biomarcador periférico eficaz usando uma abordagem simples e acessível. O infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) surge como uma alternativa para a caracterização química e estrutural de materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo amostras líquidas como soro, plasma e saliva e uma possível ponte entre a análise molecular e a prática clínica. Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar se a espectroscopia ATR-FTIR pode ser aplicada como ferramenta no rastreamento do câncer bucal por meio da análise de amostras de plasma e saliva. Metodologia: Foram analisadas amostras de plasma e saliva de pacientes com câncer bucal e controles através da espectroscopia ATR-FTIR. Os dados experimentais foram alimentados no software MATLAB 2018b e analisados por meio de duas rotinas diferentes a fim de identificar pontos de diferenciação entre os grupos. Resultados: A análise bioquímica das amostras de plasma através de ATR-FTIR alcançou 92% de sensibilidade e 100% de especificidade na diferenciação entre os grupos. A maior diferença foi encontrada entre os picos que podem estar relacionados aos ácidos nucleicos e fosfato de ácido nucleico. Estudo piloto com amostras de saliva foi capaz de discriminar os grupos caso e controle. Conclusão: Concluímos que o ATR-FTIR discriminou com sucesso as amostras de pacientes com câncer oral dos indivíduos

saudáveis usando amostras de plasma, com ácidos nucleicos sendo encontrados como biomarcadores principais.

Palavras-chave: biomarcador, ATR-FTIR, ácidos nucleicos, câncer oral, diagnóstico molecular.

NEW APPROACHES IN THE NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF ORAL CANCER USING FTIR SPECTROSCOPY ON BLOOD AND SALIVA SAMPLES

ABSTRACT

THEBIT, M.M. **New approaches in the non-invasive diagnosis of oral cancer using FTIR spectroscopy on blood and saliva samples.** 2021. 75f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Program, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Oral cancer is usually diagnosed through invasive methods, for although systemic changes can be easily detected, the identification of an effective systemic biomarker using a simple and affordable approach has yet to take place. Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) appears as an alternative for the chemical and structural characterization of organic and inorganic materials, including liquid samples as serum, plasma and saliva and a possible bridge between molecular analysis and clinical practice.

Objective: The aim of this study was to evaluate if ATR-FTIR spectroscopy can be applied as a tool in oral cancer screening through the analysis of plasma and salivary samples.

Methodology: Plasma and saliva samples from oral cancer patients and controls were analyzed by ATR-FTIR spectroscopy. Experimental data were fed into the MATLAB 2018b software and then analyzed through two different routines in order to identify points of differentiations between the groups.

Results: Biochemical analysis of the plasma samples through ATR-FTIR yielded 92% sensitivity and 100% specificity in differentiating between groups. The biggest difference was found between peaks that might be related to nucleic acids and nucleic acid phosphate. Pilot study with salivary samples reached similar accuracy **Conclusion:** We conclude that ATR-FTIR successfully discriminated between oral cancer patients and healthy subjects using plasma samples, with nucleic acids being found as major biomarkers.

Key words: biomarker, ATR-FTIR, nucleic acids, oral cancer, molecular diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sítios anatômicos da cavidade oral.....	18
Figura 2: Biofluidos utilizados em biópsia líquida e recentes artigos publicados acerca dos mesmos.....	25
Figura 3: Descrição da técnica ATR-FTIR.....	30
Figura 4: Fluxograma de atendimento ao paciente oncológico.....	32
Figura 5: Representação esquemática passo a passo do estudo.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação TNM para tumores da Cavidade Oral (2018) 19

Tabela 2: Relação entre modos vibracionais e composição molecular 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC Comitê Conjunto Americano de Estadiamento de Câncer (do inglês American Joint Committee on Cancer)

ATR-FTIR Reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Attenuated Total Reflection - Fourier Transform. Infrared)

DNA Ácido desoxirribonucleico

IARC Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês International Agency for Research on Cancer)

qPCR Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (do inglês Real Time Polymerase Chain Reaction)

TNM Expressão correspondente por extenso

UICC União Internacional de Controle do Câncer (do inglês Union for International Cancer Control)

HUCAM Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

NDB/UFES Núcleo de Diagnóstico Bucal / Universidade Federal do Espírito Santo

RNA Ácido Ribonucleico

PCA Análise de Componente Principal (do inglês Principal Component Analysis)

PC Componente Principal (do inglês Principal Component)

CT Controle

CA Câncer

NHS England Serviço de Saúde Nacional da Inglaterra (do inglês National Health
Service England)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER DE CAVIDADE ORAL.....	17
1.2 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.....	21
1.3 BIÓPSIA LÍQUIDA.....	23
1.3.1 Biópsia líquida no carcinoma de cavidade oral	26
1.3.2 A saliva como amostra biológica	27
1.4 ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR.....	28
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 INFORMAÇÕES DO PACIENTE E AMOSTRAS CLÍNICAS.....	35
3.1.1 Aquisição das amostras	36
3.2 ESPECTROSCOPIA FT-IR.....	36
3.3 PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS	37
3.4 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÕES	69

6 PERSPECTIVAS	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	76
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CAVIDADE ORAL

O câncer de cavidade oral é uma das formas de neoplasia mais prevalentes em todo o mundo. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), são esperados 377. 713 novos casos no ano corrente. Para os homens brasileiros, a taxa de incidência está em torno de 5%(DE OLIVEIRA SANTOS, 2020). Segundo o relatório sobre o cenário assistencial e epidemiológico do câncer de lábio e cavidade oral no Brasil apresentado pelo Ministério da Saúde em 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020) os homens representam 77% da taxa de óbito e são maioria na demanda por radioterapia e quimioterapia relacionados ao câncer de lábios e cavidade oral no Brasil enquanto as mulheres são maioria na realização de coleta de material para biópsia/punção.

A cavidade oral é definida como o espaço anatômico que fica entre um plano coronal imaginário traçado da junção do palato mole e duro e as papilas circunvaladas da língua até o vermelhão dos lábios. Quando nos referimos a câncer de cavidade oral estamos falando de neoplasias que acometem os lábios, os 2/3 anteriores da língua, o soalho bucal, a mucosa jugal, o palato duro, a gengiva alveolar e o trígono retro molar (WONG; WIESENFELD, 2018), estruturas essas apresentadas na Figura 1.. A região posterior da língua e o palato mole são chamados região de orofaringe e são geralmente acometidos por neoplasias de comportamento diferente do observado na cavidade oral.

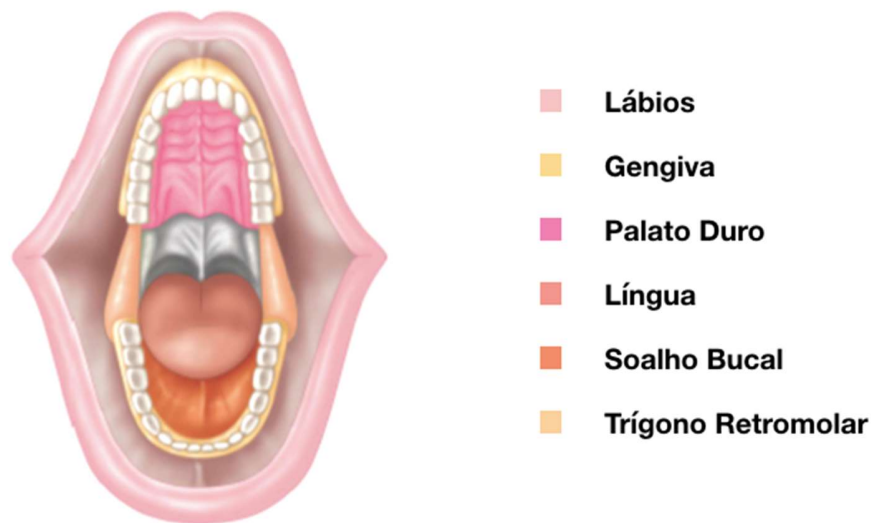


Figura 1: Sítios anatômicos da cavidade oral

O tipo mais comum de tumor maligno bucal é o carcinoma de células escamosas (CEC). O CEC é uma neoplasia com origem no epitélio de revestimento e é responsável por 95% das neoplasias orais diagnosticadas (RHODUS; KERR; PATEL, 2014). Apesar dos avanços alcançados no tratamento, o carcinoma epidermóide de cavidade oral apresenta baixa sobrevida global em 5 anos em aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados. A maioria dos pacientes são diagnosticados em estadiamento avançado impactando negativamente o prognóstico (BRENER, 2007; GOMES et al., 2019; PEREA et al., 2018).

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) pode ser precedido por lesões potencialmente malignizáveis, apresentando-se como alterações brancas (leucoplasias), vermelhas (eritroplasias) e/ou brancas e vermelhas (eritroleucoplasias). A leucoplasia é a lesão potencialmente malignizável mais prevalente e tem o tabagismo como importante fator etiológico. As taxas de transformação maligna destas lesões são incertas, variando entre 0,5% a 34%. O diagnóstico diferencial destas lesões geralmente é feito com auxílio de biópsia seguida por análise histopatológica (VAN DER WAAL, 2014; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016).

A *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e a União Internacional de Controle do Câncer (UICC) utilizam o sistema TNM para estabelecer o estadiamento das neoplasias de cavidade oral. A classificação TNM aborda a extensão anatômica do tumor primário(T), a ausência ou presença de comprometimento de linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase a distância (M) para determinar o estadiamento do quadro (HUANG; O’SULLIVAN, 2017). O sistema TNM é uma importante ferramenta de unificação de linguagem científica e clínica da abordagem dos tumores de cavidade oral e está descrita na tabela 01.

Tabela 1: Classificação TNM para tumores da Cavidade Oral (2018)

T	TUMOR PRIMÁRIO
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor de 2 cm ou menos nas maiores dimensões e até 5 mm de profundidade de invasão
T2	Tumor com mais de 2 cm nas maiores dimensões e entre 5 a 10 mm de profundidade de invasão ou tumor de mais de 2 cm e menor ou igual que 4 cm nas maiores dimensões e profundidade de invasão de até 10 mm
T3	Tumor com mais de 4 cm nas maiores dimensões ou mais de 10 mm de profundidade de invasão
T4a	Tumor invade somente as estruturas adjacentes (por exemplo, através do osso cortical da mandíbula ou da maxila ou invade a pele da face)
T4b	Tumor invade o espaço mastigatório, placas pterigoideas ou base do crânio, ou circunferencialmente a artéria carótida interna

N	ESTADIAMENTO LINFONODAL
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástases em linfonodos regionais
N1	Linfonodo regional único, ipsilateral ao tumor e com 3 cm ou menos nas maiores dimensões, sem extravasamento capsular
N2a	Linfonodo regional único, ipsilateral ao tumor, com tamanho entre 3 e 6 cm, sem extravasamento capsular
N2b	Múltiplos linfonodos regionais comprometidos, ipsilateral ao tumor, nenhum com mais de 6 cm nas suas maiores dimensões, sem extravasamento capsular
N2c	Linfonodos regionais bilaterais ou contralaterais comprometidos, nenhum maior que 6 cm em sua maior dimensão, sem extravasamento capsular
N3a	Linfonodo regional comprometido com mais de 6 cm em sua maior dimensão, sem extravasamento capsular
N3b	Metástases em um ou mais linfonodos com extravasamento capsular (a presença de envolvimento da pele ou invasão de tecidos moles com fixação da musculatura ou estruturas adjacentes ou sinais clínicos de envolvimento neural, classificado como extensão extracapsular clínica)
M	METÁSTASE DE DISTÂNCIA
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Presença de metástases a distância

Muitos fatores etiológico podem estar relacionados ao câncer bucal, sendo a exposição ao tabaco, o uso prolongado de álcool e a infecção pelo vírus do papiloma humano os mais bem estabelecidos (KUMAR *et al.*, 2016). O tabagismo especificamente, figura como fator de risco inegável para diversas neoplasias, desde o câncer do trato aerodigestivo ao câncer de trato urinário(VINEIS *et al.*, 2004). O consumo de álcool e tabaco estão diretamente relacionados ao risco de desenvolver câncer de cabeça e pescoço (incluído câncer de cavidade oral), sendo o uso de tabaco um expressivo fator de risco (ZHANG *et al.*, 2015). O papel isolado do consumo de álcool ainda não foi bem

estabelecido (HOES; DOK; VERSTREPEN, 2021) e alguns estudos sugerem que seu efeito se dá majoritariamente como potencializador dos efeitos do tabaco não apresentando, desta forma, efeito deletério com seu uso isolado (FERREIRA ANTUNES et al., 2013).

O diagnóstico tardio faz com que o prognóstico deste tipo de neoplasia se torne desfavorável reforçando a ideia de que exista urgência em se ampliar o acesso não só ao tratamento, mas aos serviços de diagnóstico especializado principalmente pelos grupos de risco.

1.2 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Atualmente o padrão ouro em identificação e categorização do câncer bucal é a biópsia seguida de análise histopatológica (CARRERAS-TORRAS; GAY-ESCODA, 2015; CHEN *et al.*, 2016). A identificação do estágio inicial e a diferenciação entre lesões malignas e potencialmente malignizáveis (leucoplasias, eritoplasias) permanece um desafio, com isto o consenso sobre a melhor técnica a ser adotada ainda não foi alcançado (LÓPEZ-LÓPEZ; OMAÑA-CEPEDA; JANÉ-SALAS, 2015; RAJMOHAN *et al.*, 2012). A precisão de técnicas subjetivas (avaliação visual ou leitura de lâminas histopatológicas) pode variar de acordo com a experiência do operador enquanto o emprego de técnicas objetivas (análise molecular) é inviabilizado pelo alto custo dos insumos e pela utilização equipamentos sofisticados e de difícil acesso.

Visando maior precisão no diagnóstico, diferentes métodos, como coloração vital, detecção baseada em luz, análise histológica e citológica e por técnica de imagem vem sendo empregados na rotina clínica. A coloração vital tem sido usada principalmente associada à biópsia incisiva auxiliando na identificação das áreas mais adequadas para a remoção do tecido a ser avaliado. Azul de toluidina, ácido acético 5% e azul de metileno

são os pigmentos mais comuns. A maioria deles apresenta boa sensibilidade, mas com baixa especificidade (EPSTEIN; SCULLY; SPINELLI, 1992).

Na detecção baseada em luz, podemos mencionar o VELscope® que é um dispositivo para visualização direta de alterações do tecido da cavidade oral através de fluorescência. Apesar de seu método simples, apresenta alto custo e não foi capaz de distinguir lesão oral benigna, displasia ou CEC, apresentando grande número de testes falso-positivos (COSCI *et al.*, 2016; KOCH; KAEMMERER; *et al.*, 2011; MORO *et al.*, 2010).

A citologia esfoliativa é outro método não invasivo que muitas vezes não é capaz de diferenciar as células neoplásicas das displásicas (KOCH; KUNKEL; *et al.*, 2011). Outra limitação é o fato de que locais diferentes, da mesma lesão, podem apresentar diferentes graus de transformação maligna, nos induzindo a um diagnóstico errôneo.

Assim como a citologia esfoliativa, a biópsia incisional pode ser realizada em local errôneo e comprometer a avaliação do quadro (CHEN *et al.*, 2016). Biópsias multirregionais e seriadas no intuito de acessar o tumor em sua totalidade não são recomendadas devido ao custo e aos riscos inerentes ao procedimento cirúrgico.

Os exames de imagem ajudam a elucidar a extensão das lesões e sua invasividade. O prognóstico e a eleição terapêutica são feitos a partir dessas informações. A técnica de medicina nuclear, mais precisamente a tomografia por emissão de pósitrons (PET), mostra-se eficaz na identificação de doenças residuais após o tratamento. Uma segunda avaliação PET melhorou a sobrevida livre de doença dos pacientes (LIAO *et al.*, 2012) no entanto, esse tipo de avaliação está distante de grande parte da população principalmente pelo alto custo.

Nos últimos anos, as taxas de sobrevida alteraram pouco apesar dos esforços na evolução das terapias oncológicas e das técnicas cirúrgicas. A morbidade relacionada à terapia diminuiu significativamente a qualidade de vida dos pacientes, estando também diretamente relacionadas ao estágio em que a doença é diagnosticada. Um melhor desfecho depende, entre outros fatores, do diagnóstico precoce e da boa vigilância, visto que esse tipo de câncer apresenta alta recorrência loco-regional. No entanto, as técnicas

tradicionais de rastreamento ainda não conseguem, sozinhas, alcançar a detecção precoce (CARRERAS-TORRAS; GAY-ESCODA, 2015; RHODUS; KERR; PATEL, 2014).

1.3 BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia convencional continua sendo o método padrão ouro para o diagnóstico e categorização do câncer, entretanto, sendo uma técnica invasiva e onerosa, como todo procedimento cirúrgico apresenta risco de complicações e limitações de indicação relacionadas principalmente ao estado de saúde do paciente.

Todas as técnicas descritas até agora partem de um exame oral convencional. Para a aplicação de todas essas técnicas o paciente deve primeiro ser examinado por um profissional treinado e uma lesão visível deve estar presente. Nenhum desses métodos pode ser usado para rastrear a população de alto risco. Para tanto, pesquisadores estão focados na descoberta de novos métodos não invasivos de diagnóstico e avaliação do desenvolvimento tumoral e da resposta terapêutica em tempo real. Nesse sentido, o campo dos biomarcadores sanguíneos surgiu como uma revolução em múltiplas áreas do diagnóstico oncológico e da medicina de precisão (FORSHEW *et al.*, 2012; SIRAVEGNA *et al.*, 2017; STROTMAN *et al.*, 2016)

A identificação de biomarcadores tumorais sistêmicos é conhecida como Biópsia Líquida e surge como uma ferramenta promissora contra a mortalidade e morbidade por câncer (STROTMAN *et al.*, 2016).

É estabelecido que a presença de tumores sólidos leva a alterações sistêmicas, embora estudos anteriores divergem quanto aos parâmetros avaliados. Para detectar os primeiros traços de tumores sólidos (por exemplo, tumores de cavidade oral), biomarcadores moleculares específicos foram investigados em um nível sistêmico.

Este tipo de abordagem se mostra realmente necessário quando contemplamos a natureza heterogênea dos tumores sólidos. Young, E. (2014) compara a abordagem diagnóstica por biópsias à tentativa de se caracterizar uma cidade inteira através de uma única rua e enfatiza que, um desvio por milímetros em uma biópsia pode alterar todo o curso e prognóstico da doença. Além disso, devemos lembrar que o ambiente tumoral é um ambiente dinâmico, que se altera, seja por pressões no próprio grupo de células, como por erros de replicação no correr do tempo. Avaliar estas alterações em nível sistêmico nos daria acesso a todo este “universo” neoplásico na totalidade de sua composição (SIRAVEGNA *et al.*, 2017; STROTMAN *et al.*, 2016; YONG, 2014). A possibilidade de avaliar as mutações identificáveis em amostras sanguíneas no curso da doença/tratamento levou a sugestão de uma nova classificação de estadiamento, e então passaríamos de TNM para TNMB (tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, metástase e avaliação sanguínea) (HUANG *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018).

Esse tipo de avaliação pode ser feito não apenas no sangue, mas em diferentes biofluidos como urina, saliva, sêmen, suor e expectoração (SIRAVEGNA *et al.*, 2017) como exemplificado na figura 02. A maioria dos artigos concentra seus esforços no diagnóstico de precisão e no tratamento personalizado tentando através das amostras não só quantificar biomarcadores como identificar mutações somáticas através da categorização de células (ou fragmentos de células) tumorais circulantes (BETTEGOWDA *et al.*, 2014; DIEHL *et al.*, 2008; FORSHEW *et al.*, 2012).

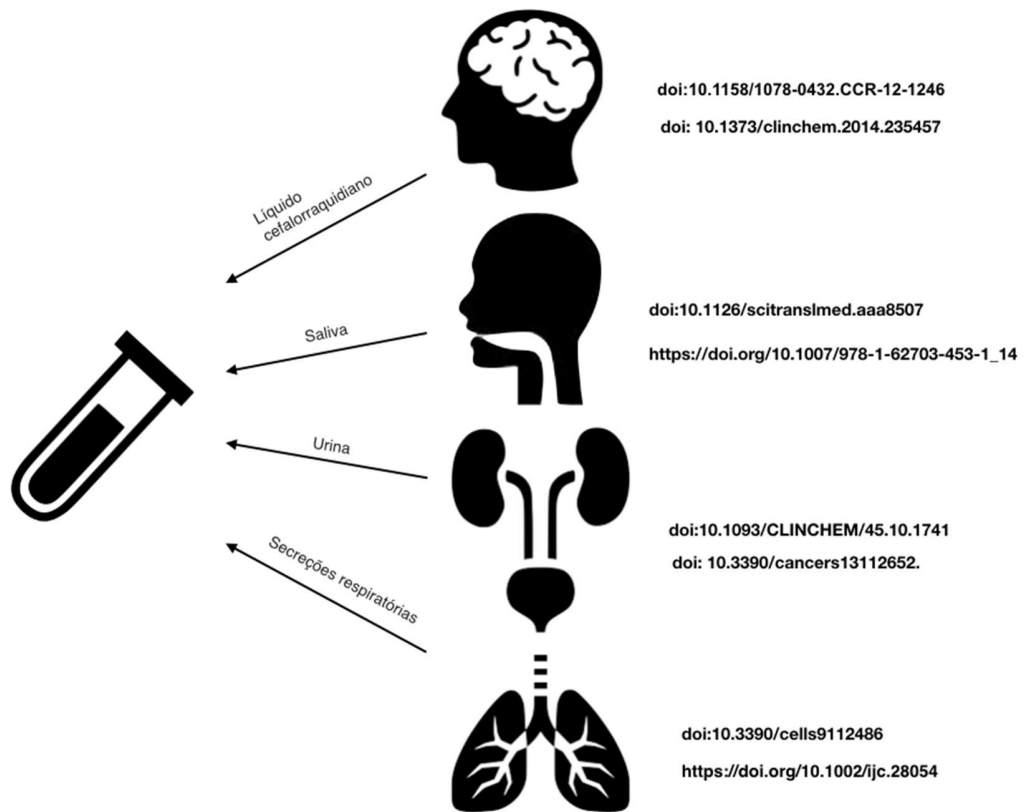


Figura 2: Biofluidos utilizados em biópsia líquida e recentes artigos publicados acerca dos mesmos.

As células tumorais circulantes se originam principalmente de eventos apoptóticos ou necróticos no microambiente tumoral e configuram o processo inicial para a liberação de ácidos nucleicos tumorais no tecido circundante. Esse fenômeno pode ser resultado do rápido crescimento e aumento do turnover frequentemente observado nas transformações e proliferações neoplásicas (FICI, 2019).

O isolamento da sequência de nucleotídeos tumorais no sangue possibilitou as técnicas de identificação de rearranjos somáticos, uma abordagem extremamente sensível e aplicável para monitorar o status da doença e elaborar a proposta terapêutica. A correspondência entre o DNA mutante de tumores sólidos e aqueles isolados em amostras de plasma de pacientes é relatada em câncer de mama (BEAVER *et al.*, 2014;

DAWSON *et al.*, 2013), ovário (FORSHEW *et al.*, 2012) e pulmão (NEWMAN *et al.*, 2014; VAN DER DRIFT *et al.*, 2010). Recentemente, o laboratório inglês GRAIL, em conjunto com o serviço de saúde nacional da Inglaterra (NHS England) anunciaram um grande estudo (165.000 pacientes) de triagem para mais de 50 tipos de tumor maligno através da análise molecular em amostras de sangue de pacientes, incluindo assintomáticos (OFMAN *et al.*, 2018). O posicionamento da NHS England gerou grande movimentação na comunidade científica que alerta tanto para alto índice de falsos positivos quanto para a triagem de tumores que não teriam seu curso alterado pelo diagnóstico precoce (TAYLOR, 2020. No entanto, parcela dos comentários positivos se apoiam na estagnação de novas formas de diagnóstico precoce em tumores altamente sensíveis a este parâmetro para o seu desfecho, em destaque os tumores de ovário, pancreático, do esôfago, alguns cânceres sanguíneos e os cânceres de cabeça e pescoço, incluído o de cavidade oral.

1.3.1 Biópsia líquida no carcinoma de cavidade oral

Um estudo com 121 pacientes com câncer de cavidade oral identificou que o DNA livre de células foi significativamente elevado em amostras de plasma de pacientes com câncer oral quando comparado ao grupo controle. Os níveis estavam diretamente correlacionados com tamanho do tumor, metástase em linfonodo cervical, estadiamento avançado e pior prognóstico (LIN *et al.*, 2018). Escores mais altos de miRNA foram encontrados em amostras de soro de pacientes com câncer de cabeça e pescoço quando comparados ao grupo controle (BELLAIRS; HASINA; AGRAWAL, 2017). A avaliação foi feita por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e mostrou que a expressão foi reduzida logo após a intervenção cirúrgica nos casos com bom prognóstico. Grande parte dos estudos que relataram resultados positivos nessa frente empregaram técnicas complexas, dispendiosas e destrutivas de amostras, como Enzyme Linked Immunosorbent Assay e Real Time Polymerase Chain

Reaction (SCHIRMER *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2016), o que dificulta a transição da pesquisa para a abordagem clínica. Quando a hipótese foi avaliada por uma técnica mais simples, como o uso de um nanodrop, não foram encontradas diferenças entre o grupo com câncer oral e o grupo controle (SHUKLA *et al.*, 2013).

1.3.2 A saliva como amostra biológica

A saliva é um fluido fisiológico elaborado a partir da secreção de glândulas salivares. Nela localizamos proteínas produzidas localmente, bem como outras moléculas de circulação sistêmica. Apesar 94 a 99% da saliva ser composta por água nela encontramos glicoproteínas, lipídeos, carboidratos e sais. Seus componentes não são provenientes exclusivamente de secreções das glândulas salivares, incluindo bactérias e seus subprodutos, o fluido crevicular, células esfoliadas e leucócitos. Algumas doenças sistêmicas como Alzheimer e diabetes podem alterar a quantidade e a qualidade da saliva secretada. Estima-se que em condições normais o homem produza entre 0.5 a 1 litro de saliva ao dia, a maior parte (80%) durante a ingestão de alimentos.

A função primordial da saliva é proteger o ambiente bucal, lubrificando e “limpando” as superfícies das mucosas e dentes protegendo-os assim de agressões físicas, químicas ou biológicas. Ela também atua no processo inicial de digestão dos alimentos através de enzimas específicas e auxiliando na formação de um bolo alimentar coeso e revestido por mucina, que facilita a deglutição. Sua atuação na percepção do paladar se dá pela dissolução dos alimentos sólidos possibilitando assim que os mesmos entrem em contato com os receptores gustativos em diferentes regiões da língua (DAWES *et al.*, 2015).

A saliva possui proteínas da imunidade inata (lectoferrina e lisozima) e imunoglobulinas conferindo a ela propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais. Ela também auxilia no processo de cicatrização tecidual e apresenta em sua composição fatores de crescimento como EGF e VEGF.

Os testes salivares são utilizados na detecção do risco de cárie na clínica odontológica a longa data, e sua utilização no diagnóstico de doenças sistêmicas a citar hepatite C e Aids vem se popularizando (MARKOPOULOS; MICHAILIDOU; TZIMAGIORGIS, 2010).

Sua coleta se mostra indolor, não invasiva e de técnica simples. Na coleta em pacientes oncológicos onde lidamos com xerostomia a técnica de coleta através de esponjas depositadas em “poças” de saliva na cavidade oral se mostrou satisfatória (MATTHEWS et al., 2013). A saliva se mostrou um substrato viável para realização de análises genéticas por PCR mesmo quando armazenada em condições consideradas não ideais (NG et al., 2004).

O uso de biomarcadores salivares no diagnóstico, prognóstico e monitoramento terapêutico oncológico vem ganhando destaque. Moléculas como, DNAs, RNAs, proteínas e metabólitos, presentes no sangue, podem também estar presente na saliva (BROZOSKI; SANTOS, 2017; CHOJNOWSKA et al., 2018; WANG et al., 2015; ZHONG et al., 2016).

Na saliva identificamos mais de 2.000 proteínas e peptídeos que estão envolvidos inúmeras diferentes funções biológicas. A avaliação de proteínas salivares através de espectroscopia por Raman se mostrou um método promissor para o diagnóstico não invasivo de câncer de mama (ZHONG et al., 2016) e câncer de cabeça e pescoço (HOLE et al., 2021). Apesar de sua estabilidade e facilidade de coleta, testes empregando saliva como amostra biológica ganharam destaque apenas nos últimos anos, com o avanço das técnicas de análise molecular.

1.4 ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR

Muitas técnicas diferentes foram exploradas para se estabelecer um método de detecção precoce e não invasiva de câncer. Métodos baseados em refletância, fluorescência, e espectroscopia parecem ser muito promissores (CARVALHO, L. F. C. S. et al., 2019; DE

CARVALHO, L. F. C. S.; SAITO NOGUEIRA, 2018; RODRIGUES et al., 2018; SAITO NOGUEIRA et al., 2016, 2021) . Nesse contexto, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) surge como uma opção de método não invasivo e não destrutivo para caracterização química e estrutural de flúidos corporais com preparação mínima de amostra . Este método não requer agentes de contraste e combina a vantagem de tecnologias livres, baseadas em luz e técnicas convencionais de preparo para fluidos corporais. Essa técnica pode ser empregada em quase todos os tipos de amostras biológicas de tecidos a fluidos corporais, incluindo saliva, soro, plasma e urina (ELKINS, 2011; LEAL et al., 2018; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008; OLLESCH et al., 2013; SALA et al., 2020).

A Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica usada para uma caracterização espectral de uma ampla gama de amostras. Ela é capaz de acessar a composição molecular de amostras sem a destruição das mesmas. Uma vez em contato com a amostra, a luz infravermelha é absorvida em frequências específicas diretamente relacionadas às energias vibracionais de ligação dos grupos funcionais presentes na molécula. Diferentes ligações em uma molécula vibram em diferentes energias e, portanto, absorvem diferentes comprimentos de onda da radiação infra vermelha. Nesta técnica temos a utilização de um espelho fixo e um espelho móvel que rebatem o feixe de radiação inicial que converge em um feixe final “variável”, conforme figura 3. Desta forma temos a tomada do resultado de diferentes comprimentos de onda em uma leitura única . A posição (frequência) e intensidade dessas faixas de absorção contribuem para o espectro geral, criando uma impressão digital característica da molécula.

A espectroscopia FTIR tradicional envolve a transmissão direta do feixe infravermelho através da amostra. Já na técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR) a energia da luz passa através de um aparato opticamente transparente e com índice de refração superior ao meio circundante. Ele funciona então como um guia refletindo internamente a energia da luz e produzindo uma onda evanescente que entrará em contato com a amostra. A amostra então absorve parte da energia de acordo com sua composição molecular. Essas absorções atenuam o feixe de infravermelho de uma forma detectável. O feixe de

energia atenuada atinge o detector que fica na extremidade oposta do cristal. A leitura então é feita por um software e apresentado no formato de comprimento de ondas. Temos então a impressão digital da nossa amostra.

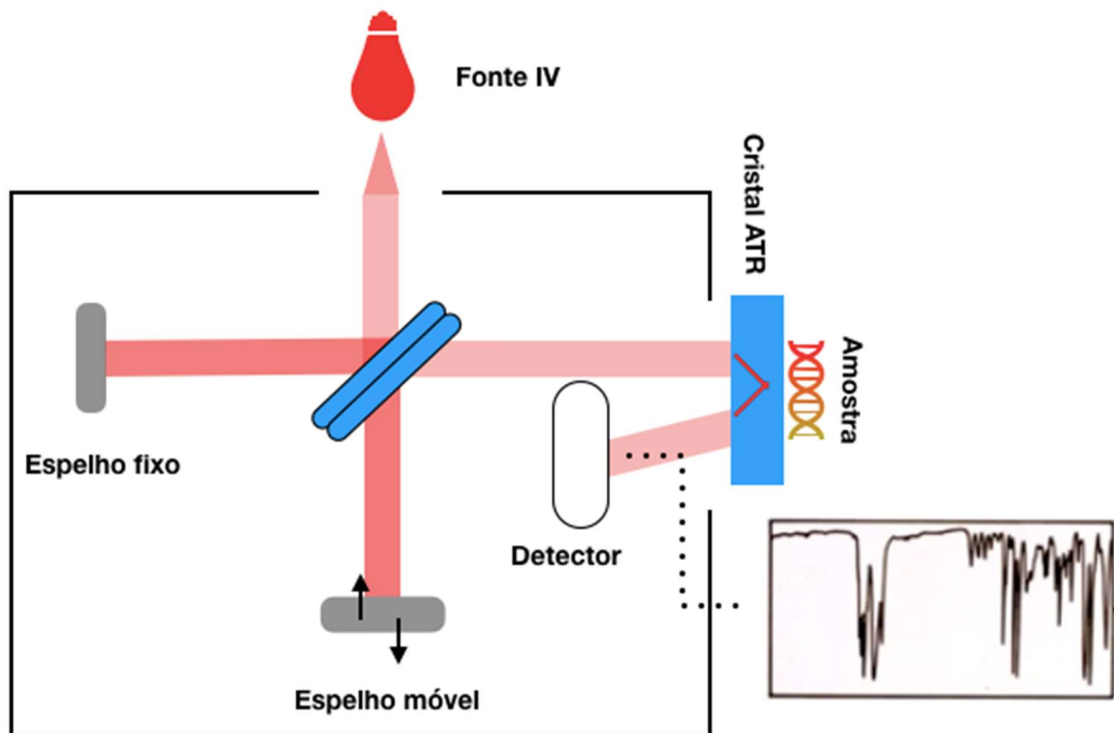


Figura 3: Descrição da técnica ATR-FTIR. A radiação IV entra no interferômetro e se dirige para um rebatedor que o divide o feixe e direciona parte para um espelho móvel e parte para um espelho fixo, os feixes agora divididos retornam ao rebatedor e são direcionados ao cristal atenuante de reflexão onde a amostra está disposta para que ocorra a aquisição dos espectros.

A relação entre os modos vibracionais e a composição molecular de amostras biológicas já foi descrito anteriormente e pode ser visto, no nosso intervalo estudado, na tabela a seguir (tabela 02):

Tabela 2: Relação entre modos vibracionais e composição molecular

Bands	Formation	Group
836	Left-handed helix DNA	DNA
928	Left-handed helix DNA	DNA
991	C-O, ribose, C-C	DNA
1044	Symmetric PO ² in RNA and DNA	Phosphate
1077	Symmetric PO ² stretching	Phosphate
1120	C-O stretching mode	
1243	Asymmetric PO ²	Phosphate
1400	Symmetric stretch of proteins	Protein
1475	CH ₂ bending chains in lipids	Lipids
1513	CH in-plane bend	
1543	Amide II	Protein
1606	Adenine vibration in DNA	DNA
1633	Amide I region	Protein
1653	C=O, C=N, N-H of adenine, thymine, guanine, cytosine	DNA

O recente enfoque na aplicação da espectroscopia vibracional por meio da análise de tecidos e fluidos corporais representa um passo na direção da aplicação clínica dessa

ferramenta, que pode participar de diferentes etapas do processo diagnóstico como representado na figura 04.

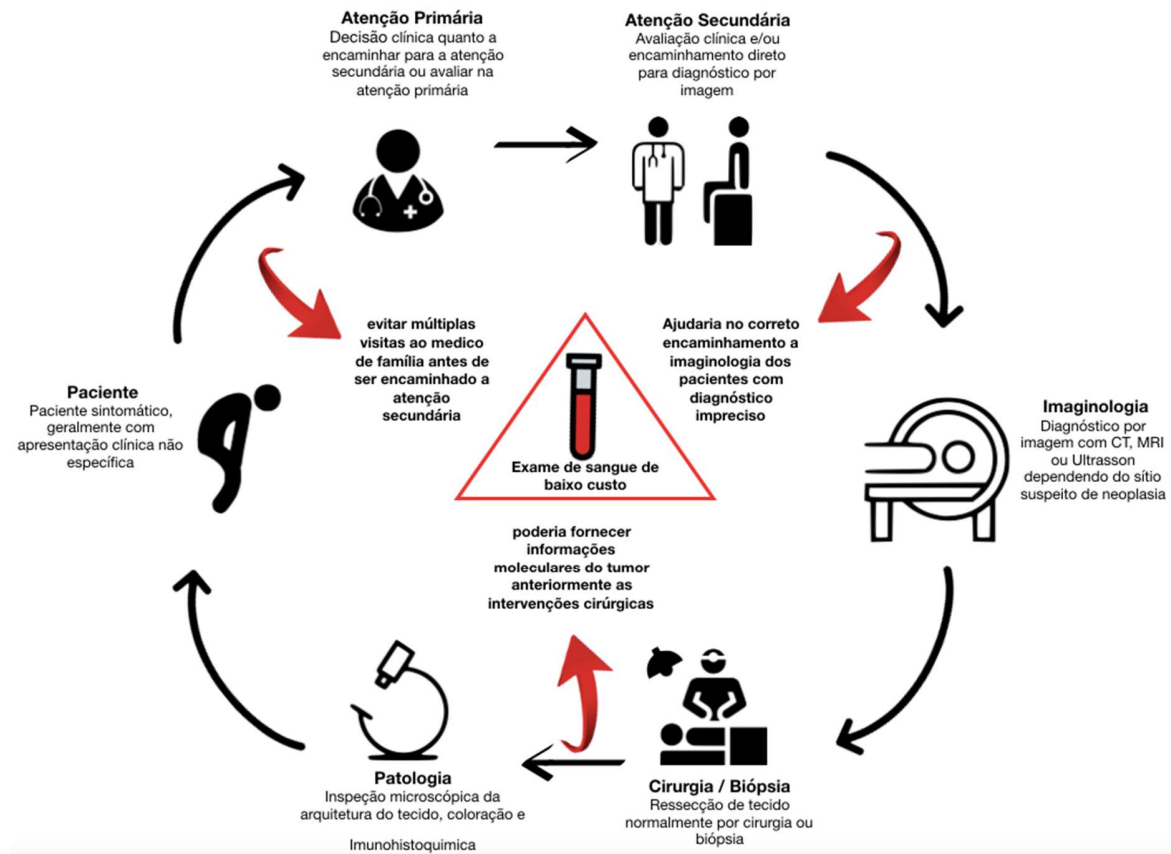


Figura 4: Fluxograma de atendimento ao paciente oncológico. Apresenta o caminho do paciente a partir de sua entrada no sistema de atenção primário até a finalização do diagnóstico sinalizando os pontos de possível aplicação do exame de sangue de baixo custo como facilitador do processo.

Neoplasias de cérebro, pulmão e ovário já foram estudadas com sucesso pela técnica FTIR. Investigação com amostras de urina utilizando modelo de análise semelhante ao empregado em nosso trabalho foi capaz de alcançar sensibilidade de 83% e especificidade de 60% em discriminar amostras de pacientes diagnosticados com câncer de próstata. Uma tentativa de diagnosticar casos de carcinoma in situ de mama alcançou especificidade e sensibilidade superiores a 95%. Esforços em discriminar neoplasias do

trato urinário de doenças inflamatórias em um primeiro momento não obtiveram sucesso oscilando em taxas aceitáveis ou não de sensibilidade e especificidade de acordo com a análise de dados empregada. A tentativa de transladar para a prática clínica até o momento foi dada na triagem de tumores cerebrais. Esforços que remontam de 2014 partem de um estudo piloto com 97 pacientes até um estudo de coorte de 433 pacientes em 2016, atingindo 92,8% de sensibilidade e 91,5% de especificidade. Além da resistência por parte da comunidade médica em lidar com novos métodos de diagnóstico o maior desafio quando falamos de aplicabilidade clínica é a dificuldade em padronizar a técnica. Neste interim quatro pontos do design do estudo, representado na figura 5, se destacam: A coleta da amostra, o armazenamento da amostra, a deposição e secagem da amostra e a padronização dos algoritmos para análise dos dados formados.

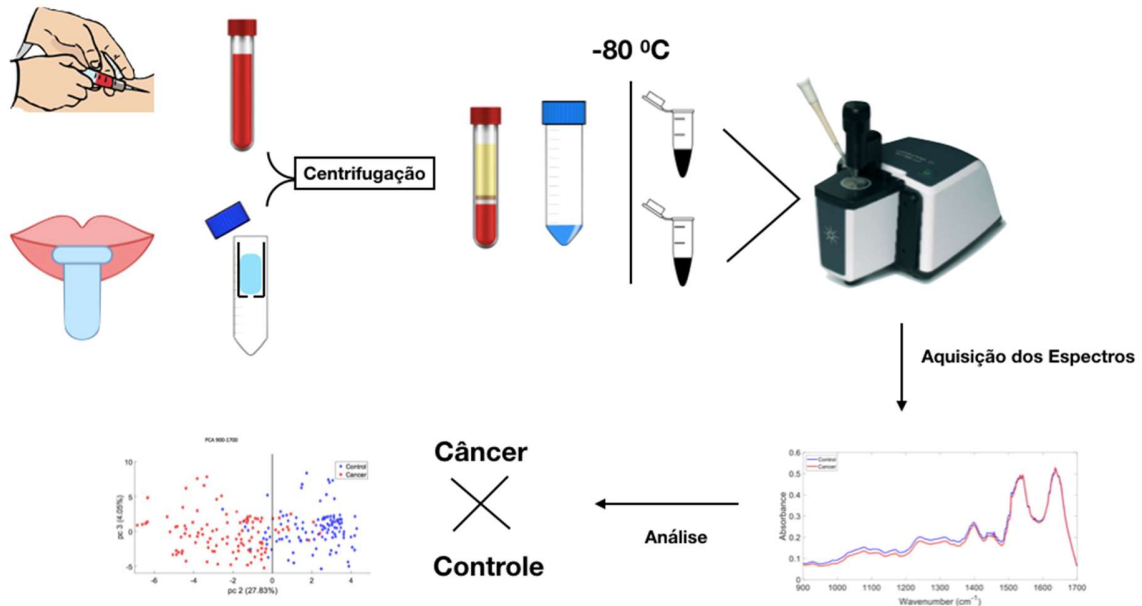


Figura 5: Representação esquemática passo a passo do estudo. O esquema demonstra a complexidade do processo que inclui fase pré experimental com a aquisição e estocagem das amostras, fase analítica de deposição e secagem da amostra no aparelho e fase de análise dos espectros e dados obtidos para posterior tomada de decisão clínica.

Apesar dos recentes avanços é indiscutível a necessidade de estudos mais robustos e com uma amostragem consistente. É neste esforço que conduzimos este estudo preliminar com amostras de sangue e saliva de pacientes diagnosticados com Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral no município de Vitória.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar ATR-FTIR como ferramenta diagnóstica no rastreamento de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral utilizando amostras de sangue e saliva.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil clínico-patológico da população estudada;
- Discriminar entre grupo câncer e não câncer por avaliação das amostras biológicas por ATR-FTIR;
- Identificação dos grupos funcionais envolvidos na diferenciação entre os grupos;
- Avaliar o poder de diferenciação da técnica em diferentes estadiamentos;
- Avaliar a aplicabilidade da técnica em diferentes naturezas amostrais (sangue e saliva).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INFORMAÇÕES DO PACIENTE E AMOSTRAS CLÍNICAS

Para responder aos objetivos foi realizado um estudo observacional analítico transversal incluindo pacientes com câncer atendidos no ambulatório de Cabeça e Pescoço da HUCAM e pelos pacientes encaminhados ao Núcleo de Diagnóstico Bucal - NDB/UFES, com lesões suspeitas de malignidade e lesões com potencial de malignização da cavidade oral. Baseado na rotina de atendimento do serviço acompanhamos 40 pacientes com câncer e 25 com lesões suspeitas de malignidade ou lesões com potencial de malignização.

Foram incluídos neste estudo indivíduos com o diagnóstico histopatológico de CEC ou que apresentaram lesões com características clínicas de leucoplasias, eritroplasias, eritroleucoplasias ou queilites actínicas, de ambos os gêneros, grupos étnicos e que tinham idade maior ou igual a 18 anos. Foram excluídos os casos de CEC recidivante, ou que já foram submetidos à terapia antineoplásica, indivíduos que apresentaram condições sistêmicas debilitantes ou incapacidade intelectual para responder os questionários aplicados e, assim limitantes de sua participação no estudo. Foram excluídos também pacientes submetidos recentemente a procedimentos odontológicos como exodontias, raspagens ou cirurgia de qualquer natureza.

Foram obtidos os dados clínico-patológicos como tempo de evolução, sinais e sintomas no momento do diagnóstico, estadiamento do tumor segundo a classificação TNM (União Internacional contra o Câncer - UICC), localização do tumor, classificação do grau histológico tumoral conforme SBR (Scarff-Bloom-Richardson), história do consumo de álcool e tabaco, além das variáveis, gênero, idade (somente maiores de 18 anos) e etnia.

3.1.1 Aquisição das amostras

As amostras de tecido fresco (tumor e linfonodo), para este estudo, foram obtidas de pacientes com CEC submetidos a cirurgia nos Hospitais HUCAM. Após a excisão, os tecidos foram imediatamente imersos em soluções de RNA Ladder e armazenados a 4 ° C durante 24 horas e em seguida à temperatura de -80 ° C até à sua utilização.

As amostras de leucoplasias, eritroplasias, eritroleucoplasias ou queilites actínicas foram obtidas durante exame de biópsia incisional. As lesões foram fotografadas e mensuradas por régua calibrada. Previamente ao procedimento cirúrgico a região foi corada por azul de toluidina com a remoção de tecido sendo feita na região mais corada.

As amostras de sangue (10 ml) e saliva foram coletadas no hospital e no ambulatório supracitados. A amostra de sangue foi processada separando-se plasma, soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos, e posteriormente acondicionadas por 24 horas à 4 ° C e em seguida à -80 ° C até seu uso. Para estocagem da amostrada de saliva, o rolete de algodão encharcado foi centrifugado e a saliva depositada no fundo do eppendorf foi pipetada e armazenada à -80 ° C.

O teste de Qualidade de vida utilizado foi o EORTC QLQ–C30 *Quality of Life Index*. Se trata de um teste multidimensional, composto por 30 questões que avaliam o paciente nas semanas que precedem a entrevista. O questionário aborda questões gerais sobre como sintomas, comprometimento psicológico, interação social, auto-observação corporal, saúde global e qualidade de vida.

3.2 ESPECTROSCOPIA FT-IR

A instrumentação ATR-FTIR compreende um espectrômetro de portátil FTIR (Cary 630 FTIR Spectrometer, Agilent, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) equipado com um cristal ZnSe . Os espectros foram registrados na faixa de número de onda de 650 a 4000

cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹. Para cada medição, 4 µl de plasma foram colocados diretamente sobre o cristal. Para secar a amostra ao ar, o tempo médio de espera antes de iniciar a primeira medição de FTIR foi de seis minutos. A análise foi realizada com 32 varreduras de espectro e 32 varreduras de fundo. Coletamos 3 espectros por amostra e geramos um total de 102 espectros (51 para o grupo CT e 51 para o grupo CA). Após cada análise, a amostra foi retirada do cristal com papel absorvente e o cristal foi limpo com água milliQ e álcool 70% para remoção total, evitando-se contaminação entre as amostras.

3.3 PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS

Os dados experimentais foram importados no software MATLAB, ambiente 2018b utilizando rotinas caseiras. Em primeiro lugar, os espectros de FTIR brutos das amostras de plasma foram corrigidos de fundo e normalizados para o vetor. Em seguida, os espectros de FTIR foram suavizados usando um filtro Savitsky-Golay (2ª ordem polinomial usando 13 pontos) a fim de remover o ruído de alta frequência, mantendo os picos de absorção infravermelho. Em seguida, os dados de FTIR foram divididos em região espectral de impressão digital (650-1800 cm⁻¹) e região de alto número de onda (2800-3100 cm⁻¹). A “região silenciosa” (1800-2800 cm⁻¹) e os números de onda acima de 3100 cm⁻¹ (dominada pelo sinal de água residual) foram removidos da análise. As regiões espectrais analisadas foram vetorizadas normalizadas separadamente.

3.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

Após o pré-processamento e divisão dos dados FTIR em impressão digital e regiões de alto número de onda, eles foram centrados na média e processados usando a Análise de Componentes Principais (PCA). PCA é uma transformação ortogonal do conjunto de dados original em um novo sistema de base ortogonal composto por variáveis com maior variância explicada no conjunto de dados. Essas variáveis (componentes principais ou PCs) são linearmente independentes e ordenadas da maior para a menor variância explicada. Neste estudo, consideramos os dois primeiros PCs com a maior variância explicada para a classificação dos grupos CT e CA, uma vez que esses PCs representaram mais de 95% da variância total do conjunto de dados.

O peso (carregamento) de cada variável original (número de onda) na composição de um PC determina o quanto o PC é influenciado por aquela variável. A combinação de pesos (carregamentos de PC) indica as regiões espectrais que influenciam a maior parte da variância do conjunto de dados. Os novos valores de cada espectro de FTIR nas coordenadas do PC são chamados de escores do PC, que foram usados para avaliar a diferenciação entre os grupos CT e CA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presente seção será apresentada em formato de dois artigos.

- 1) A NEW APPROACH FOR THE CLINICAL DIAGNOSIS OF ORAL CANCER USING MULTIVARIATE DATA ANALYSIS TOOLS COMBINED WITH FTIR SPECTROSCOPY” submetido e aguardando apreciação
- 2) “LASER THERAPY AS A PREVENTIVE APPROACH FOR ORAL MUCOSITIS IN CANCER PATIENTS UNDERGOING CHEMOTHERAPY: THE POTENTIAL ROLE OF SUPEROXIDE DISMUTASE” publicado (DOI:10.31557/APJCP.2021.22.10.3211).

Artigo Submetido ao Journal Applied of Oral Science

A NEW APPROACH FOR THE CLINICAL DIAGNOSIS OF ORAL CANCER USING MULTIVARIATE DATA ANALYSIS TOOLS COMBINED WITH FTIR SPECTROSCOPY

Marcela Thebit¹, Leonardo Leal², Daniely De Nardi², Lucas Bonela¹, Marcelo Saito Nogueira³, Priscila Castro⁴, Valério Barauna², Luis Felipe Carvalho⁴, and Sonia Gouvea².

1. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Departamento de Biotecnologia, Vitória, Espírito Santo, Brasil.
2. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Departamento de Ciências Fisiológicas, Vitória, Espírito Santo, Brasil.
3. University College Cork (UCC), Tyndall National Institute, Cork, Irlanda.
4. Universidade de Taubaté, Taubaté, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: marcela.thebit@gmail.com, Av. Marechal Campos, 1468, Vitória - ES, Brasil. Código postal: 29043-900, Tel.: +55 27 3335-7342/ 981527133, Fax: +55 27 3335-7330.
Marcela Marçal Thebit.

Abstract:

Introduction: Oral cancer is usually diagnosed through invasive methods, for although systemic changes can be easily detected, the identification of an effective systemic biomarker using a simple and affordable approach has yet to take place. Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) appears as an alternative for the

chemical and structural characterization of organic and inorganic materials, including liquid samples as serum and plasma. **Objective:** The aim of this study was to evaluate if ATR-FTIR spectroscopy can be applied as a tool in oral cancer screening through the analysis of plasma samples. **Methodology:** For this, we analyzed 74 plasma samples (37 controls and 37 oral cancer patients). Samples were analyzed for their nature using small amount of plasma in triplicate readings. Experimental data were fed into the MATLAB 2018b software and them analysed through two diferent rotines in order to identify points of differentiations between the groups. **Results:** Biochemical analysis of the plasma samples through ATR-FTIR yielded 92% sensitivity and 100% specificity in differentiating between groups. The biggest difference was found between peaks that might be related to nucleic acids and nucleic acid phosphate. **Conclusion:** We conclude that ATR-FTIR successfully discriminated between oral cancer patients and healthy subjects using plasma samples, with nucleic acids being found as major biomarkers.

Keywords: Cancer Screening, ATR-FTIR, Cell-Free Nucleic Acids, Molecular Diagnostic Techniques, Blood Chemical Analysis

1. INTRODUCTION

Oral cancer is one of the most prevalent forms of neoplasia worldwide. It is the 11th most common type of cancer in men, with a 2.6% incidence rate. According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), 377. 713 new cases are expected (GLOBOCAN, 2020). For Brazilian men, the incidence rate is around 5% (INCA, 2020). The most common type of oral tumor is the squamous cell carcinoma (OSCC) (RHODUS; KERR; PATEL, 2014) which has a poor 5-year overall survival in approximately 50% of diagnosed patients, despite the advances reached in cancer care (BELAIRS; HASINA; AGRAWAL, 2017). Modern diagnosis employs specialized clinical examination, image exams, and

histological and molecular evaluations of the biopsied tissue (CARRERAS-TORRAS; GAY-ESCODA, 2015; CHEN et al 2016; SCHIRMER et al, 2018). Many etiological risk factors can be related to oral cancer, with tobacco exposure, sustained alcohol abuse, and oncogenic human papilloma virus infection being the most well established ones (KUMAR et al, 2016; ZANG et al, 2015). In spite of the effort towards better oncologic treatment and surgery techniques, survival rates have been poorly improved. Morbidities related to the therapy significantly decrease the patients' quality of life, being also directly related to the stage in which the disease is diagnosed (BELAIRS; HASINA; AGRAWAL, 2017). A better outcome depends, among other factors, on early diagnosis and good surveillance, as this type of cancer has high locoregional recurrence (SALA, 2020). However, traditional screening techniques fail to achieve early detection on their own (CARRERAS-TORRAS; GAY-ESCODA, 2015).

Although conventional biopsy remains the gold standard method for cancer diagnosis and categorization, it is an invasive, costly technique (CHEN et al 2016). Besides, much like all surgery procedures, it carries a risk of complications and has contraindications related to the patients' health status (BELAIRS; HASINA; AGRAWAL, 2017). Since multiple or even serial biopsies are not a feasible option to accurately evaluate tumor progression, staging, or therapy response, an effort to identify a less invasive method to monitor the status of the disease is necessary. The identification of systemic tumor biomarkers emerges as a promising tool against cancer mortality and comorbidity (NONAKA; WONG, 2018). It has already been established that the presence of solid tumors leads to systemic alterations, even though previous studies differ regarding the parameters assessed. To detect the first traces of solid tumors (e.g., oral tumors), specific molecular biomarkers have been investigated at a systemic level (LOUSADA-FERNANDES et al, 2018; SIRAVEGNA et al, 2017; STROTMAN et al, 2016). One type of study line focuses on the categorization of circulating tumor cells (CTC). CTC originate mainly from apoptotic or necrotic events at the tumor microenvironment and can be the starting process for the release of tumor nucleic acids – for instance, DNA – in the surrounding tissue (BABJI et al, 2019; BELAIRS; HASINA; AGRAWAL, 2017; DIEHL et al, 2008). This phenomenon can be the result of the rapid growth and increased turnover often observed in neoplastic transformations and proliferation. Nevertheless, almost all studies that reported positive

results on that front employed complex, dispendious, and sample destructive techniques, such as Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Real Time Polymerase Chain Reaction (BEAVER et al, 2014; BETTEGOUWDA et al, 2014), what hinders the transition from research to a clinical approach.

Many different techniques have been explored to improve the noninvasive, early detection of cancer. Methods based on reflectance, fluorescence, fluorescence lifetime, and Raman scattering using label free imaging and spectroscopy appear to be very promising (CARVALHO et al, 2019; COSCI et al, 2016; NOGUEIRA et al, 2016). In this context, attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR- FTIR) spectroscopy arises as an option of a noninvasive, nondestructive method for chemical and structural characterization of body fluids with minimal sample preparation (LEAL et al, 2018; OLLESCH et al, 2013; TAKAMURA et al, 2018). This method requires no contrast agents and combines the advantage of label free, light based technologies and conventional body fluid techniques, detecting diseases through systemic alterations. This technique can be employed using almost all types of body fluid, including saliva, serum, plasma, and urine. The recent focus on vibrational spectroscopy application through the analysis of tissues and body fluids represents a step towards the clinical application of this diagnostic tool¹⁰.

Thus, the aim of this study was to conduct a plasma evaluation using ATR-FTIR spectroscopy to discriminate between OSCC and healthy patients.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. PATIENT INFORMATION AND CLINICAL SAMPLES

This study was approved by the Institutional Ethics Committee for human subjects (CAAE:62653116.0.0000.5060 CCS/UFES) and performed at the ambulatory of the Cassiano Antônio Moraes University Hospital (HUCAM). It was carried out according to

the Code of Ethics of the World Medical Association. All patients signed an informed consent form before taking part in the study. Samples were collected during the outpatient care, always in the morning (7:00 am to 10:00 pm). Blood samples were collected and centrifuged at 1000 g for 15 min at 4 °C. Plasma was stored at -80 °C until the measurements were performed. The cancer group (CA group) consisted of 37 OSCC patients with diagnoses confirmed by histopathological analysis, whereas the control group (CT group) included 37 healthy subjects free of any oncologic notification.

Inclusion criteria were: patients of both genders, aged over 18 years, with untreated oral cancer, with or without use of tobacco and alcohol. Exclusion criteria were: patients diagnosed with any cancer or under any malignant disease treatment, and the presence of comorbidities such as severe cardiac, renal, and intellectual dysfunction. Clinical data (gender and age) were obtained from medical records. The mean age was similar in both groups (CA = 57.96 ± 9.49 and, CT = 52.67 ± 10.37). The male gender corresponded to 73.53% of the sample as a whole, comprising 88% of cancer patients and 59% of control individuals.

2.2. FTIR SPECTROSCOPY

The ATR-FTIR instrumentation comprises an FTIR benchtop spectrometer (Cary 630 FTIR Spectrometer, Agilent) equipped with diamond crystal. Spectra were recorded in the wavenumber range of 650 to 4000 cm^{-1} , with 4 cm^{-1} resolution. Measurements were taken for each sample in triplicate. For every measurement, 4 μL of plasma was placed directly over the crystal. To allow the sample to air dry, we waited in average six minutes before taking the first FTIR measurement. Analysis was performed with 32 spectra and 32 background scans. After each analysis, the sample was removed from the crystal with absorbent paper and the crystal cleaned with Milli-Q™ water and 70% ethanol for total removal, thus avoiding contamination between samples.

2.3. DATA PRE-PROCESSING

Experimental data were fed into the MATLAB 2018b software using homemade routines. First, raw FTIR spectra of the plasma samples were background corrected and vector normalized. FTIR spectra were then smoothed using a Savitsky-Golay filter (2nd polynomial order using 11 points) to remove high frequency noise, while keeping the infrared absorption peaks. FTIR data were selected in the fingerprint spectral region (900-1700 cm^{-1}), which has the best signal for biological compounds. The spectral regions analyzed were vector normalized separately.

2.4. MULTIVARIATE ANALYSIS

2.4.1. Exploratory analysis

After being preprocessed and selected into fingerprint region, FTIR data were mean centered and processed using Principal Component Analysis (PCA). PCA is an orthogonal transformation from the original dataset into a new orthogonal basis system composed by variables with higher explained variance on the dataset. These variables (principal components or PCs) are linearly independent and ordered from the highest to the lowest explained variance. In this study, we considered the first two PCs with highest explained variance for classification of the CT and CA groups, as these PCs represented more than 95% of the total variance of the dataset.

The weight (loading) of each original variable (wavenumber) on the composition of a PC determines how much it is influenced by that variable. The combination of weights (PC loadings) indicates the spectral regions influencing most of the dataset variance. The new

values of each FTIR spectrum on the PC coordinates are called PC scores, which were used to assess the differentiation between the CT and CA groups.

2.4.2. Classification Analysis

Supervised analysis was used to classify samples into CT and CA groups. Discriminant Analysis (DA) was applied to PCA and Partial Least Squares (PLS) scores obtained from second derivative of the FTIR spectra in the fingerprint region. Cross validation was conducted by leave one patient out method for PCA-DA and PLS-DA. External validation was performed by using the Kennard-Stone method with 80% of spectra in the calibration set and 20% for the blind test set with five PLS latent variables.

3. RESULTS

3.1. CHEMOMETRY AND FTIR ANALYSIS

3.1.1. Mean spectra and second derivative analysis

Mean spectra from the fingerprint region and the second derivative are shown in figures 1 and 2. Blue lines represent the mean of the control group and red lines the mean of the cancer group. There was little difference between groups, in spite of a slightly greater absorbance in the control group.

3.1.2. Principal Component Analysis (PCA) of the Fingerprint Region

While FTIR spectra provide the vibrational modes of each group separately, principal component loadings extracted from PCA provide information about the FTIR peaks responsible for the variance on the dataset containing the control (CT) and cancer (CA) groups. Figure 3 shows the PCA performed with the second derivative of the FTIR spectra (PC2) from the 900-1700 cm^{-1} region, and figure 4 the loading plot for PC2.

In the scatter plot of figure 3, PC1 values above and below zero can be used to differentiate the CT and CA groups. By using the differentiation provided by PC2 (27.83% of explained variance), 91.1% sensitivity and 87.4% specificity were obtained.

The loading plot for PC2 shown in figure 4 suggests that the fingerprint spectral peaks responsible for oral cancer identification can be attributed to nucleic acids and nucleic acid phosphate groups (1027, 1224, 1383, 1462, 1487, 1495, 1511, 1526, 1582, 1590 cm^{-1}), as well as to proteins (1355, 1420, 1450, 1467, 1480, 1517, 1545, 1630 cm^{-1}).

By using the loadings of the PC component with the second biggest variance (PC2), we listed the vibrational modes that only appeared in the PC loadings in addition to the peaks previously observed in the ATR spectra. These vibrational modes and associated compounds are shown in table 1.

3.1.3. PLS-DA

PLS-DA was applied to the second derivative of the FTIR spectra in the fingerprint regions. It revealed 99% sensibility, 98% specificity, and an AUC with 99% accuracy in differentiating between CA and CT. The most important peaks according to this analysis were similar to those of the PCA Loading Plot, that is, nucleic acids and nucleic acid phosphate groups (1383, 1462, 1495, 1511, 1526, 1590 cm^{-1}) for the CA group, and proteins (1420, 1480, 1545, 1630 cm^{-1}) for the CT group.

For external validation, we conducted a blind validation with the 20% of the samples that had been separated, having obtained 84.4% sensitivity and 91% specificity, with an accuracy of 82%, as can be seen in figure 5.

4. DISCUSSION

The use of body fluid samples in solid tumors diagnosis remains a challenge. In the present study, we tested for the first time whether an approach using an optical technique (FTIR spectroscopy) to analyze plasma samples would shed light on intrinsic mechanisms involving oral squamous cell carcinoma.

Vibrational modes and structural components of biological samples have been previously described (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008). We performed a similar analysis to access the features of ATR spectra and observed a strong contribution of nucleic acids to these spectra.

A recent review suggested circulating DNA as a promising biomarker in oral cancer detection and monitoring, even though it lacks standardization and sampling (LIN et al, 2018). Considering the high turnover in tumor sites, high apoptosis and necrosis levels are expected, with tumor DNA being released into surrounding tissues (BELAIRS; HASINA; AGRAWAL, 2017). Unfortunately, free tumor DNA has limited applications, for it represents only a small fraction of the total DNA found in body fluids, usually less than 1.0% of the total cell-free DNA (DIEHL et al, 2008). In our study, mean spectra from the fingerprint region distinguished cancer and healthy samples mostly through peaks related to nucleic acids and nucleic acid phosphate groups.

The sources of changes in the nucleic acids peak are still unclear and cannot be assigned to tumoral DNA. It is well known that circulating DNA can originate from several sources, including tumor sites, but its levels can also be affected by infections or inflammatory conditions (LIN et al, 2018). Although there is not a consensus on the main source of increased amounts of cell-free nucleic acids (cfDNA, cfRNA, and miRNA), most studies highlight their presence as disease biomarkers in liquid biopsies (BEAVER et al, 2014; BETTEGOUWDA et al, 2014; DAWSONS et al, 2013; LOUSADA-FERNANDES et al, 2018; MCBRIDE et al, 2010; NEWMAN et al, 2014; SCHLANGER; PANTEL, 2016; SIRAVEGNA *et al.*, 2017). A study that focused on the identification of somatic mutations

showed that tumor DNA was present in 100% of saliva samples from oral cavity cancer patients (WANG et al, 2015). Further studies addressing different body fluids would be necessary to enrich the methodology under discussion.

Early detection of cancer is important to improve survival rates, decrease associated comorbidities, and increase quality of life after and during cancer management. Therefore, there is an urgent need for the validation of simple, low cost, label free, and noninvasive techniques to that end, such as FTIR spectroscopy. The cost of supplies, trained professionals, and laboratory equipment involved in sample preparation for FTIR spectroscopic methods can be minimum compared to the techniques routinely employed, what should contribute to the clinical translation of these methods.

A previous study on colorectal cancer screening revealed that infrared spectral analysis distinguished between cancer, benign lesions, and cancer free groups with satisfactory sensitivity and specificity (BARLEV et al, 2016). In the present study, we achieved 91.1% sensitivity and 87.4% specificity through PC1 evaluation. Previous studies on different types of solid tumors identified 93.3% sensitivity and 87.8% specificity using FTIR to analyze plasma samples, corroborating our findings(BEAVER et al, 2014; BETTEGOUWDA et al, 2014; KHANMOHAMMADI et al, 2007; LOUSADA-FERNANDES et al, 2018; SIRAVEGNA *et al.*, 2017; ZHONG et al, 2016). In turn, the analysis of blood serum samples of cancer patients by Raman spectroscopy yielded 91.2% sensitivity and 96.7% specificity, indicating that a combination of both techniques should be better explored.

When the PLS-DA supervised analysis was employed to distinguish between the CT and CA groups, a sensitivity of 92% and a specificity of 100% were reached. The supervised analysis method distinguished between patients in early stage from those with late stage cancer. This finding points to this technique being potentially useful for therapeutic response follow up. Zhong et al. (2016) stated that the amount of DNA isolated from breast cancer plasma samples was greater than in healthy samples, with lymph node involvement and distant metastasis samples presenting even higher levels, reaffirming the plasmatic nucleic acid identification not only as a diagnostic method but also as a monitoring one.

In general, we could argue that FTIR spectroscopy provides relevant biochemical information concerning plasma samples of oral squamous cell carcinoma patients. In this context, FTIR emerges as a promising method for the evaluation of body fluids with almost no sample preparation, no sample destruction, real time results, and accuracy close to that of gold standard methods (BUTLER et al, 2019; KHANMOHAMMADI et al, 2007; OLLESCH et al., 2013). Thus, further studies should be conducted to ensure this method is made available to clinicians and health professionals, for it can be easily performed by a non-specialist, allowing serial sampling at the assessment of dysplastic changes and during the course of treatment. In the future, additional studies may be carried out to verify whether patients with premalignant lesions or potential risk factors (tobacco/alcohol/Human Papilloma Virus) have different profiles that might be identified by FTIR. That would allow for diagnoses to be made early and at a low cost.

5. CONCLUSIONS

This study describes the application of FTIR for noninvasive oral cancer screening. The method distinguished between cancer and noncancer samples through supervised (PLS-DA) and non-supervised (PCA) analysis. The classification of cancerous and non-cancerous plasma samples was performed with 92% sensitivity and 100% specificity through PLS-DA analysis. The fingerprint spectral peaks responsible for oral cancer identification can be attributed to nucleic acids and nucleic acid phosphate groups. The PLS-DA method was also successful in distinguishing between advanced and early stage cancer samples. The combination of reproducibility, cost effectiveness, real time diagnosis, and protocol simplicity can lead to the broad adoption of FTIR biofluid analysis in the clinical practice.

Acknowledgments: The authors would like to thank the medical team of Cassiano Antônio Moraes University Hospital (HUCAM) for their assistance with the collection of the data, and Multiuser Instrumentation Laboratory LabPetro (UFES, Brazil) for

performing FTIR, measurements (Technical Cooperation Agreements nos. 0050.0022844.06.4).

REFERENCES:

Babji D, Nayak R, Bhat K, Kotrashetti V. Cell-free tumor DNA: Emerging reality in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019; 23(2):273-279. [Internet]. Available from: [http://www.jomfp.in/printarticle.asp?issn=0973-](http://www.jomfp.in/printarticle.asp?issn=0973-029X;year=2019;volume=23;issue=2;spage=273;epage=279;aulast=Babji)

029X;year=2019;volume=23;issue=2;spage=273;epage=279;aulast=Babji

Barlev E, Zelig U, Bar O, Segev C, Mordechai S, Kapelushnik J, et al. A novel method for screening colorectal cancer by infrared spectroscopy of peripheral blood mononuclear cells and plasma. *Journal of Gastroenterology.* 2016 Mar 1;51(3):214–21.

Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clinical Cancer Research.* 2014 May 15;20(10):2643–50.

Bellairs JA, Hasina R, Agrawal N. Tumor DNA: an emerging biomarker in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2017 Sep 1;36(3):515–23.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine.* 2014 Feb 19;6(224).

Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, et al. Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nature Communications.* 2019 Dec 1;10(1).

Carreras-Torras C, Gay-Escoda C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal.* 2015 May 1;20(3): e305–15.

Carvalho LFCS, Nogueira MS, Bhattacharjee T, Neto LPM, Daun L, Mendes TO, et al. In vivo Raman spectroscopic characteristics of different sites of the oral mucosa in healthy volunteers. *Clinical Oral Investigations.* 2019 Jul 1;23(7):3021–31.

Chen S, Forman M, Sadow PM, August M. The Diagnostic Accuracy of Incisional Biopsy in the Oral Cavity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2016 May 1;74(5):959–64.

Cosci A, Nogueira MS, Pratavieira S, Takahama A, Azevedo R de S, Kurachi C. Time-resolved fluorescence spectroscopy for clinical diagnosis of actinic cheilitis. *Biomedical Optics Express*. 2016 Oct 1;7(10):4210.

Data source. GLOBOCAN 2020: Estimated number of new cases in 2020, lip, oral cavity, males, all ages. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-sunburst?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=1&cancer=1&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1

Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013 Mar 28;368(13):1199–209.

Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*. 2008 Sep;14(9):985–90.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimate/2020 – Cancer Incidence in Brazil [Internet]. 2019 [cited 2020 Jul 15]. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

Khanmohammadi M, Ansari MA, Garmarudi AB, Hassanzadeh G, Garoosi G. Cancer diagnosis by discrimination between normal and malignant human blood samples using attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer Investigation*. 2007 Sep;25(6):397–404.

Khanmohammadi M, Rajabi FH, Garmarudi AB, Mohammadzadeh R, Mohammadzadeh R. Chemometrics assisted investigation of variations in infrared spectra of blood samples obtained from women with breast cancer: A new approach for cancer diagnosis. *European Journal of Cancer Care*. 2010 May;19(3):352–9.

Kumar M, Nanavati R, Modi T, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. Vol. 12, From: *Journal of Cancer Research and Therapeutics*.

- Leal LB, Nogueira MS, Canevari RA, Carvalho LFCS. Vibration spectroscopy and body biofluids: Literature review for clinical applications. Vol. 24, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V.; 2018. p. 237–44.
- Lin LH, Chang KW, Kao SY, Cheng HW, Liu CJ. Increased plasma circulating cell-free DNA could be a potential marker for oral cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Nov 1;19(11).
- Lousada-Fernandez F, Rapado-Gonzalez O, Lopez-Cedrun JL, Lopez-Lopez R, Muínelo-Romay L, Suarez-Cunqueiro MM. Liquid biopsy in oral cancer. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
- McBride DJ, Orpana AK, Sotiriou C, Joensuu H, Stephens PJ, Mudie LJ, et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2010 Nov;49(11):1062–9.
- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. Vol. 43, *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008. p. 134–79.
- Newman AM, Bratman S v., To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*. 2014 Apr 13;20(5):548–54.
- Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *Journal of Dental Research*. 2018 Jun 1;97(6):701–8.
- Ollesch J, Drees SL, Heise HM, Behrens T, Brüning T, Gerwert K. FTIR spectroscopy of biofluids revisited: An automated approach to spectral biomarker identification. *Analyst*. 2013 Jul 21;138(14):4092–102.
- Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral Cancer. Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. Vol. 58, *Dental Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2014. p. 315–40.
- Saito Nogueira M, Cosci A, Pratavieira S, Takahama A, Souza Azevedo R, Kurachi C. Evaluation of actinic cheilitis using fluorescence lifetime spectroscopy. In: *Optical Biopsy XIV: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis*. SPIE; 2016. p. 97031U.
- Sala A, Anderson DJ, Brennan PM, Butler HJ, Cameron JM, Jenkinson MD, et al. Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection. Vol. 477, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2020. p. 122–30.

Schirmer MA, Beck J, Leu M, Oellerich M, Rave-Fränk M, Walson PD, et al. Cell-Free plasma DNA for disease stratification and prognosis in head and neck cancer. *Clinical Chemistry*. 2018 Jun 1;64(6):959–70.

Schlange T, Pantel K. Potential of circulating tumor cells as blood-based biomarkers in cancer liquid biopsy. Vol. 17, *Pharmacogenomics*. Future Medicine Ltd.; 2016. p. 183–6.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Vol. 14, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 531–48.

Strotman LN, Millner LM, Valdes R, Linder MW. Liquid Biopsies in Oncology and the Current Regulatory Landscape. Vol. 20, *Molecular Diagnosis and Therapy*. Springer International Publishing; 2016. p. 429–36.

Takamura A, Watanabe K, Akutsu T, Ozawa T. Soft and Robust Identification of Body Fluid Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometric Strategies for Forensic Analysis. *Scientific Reports*. 2018 Dec 1;8(1).

Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Science Translational Medicine* [Internet]. 2015;7(293ra104). Available from: www.ScienceTranslationalMedicine.org

Zhang Y, Wang R, Miao L, Zhu L, Jiang H, Yuan H. Different levels in alcohol and tobacco consumption in head and neck cancer patients from 1957 to 2013. *PLoS ONE*. 2015 Apr 13;10(4).

Zhong L, Cheng F, Lu X, Duan Y, Wang X. Untargeted saliva metabonomics study of breast cancer based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta* [Internet]. 2016;158:351–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.049>

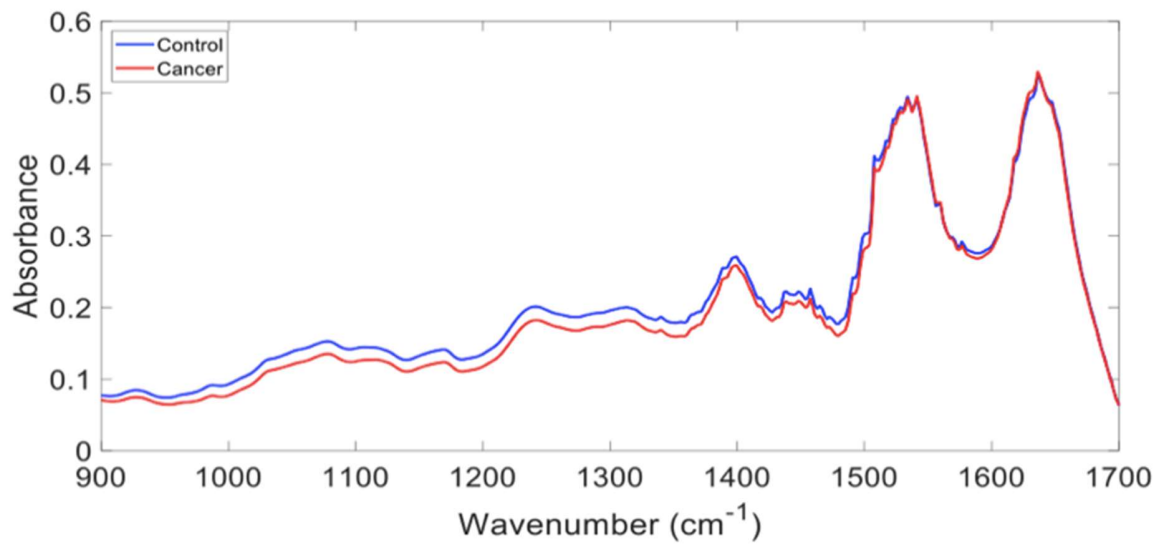
Figures and Legends:**Figure 01:**

Figure 1. Mean FTIR-ATR spectra from 900-1700 cm⁻¹ distinguishing the control group (blue) from the cancer group (red)

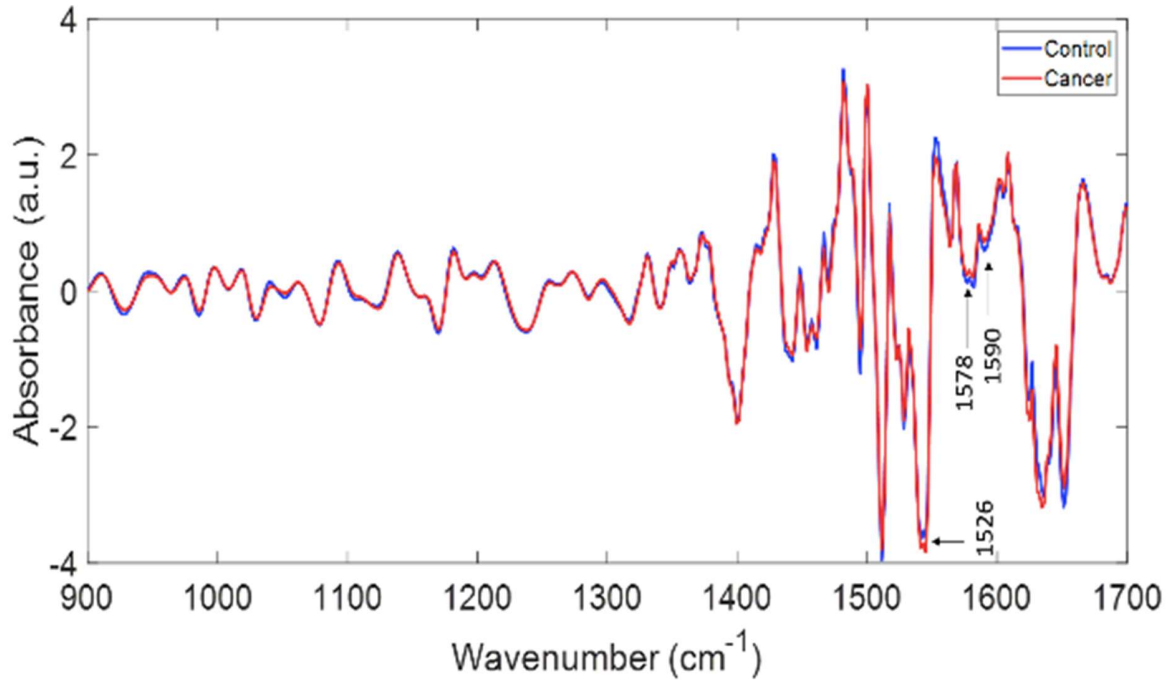
Figure 02:

Figure 2. Mean of second derivative spectra of the control group (blue) fingerprint and the cancer group (red) showing different absorbance intensity between groups. The arrows highlight three peaks observed at 1526, 1578, and 1590 cm^{-1} that can be related to nucleic acid and nucleic acid phosphate.

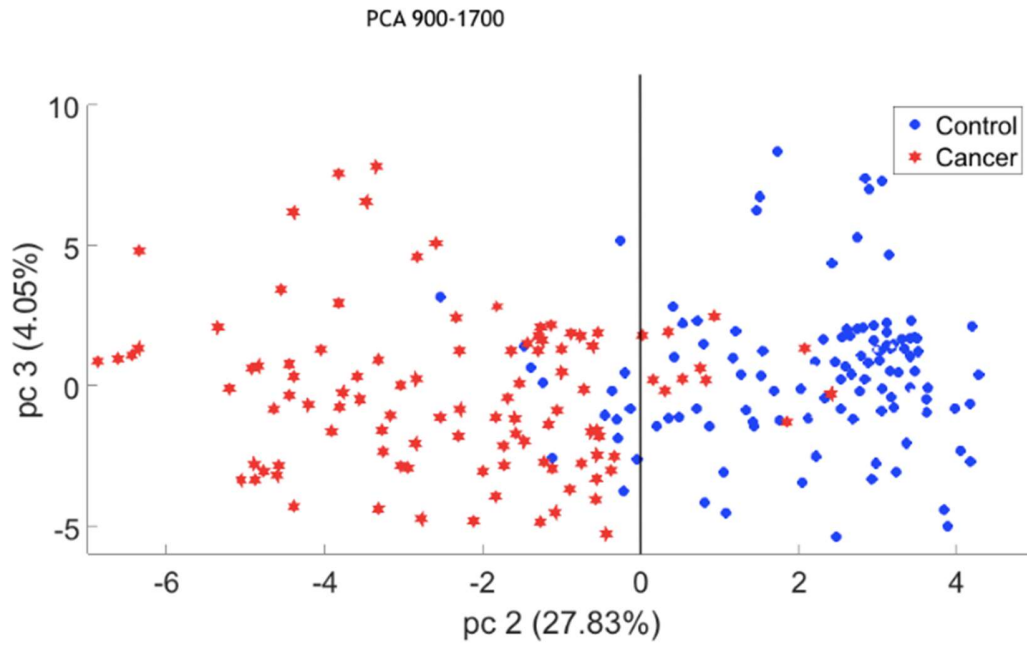
Figure 03:

Figure 3. PCA scores plot of PC1 x PC2 of the fingerprint region of the control group (blue dots) and the cancer group (red dots). PC1 values above and below zero can be used to differentiate the CT and CA groups.

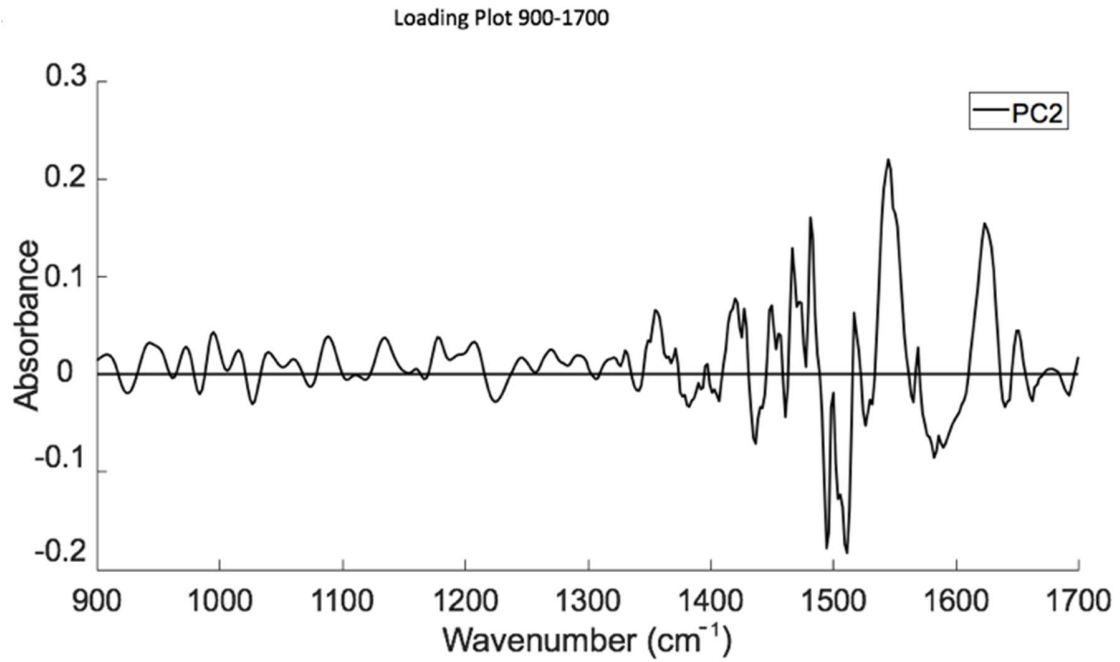
Figure 04:

Figure 4. Loading plot of PC2 performed with spectra from 900-1700 cm⁻¹. The fingerprint spectral peaks responsible for distinguishing the cancer group can be identified in the negative absorbance area of the graphic.

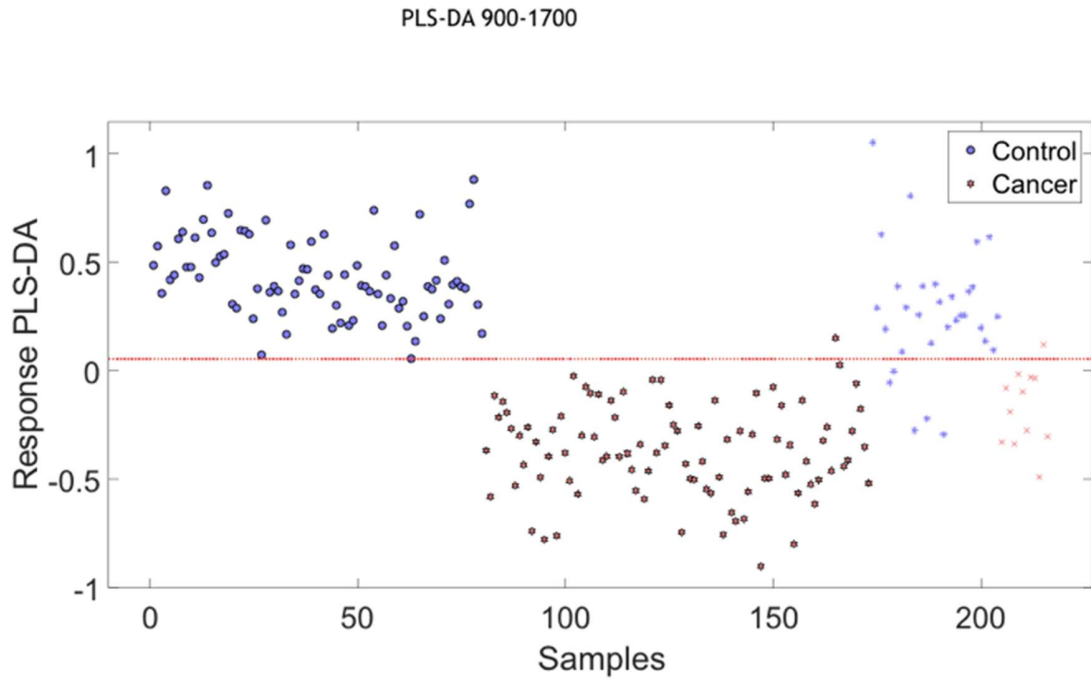
Figure 05:

Figure 5. Supervised analysis PSL-DA performed in FTIR spectra from the 900-1700 cm^{-1} region. Values above and below zero was used to differentiate the CT and CA groups.

Table:

Table 1. Vibrational modes observed in the loading plot from PC2.

Bands (-)	Cancer group	Classification	Bands (+)	Control group	Classification
1022	Symmetric phosphodiester stretching band RNA	Nucleic acid	1349	CH2	Protein
1224	Phosphate	Phosphate	1420	Deformation C-H	
1383	Stretching C-N cytosine, guanine	Nucleic acid	1450	Asymmetric CH3 bending of the methyl groups of proteins	
1457	Extremely weak peaks of DNA & RNA	Nucleic acid	1467	CH2 scissoring mode of the acyl chain of lipid	Lipids
1487	C8-H coupled with a ring vibration of guanine	Nucleic acid	1570	Amide II	Protein
1495	C=C, deformation C-H		1545	Amide II	Protein
1520	C=N guanine	Nucleic acid	1630	Amide I region	Protein

1526	C=N guanine	Nucleic acid
1578	C=N adenine	Nucleic acid
1590	C=N, NH2 adenine	Nucleic acid

***Table 1. Negatives bands represent the CA group and positives bands represent the CT group**

Laser Therapy as a Preventive Approach for Oral Mucositis in Cancer Patients Undergoing Chemotherapy: The Potential Role of Superoxide Dismutase

Beatriz Coutens de Menezes¹, Marcela Marçal Thebit², Lucas André Silva Bonela², Karine Gadioli de Oliveira¹, Washington Luiz Gonçalves³, Nazare Souza Bissoli¹, Carmem Luiza Sartorio^{1*}, Sonia Alves Gouvea^{1,2}

Abstract

Purpose: Oral mucositis is a painful condition that occurs in patients who undergo chemotherapy. Due to the worsening of oral mucositis, the patient may progress to a worse clinical condition and interrupt antineoplastic treatment. There is little literature on low-power laser therapy in chemotherapy for other solid tumors. The purpose of this study was to investigate whether low-level laser therapy (LLLT) applied before chemotherapy could prevent oral mucositis in patients with solid tumors. **Methods:** Laser therapy was applied at a frequency of 630nm, with a dose of 2J / cm², for the prevention of oral mucositis induced by chemotherapy specifically for non-hematological tumors. Epidemiological data, total neutrophils, general side effects, development of oral mucositis and degree, and the performance of low-power laser therapy to prevent oral mucositis were collected. The involvement of oxidative stress was evaluated by the enzyme superoxide dismutase (SOD) through blood samples, before and after chemotherapy treatments. **Results:** LLLT in the proposed protocol is efficient in reducing the development of oral mucositis (only at grade I/II) in patients under chemotherapy and able to reduce the severity of oral mucosal lesions, in patients who developed mucositis after the use of the laser for prevention. All individuals who underwent LLLT protocol did not show a significant reduction of SOD activity after the last chemotherapy cycle. **Conclusions:** The prophylactic laser therapy protocol proposed by the study, defined at a frequency of 630nm, a dose of 2J / cm², demonstrated the ability to decrease the occurrence of oral mucositis in patients undergoing chemotherapy protocols to solid tumors. This effect could be related to preserved SOD activity, as it was observed that oral mucositis is related to leukopenia and reduced SOD activity and LLLT protocol prevented the decrease of SOD activity.

Keywords: Oral mucositis- low-power laser therapy- solid tumors- chemotherapy- oxidative stress

Asian Pac J Cancer Prev, **22** (10), 3211-3217

Introduction

Chemotherapy is used in the therapy of control and remission of various solid tumors, such as those of the gastrointestinal tract, breast, and cervix. Its adverse effects are conditioned to the administration, the dose, and may involve hematologic, dermatologic and gastrointestinal tract alterations. Oral mucositis (OM) is considered one of the main side effects of chemotherapy for antineoplastic treatment. The prevalence of OM is variable, depending on the type of chemotherapy and individual response (Rubenstein et al., 2004; Curra et al., 2018), Keefe (2007) demonstrated that 5 to 15% of patients in chemotherapy could be affected by severe mucositis (grade III and IV). Depending on the grade, OM can lead to worsening

of life quality during treatment, e.g. due to harder swallowing, hydric and alimentary intake, and capacity of communication. Moreover, the detrimental effects of OM may include also discontinuity of treatment (Parulekar et al., 1998; Bellm et al., 2000).

Several cytotoxic agents have been related to oral and gastrointestinal mucosal injury and some of them are especially associated with OM, e.g. methotrexate, fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide, dactinomycin, bleomycin, and also the combined treatment with mitomycin, taxanes (paclitaxel and docetaxel), vincristine, and vinorelbine. These treatments can exacerbate toxicity in oral mucosa, leading to inflammation and ulceration (Moran, 2000; Curra et al., 2018).

¹Department of Physiological Science, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

²Biotechnology Post-Graduation Program, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

³Residency Program in Health, University Santa Ursula, Rio de Janeiro, Brazil. *For Correspondence: carmemsartorio@gmail.com

Many therapeutic approaches have been recommended to mitigate these adverse effects. Laser therapy has been considered a noninvasive technique that promotes pain relief and reduces the severity of oral mucositis in patients. There is evidence in the literature that low-level laser therapy in OM lesions results in a significant reduction of its severity, and promotes an important preventive effect on the appearance of lesions (Brugnera Júnior et al., 2003; Vladimirov Iu et al., 2004; Lubart et al., 2005; Stokman et al., 2006; Khouri et al., 2009).

The underlying mechanisms of photobiomodulation are not fully understood. However, *in vitro* and pre-clinical assays demonstrate that low-level laser therapy can mitigate apoptosis and improve cellular proliferation, migration (Nunez et al., 2012). Clinically, it may result in three relevant effects: analgesic, anti-inflammatory, and reparative, giving support to its therapeutic application. However, the type of cell, laser wavelength, and energy dose significantly influence these results (Nunez et al., 2012).

Preventive usage of low-level laser therapy has been indicated for OM for patients who underwent radiotherapy in head and neck cancer (Antunes et al., 2013; Lalla et al., 2014; Zecha et al., 2016). Short term low-level laser therapy promotes the enhancement of reactive oxygen species (ROS), followed by induction of antioxidants, which counterbalance the redox equilibrium (Eichler et al., 2007). This antioxidant response may be a preventive response to oxidative stress, explaining the global antioxidant effect of low-level laser therapy (photobiomodulation) modulating the inflammatory cascade related to the induced aggression (Nunez et al., 2012). It has been demonstrated that antioxidant enzymes as superoxide dismutase (SOD) and catalase, which are inactivated in low pH and inflammation, are reactivated by laser light (Vladimirov Iu et al., 2004).

Despite laser treatment applicability in OM in patients with non-hematological tumors, there is a lack of information on its potential use as a preventive approach for adverse chemotherapy effects. In this context, the present work evaluated the preventive potential of low-level laser therapy (2 J/cm^2) in patients with solid tumors who underwent chemotherapy.

Materials and Methods

The current retrospective study analyzed the data of 287 eligible patients with solid tumors. The study was approved by the Ethical Committee of the Federal University of Espirito Santo (CAAE: 2.186.172/2017), being conducted in accordance with the Helsinki Declaration. All participants signed the written informed consent form. A total of 287 patients with solid tumors, entre 2016 e 2018 in treatment in a reference oncology center (Centro Capixaba de Oncologia-CECON - Vitoria, ES, Brazil) were analyzed. The exclusion criteria were: patients who had already been treated for head and neck squamous cell carcinoma, or who had a recurrent malignant disease, or who were younger than 18 years of age. The demographic characteristics of the patients (gender, age, tobacco and alcohol consumption, tumor

location, and tumor stage), were obtained from their medical records. The TNM stages of the tumors were determined according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) 7th edition staging system, using available clinical and pathologic data on tumor invasion, lymph nodes status, and metastasis. The body mass index (BMI) was accessed by measuring weight and height (kg/m^2) and the systolic blood pressure (SBP) by using a validated digital blood pressure measuring device Omron HEM-705 CP (Omron Healthcare, INC. Illinois, USA).

Treatments and laser therapy

All patients enrolled underwent chemotherapy, in which AC-T represents the association of doxorubicin and paclitaxel; TC is the association between docetaxel and cyclophosphamide; the associations of carboplatin and cisplatin are called PLATIN and the protocols using fluorouracil (FOLFOX, FOLFIRI, FEC) are called 5FU. The cancer patients were distributed into two groups: a group irradiated with laser emitting light in the red region ($N = 204$) and a control group – non- irradiated with laser ($N = 83$).

The patients in the red laser group underwent a low-level laser irradiation application right before the starting of each cycle of chemotherapy. The DMC / LASER THERAPY XT (100mW) (Twin Laser – MM Optics S.A Ltda., São Carlos, SP, Brazil) apparatus was used, emitting a 630-nm wavelength, set at an output power of 30 mW, with beam area of 0.04 cm^2 in the focal region. The laser dose was 2 J/cm^2 , according Zecha (2016). The whole oral cavity was irradiated, including lip mucosa, soft palate, the floor of the mouth, buccal mucosa, tongue, and vestibule. Each point in the irradiated area was at a distance of about 1 cm from the other irradiation points.

Biochemical Analysis

Blood samples

From all patients enrolled, 35 individuals (which were starting chemotherapy at the beginning of the study) had blood samples collected. A blood sample (10 mL) was collected from each patient in two different time points - before starting chemotherapy and in the last cycle of chemotherapy. All samples were centrifuged (4°C , 2,000g, 15 min) and serum samples were aliquoted and stored at -80°C for subsequent analysis. An aliquot of blood was designed for laboratory leucocyte count.

Serum biochemical assays

Superoxide Dismutase (SOD) activity was assessed using a kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), following the manufacturer's instructions. SOD radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine were detected with tetrazolium salt. One unit of SOD was considered as the amount of enzyme that promotes a 50% dismutation of superoxide radical. Substrate ($50 \mu\text{L}$) was added to $10 \mu\text{L}$ of samples (diluted 5x) and standards (in duplicates) in a 96-well plate. Xanthine oxidase ($25 \mu\text{L}$) was added to initiate the reaction. The absorbance was read at 450 nm after 20 min incubation at room temperature on a shaker using a plate reader. Quantification was performed

by comparison with standard SOD concentrations, being expressed in U/ml.

Statistical analysis

Data are reported as means±SD. Kruskal-Wallis test was used to perform comparisons of averages between leucocyte counting and mucositis. Mann-Whitney test was used to compare SOD activity, oral mucositis, and laser therapy. Qualitative variables were analyzed through the chi-square test and Fisher’s exact test (for samples in which n<5). Data were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®, version 20). A 95% confidence interval and a significance level of 5% (p< 0.05) were considered.

Results

The descriptive features of the patients were grouped regarding age, gender, hemodynamics, body composition and anthropometry, and blood pressure. The majority of selected individuals were women (79.8%, N=229 vs. male 20.2%, N=58), and the mean age was 56 years (Range 29-89). The consumption of tobacco and alcohol was observed in a few individuals of the sample. However, the majority were non-smokers 94.4% (N = 271) and non-alcoholics 87.5% (N = 251). Regarding comorbidities, only 31% of all patients presented Hypertension and 16.7% Diabetes.

As a complementary evaluation general parameters as arterial blood pressure, and body mass index (BMI) were measured before and after chemotherapy. No alterations were observed in these parameters at the end of the treatment. The mean initial systolic/diastolic pressure (123/78 mm Hg) was similar to the end of treatment (119/76 mmHg). The initial BMI was 25.89 and the end of 25.75.

The majority of patients enrolled presented breast (62.2%) or gastric (25.4%) cancer. All patients underwent chemotherapy, and the largest part was treated with AC-T and 5FU. The TMN Classification of Malignant Tumors demonstrated that more than 50% of tumors, at diagnosis time, were in the initial stage (I and II), independent of their locations (Table 1).

Adverse effects during chemotherapy were evaluated regarding the frequency of occurrence, and protocol of treatment (Table 2). From 287 patients, 277 (96.5%) showed at least one adverse effect during chemotherapy cycles. Considering all patients analyzed, nausea was the most frequent symptom (57.4%) and oral mucositis showed a high incidence (30.6%).

No differences were observed in the manifestation of OM when analyzed different protocols of chemotherapy (AC-T, TC, 5FU and PLATIN; p=0,384). However, without laser therapy 69.9% of the individuals evaluated developed OM.

To prevention and treatment of OM low-level laser therapy was used (frequency of 630nm –dose 2J/cm²). The results of 204 patients analyses who underwent preventive LLLT, demonstrated that this protocol can reduce occurrence and gravity of OM (Table 3). Patients who underwent laser therapy presented OM only at grade

I and II, with the majority at grade I. However, patients without laser therapy presented OM grade I to III, and most frequently the grade II (Table 3). Moreover, considering individual protocols of treatment and OM occurrence, laser therapy showed a significant reduction difference in the manifestation of oral mucositis as compared to patients who did not undergo laser therapy.

To evaluate the potential causes related to this effect of laser therapy leucocyte counting analysis was performed in patients with or without OM (Figure 1). Leucocyte counting is significantly lower (p<0.05) in patients presenting oral mucositis (Figure 1a). On the other side, laser therapy did not change leucocyte quantity in patients presenting OM (p=0.147, Figure 1b).

Moreover, from all patients included in this study, 35 individuals underwent blood withdrawn to evaluate

Table 1. Location, Stage and Regimen of Chemotherapy Treatment

	N (%)
Solid tumors	
Breast	190 (66.2)
Gastrointestinal tract	73 (25.4)
Pancreas	12 (4.1)
Uterus/ovarian	4 (1.4)
Lung	2 (0.6)
Prostate	2 (0.6)
Larynx	2 (0.6)
Liver	1 (0.3)
Vesicle	1 (0.3)
Conditioning regimens	
AC-T	139 (48.4)
5FU	95 (33.1)
TC	43 (15)
PLATIN	10 (3.5)
T	
1	68 (26)
2	93 (35.5)
3	74 (28.2)
4	27 (10.3)
N	
0	121 (48)
1	101 (40.1)
2	26 (10.3)
3	4 (1.6)
M	
0	206 (82.1)
1	45 (17.9)
Stage of disease	
Stage I	61 (21.6)
Stage II	99 (35.2)
Stage III	68(24.1)
Stage IV	54 (19.1)

ACT, doxorubicin+cyclophosphamide+paclitaxel; 5FU, fluorouracil; TC, docetaxel+cyclophosphamide; PLATIN, carboplatin and cisplatin

Table 2. Adverse Effects of Chemotherapy Protocols

	Diarrhoea N (%)	Nausea N (%)	Vomiting N (%)	Mucositis N (%)
AC-T	17 (12.2)	97 (69.7)	25 (18)	45 (32.3)
5 FU	39 (41)	39 (41)	20 (21)	32 (33.6)
TC	14 (32.5)	23 (53.5)	05 (11.6)	09 (20.9)
PLATIN	02 (20)	06 (60)	01 (10)	02 (20)

(doxorubicin+cyclophosphamide+paclitaxel), 5FU (fluorouracil), TC (docetaxel+cyclophosphamide), PLATIN (carboplatin and cisplatin).

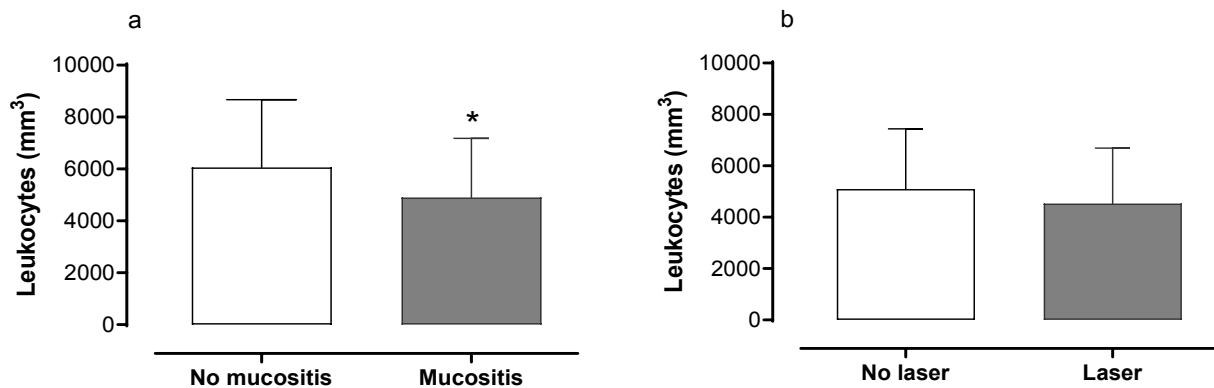


Figure 1. Leucocyte Count and Oral Mucositis. (a) Total leucocyte count and development of oral mucositis, (b) Total leucocyte count in patients with oral mucositis, with or without laser therapy. Mann-Whitney test; *p<0.0001. Data are mean ± SD

superoxide dismutase (SOD) activity – before the first and after the last cycle of chemotherapy. No differences were observed in serum SOD activity in patients without mucositis (1.664±0.77/ 1.589±0.70 U/mL Before/After Chemo; p=0,693; Figure 2a). On the other side, in patients with mucositis SOD activity was reduced (p<0.05) at the end of treatment (1.753±0.65/ 0.824±0.39 U/mL, Before/After Chemo; Figure 2b).

Table 3. Comparison between Preventive Laser Therapy and the Development of Oral Mucositis in Different Protocols. In sequence, the grades (I, II, III and IV) of the subjects (N = 88) with mucositis who did not use laser therapy were evaluated with those who did.

	No Laser N (%)	Laser N (%)	P
AC-T			
No Mucositis	11 (27.5)	83 (83.9)	p<0.0001
Mucositis	29 (72.5)	16 (16.1)	
TC			
No Mucositis	02 (25)	32 (91.5)	p=0.0003*
Mucositis	06 (75)	03 (8.5)	
5 FU			
No Mucositis	11 (33.3)	52 (83.9)	
Mucositis	22 (66.7)	10 (16.1)	p<0.0001
Grade Mucositis			
I	19 (32.75)	22 (73.3)	
II	30 (51.75)	08 (26.7)	p<0.001
III	09 (15.5)	0	
IV	0	0	

AC-T, doxorubicin+cyclophosphamide+paclitaxel; 5FU, fluorouracil; TC, docetaxel+cyclophosphamide

In addition, the level of SOD activity in the serum of patients who underwent or not laser therapy – before the first and after the last cycle of chemotherapy was compared (Figure 3). In patients not submitted to laser therapy, there was a significant reduction (*p<0,05) of SOD activity (1.89±0.66/ 0.691±0.53 U/mL Before/After Chemo; Figure 3a) when comparing SOD levels before the first and after the last cycle of chemotherapy. Interestingly, laser therapy was able to prevent the reduction of SOD activity at the observed time points (1.652±0.77/ 1.404±0.66 U/mL Before/After Chemo; Figure 3b).

Discussion

This work demonstrates the potential preventive effect of laser therapy for oral mucositis in patients with solid malignant tumors who underwent chemotherapy. This protection could be related to the maintenance of SOD activity in patients receiving laser therapy.

In the present study, the majority of patients were women, and the most common tumor was breast cancer, followed by gastrointestinal tumors. Previous reports indicate that in women at the same age of the patients included in the present work, breast cancer is the most common tumor (INCA, 2019).

Staging at diagnosis time is variable, and it directly influences the treatment choice and prognosis. In this study, the majority of the patients presented tumors at stage II. Associated to stage I, these are considered initial states of cancer. However, previous studies demonstrated that more advanced stages (III and IV) are more commonly found in Brazil at diagnosis time (INCA, 2020). This discrepancy probably is related to the sample, as our patients were from a private clinic,

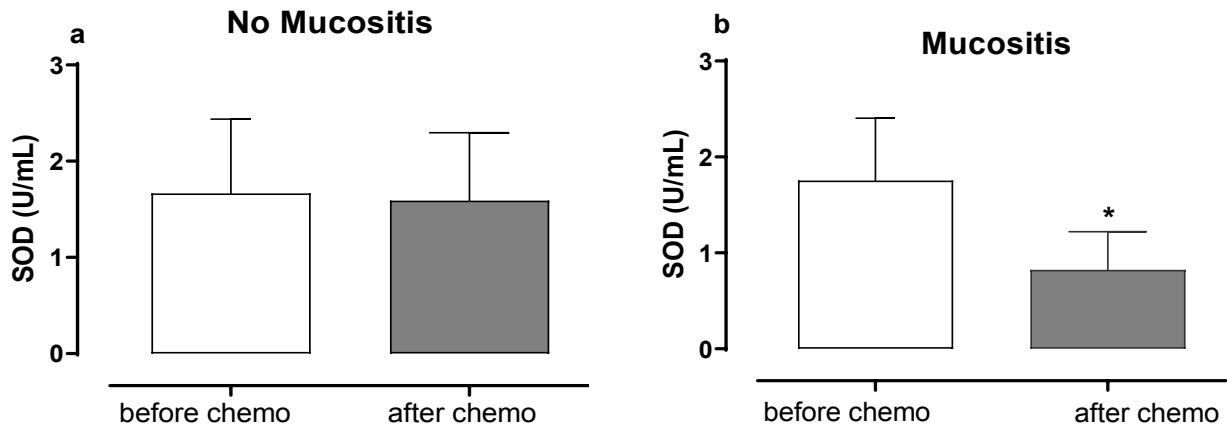


Figure 2. Superoxide Dismutase (SOD) Activity in Serum of patients (a) without mucositis or (b) with mucositis before the first and after the last cycle of chemotherapy. Mann-Whitney test; * $p < 0.05$. Data are mean \pm SD

having a different profile regarding the feasibility of early diagnosis.

Oral mucositis has been described as one of the adverse effects related to chemotherapy, and the search for preventive and therapeutic approaches is relevant to manage this clinical feature. In the present study, the chemotherapeutic compounds were mostly AC-T (48.4%) and 5FU (33.1%). From this sample, 32.3% of which treated with AC-T and 33.6% which received 5FU presented mucositis. Al Ibraheemi (2016) have demonstrated 89.3% of mucositis in patients treated with AC-T, independent of the gravity of tumor and without preventive approaches. Epstein (1999) also demonstrated the association of chemotherapy and oral mucositis. From all adverse symptoms associated with chemotherapy in the current study, mucositis represents 30.6% of incidence, independent of treatment choice.

However, in patients who underwent laser therapy, mucositis incidence was lower (14.7%) as compared to patients not submitted to this treatment (69.9%), and this reduction was observed in all chemotherapeutic protocols analyzed. In the current study, the application of low-level laser therapy in the red spectrum (630nm - 2J / cm²), in all cycles of chemotherapy, significantly reduced the severity of oral mucositis. Moreover, in patients who

underwent laser therapy and still showed mucositis, it was less severe - grade I and II - with no manifestation of mucositis grade III or IV.

Laser therapy has been described as a treatment in patients with malignant neoplasm of the head and neck to mitigate the effects of mucositis due to chemoradiation therapy (Zecha et al., 2016). The use of photobiomodulation in hematopoietic stem cell transplantation patients is also documented, related to high-dose chemotherapy in hematological malignancies, being effective in reducing the severity of chemotherapy-induced oral mucositis (Eduardo Fde et al., 2015; Silva et al., 2015; Bezinelli et al., 2016). Despite the benefits of inducing photobiomodulation by laser therapy in patients with solid tumors undergoing chemotherapy, there is no consensus regarding laser doses and frequencies to be used, which can vary from 7 to 10 days of application and in doses that vary from 2 to 10 J / cm² (Anschau et al., 2019; Daugélaitė et al., 2019).

NetoWestphalen (2018) described prophylactic laser therapy in chemotherapy for solid tumors with laser application frequency and doses different from those used in the present study. These authors evaluated the use of low-level laser therapy to reduce the severity of oral mucositis in individuals with breast cancer and

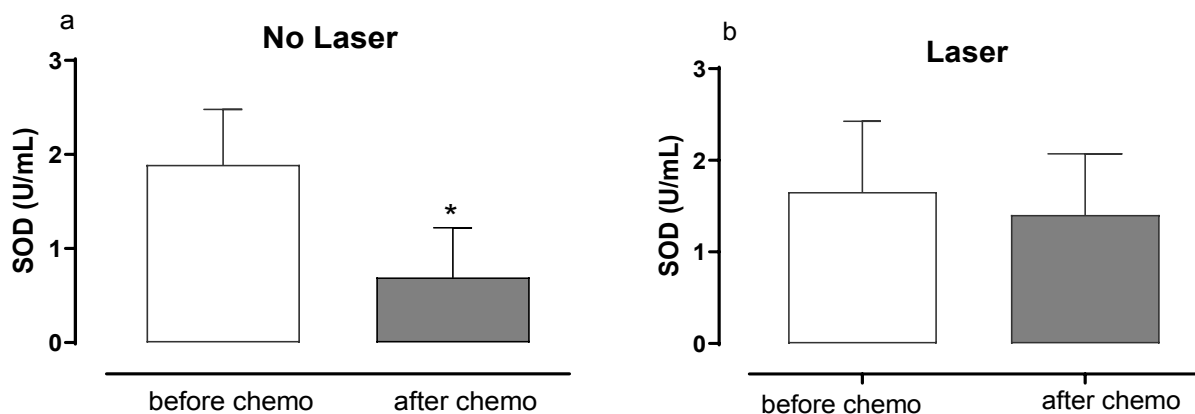


Figure 3. Superoxide Dismutase (SOD) Activity before the First and after the Last Cycle of Chemotherapy in Serum of Patients (a) without laser therapy or (b) who underwent laser therapy. Mann-Whitney test; * $p < 0.05$. Data are mean \pm SD

receiving chemotherapy [fluorouracil (5-FU) + adriamycin (doxorubicin) + cyclophosphamide], using 660nm laser - 4J / cm² or 808nm - 4J / cm², during 7 consecutive days. The severity of mucositis in the laser group was lower than in the control group, which used only 0,12% chlorhexidine, but no statistical difference was observed between the two wavelengths appointed. These results demonstrate that low-intensity laser radiation can be useful in the treatment of oral mucositis. Our results demonstrate that laser therapy, even in lower doses (630nm - 2J/cm²), has shown preventive effects reducing the incidence and gravity of oral mucositis related to chemotherapy.

On the other hand, Rozza-de-Menezes (2018) demonstrated that in patients under treatment with fluorouracil and doxorubicin for solid tumors, both the use of low-power laser therapy (650nm, 4J / cm²) or improvement of oral care showed positive results to prevent oral mucositis and should be further investigated in similar and larger samples.

The presence of mucositis has been associated with leukopenia, due to the reduced capacity for an inflammatory response to the cytotoxic effects of chemotherapy on the oral mucosa, which may alter the final response of tissue repair (Suresh et al., 2010; Patussi et al., 2014; Al Ibraheemi and Shamoun, 2016). According to Suresh (2010), leukocyte levels below 3,000 / mm³ increase the risk of oral mucositis. In the present study, we corroborate this observation where the reduction in the number of total leukocytes occurs in parallel with the higher incidence of oral mucositis, and the use of low-level laser therapy did not change this parameter. This fact must be related to the impairment of the inflammatory response, mediated by immune cells, impairing the inflammatory, proliferative (mediated by fibroblasts, associated with collagen production and angiogenesis), and remodeling (reorganization and maturation of the tissue) phases of healing (Martin and Leibovich, 2005). Given the above, the lack of effect of low-level laser therapy photobiomodulation on leukocytes could point to other basal mechanisms involved in this response.

The relationship between the development of mucositis and oxidative stress has been described, by the formation of reactive oxygen species (ROS) that maintain mechanisms of cellular damage, caused initially by the cytotoxicity of chemotherapy protocols (Scully et al., 2006). In the present study, no change in SOD activity was observed before the start of treatment and in the last chemotherapy cycle in those patients who did not present mucositis. The decrease in SOD activity with the use of cytotoxic chemotherapeutic agents has already been described, leading to an increase in oxidative stress and leading to an increase in adverse effects (Sakanyan, 2018). In this context, measures that can preserve or increase the redox balance could prevent the adverse effects of chemotherapy (Borutaite et al., 2000; Bezinelli et al., 2016; Dos Santos et al., 2017; Anderson et al., 2018).

In the present study, patients who developed oral mucositis showed a reduction in serum SOD activity in the last chemotherapy cycle when compared to the beginning of treatment. However, when only patients with mucositis were observed, prophylactic low-level laser therapy was

able to prevent the reduction of SOD. The possibility of low-level laser therapy being related to maintaining or increasing SOD activity was raised by Vladimirov Iu (2004) in an analysis of the mechanisms of action of low-level laser therapy in different tissues and cells. This fact was also reported in other pathological conditions such as experimental rheumatoid arthritis, where there is an increase in the production of ROS, and laser therapy was associated with an increase in antioxidant defenses, including SOD. The current study brings new information regarding the effect of photobiomodulation by low-level laser therapy and SOD activity, acting as prophylactic approach for oral mucositis related to chemotherapy.

In conclusion, the prophylactic laser therapy protocol proposed by the study, defined at a frequency of 630nm and a dose of 2J / cm², demonstrated the ability to decrease the occurrence of oral mucositis in patients undergoing chemotherapy protocols with high potential to induce tissue damage, in patients with non-hematological (solid) tumors. It was observed that oral mucositis is related to leukopenia and reduced SOD activity. Low-level laser therapy prevented the reduction of SOD activity, without influencing leukocyte levels. Photobiomodulation by applying low-power laser could be a non-invasive approach in the prevention of oxidative stress, mitigating the damaging effects of chemotherapy such as oral mucositis. Its clinical applicability has been demonstrated as an important therapeutic tool and its novel preventive potential is demonstrated by this study.

Author Contribution Statement

BCM, MMT: equally contributed to conception, design, analysis and interpretation of data. KGO, LASB, and WLG: contributed to acquisition of data and literature research. CLS, NSB and SAG: provided resources and final approval of the manuscript. KGO, CLS and SAG: contributed to the discussion and manuscript drafting. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

Funding statement

This study was supported by grants from the Fundação Estadual de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to thank the medical team of CECON, Vitória, ES, Brazil, for their assistance with data collection.

The study was approved by the local Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (CAAE: 2.186.172/2017) and a written informed consent was obtained from each patient. Consent for publication of the clinical and pathological data was obtained from all patients involved. All datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Al Ibraheemi AA, Shamoun S (2016). Incidence and risk factors of oral mucositis in patients with breast cancer who receiving chemotherapy in Al-Bashir Hospital. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, **10**, 217-23.
- Anderson CM, Sonis ST, Lee CM, et al (2018). Phase 1b/2a trial of the superoxide dismutase mimetic GC4419 to reduce chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral cavity or oropharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **100**, 427-35.
- Anschau F, Webster J, Capra MEZ, et al (2019). Efficacy of low-level laser for treatment of cancer oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*, **34**, 1053-62.
- Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, et al (2013). Phase III trial of low-level laser therapy to prevent oral mucositis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiation. *Radiother Oncol*, **109**, 297-302.
- Bellm LA, Epstein JB, Rose-Ped A, et al (2000). Patient reports of complications of bone marrow transplantation. *Support Care Cancer*, **8**, 33-9.
- Bezinelli LM, Eduardo FP, Neves VD, et al (2016). Quality of life related to oral mucositis of patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation and receiving specialised oral care with low-level laser therapy: a prospective observational study. *Eur J Cancer Care (Engl)*, **25**, 668-74.
- Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC (2000). Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1459**, 405-12.
- Brugnera Júnior A, Santos AECGd, Bologna ED, et al (2003). Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. p119.
- Curra M, Soares Junior LAV, Martins MD, et al (2018). Chemotherapy protocols and incidence of oral mucositis. An integrative review. Einstein (Sao Paulo), p 16.
- Daugėlaitė G, Užkuraitytė K, Jagelavičienė E, et al (2019). Prevention and Treatment of Chemotherapy and Radiotherapy Induced Oral Mucositis. *Medicina (Kaunas)*, p 55.
- Dos Santos SA, Dos Santos Vieira MA, Simões MCB, et al (2017). Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. *Lasers Med Sci*, **32**, 1071-9.
- Eduardo Fde P, Bezinelli LM, de Carvalho DL, et al (2015). Oral mucositis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: clinical outcomes in a context of specialized oral care using low-level laser therapy. *Pediatr Transplant*, **19**, 316-25.
- Eichler M, Lavi R, Friedmann H, et al (2007). Red light-induced redox reactions in cells observed with TEMPO. *Photomed Laser Surg*, **25**, 170-4.
- Epstein JB, Schubert MM (1999). Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **88**, 273-6.
- Instituto Nacional do Câncer (2019). Tipos de câncer. <https://www.inca.gov.br/campanhas/outubro-rosa/2016/cancer-de-mama-vamos-falar-sobre-isso>.
- Instituto Nacional do Câncer (2020). Câncer de mama: vamos falar sobre isso? <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>.
- Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, et al (2007). Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer: Interdisciplinary Int J Am Cancer Soc*, **109**, 820-31.
- Khouri VY, Stracieri AB, Rodrigues MC, et al (2009). Use of therapeutic laser for prevention and treatment of oral mucositis. *Braz Dent J*, **20**, 215-20.
- Lalla RV, Bowen J, Barasch A, et al (2014). MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*, **120**, 1453-61.
- Lubart R, Eichler M, Lavi R, et al (2005). Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg*, **23**, 3-9.
- Martin P, Leibovich SJ (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*, **15**, 599-607.
- Moran P (2000). Cellular effects of cancer chemotherapy administration. *J Intravenous Nurs*, **23**, 44-51.
- Neto AEM, Westphalen FH (2018). Effectiveness of low level laser used in the prevention and treatment of oral mucositis in patients with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *J Dent Sci Oral Maxillofacial Res*, **1**, 79-83.
- Nunez S, Ribeiro MS, Segundo A (2012). Laser de baixa potência : princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. In *Terapia a Laser de baixa Potencia em Mucosite Oral*. Elsevier, Rio de Janeiro, pp 201-18.
- Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, et al (1998). Scoring oral mucositis. *Oral Oncol*, **34**, 63-71.
- Patussi C, Sassi LM, Munhoz EC, et al (2014). Clinical assessment of oral mucositis and candidiasis compare to chemotherapeutic nadir in transplanted patients. *Braz Oral Res*, **28**, 1-7.
- Rozza-de-Menezes R, Souza PHC, Westphalen FH, et al (2018). Behaviour and prevention of 5'Fluorouracil and Doxorubicin-induced oral mucositis in immunocompetent patients with solid tumors: A Randomised Trial. *Oral Health Prev Dent*, **16**, 549-55.
- Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, et al (2004). Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*, **100**, 2026-46.
- Sakanyan V (2018). Reactive Chemicals and Electrophilic Stress in Cancer: A Minireview. *High Throughput*, p 7.
- Scully C, Sonis S, Diz PD (2006). Oral mucositis. *Oral Dis*, **12**, 229-41.
- Silva LC, Sacono NT, Freire Mdo C, et al (2015). The impact of low-level laser therapy on oral mucositis and quality of life in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation using the oral health impact profile and the functional assessment of cancer therapy-bone marrow transplantation questionnaires. *Photomed Laser Surg*, **33**, 357-63.
- Stokman MA, Spijkervet FK, Boezen HM, et al (2006). Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: results of meta-analyses. *J Dent Res*, **85**, 690-700.
- Suresh AV, Varma PP, Sinha S, et al (2010). Risk-scoring system for predicting mucositis in patients of head and neck cancer receiving concurrent chemoradiotherapy [rasm-hn]. *J Cancer Res Ther*, **6**, 448-51.
- Vladimirov Iu A, Klebanov GI, Borisenko GG, et al (2004). [Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect]. *Biofizika*, **49**, 339-50.
- Zecha JA, Raber-Durlacher JE, Nair RG, et al (2016). Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. *Support Care Cancer*, **24**, 2793-805.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

5 CONCLUSÕES

Concluimos que o ATR-FTIR discriminou com sucesso as amostras de pacientes com câncer oral dos indivíduos saudáveis usando amostras de plasma, com ácidos nucleicos sendo encontrados como biomarcadores principais. A técnica foi satisfatória em separar o grupo câncer segundo seu estadiamento se mostrando uma valiosa ferramenta para acompanhamento do status da doença e resposta terapêutica. Em um primeiro momento análises de amostra salivar se mostraram promissoras. Estudos comparativos entre lesões potencialmente malignizáveis, doenças inflamatórias sistêmicas e alterações autoimunes são sugeridos para que as evidências se tornem mais robustas e possam transladar para a prática clínica.

6 PERSPECTIVAS

É importante destacar que ainda não existe uma proposta padronizada de aplicação de ATR-FTIR na análise de amostras biológicas para rastreamento oncológico. Portanto análises com diferentes naturezas de amostra e em tempos distintos do curso da doença seriam de grande valia bem como a avaliação da resposta sistêmica às condutas terapêuticas utilizando-se este método.

REFERÊNCIAS

- BEAVER, Julia A. *et al.* Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 10, p. 2643–2650, 15 maio 2014.
- BELLAIRS, Joseph A.; HASINA, Rifat; AGRAWAL, Nishant. Tumor DNA: an emerging biomarker in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 36, n. 3, p. 515–523, 1 set. 2017.
- BETTEGOWDA, Chetan *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 224, 19 fev. 2014.
- BROZOSKI, D. T.; SANTOS, C. F. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3 , RU PRQWKV XVLQJ ¿ YH GLIIHUHQW. *Journal of Applied Science*, v. 25, n. 2, p. 147–158, 2017.
- CARRERAS-TORRAS, Clàudia; GAY-ESCODA, Cosme. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, v. 20, n. 3, p. e305–e315, 1 maio 2015.
- CARVALHO, L. F. C. S. *et al.* In vivo Raman spectroscopic characteristics of different sites of the oral mucosa in healthy volunteers. *Clinical Oral Investigations*, v. 23, n. 7, p. 3021–3031, 1 jul. 2019.
- CARVALHO, L. F. das C. e. S.; SAITO NOGUEIRA, M. New insights of Raman spectroscopy for oral clinical applications. *Analyst*, v. 143, n. 24, p. 6037–6048, 21 dez. 2018.
- CHEN, Sara *et al.* The Diagnostic Accuracy of Incisional Biopsy in the Oral Cavity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 74, n. 5, p. 959–964, 1 maio 2016.
- CHOJNOWSKA, S. *et al.* Human saliva as a diagnostic material. *Advances in Medical Sciences*, v. 63, n. 1, p. 185–191, 2018.
- COSCI, Alessandro *et al.* Time-resolved fluorescence spectroscopy for clinical diagnosis of actinic cheilitis. *Biomedical Optics Express*, v. 7, n. 10, p. 4210, 1 out. 2016.
- DAWES, C. *et al.* The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, v. 60, n. 6, p. 863–874, 2015.
- DAWSON, Sarah Jane *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 368, n. 13, p. 1199–1209, 28 mar. 2013.
- DIEHL, Frank *et al.* Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*,

v. 14, n. 9, p. 985–990, set. 2008.

ELKINS, K. M. Rapid presumptive “fingerprinting” of body fluids and materials by atr ft-ir spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*, v. 56, n. 6, p. 1580–1587, nov. 2011.

EPSTEIN, Joel B.; SCULLY, Crispian; SPINELLI, John. Toluidine blue and Lugol’s iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 21, n. 4, p. 160–163, 1992.

FICI, Pietro. Cell-free DNA in the liquid biopsy context: Role and differences between ctDNA and CTC marker in cancer management. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.]: Humana Press Inc., 2019. v. 1909. p. 47–73.

FORSHEW, Tim *et al.* Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 136, 30 maio 2012.

GOMES, Vitória Mikaelly da Silva *et al.* Mortalidade brasileira por câncer de cavidade oral. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd*, v. 16, n. 3, p. 164–166, 2019. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.>>.

HOES, Lore; DOK, Rüveyda; VERSTREPEN, Kevin J. Ethanol-Induced Cell Damage Can Result in the Development of Oral Tumors. p. 1–22, 2021.

HOLE, A. *et al.* Salivary Raman Spectroscopy: Standardization of Sampling Protocols and Stratification of Healthy and Oral Cancer Subjects. *Applied Spectroscopy*, v. 75, n. 5, p. 581–588, 2021.

HUANG, S. H. *et al.* Incorporating blood-based liquid biopsy information into cancer staging: Time for a TNMB system? *Current Treatment Options in Oncology*, v. 18, n. 2, p. 311–323, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx766>>.

HUANG, S. H.; O’SULLIVAN, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, v. 18, n. 7, 2017.

KOCH, Felix Peter; KAEMMERER, Peer W.; *et al.* Effectiveness of autofluorescence to identify suspicious oral lesions-a prospective, blinded clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, v. 15, n. 6, p. 975–982, dez. 2011.

KOCH, Felix Peter; KUNKEL, Martin; *et al.* Diagnostic efficiency of differentiating small cancerous and precancerous lesions using mucosal brush smears of the oral cavity-a prospective and blinded study. *Clinical Oral Investigations*, v. 15, n. 5, p. 763–769, out. 2011.

KUMAR, Malay *et al.* *Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. Journal of Cancer Research and Therapeutics*. [S.l.: s.n.], 2016

LEAL, L. B. et al. Vibration spectroscopy and body biofluids: Literature review for clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 dez. 2018 <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.09.008>

LIAO, Chun Ta *et al.* Impact of a second FDG PET scan before adjuvant therapy for the early detection of residual/relapsing tumours in high-risk patients with oral cavity cancer and pathological extracapsular spread. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 39, n. 6, p. 944–955, jun. 2012.

LIN, Li Han *et al.* Increased plasma circulating cell-free DNA could be a potential marker for oral cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 11, 1 nov. 2018.

LÓPEZ-LÓPEZ, José; OMAÑA-CEPEDA, Carlos; JANÉ-SALAS, Enric. *Oral precancer and cancer. Medicina Clínica*. [S.l.]: Ediciones Doyma, S.L. , 6 nov. 2015.

MARKOPOULOS, A. K.; MICHAILIDOU, E. Z.; TZIMAGIORGIS, G. Salivary Markers for Oral Cancer Detection. *The Open Dentistry Journal*, v. 4, n. 1, p. 172–178, 2010.

MATTHEWS, A. M. et al. Saliva collection methods for DNA biomarker analysis in oral cancer patients. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 51, n. 5, p. 394–398, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.09.017>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório sobre o cenário assistencial e epidemiológico do câncer de lábio e cavidade oral no Brasil. v. 2, p. 27, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/relatorio_cancer_de_boca_2020_0.pdf>.

MORO, Alessandro *et al.* Autofluorescence and early detection of mucosal lesions in patients at risk for oral cancer. 2010, [S.l.: s.n.], 2010. p. 1899–1903.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. [S.l.: s.n.]. , 2008

NEWMAN, Aaron M. *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*, v. 20, n. 5, p. 548–554, 13 abr. 2014.

NG, D. P. K. et al. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clinica Chimica Acta*, v. 343, n. 1–2, p. 191–194, 2004.

OFMAN, J. J. et al. GRAIL and the quest for earlier. 2018.

OLIVEIRA SANTOS, Marcell. Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 66, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2020.

- OLLESCH, J. et al. FTIR spectroscopy of biofluids revisited: An automated approach to spectral biomarker identification. *Analyst*, v. 138, n. 14, p. 4092–4102, 21 jul. 2013.
- PEREA, Lillia Magali Estrada et al. Trend of oral and pharyngeal cancer mortality in Brazil in the period of 2002 to 2013. *Revista de Saude Publica*, v. 52, 2018.
- RAJMOHAN, M et al. Assessment of oral mucosa in normal, precancer and cancer using chemiluminescent illumination, toluidine blue supravital staining and oral exfoliative cytology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 16, n. 3, p. 325–329, 2012.
- RHODUS, Nelson L.; KERR, A. Ross; PATEL, Ketan. *Oral Cancer. Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. Dental Clinics of North America*. [S.l.]: W.B. Saunders. , 2014
- RODRIGUES, L. M. et al. Evaluation of inflammatory processes by FTIR spectroscopy. *Journal of Medical Engineering and Technology*, v. 42, n. 3, p. 228–235, 2018.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03091902.2018.1470691>>.
- SAITO NOGUEIRA, Marcelo et al. Biochemical Profiles of In Vivo Oral Mucosa by Using a Portable Raman Spectroscopy System. *Optics*, v. 2, n. 3, p. 134–147, 2021.
- SAITO NOGUEIRA, Marcelo et al. Evaluation of actinic cheilitis using fluorescence lifetime spectroscopy. 7 mar. 2016, [S.l.]: SPIE, 7 mar. 2016. p. 97031U.
- SALA, A. et al. Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection. *Cancer Letters*. [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd. , 1 maio 2020
- SCHIRMER, Markus A. et al. Cell-Free plasma DNA for disease stratification and prognosis in head and neck cancer. *Clinical Chemistry*, v. 64, n. 6, p. 959–970, 1 jun. 2018.
- SCHMIDT, Henri et al. *The development of a liquid biopsy for head and neck cancers. Oral Oncology*. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 out. 2016
- SHUKLA, Deepika et al. Can quantifying free-circulating DNA be a diagnostic and prognostic marker in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 71, n. 2, p. 414–418, fev. 2013.
- SIRAVEGNA, Giulia et al. *Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nature Reviews Clinical Oncology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 set. 2017
- STROTMAN, Lindsay N. et al. *Liquid Biopsies in Oncology and the Current Regulatory Landscape. Molecular Diagnosis and Therapy*. [S.l.]: Springer International Publishing. , 1 out. 2016
- TAYLOR, W. C. Comment on ‘Sensitive and specific multi-cancer detection and

localization using methylation signatures in cell-free DNA' by M. C. Liu et al. *Annals of Oncology*, v. 31, n. 9, p. 1266–1267, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.04.013>>.

VAN DER DRIFT, Miep A. *et al.* Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, v. 68, n. 2, p. 283–287, 2010.

VAN DER WAAL, Isaïc. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable? *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, v. 19, n. 4, 2014.

WANG, Y. *et al.* Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Science Translational Medicine*, v. 7, n. 293ra104, 2015. Disponível em: <www.ScienceTranslationalMedicine.org>.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review of observational studies. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 45, n. 3, p. 155–166, 1 mar. 2016.

WONG, T. S.C.; WIESENFELD, D. Oral Cancer. *Australian Dental Journal*, v. 63, p. S91–S99, 1 mar. 2018.

YANG, M. *et al.* Incorporating blood-based liquid biopsy information into cancer staging: Time for a TNMB system? **Annals of Oncology**, v. 29, n. 2, p. 311–323, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx766>>.

YONG, Ed. Written in blood: DNA circulating in the bloodstream could guide cancer treatment - if researchers can work out how best to use it. *Nature*, v. 511, n. 7511, p. 524–526, 2014.

ZHONG, L. *et al.* Untargeted saliva metabonomics study of breast cancer based on ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta*, v. 158, p. 351–360, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.049>>.

APÊNDICES

Os dados apresentados nesta sessão foram gerados a partir da presente tese e serão utilizados em publicações futuras.

Tabela Suplementar 01:

Caracterização da amostra quanto a idade, sexo e estadiamento (amostra submetida a análise por ATR-FTIR em plasma)

	Cancer	Controle
Idade	57.96(+/- 9.49)	52.67(+/- 10.37)
Mulheres	7	24
Homens	37	13
Estadiamento da doença		
T1	05	-
T2	07	-
T3	04	-
T4	11	-
N0	17	-
N1	02	-
N2	05	-
N3	03	-

O Sistema TNM de estadiamento foi utilizado da caracterização e estratificação da doença. 10 pacientes ainda estavam com estadiamento em investigação e não foram incluídos na tabela.

As figuras suplementares 01 e 02 apresentam o resultado da análise do plasma por FTIR-ATR quando discriminamos entre estadiamento inicial (T1 e T2) e avançado (T3 e T4). Este resultado é de suma importância uma vez que o prognóstico favorável está diretamente relacionado ao diagnóstico precoce.

Figura suplementar 01:

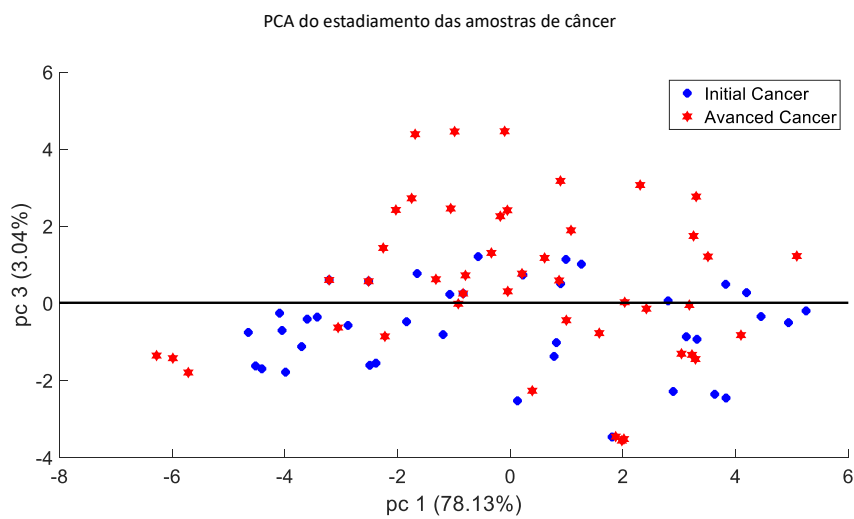
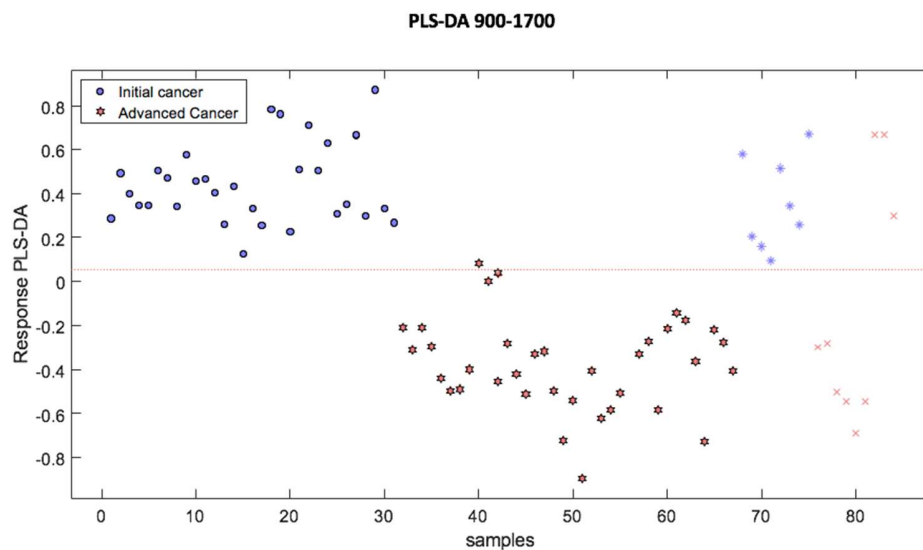


Figura suplementar 02:



A tabela a seguir apresenta os dados clínico-patológicos como estadiamento do tumor segundo a classificação TNM (União Internacional contra o Câncer - UICC), localização do tumor e tratamento proposto. Também estão presentes os dados, altura, peso, sexo, idade e presença de comorbidade. A história do consumo de álcool e tabaco e sua relação com o estadiamento se encontram na tabela 04 e 05.

Tabela suplementar 03:

Dados clinico-patológicos

Variável	n	%
Sexo		
Feminino	10	26
Masculino	29	74
Idade (anos)	61± 12	
Peso (Kg)	55± 11	
Altura (metro)	1,55 ± 0,4	
Tabagista		
Sim	25	64
Não	7	18
Ex tabagista	7	18
Etilista		
Sim	22	56,4
Não	11	28,2
Ex etilista	6	15,4
Comorbidades		
Sem comorbidades	12	31
Hipertensão	9	23
Diabetes	2	5

Hipertensão e diabetes	8	20,5
Não informado	8	20,5
Estadiamento		
I	8	20,5
II	13	33,3
III	6	15,4
IV	12	30,8
Local da lesão		
Borda lateral de língua	12	31
Assoalho	8	23
Lábio inferior	6	15
Mucosa jugal	9	21
Área Retromandibular	4	10
Tratamento proposto		
Cirurgia	19	49
Radioterapia	11	28
Radio+químio	7	18
Cirurgia+radio+químio	2	5

As variáveis Etilismo e Tabagismo foram relacionadas ao estadiamento como disposto a seguir:

Tabela suplementar 04:

Relação Etilismo x Estadiamento

Estadiamento	Etilista	Não Etilista	Ex-etilista	Total
	N(22)	N(11)	N(6)	N(39)
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
I/II	8(38)	10(47,6)	3(14,4)	21(100)
III/IV	14(77,7)	1(5,7)	3(16,6)	18(100)

Tabela suplementar 05:

Relação Tabagismo x Estadiamento

Estadiamento	Tabagista	Não tabagista	Ex-tabagista	Total
	N(25)	N(07)	N(07)	N(39)
	N(%)	N(%)	N (%)	N (%)
I/II	10(47,61)	7(18)	4(33)	21(100)
III/IV	15(83,3)	0(0)	3(17)	18(100)

ANEXOS

Participação em publicações(anais, capítulo de livro) nos últimos 05 anos:

1. Machado, K L L L. et al. The Seroconversion Rate of the Yellow Fever Vaccine Is Lower in Patients Vaccinated Inadvertently. In: **Anais do 36º Congresso Brasileiro de Reumatologia. [ISBN 978-85-212-1892-0]**. São Paulo: Blucher, 2019. ISSN 2357-7282, DOI :10.5151/sbr2019-608
2. Valim V, Pinto AD, Martins Rocha PC, et al. Safety and efficacy of primary yellow fever vaccination in autoimmune disease: a prospective controlled study. In: **Annals of the Rheumatic Diseases**. p.2110.AB1298 DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-eular.6424>
3. Nardi, D, Oliveira, K, Thebit, M, Menezes, B, Bissoli, N, Gouvea, S. Predictive Value of CRP Levels in Patients with Head and Neck Cancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**. p 126. e173. Doi:10.1016/j.oooo.2018.02.691.
4. Silva, F, Gouvea, S, Oliveira, K, Araújo, M, Sartório, C, Thebit, M, Silva, A. (2017). Hypertensive Retinopathy: Pathophysiology and Clinical Management.

Participação em artigos publicados nos últimos 05 anos:

1. Santa-Rosa, C; Thebit, M; Maciel, K; Brito, L; Vieira, L; Ribeiro-Sobrinho, A. (2018). Evaluation of chemokines and receptors in gnotobiotic root canal infection by *F. nucleatum* and *E. faecalis*. **Brazilian Oral Research**. 32. Doi:10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0120.

2. DE OLIVEIRA, K G. et al.(2020). Prognostic value of pretreatment cardiovascular biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1435–1442, 2021.