

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DO USO DE SORO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA  
POR MEIO DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS FTIR E RAMAN**

**EVA MENDES MONTEIRO**

**UBERLÂNDIA  
2021**

**EVA MENDES MONTEIRO**

**AVALIAÇÃO DO USO DE SORO PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA  
POR MEIO DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS FTIR E RAMAN**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Dr. Robinson Sabino da Silva

Co-orientadora: Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

**UBERLÂNDIA  
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M775a Monteiro, Eva Mendes, 1988-  
2021 Avaliação do uso de soro para diagnóstico de câncer de mama por meio das técnicas espectroscópicas FTIR e RAMAN [recurso eletrônico] / Eva Mendes Monteiro. - 2021.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.

Coorientadora: Yara Cristina de Paiva Maia.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.5543>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

I. Ciências médicas. I. Silva, Robinson Sabino da, 1981-, (Orient.). II. Maia, Yara Cristina de Paiva, 1975-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

---

CDU:61

Glória Aparecida  
Bibliotecária - CRB-6/2047

# ATA DE APROVAÇÃO

21/09/2021 16:44

SEMUFU - 3001348 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 11 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 3225-8628 - www.ppcsafamed.ufu.br - ppcsafamed@famed.ufu.br



## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Tese de Doutorado Nº 011/PPCSA				
Data:	24.08.2021	Hora de início:	08:00h	Hora de encerramento:	12:00h
Matrícula do Discente:	11713CSD004				
Nome do Discente:	Eva Mendes Monteiro				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DO SORO POR MEIO DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS FTIR E RAMAN PARA O CÂNCER DE MAMA				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	2: Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico das Doenças e Agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS PELA SALIVA				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma **Google Meet**, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Lúcio Roberto Caçado Castellano (UFPB), Silma Regina Ferreira Pereira (UFMA), Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo, Thaise Gonçalves de Araújo (UFU) e Robinson Sabino da Silva (UFU) orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Lúcio Roberto Caçado Castellano**, Usuário Externo, em



25/08/2021, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 18:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Silma Regina Ferreira Pereira, Usuário Externo**, em 25/08/2021, às 19:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 21:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Van Petten Vasconcelos Azevedo, Usuário Externo**, em 26/08/2021, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3001348** e o código CRC **68BF4A24**.

## DEDICATÓRIA

*À minha família, pelo amor incondicional, apoio e incentivo dedicados em todos os momentos de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus, obrigada por tudo que o senhor me proporciona!

A vocês pais, João e Aparecida, pelo apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida; Aos meus irmãos, João (*In memoriam*), Aparecida e Daniel pelo amor incondicional.

Ao orientador Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva pelo apoio, orientações e ensinamentos, paciência e dedicação. Tornando-se uma referência profissional para mim, devido a sua inteligência e simplicidade. Obrigada pela oportunidade oferecida para realização deste sonho.

À Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia, pela co-orientação e aprendizados. Obrigada por fazer parte dessa realização e me fazer sonhar com novos projetos.

Ao Centro de Fisiologia Integrada e Nano biotecnologia Salivar pela oportunidade e aprendizado, em especial ao Douglas Caixeta e Léia Cardoso por toda colaboração, ensinamentos e amizade, vocês foram essenciais. Sem vocês seria uma caminhada árdua. Gratidão.

À equipe do grupo de pesquisa BioNut, em especial a Aline, que foi fundamental nesse processo.

Ao Dr. Paulo César de Sousa o meu eterno agradecimento por tudo que tem feito por mim, pela confiança e pelas oportunidades, que foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Ao Paulo César Segundo, minhas eternas admirações e respeito, obrigada por tudo!

Ao Eduardo pelo apoio no decorrer dessa jornada e toda família Souza. À Faculdade Patos de Minas, pelo apoio e incentivo.

Às minhas amigas Adrielle e Rosana, que foram essenciais, nunca me deixaram desistir e sempre reforçando sobre minhas qualidades, me ajudando na pesquisa e sempre me oferecendo um ombro amigo em todas os momentos. Sou grata a Deus por tê-las comigo. Obrigada por tudo!

Às minhas amigas e equipe de trabalho Darlene, Larissa e Majorie e demais funcionários da Faculdade, obrigada por tudo!

Ao laboratório Multiusuário do Instituto de Física, em especial ao Guilherme Fernandes por todo o apoio nos processamentos das amostras e explicações relacionadas a operacionalização do equipamento Raman.

Ao Instituto de Física da UFU, pela disponibilidade de utilização do Horiba LabRAM HR Evolution Raman microscope, que foi disponibilizado pelo programa “Pró-Equipamentos” da CAPES.

Agradeço infinitamente todas as pessoas que, de um modo especial, sempre estiveram presentes em todos os momentos desta jornada, que de alguma forma contribuíram para a minha progressão acadêmica e profissional, o meu profundo agradecimento.

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades e força para seguir em frente passando por todos os obstáculos.



“Procuremos como procuram aqueles que devem encontrar, e encontremos como encontram aqueles que devem continuar procurando; pois está escrito: aquele que chegou ao fim não fez senão começar.”

Sto. Agostinho – De Ord. II.19.

## RESUMO

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) e espectroscopia Raman são técnicas variantes da espectroscopia vibracional, permitem a identificação rápida e não invasiva, com alta especificidade, livre de reagentes, baixo custo, volume reduzido de amostras e simples de operar. Essas técnicas permitem obter informações não apenas sobre as partículas químicas por meio da identificação de grupos funcionais, mas também permitem análises qualitativas e quantitativas das substâncias químicas presentes no material analisado. Ambas as técnicas espectrais têm sido utilizadas no diagnóstico de diversas doenças, por detectar pequenas variações no conteúdo molecular relacionado à doença e indicar o potencial do diagnóstico precoce. O câncer de mama é a principal causa de morte entre as mulheres no mundo. Em 2020, entre os cânceres mais incidentes em ambos os sexos e idades, o câncer de mama ficou em primeiro lugar com uma estimativa de 2.261.419 novos casos. Para cada ano do triênio 2020-2022, são estimados 66.280 novos casos. Este valor corresponde a um risco estimado de 61,61 casos novos por 100 mil mulheres. O diagnóstico do câncer de mama compreende quatro técnicas convencionais: histopatologia, mamografia, ultrassom e ressonância magnética. Porém, as técnicas disponíveis têm suas limitações para o diagnóstico precoce do câncer de mama, o alto custo e a falta de indicação para mulheres jovens. O objetivo do nosso estudo é analisar técnicas espectroscópicas comparativas em amostras de soro de pacientes com câncer de mama e doença benigna da mama. Aplicamos a ferramenta ATR-FTIR associada ao classificador de análise discriminante linear (LDA) para identificar alterações no soro de pacientes com tumor maligno e doença benigna da mama para investigar seu potencial no diagnóstico de câncer de mama. A classificação do espectro infravermelho sérico por LDA mostrou sensibilidade de 89%, especificidade de 74% e acurácia de 84% entre tumor maligno e pacientes benignos. A espectroscopia Raman detectou sete bandas espectrais com potencial e, destas, uma banda na região do número de onda  $1083\text{ cm}^{-1}$  na segunda derivada demonstrou forte correlação, com sensibilidade e especificidade de 80,00% e 61,1%, respectivamente, em comparação ao câncer de mama e doença benigna da mama. Concluímos que este estudo é o primeiro a caracterizar e usar a análise química derivada. Além disso, demonstrou o possível uso potencial do biomarcador espectral do ATR-FTIR e do Raman sorológico. Assim, ATR-FTIR e espectroscopia Raman são técnicas promissoras e robustas para um diagnóstico precoce e diferenciam a doença benigna da mama do câncer de mama.

**Palavras chave:** Câncer de mama, Biomarcador, Espectroscopia, Diagnóstico Precoce.

## ABSTRACT

Infrared spectroscopy with attenuated total reflection fourier transforms (ATR-FTIR) and Raman spectroscopy are variant techniques of vibrational spectroscopy, allow rapid and non-invasive identification, with high specificity, reagent-free, low cost, reduced volume of samples and simple to operate. These techniques allow obtaining information not only about the chemical particles through the identification of functional groups, but also allow qualitative and quantitative analysis of the chemical substances present in the analyzed material. Both spectral techniques have been used in the diagnosis of several diseases, by detecting small variations in the molecular content related to the disease and indicating the potential of early diagnosis. Breast cancer is the leading cause of death among worldwide women. In 2020, among the most incident cancers in the world, in both sexes and ages, breast cancer ranked first with an estimated 2,261,419 new cases. For each year of the 2020-2022 triennium, an estimated 66,280 new cases are estimated. This value corresponds to an estimated risk of 61,61 new cases per 100 thousand women. The diagnosis of breast cancer comprises four conventional techniques: histopathology, mammography, ultrasound and magnetic resonance. However, the available techniques have their limitations for the early diagnosis of breast cancer, the high cost and no indication for young women. The aim of our study is to analyze comparative spectroscopic techniques in the serum samples of patients with breast cancer and benign breast disease. We applied the ATR-FTIR tool associated with the linear discriminant analysis (LDA) classifier to identify changes in the serum of patients with malignant tumors and benign breast disease to investigate their potential in the diagnosis of breast cancer. Serum infrared spectrum classification by LDA showed a sensitivity of 89%, specificity of 74% and accuracy of 84% between malignant tumors and benign patients. Raman spectroscopy detected seven spectral bands with potential and, of these, a band in the region of the 1083  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber in the second derivative showed a strong correlation, with sensitivity and specificity of 80.00% and 61.1%, respectively, in compared to breast cancer and benign breast disease. We conclude that this study is the first to characterize and use derived chemical analysis. Furthermore, it demonstrated the possible potential use of the spectral biomarker of ATR-FTIR and serological Raman. Thus, ATR-FTIR and Raman spectroscopy are promising and robust techniques for an early diagnosis and differentiate benign breast disease from breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, Biomarker, Spectroscopy, Early Diagnosis.

## LISTA FIGURAS

Figura 1– Estrutura da mama feminina .....	15
Figura 2 – Estrutura da Glândula Mamária .....	17
Figura 3 – Diagrama dos mecanismos de Espalhamento da radiação eletromagnética .....	26
Figura 4– Representação do espectro eletromagnético .....	28
Figura 5– Representação de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR.....	29
Figura 6– Representação esquemática do do sistema ATR-FTIR.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee for Cancer
ATR	Reflexão total atenuada
CCD	Charge-coupled device
CDIS	Carcinoma Ductal in situ
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
ER	Estrogênio receptor
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano
IR	Infravermelho
IHC	Imunohistoquímica
LDA	Análise Discriminante Linear
LR	Regressão Logística
MRI	Ressonância magnética
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PR	Receptor de progesterona
RH	Receptores hormonais
SVM	Máquina de vetores de suporte
TNM	Tumor primário [T], linfonodos regionais [N], metástases à distância [M])
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
WHO	World Health Organization
TNM	Tumor primário [T], linfonodos regionais [N], metástases à distância [M])

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Anatomia mamária feminina e câncer de mama .....	14
1.2 Rastreamento do câncer de mama .....	20
1.3 Soro como fluido diagnóstico.....	22
1.4 Espectroscopia Raman.....	24
1.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR).....	27
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral .....	33
2.2 Objetivos Específicos .....	33
Artigo 1.....	34
Artigo 2.....	52
Referências .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente com a maior taxa de mortalidade entre as neoplasias que acometem mulheres em todo o mundo (TORRE, 2016), com 2,1 milhões de novos casos registrados mundialmente em 2018. A prevalência do câncer de mama tem aumentado ao longo dos anos em todo o mundo (BRAY, 2018; FOROUZANFAR, 2011). Em 2020, entre os cânceres mais incidentes, em ambos os sexos e idades, o câncer de mama ficou em primeiro lugar (2.261.419), seguido pelo câncer de pulmão (2.206.771), cólon e reto (1.931.590) e próstata (1.414.259) (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, estima-se 66.280 novos casos de câncer de mama em cada ano no triênio 2020-2022; esse valor corresponde a um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019). Para o desenvolvimento de novas plataformas diagnósticas para câncer de mama é necessário ter uma compreensão global da fisiologia da glândula mamária e alterações patofisiológicas relacionadas a esse tipo de câncer.

### 1.1 Anatomia mamária feminina e câncer de mama

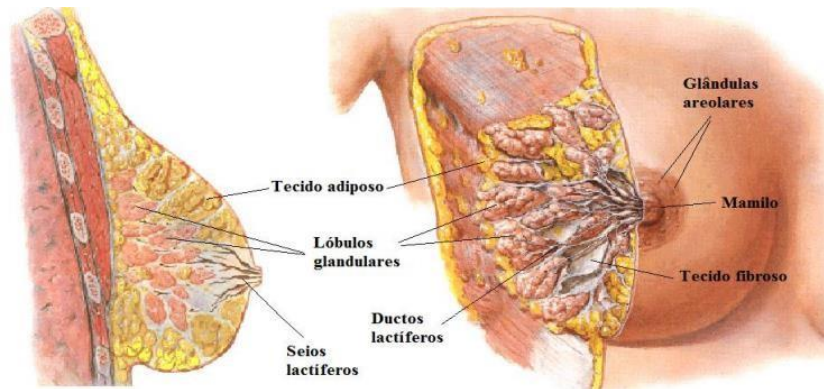
A glândula mamária passa por diversas transformações de desenvolvimento que se iniciam na vida intrauterina. Esta glândula sofre modificações durante a puberdade, gravidez e lactação relacionadas ao tamanho, forma e função (JESINGER, 2014; FENG *et al.*, 2018), reguladas principalmente pela produção hormonal (LANIGAN *et al.*, 2007).

A compreensão da anatomia e histologia da mama é fundamental para entender fatores precursores do câncer de mama. São órgãos pares, localizados no tórax, por cima dos músculos grande peitoral, conforme demonstrado na Figura 1. A mama é constituída por uma auréola, estrutura central da mama e um mamilo. O mamilo (tecido glandular) composto por um sistema ductal que se estende entre o tecido estromal, formado por tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso. O tecido glandular apresenta de 15 a 20 lobos, que compreendem 20 a 40 lóbulos (orifícios ductais), são independentes, separados por tecido fibroso, que correspondem as vias de drenagem das unidades funcionantes, ou seja, os lobos mamários, que convergem para o mamilo através do sistema ductal (BORGES, 2015; BERNANDES, 2010).

O sistema ductal é constituído por diversos ductos que drenam os alvéolos se fundindo para culminar em um ducto principal que se dilata em um ducto lactífero. A dilatação destes ductos por meio de exame de imagem (ultrassonografia) é geralmente sugestiva de patologias como doenças benignas da mama (adenoma intra-ductal, doença fibrocística ou

ectasia ductal), ou malignidade, exceto em lactantes (PANDYA; MOORE, 2011; HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

Figura 1– Estrutura da mama feminina



Fonte: Modificado NETTER ( 1995)

O epitélio mamário é constituído por dois principais tipos celulares: basal e luminal, conforme demonstrado na Figura 2A. O epitélio basal é a camada externa da camada contrátil que circunda a camada luminal e têm propriedades de células musculares lisas pelas células mioepiteliais. O epitélio luminal é a camada interna, dá origem aos ductos, possuem populações celulares determinadas pelos receptores hormonais e contém células epiteliais cuboidais, que têm o potencial de se diferenciar ainda mais em células secretoras de leite (lactócitos) durante a lactação (MACIAS; HINCK, 2012; HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

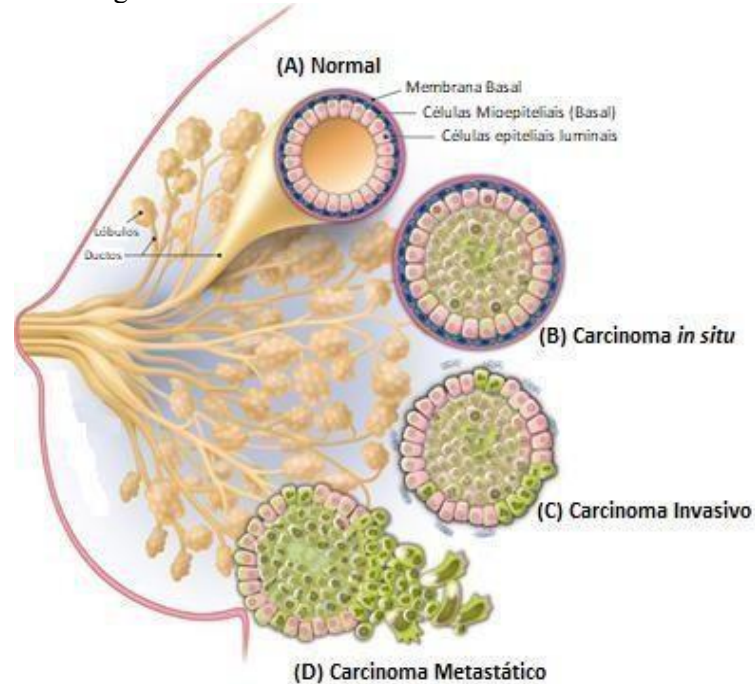
Os mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica realizam um papel fundamental no desenvolvimento e no processo de diferenciação celular, quando ocorrem alterações genéticas e epigenéticas, as vias de sinalização que regulam a proliferação, divisão e apoptose celular podem ficar desequilibradas e modificar a estrutura normal e o funcionamento das células da mama, aumentando o potencial destas células em se tornar neoplásicas (FENG *et al.*, 2018). O câncer de mama é uma doença clinicamente heterogênea devido a vários fatores que contribuem para sua carcinogênese, progressão, metástase e reincidência (KOH *et al.*, 2014). Dentre esses fatores, podem-se citar níveis de hormônios endógenos, fatores de crescimento, oncogenes e genes supressores de tumor, idade, história familiar e estilo de vida (KEEN; DAVIDSON, 2003; SHARMA *et al.*, 2010). O desenvolvimento do câncer de mama envolve uma sequência de estágios clínicos iniciando com carcinoma *in situ*, progredindo para lesão invasiva e podendo culminar em doença metastática (GHERSEVICH; CEBALLOS,



2014). Atualmente as neoplasias malignas da mama podem ser classificadas como:

- 1 Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS): é o tipo mais comum, corresponde a 90% dos tumores não invasivos, são classicamente identificados pela delimitação das células malignas nos ductos e lóbulos pela membrana basal, ou seja, não apresenta metástase. Sua classificação histológica compreende subtipos de baixo grau, grau intermediário e alto grau. Em geral são diagnosticadas em exames de rastreamento quando microcalcificações com morfologia e características específicas são evidenciadas no exame de mamografia (Figura 1B) (BORGES, 2015; DUFFY *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2012, SHARMA *et al.*, 2010).
- 2 Carcinoma Ductal Invasivo (CDI): corresponde a 80% dos tumores invasivos. Origina-se quando ocorre invasão do estroma e infiltração da membrana basal com a perda de células mioepiteliais. Destaca-se que pode ser invasivo, no entanto, não é obrigatoriamente metastático. Como não possuem critérios definidos para nenhum outro tipo característico de tumor, também são conhecidos como “carcinoma invasivo sem outra especificação” (SOE). Sua classificação depende da severidade dos níveis de túbulos, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico. Nos exames de imagens, o aspecto está relacionado a nódulos com margens espiculadas, indistintas, microlobuladas e frequentemente circunscritas (Figura 1C) (DUFFY *et al.*, 2016; BORGES, 2015; FU *et al.*, 2018; POLYAK, 2007; SHARMA *et al.*, 2010).
- 3 Carcinoma metastático: é raro, mas de bom prognóstico, pode invadir os tecidos adjacentes e metastizar para outros órgãos, apresenta grande variedade de fenótipos morfológicos e subtipos histopatológicos com características clínicas e patológicas distintas. Necessitam de profissionais bastante treinados para seu diagnóstico pela mamografia e ultrassonografia pois apresentam uma aparência indeterminada (SHARMA *et al.*, 2010; POLYAK, 2007).

Figura 2 – Estrutura da Glândula Mamária



(A) Organização normal das células; (B) Carcinoma *in situ*; (C) Carcinoma Invasivo; (D) Células cancerosas com capacidade metastática.

Fonte: Modificado de Marshall (2014)

Atualmente o sistema utilizado mundialmente para realização do estadiamento do câncer de mama é o TNM (tumor primário [T], linfonodos regionais [N], metástases à distância [M]), que foi inicialmente desenvolvido em 1959 pelo American Joint Committee for Cancer (AJCC). O TNM está frequentemente passando por atualizações referendadas por um conjunto de especialistas em câncer de mama e representantes da AJCC. Atualmente, os grupos de estágios são 0, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV (GIULIANO *et al.*, 2017).

Resumidamente, a determinação de câncer patológico (p) sobre o T compreende: TX, primário o tumor não pode ser avaliado; T0, sem evidência de tumor primário; Tis (DCIS), ductal carcinoma *in situ* (DCIS); Tis (Paget), doença de Paget do mamilo não associada a carcinoma invasivo e / ou CDIS no parênquima mamário subjacente; T1, tumor  $\leq 20$ mm na maior dimensão; T2, tumor  $> 20$ mm mas  $\leq 50$ mm na maior dimensão; T3, tumor  $> 50$  mm na maior dimensão; e T4, tumor de qualquer tamanho com extensão para a parede torácica e / ou para a pele (ulceração ou macroscópica nódulos) (GIULIANO *et al.*, 2017).

Em relação a N, existe: NX; linfonodos regionais não podem ser avaliados (por

exemplo, quando estes não foram removidos para estudo patológico ou removidos anteriormente); ou N0, sem linfonodo regional metástase identificado ou células tumorais isoladas apenas; N1, micro metástases ou metástases em 1-3 linfonodos axilares e/ou linfonodos mamários internos clinicamente negativos com micro metástases ou macro metástases por biópsia de linfonodo sentinela; N2; metástases em 4-9 linfonodos axilares ou mamária interna ipsilateral positiva linfonodos por imagem na ausência de metástases em linfonodos axilares; N3, metástases em 10 ou mais linfonodos axilares, ou em infra claviculares (nível III axilar) linfonodos ou linfonodos mamários internos ipsilaterais positivos por imagem na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos de nível I e II, ou em mais de 3 linfonodos axilares e micro metástases ou macro metástases por linfa sentinela biópsia de linfonodo em linfonodos mamários internos ipsilaterais clinicamente negativos ou em linfonodos supra claviculares ipsilaterais (GIULIANO *et al.*, 2017).

As categorias de M incluem: M0, nenhuma evidência clínica ou radiográfica de metástases; M1, metástases distantes detectadas por meios clínicos e radiográficos e/ou metástases histologicamente comprovadas maiores que 0,2 mm (GIULIANO *et al.*, 2017).

No que diz respeito aos tumores de mama, o método semi-quantitativo de graduação histológica da malignidade proposto por Bloom e Richardson (1957), posteriormente modificado por Elston e Ellis, avalia três fatores: índice mitótico, polimorfismo nuclear e a presença ou não de formação tubular. Cada um dos 3 fatores recebe uma pontuação de 1 a 3 (sendo 1 o mais próximo do normal). De acordo com a pontuação combinada do tumor, o tumor está incluído em grau 1, grau 2, grau 3. Câncer de mama de alto grau tende a recorrência e metástase precoce, enquanto os pacientes com tumores de baixo grau geralmente têm um bom resultado clínico (VUONG *et al.*, 2014; GIULIANO *et al.*, 2017). As diferentes classificações são baseadas na histologia do tumor, sendo os principais: Carcinoma Ductal (*In situ* ou invasivo) e Carcinoma Lobular (invasivo). Além desses tipos mais comuns, ainda podem existir outros tipos de tumores mais raros, como câncer de mama inflamatório, carcinoma papilar, tumor Phyllodes, dentre outros (FENG *et al.*, 2018). Baseados no padrão de expressão gênica os tumores de mama são classificados em 4 subtipos principais, luminal A e B, normal-like, basal-like e HER-2+ (do inglês human epidermal growth factor receptor-type 2) (PEROU *et al.*, 2000).

Com a utilização das técnicas moleculares, os processos envolvidos da carcinogênese têm sido esclarecidos tais como: processos biológicos, processos patogênicos e respostas preditoras farmacológicas da intervenção terapêutica. Isso resultou em informações alternativas para auxiliar os oncologistas clínicos, o que pode influenciar diretamente nas

tomadas de decisões sobre a terapia mais efetiva utilizando conceitos de medicina personalizada (ou medicina de precisão). Alguns marcadores moleculares de câncer de mama são reconhecidos com valor prognóstico e / ou terapêutico como receptores hormonais (HR), antígeno Ki-67, oncogene HER2 e proteínas p53 e os genes para câncer de mama relativos à hereditariedade, tais como, BRCA1 e BRCA2 (HIRATA *et al.*, 2014; VUONG *et al.*, 2014; MAHDAVI *et al.*, 2018).

O receptor de estrogênio (ER) e o receptor de progesterona (PR) são os principais HR que influenciam no câncer de mama. Estes receptores são proteínas expressas no epitélio e no estroma da mama que podem ser ativados por hormônios circulantes específicos. Fatores de risco são associados a tumores de mama ER + e PR + e podem envolver mecanismos relacionados à exposição aos hormônios estrogênio e progesterona. HER2 é um receptor transmembrana de tirosina quinase pertencente a uma família de crescimento epidérmico e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). A detecção de oncogene ERBB2 / HER2 é considerada um marcador de mau prognóstico (HIRATA *et al.*, 2014; VUONG *et al.*, 2014).

O antígeno Ki-67 é uma proteína de ligação ao DNA que é expressa em todos os vertebrados e é considerado um marcador de proliferação utilizado para classificação tumoral. A pontuação do Ki-67 é mensurada em cortes histológicos pela metodologia imunohistoquímica (IHC) e é definida como a porcentagem de células de carcinoma invasivo coradas. A proteína tumoral p53 é fundamental para a manutenção da integridade do genoma e homeostase celular normal. Mutações no gene TP53 resultam em acúmulo de proteína p53 alterada no núcleo, que é detectada pelo método pelo IHC, sendo um indicador de um mau prognóstico em condições clínicas (HIRATA *et al.*, 2014; VUONG *et al.*, 2014).

A expressão dos marcadores ER, PR, HER2 e Ki-67 por imunohistoquímica (IHC) auxiliam a classificação do câncer de mama em subtipos luminais. Os tumores luminais apresentam maior prevalência e são classificados conforme a expressão dos receptores hormonais, expressão de HER-2 e níveis de Ki67. Os tumores luminal A possuem expressão do ER e PR, ausência da expressão de HER-2 e Ki67  $\leq 14\%$  e os tumores luminal B (ER- e / ou PR-positivo / HER2-negativo / Ki-67  $\geq 14\%$ ; ER- e / ou PR-positivo / HER2-positivo / qualquer Ki-67), HER2-positivo (ER- e PR-negativo / HER2-positivo) (LIN *et al.*, 2015; TOSS; CRISTOFANILLI, 2015). Os luminais A apresentam um melhor prognóstico em comparação com os tumores luminais B (EROLES *et al.*, 2012). Os tumores triplo negativo ou tipo basal (ER- e PR- / HER2-) (LI *et al.*, 2015; TOSS; CRISTOFANILLI, 2015), representantes principalmente do basal-like, são tumores que apresentam um desenvolvimento mais agressivo, gerando instabilidade genômica (ARPINO; MILANO; PLACIDO, 2015).

Os significativos avanços na abordagem do câncer de mama que ocorreram nos últimos anos permitiram redução significativa de cirurgias mais agressivas e também permitiram maior eficácia dos tratamentos baseados em conceitos de medicina de precisão (SLEDGE, 2014). A escolha do tratamento varia de acordo com as classificações supra-citadas, bem como das condições clínicas da paciente (idade, status menopausal, comorbidades e escolhas do paciente). As terapias incluem tratamento local tais como cirurgia (além de reconstrução mamária) e radioterapia, e sistêmico com quimioterapia e hormonioterapia (DEPCIUCH *et al.*, 2017; ROZEN *et al.*, 2008).

## 1.2 Rastreamento do câncer de mama

Uma das prioridades na agenda da Política Nacional de Saúde é uma atenção eficiente do câncer de mama, em decorrência de sua grande magnitude como problema de saúde pública no Brasil. Entre as ações de atenção planejadas para o controle do câncer de mama, está a detecção precoce, que incide em ações de rastreamento e diagnóstico precoce (GEBRIM, 2016).

As diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil foram formadas a partir da sistematização de evidências das pesquisas científicas, em coerência com a Lei nº 12.401/2011, o Decreto nº 7.508/2011 e a Política Nacional de Gestão de Tecnologias em Saúde, representando um avanço importante na consolidação da prática de elaboração de documentos técnicos e de políticas públicas baseadas em evidências (BRASIL, 2013; GEBRIM, 2016).

O rastreamento do câncer de mama tem como objetivo principal estabelecer precocemente seu diagnóstico e aplicar o tratamento adequado de forma célere, contribuindo significativamente para a redução das taxas de mortalidade. A tecnologia vem contribuindo com as técnicas de diagnóstico para a detecção do câncer de mama incluindo: mamografia, ultrassonografia, ressonância magnética [MRI], fotoacústica, tomografia por emissão de pósitrons [PET]), elastografia e tomografia de fluorescência. Porém, essas técnicas apresentam limitações, podendo apresentar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Basicamente, o diagnóstico de câncer de mama compreende quatro técnicas convencionais: histopatologia, mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética (TIRONA, 2013; DEPCIUCH; KAZNOWSKA *et al.*, 2016; GEBRIM, 2016; COMSTOCK *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2014).

A histopatologia é considerada a técnica padrão ouro para realização do diagnóstico do câncer de mama. Os parâmetros histopatológicos são considerados prognósticos clássicos, resultando em uma análise precisa das características morfológicas das células e tecidos afetados em seções de tecido através da luz do microscópio. O patologista desempenha um papel crucial no diagnóstico acurado e na subsequente avaliação preditiva para nortear tratamento e decisões de conduta médica. No entanto, é altamente subjetivo, uma vez que requer o julgamento de patologistas e também é um procedimento invasivo para o paciente, pois as amostras dos tecidos são obtidas a partir de biópsia ou cirurgia da mama (DOWSETT *et al.*, 2000; SIMONOVA; KARAMANCHEVA, 2013; BUNACIU *et al.*, 2015).

A mamografia é a técnica radiográfica mais usada para detectar câncer de mama, realizada com equipamentos de radiodiagnóstico. Atualmente, a realização da mamografia envolve a exposição da mama a um feixe de raios-X, do qual parte é absorvida, parte é transmitida e parte é espalhada pelo tecido da mama. No entanto, pode apresentar falso positivo ou resultados negativos, baixa sensibilidade e especificidade. Além disso, existem os riscos inerentes a indução de câncer e desconforto à realização da mamografia (FEIG, 2006; LAW *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2015; DEPCIUCH, KAZNOWSKA, *et al.*, 2016; PEAIRS *et al.*, 2017).

A ultrassonografia é um exame de imagem que emprega ondas sonoras de alta frequência. A construção da imagem ultrassonográfica acontece na velocidade em que a onda sonora se propaga entre os tecidos. Sendo um exame ecográfico, a ultrassonografia na paciente assintomática pode fornecer suporte ao resultado obtido na mamografia em pacientes com mamas densas, porém o método de diagnóstico é influenciado pela experiência do ultrassonografista, tal como posicionamento adequado da paciente e conhecimento detalhado da anatomia normal e dos aspectos múltiplos da patologia mamária (MICHELIN *et al.*, 2001). A ultrassonografia é um método não invasivo, apresenta baixa resolução e grande margem de erro pois, frequentemente, não permite a localização precisa e alterações do tumor (CATARZI *et al.*, 1992; DEPCIUCH; KAZNOWSKA *et al.*, 2016; PEAIRS *et al.*, 2017).

A ressonância magnética (RM) é o um método sensível, não invasivo, porém, de baixa especificidade. É utilizada para realizar a triagem em pacientes de alto risco em conjunto com a mamografia, permite indicações para realizar a avaliação pré-operatória de tumores e a resposta à quimioterapia adjuvante. O princípio físico da RM é fundamentado no resultado da interação entre o campo magnético produzido pelo equipamento com os prótons de hidrogênio do tecido humano. O equipamento encaminha um pulso de radiofrequência e a captura os sinais por uma unidade receptora. Este sinal é codificado, capturado, processado e

gerado em imagem. Atualmente, a RM é uma das plataformas mais sensíveis para a detecção precoce do câncer de mama (BORGES, 2015; DEPCIUCH; KAZNOWSKA *et al.*, 2016; PEAIRS *et al.*, 2017).

No entanto, as técnicas disponíveis apresentam limitações para o diagnóstico precoce do câncer de mama. Com o aumento da incidência mundial e a ausência de métodos confiáveis e suficientes para a detecção precoce, demandam de testes diagnósticos quantitativos confiáveis, econômicos, de alto rendimento, menos invasivos, com alta sensibilidade e especificidade para identificar alterações moleculares características do câncer de mama.

Desta maneira, novas plataformas de triagem diagnóstica poderão contribuir significativamente no desfecho clínico do paciente por meio da identificação de estágios iniciais, redução da mortalidade, monitoramento do tratamento e identificação de grupos de alto risco (CHENG *et al.*, 2015; HUGHES *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2020).

Portanto, os biomarcadores séricos podem servir como rastreamento sérico rápido e reduzir significativamente o tempo de diagnóstico atual por meio de técnicas espectroscópicas. O soro sanguíneo é um carregador de molécula no corpo, entre elas, estão aquelas secretadas de diferentes tecidos em resposta a diferentes necessidades fisiológicas, disfunções e estados patológicos (MOTTA, 2003; PSYCHOGIOS, 2011).

Entre as plataformas candidatas estão a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman. Ambas são técnicas analíticas, vibracionais, que fornecem efetivamente, de forma não destrutiva e sem rótulos, informações sobre a estrutura e composição química de materiais biológicos em nível molecular. As técnicas espectroscópicas tem sido utilizadas para detectar várias patologias, durante a progressão da doença, metabólicos tumorais podem ser identificados em diversos materiais biológicos (KENDALL *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011; BUNACIU *et al.*, 2015; VARGAS-OBETA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; NARGIS *et al.*, 2019; KAR *et al.*, 2019; SITNIKOVA *et al.*, 2020; ).

### **1.3 Soro como fluido diagnóstico**

O sangue possui uma parte de elementos figurados como os eritrócitos (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas (derivados citoplasmáticos dos megacariócitos) e outra parte líquida designada por plasma, onde os elementos figurados se encontram suspensos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; HOFFBRAND; MOSS, 2013).

### 1.3.1 Plasma

As amostras de materiais biológicos, tais como soro e plasma, analisadas em diversos estudos epidemiológicos ou clínicos, são extremamente importantes, pois trazem habitualmente inúmeros avanços nas estratégias de combate a doenças, através da análise de substâncias detectáveis que podem ser úteis na prevenção ou no tratamento de patologias.

Na coleta de sangue por punção venosa, cujo objetivo seja obtenção de sangue total ou plasma deve-se empregar um tubo contendo anticoagulante, considerando que este não deve interferir nos analitos químicos a serem dosados. O plasma pode ser obtido nesse processo após coleta de sangue e por centrifugação mecânica com a utilização de uma centrífuga para tubos, quando ocorrerá separação do sobrenadante (plasma) e sedimento (células do sangue) (VIVAS, 2008; MOTTA, 2003).

O plasma é um líquido tecidual constituído em sua maioria por água (92%) e contém diversas substâncias com pesos moleculares diferentes que perfazem 7% do seu volume. Os componentes difundidos são proteínas plasmáticas, nutrientes, eletrólitos e gases respiratórios (MESCHER, 2013; MOTTA, 2003). No que se refere às proteínas plasmáticas, destacam-se a albumina, por estar envolvida na importante regulação da pressão osmótica do sangue e por ser a proteína mais abundante no plasma; as imunoglobulinas relacionadas ao sistema imunitário e os fatores de coagulação que exercem um papel determinante no processo de hemostasia (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Outro componente muito utilizado é plasma rico em plaquetas (PRP), material de fonte endógena de fatores de crescimento, utilizado como tratamento terapêutico inovador no reparo e regeneração de diversos tecidos capazes de estimular a angiogênese, diferenciação e proliferação celular (CHOUKROUN *et al.*, 2006; BAIN, 2007). Em processos transfusionais, o plasma humano também pode ser utilizado como um produto para fins terapêuticos conhecido como plasma fresco congelado, ou, ainda como material para a produção de produtos farmacêuticos, conhecidos como derivados de plasma (BURNOUF, 2007; SHAZ *et al.*, 2013).

### 1.3.2 Soro

Na coleta de sangue por punção venosa, cujo objetivo seja obtenção não mais de sangue total ou plasma, e sim soro, deve ser utilizado um tubo sem aditivo anticoagulante (tubo seco), considerando assim que o sangue irá coagular dentro do tubo.



O soro difere do plasma por não conter fibrinogênio, proteína consumida juntamente com os demais fatores da cascata de coagulação para formação do tampão hemostático de fibrina. Na centrifugação do sangue total coagulado, separam-se o sedimento (células do sangue) e sobrenadante (soro) (VIVAS, 2008; VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005).

A coleta de sangue é um dos procedimentos minimamente invasivos mais comuns na atenção de saúde (WEBSTER, 2009), apresentando algumas vantagens: coleta de forma comumente utilizada na prática clínica, fácil armazenamento, baixo custo, proporcionando a segurança para o profissional e do paciente (VIVAS, 2008). O soro também permite analisar as alterações bioquímicas precocemente nas patologias e oferece uma oportunidade de desenvolvimento de biomarcadores preditivos (ZHANG; SUN; WANG, 2012). O soro já foi descrito como um fluido de alto potencial para diagnósticos em neoplasias, tais como: câncer de mama (VARGAS-OBIETA *et al.*, 2016; ELMI *et al.*, 2017; SITNIKOVA, V. E. *et al.*, 2020), câncer cervical (GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2013); câncer de estômago (TEH, 2010); tumor cerebral (HANDS *et al.*, 2016).

Contudo, essas vantagens alinhadas às técnicas espectroscópicas podem permitir o desenvolvimento de novas tecnologias, tais como a espectroscopia de infravermelho e Raman, que são ferramentas promissoras para a implementação de análises quantitativas em rotinas clínicas, realizando o diagnóstico precoce, com a possibilidade de análise em tempo mais rápido do que as técnicas correntemente utilizadas por meio do soro do paciente.

#### **1.4 Espectroscopia Raman**

A ciência que estuda as interações da radiação eletromagnética com a amostra, chama-se espectroscopia, tornando-se uma das suas principais finalidades a análises dos níveis de energia e interação dos átomos ou moléculas (SALA, 2008). Na análise de moléculas, a região espectral onde essas transições são investigadas podem ser: eletrônicas, vibracionais ou rotacionais. Em geral, as transições eletrônicas encontram-se na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas (SALA, 2008; SKOOG, 2007). As diversas regiões espectrais exigem espectrômetros com elementos ópticos e eletrônicos apropriados. Sendo assim, cada modelo de espectroscopia exige uma tecnologia própria (NAWROCKA, 2017; SKOOG, 2007).

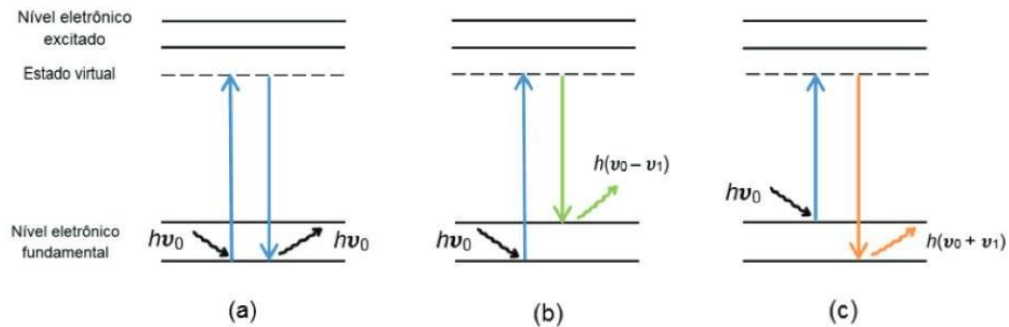
A espectroscopia Raman é uma técnica de espalhamento baseada no efeito Raman, descoberto pelo físico Chandrasekhara Venkata Raman e publicado em 1928. Os efeitos Raman

caracterizam-se devido a uma alteração na frequência de uma pequena fração da radiação incidente quando esta é espalhada por moléculas (OLIVEIRA, 2009; SKOOG, 2007; FERRARO, 2003). A espectroscopia Raman é uma técnica óptica utilizada para caracterização de moléculas baseada na dispersão inelástica da luz monocromática (e.g., laser), que analisa as interações da radiação eletromagnética com a amostra analisada, determinando os níveis de energia vibracionais de átomos ou moléculas, como forma de obtenção de informações sobre a estrutura química e a forma física, identificação de substâncias a partir dos padrões de espectros característicos, tais como a impressão digital, e para determinar, quantitativa ou semi-quantitativamente de uma substância na amostra estudada (EDWARDS, 2005; SKOOG, 2007; HERRERO, 2008). A interação ocorre desde a absorção, emissão, ou do espalhamento dos fótons. Quando há absorção de fótons, a molécula sofre uma modificação de seu estado, eletrônico, vibracional ou rotacional (SALA, 2008). Os espectrofotômetros detectam este fenômeno, na região do ultravioleta ou visível que causa mudanças do estado eletrônico da molécula e próximo da região do infravermelho que induz mudanças no estado vibracional ou rotacional (SKOOG, 2002; SALA, 2008; HOLLER, 2009; SKOOG, 2017).

No momento em que a onda eletromagnética interage com o material, as órbitas eletrônicas das moléculas são movimentadas periodicamente com a mesma frequência do campo elétrico da onda incidente. Esta oscilação eletrônica resulta na separação (distribuição) das cargas dentro das moléculas, o que é descrito como momento de dipolo induzido, assim ocorrendo interação dipolar elétrica entre o momento de dipolo induzido e a radiação eletromagnética ocorre o espalhamento da luz incidente (SALA, 1996; SKOOG, 2007).

Como pode-se visualizar na Figura 3 que demonstra um diagrama dos mecanismos de espalhamento da radiação eletromagnética, no espalhamento Rayleigh (a), emprega-se o princípio da conservação de energia, ou seja, a molécula, depois de excitada, decai emitindo um fóton idêntico ao incidido, o fóton é espalhado sem ocorrer alterações dos comprimentos de onda, sendo assim, a energia do fóton é a mesma antes e após sua interação com a amostra. No espalhamento inelástico Raman Stokes (b) um fóton de energia excita uma molécula no estado fundamental e essa passa para um estado intermediário (ou virtual) e em seguida decai para um estado vibracionalmente excitado de energia  $v_1$ , emitindo um fóton com energia  $v_0 - v_1$ , perderá a mesma porção de energia que a molécula adquiriu. Nesse caso, o fóton espalhado possui energia menor que a do incidente. No espalhamento inelástico Raman anti-Stokes (c), a molécula já se encontra em um estado excitado, após a sua interação com o fóton ela passa para um estado virtual e decai até seu estado fundamental emitindo um fóton com energia  $v_0 + v_1$ .

Figura 3 – Diagrama dos mecanismos de Espalhamento da radiação eletromagnética



(a) espalhamento elástico (Rayleigh), (b) espalhamento inelástico (região Stokes) e (c) espalhamento inelástico (região anti Stokes), onde  $\nu_0$  é a frequência do fóton incidente e  $\nu_1$  é o valor da diferença de energia entre o estado fundamental e o excitado (SANTOS *et al.*, 2019).

A espectroscopia Raman é uma ferramenta óptica, quantitativa, rápida, não destrutiva, de alta sensibilidade a pequenas mudanças estruturais e com aplicações na identificação de “impressões digitais moleculares”, proporcionando alta precisão, amplamente utilizada para investigar a estrutura e propriedades das moléculas, utilizando materiais biológicos, tais como tecidos, fluidos e tumores humanos, contribuindo para diversas aplicações médicas e diversas áreas (KUMAMOTO, 2018; HUANG, 2005; DECARLO, 2018; BUZZINI, 2009). Essa técnica detecta os componentes bioquímicos em uma quantidade muito pequena de amostra e livre de qualquer reagente. Essas vantagens tornam uma ferramenta poderosa para análise de diferentes amostras biológicas (ZHANG, 2018).

Uma ampla gama de estudos utilizou a espectroscopia Raman, que se mostrou promissora à aplicabilidade da técnica para diversas áreas, tais como: biológicas e biomédicas, Lin *et al.* (2012) pesquisou diferenças de tumores do tecido de laringe entre o tecido normal e canceroso da laringe. A técnica tem confirmado várias vantagens, tais como, análises de proteínas teciduais, componentes do sangue, tecidos biológicos (ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2009), patologias relacionadas a córnea, arteriais e pesquisas de câncer em tecidos moles da mama, do colo, da bexiga e outros (ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2009). Também é possível contribuir para o diagnóstico de desordens relacionadas ao cérebro, como doença de Alzheimer (PARASKEVAIDI *et al.*, 2018). E, na indústria farmacêutica, estudo realizado para analisar o controle de qualidade online na fabricação de comprimidos farmacêuticos (WILLIAMS; BONAWI-TAN, 2004). Decarlo (2018) realizou um estudo sobre a mineralogia dos esqueletos dos corais e Santos (2019) aplicou espectroscopia Raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. Na ciência forense, é possível constatar partículas

microscópicas de drogas ilícitas em resíduos (DAY *et al.*, 2004).

Especificamente para o câncer de mama, já existem indicações para o uso da espectroscopia Raman como potencial para triagem e diagnóstico do câncer mamário, o que difere de outros estudos que utilizaram maiores quantidades de amostras e outros materiais, como tecidos biológicos, plasma e sangue total (HAKA *et al.*, 2009; SYNYTSYA, 2014; BILAL, 2017; NARGIS, 2019; KOTHARI, 2021).

Durante o desenvolvimento do tumor, os metabólitos neoplásicos podem ser identificados na corrente sanguínea, os quais têm o potencial de serem detectados pelas vibrações das conexões nas biomoléculas por meio da espectroscopia Raman; portanto, a técnica é capaz de fazer o diagnóstico do câncer, tornando-se uma ferramenta clínica promissora para o diagnóstico do câncer de mama (CALDEIRA, 2006; TEH, 2010). O que contribui para o diagnóstico precoce e com as estratégias de intervenções terapêuticas precoces que possam minimizar as morbidades e reduzir a mortalidade.

### **1.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR)**

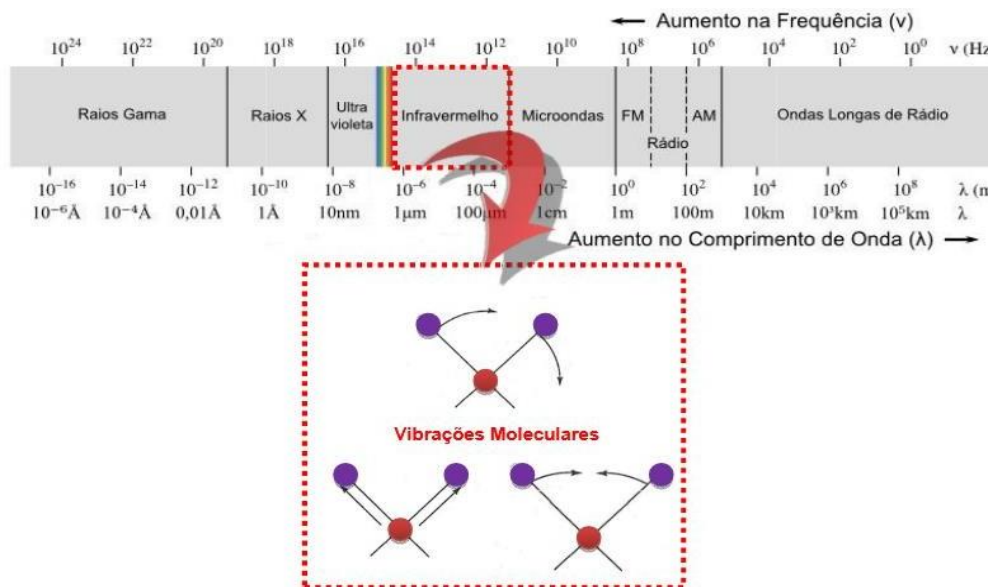
A espectroscopia de infravermelho é uma plataforma baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula que utilizam a interação da radiação eletromagnética com a matéria como forma de obtenção de informações sobre a estrutura química e a forma física da amostra analisada (STUART, 2005; BARTH, 2007).

A aplicação da espectroscopia de infravermelho é empregada no campo biológico desde 1950, com análise da estrutura de polipeptídeos e proteínas e, gradativamente foi aplicada à análise de ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos (BEEKES *et al.*, 2007). Várias pesquisas utilizaram a espectroscopia FTIR como uma ferramenta de identificação de metabólitos e bioquímica para detecção e diagnóstico de diversas patologias, como artrite (ELLIS; GOODACRE, 2006), câncer, doenças ósseas, aterosclerose, pedras nos rins e cálculos biliares, diabetes, osteoartrite (KRAFFT *et al.*, 2009). Podendo ser empregada em diversas amostras biológicas, incluindo sangue, saliva, urina, muco vaginal, muco nasal, lágrimas, leite materno, tecido, células, cera de ouvido, fezes, unhas, cabelos e sêmen (ELKINS, 2011; TREVISAN *et al.*, 2014). Consequentemente, a espectroscopia de infravermelho apresenta características dos espectros de infravermelho que permitem a identificação de moléculas biológicas (BEEKES *et al.*, 2007).

A espectroscopia FTIR utiliza a região do infravermelho do espectro

eletromagnético, que corresponde ao comprimento de onda entre  $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ,  $12800$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ ,  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  e  $400$  a  $30 \text{ cm}^{-1}$ , conforme Figura 4 (GAFFNEY; MARLEY; JONES, 2012). A região espectral do infravermelho médio  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  é onde encontra-se o maior número de aplicações e a maior parte das pesquisas desenvolvidas com amostras biológicas, uma vez que é nesta região do infravermelho que os componentes bioquímicos possuem vibrações moleculares (KATON, 1994; SMITH, 1999; CHAN; KAZARIAN, 2016).

Figura 4– Representação do espectro eletromagnético



Fonte: Adaptado de Skoog (2002)

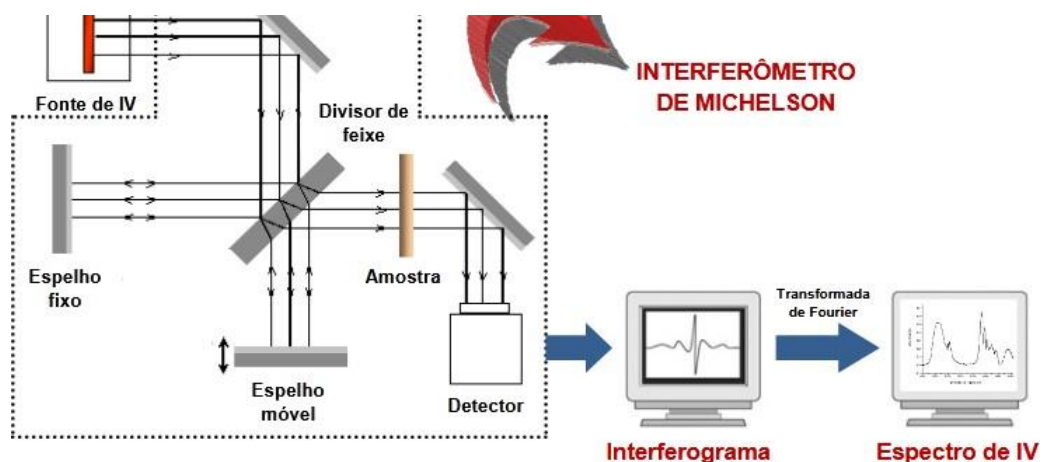
Nas análises espectroscópicas, o comprimento de onda é a grandeza que representa a energia e a frequência da onda eletromagnética. O comprimento de onda da radiação incidente absorvida ocorre devido às interações intermoleculares. Os átomos da molécula ao se movimentarem, realizam uma variação na distribuição de carga molecular devido ao momento dipolo, quando a molécula vibra ou gira, ocorrendo uma modificação em seu momento dipolo com a formação de um campo elétrico que interage com o campo associado à radiação. Nesse momento a molécula torna-se ativa no infravermelho. Estes modos vibracionais podem ser qualitativamente e quantitativamente mensuráveis. Dessa forma, é possível relacionar os grupamentos moleculares com os compostos responsáveis pela absorção/vibração. Devido a absorção do infravermelho, gera um espectro resultante específico da molécula, descrito como uma "impressão digital" infravermelha da amostra (CLEMENS *et al.*, 2014; BUNACIU; HOANG; ABOUL- ENEIN, 2017).

Atualmente na espectroscopia no infravermelho um dos equipamentos mais usados

são os com transformada de Fourier (FTIR), que apresentam em sua óptica o interferômetro de Michelson, permitindo uma excelente resolução e qualidade do espectro promovendo o aumento do sinal e maior velocidade de varredura e aquisição dos espectros (AL-SAEED; KHALIL, 2012). A espectroscopia FTIR fundamenta-se na interferência da radiação entre dois feixes para originar um interferograma que é um sinal gerado em função da alteração do comprimento percorrido entre os dois feixes (STUART, 2005). Os componentes básicos do interferômetro mais comumente utilizado na espectrometria de FTIR, o interferômetro de Michelson, um beamsplitter (espelho semi-reflexivo) que separa o feixe de radiação infravermelha em dois segmentos (perpendiculares entre si), sendo uma parte apontada a um espelho fixo e a outra parte para um espelho móvel. Após ocorrer a reflexão nos espelhos, os feixes voltam a se encontrar e atingem o material analisado (STUART, 2005; AL-SAEED; KHALIL, 2012).

A Figura 5 demonstra esquematicamente o funcionamento da absorção no infravermelho por transformada de Fourier. A radiação emitida da fonte é passada através de um interferômetro, que atinge um espelho fixo e um móvel, e então incide na amostra. A radiação não absorvida pela amostra incide em um detector fotossensível que irá amplificar o sinal, convertendo em um interferograma e transferido para o computador de transformação de Fourier, nesse momento é convertido em um espectro de absorção óptica, que demonstra a intensidade de absorção em função do número de onda (STUART, 2005; BASSAN, 2011; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017).

Figura 5– Representação de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR

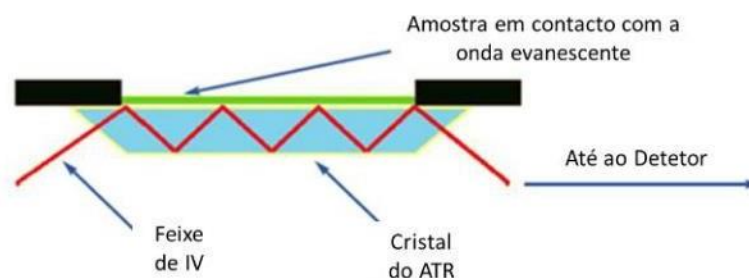


Fonte: Adaptado de Pereira (2016)

Os espectros de FTIR podem ser obtidos principalmente em três diferentes configurações experimentais: transmissão, transflexão ou reflexão total atenuada (BUNACIU *et al.*, 2015; LIMA, C. A. *et al.*, 2015). A transmissão opera com radiação infravermelho através do substrato da amostra antes que a radiação resultante seja identificada. Os espectros estão sujeitos a interferências de efeitos físicos que ocorrem durante a análise da amostra (BEASLEY *et al.*, 2014; CHAN; KAZARIAN, 2013). Por sua vez, a transflexão detecta a radiação infravermelho absorvida depois de ser transmitida através da amostra, refletida pelo substrato e transmitida de volta através da amostra (BUNACIU *et al.*, 2015; LIMA, C.A. *et al.*, 2015). Os princípios da reflexão interna total não necessitam de substratos especiais e de qualquer preparação da amostra, requer somente que o material a ser estudado seja sólido ou líquido, tornando o método rápido e simples, sendo mais recomendado para processos de diagnósticos de desordens patológicas (DORLING; BAKER, 2013; TATULIAN, 2003).

Segue o esquema representativo do acessório ATR na figura 6, a amostra precisa ser inserida em contato direto com um cristal de diamante, induzindo a reflexão interna total da radiação incidente, que é atenuada e adentra na amostra como uma onda evanescente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Esta onda evanescente é então modificada e encaminhada de volta para o detector no espectrômetro FTIR, gerando um espectro único, que representa o sinal médio da área da amostra pela qual a luz passou (BARTH, 2007; LANE; SEE, 2012; CLEMENS *et al.*, 2014; BUNACIU *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2015)

Figura 6– Representação esquemática do do sistema ATR-FTIR



Fonte: Stuart (2004)

A utilização da técnica de FTIR apresenta várias vantagens em estudos biológicos, diagnóstico e monitoramento de diversas patologias, pois permite a identificação rápida e não

invasiva de alterações bioquímicas moleculares com alta especificidade, simplicidade em operar, livre de reagentes, baixo custo, volume reduzido de amostras, permite a utilização de fluidos e tecidos biológicos, método computacional que permite análises repetitivas e automatizadas, contribuindo para uma avaliação rápida e objetiva do material.

Além disso, permite análise *in vivo*, eliminando longos períodos e biópsias dolorosas, podendo ser usado durante ou antes da operação cirúrgica, tornando-se uma ferramenta promissora com potencial para fornecer informações para diagnóstico precoce e rastreamento de várias doenças, contribuindo para minimizar as morbidades e reduzir a mortalidade (SIMONOVA; KARAMANCHEVA, 2013; DEPCIUCH *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que na literatura existe uma variedade de estudos biológicos em que se utilizou a espectroscopia FTIR para fins de diagnóstico e monitoramento de patologias, com alta especificidade e sensibilidade. Dentre as patologias, podemos citar: diabetes mellitus (CAIXETA *et al.*, 2020), artrite reumatóide (RODRIGUES *et al.*, 2021), transtorno depressivo maior e transtorno bipolar (DEPCIUCH *et al.*, 2016), e câncer, tais como: mama (ELMI *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2020; SITNIKOVA *et al.*, 2020), ovário (LIMA, K. *et al.*, 2015), pulmão (LEWIS *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2013), próstata (HUGHES *et al.*, 2014), cérebro (NOREEN *et al.*, 2011; NOREEN *et al.*, 2013).

A maioria das pesquisas de espectroscopia FTIR que analisam o câncer de mama tem usado como amostra biológica, tecidos e saliva (FABIAN *et al.*, 2006; MEHROTRA *et al.*, 2007; DEPCIUCH *et al.*, 2016; VERDONCK *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2020).

Portanto, a associação da doença fisiológica com a atividade fisiológica do soro sugere a possibilidade do uso do soro como meio de diagnóstico, o qual possui uma série de vantagens bioquímicas e logísticas sobre a análise de outros fluidos biológicos (ZHANG; SUN; WANG, 2012). O soro é simples, rápido e seguro para coletar; é fácil de armazenar; baixo custo, risco e dor para o paciente; é simples de preparar, envolvendo centrifugação antes do armazenamento (VIVAS, 2008).

Levando em conta os dados epidemiológicos preocupantes sobre o câncer de mama e as limitações dos métodos de diagnósticos atuais associados ao potencial da espectroscopia de infravermelho (IR) como uma técnica não invasiva, não destrutiva, rápida, livre de reagentes e alta especificidade para detectar os metabólitos (ZHANG *et al.*, 2010; ELKINS, 2011; SIMONOVA; KARAMANCHEVA, 2013; DEPCIUCH *et al.*, 2016) e logística da obtenção do soro como fluido biológico para o diagnóstico de várias doenças, estudos fundamentados nesses pilares são de extremo potencial e importância.



A utilização da espectroscopia FTIR na investigação de soro de pacientes com câncer de mama pode ser desde o diagnóstico precoce, até o monitoramento da doença e seu tratamento pela análise de toda a assinatura bioquímica do material, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar biomarcadores sorológicos para diagnóstico precoce do câncer de mama por espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) e espectroscopia Raman.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### **Artigo I:**

Demonstrar a capacidade da espectroscopia Raman como ferramenta de diagnóstico óptico para o rastreamento do câncer de mama, utilizando soro.

#### **Artigo II:**

Demonstrar a capacidade da espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR), aplicado no soro para o diagnóstico precoce do câncer de mama.

1 **Artigo 1**  
2 **Diferential molecular signature of human serum using**  
3 **Raman spectroscopy for breast cancer detection**  
4  
5

6 Eva Mendes Monteiro<sup>1</sup>, Douglas Cardoso Caixeta<sup>1</sup>, Léia Cardoso-Souza<sup>1</sup>, Aline Tatiane Faria  
7 Silva<sup>1</sup>, Luiz Ricardo Goulart<sup>2</sup>, Yara Cristina de Paiva Maia<sup>2,3</sup>, Robinson Sabino-Silva<sup>\*</sup>  
8  
9  
10  
11

12 <sup>1</sup>Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia,  
13 Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

14 <sup>2</sup>Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia,  
15 Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

16 <sup>3</sup>School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.  
17  
18

19 \* Corresponding Author:  
20  
21

22 Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical  
23 Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902,  
24 Uberlandia, MG, Brazil

25 E-mail: [robinsonsabino@gmail.com](mailto:robinsonsabino@gmail.com)

## 1 **Abstract**

2  
3  
4  
5 Breast cancer is the tumor that most affects women worldwide, becoming a worldwide public  
6 health issue. Therefore, early detection, low-cost and high-sensitivity diagnostic screening  
7 platforms are useful for public health. Raman Spectroscopy is an optical technique that allows  
8 obtaining data about specific molecules in each sample. In this context, Raman presents great  
9 potential in the diagnosis of several pathologies, including breast cancer, by detecting subtle  
10 variations in the molecular content. We applied Raman spectroscopy in the serum of breast  
11 cancer and benign breast disease patients to investigate its potential to discriminate breast  
12 cancer samples. Seven spectral bands with potential were more frequently detected by Raman  
13 and the wavenumber at  $1083\text{ cm}^{-1}$  showed sensitivity and specificity of 80.0% and 61.1%,  
14 respectively, when compared breast cancer with benign breast disease patients. We concluded  
15 that Raman vibrational mode at  $1083\text{ cm}^{-1}$  could be considered a potential spectral marker of  
16 breast cancer.

## 17 18 **Introduction**

19  
20 Cancer is the main global public health problem, ranking 4th among the main causes  
21 of death before 70 years old [1]. The recent estimation of cancer worldwide reported 18  
22 million cases and 9.6 million deaths [2]. Breast cancer is the most incident, prevalent, and with  
23 the highest mortality rate among neoplasms that affect women worldwide [3], with 2.1 million  
24 new cases registered worldwide in 2018 [2]. The prevalence of breast cancer has increased over  
25 the years worldwide [2,4]. Breast cancer is the most commonly diagnosed with an estimated  
26 2.261.419 new cases globally in 2020 [5]. Breast cancer is a complex and heterogeneous

27 pathology, in which there are different risk factors involved, such as genetic predisposition,  
28 levels of endogenous hormones, age, family history, inadequate diet, physical inactivity,  
29 alcohol intake, among others [6,7]. A breast cancer cell normally doubles every 100-300 days.  
30 A 1 cm breast cancer performs an average of 30 duplications before reaching this length, it is  
31 estimated that this cancer has, at least, 7 years of evolution [8]. Given such circumstances, early  
32 diagnosis of breast cancer is considered vital due to recent statistics present a five-year survival  
33 rate of 96% for those whose cancer was detected in the early stages, in contrast with reduced  
34 survival rate when breast cancer is detected in the late stages [9].

35           Screening tests for breast cancer could contribute to early detection of the disease  
36 allowing appropriate treatment. Currently, breast cancer diagnostics are based on  
37 ultrasonography, mammography, magnetic resonance, positron emission tomography, and  
38 histopathological techniques [10]. Although these techniques present adequate accuracy, these  
39 analyses were related to high cost and false-positive or false-negative results [10,11]. Thus,  
40 there is an urgent need to develop novel reliable alternatives for the early detection of breast  
41 cancer, with high accuracy, low cost, and minimally invasive.

42           Raman is a quantitative and rapid spectroscopy technique that analyzes molecular  
43 vibrations, providing highly sensitive, label-free, low-cost, safety of the patient and provide  
44 detailed molecular information about the structure of biomolecules during the pathological  
45 condition, which provides a unique molecular signature of samples [12,13].

46           Based on these characteristics, the use of spectroscopic platforms has been used for  
47 the diagnosis of several diseases, including cancer [13]. There are some studies applied to detect  
48 tumor profiles by Raman Spectroscopy [14,15,16,17, 18]. During the development of the tumor,  
49 the neoplastic metabolites can be identified in the bloodstream, which has the potential to be  
50 detected by Raman spectroscopy. Therefore, this platform has the potential to detected cancer  
51 profiles, becoming a promising clinical tool for the diagnosis of breast cancer [19,20]. In this

52 study, Raman Spectroscopy was employed to analyze the unique signatures of serum samples  
53 from malignant tumor and benign tumor patients of breast cancer. In this context, we evaluated  
54 Raman Spectroscopy as an optical diagnostic tool for the screening of breast cancer.

55

## 56 **Materials and Methods**

57

58 The research was carried out in the Cancer Hospital at Federal University of  
59 Uberlandia (HC-UFU, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil), with approval from the UFU  
60 Research Ethics Committee (protocol number 4.047.065), and following the relevant guidelines  
61 based on the standards of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained  
62 from all the participants of this study. Exclusion criteria were age below 18 years, primary  
63 tumor site other than the breast, and physical and/or mental inability to respond to the tools  
64 necessary for data collection. The study group included 33 subjects, 15 with confirmed breast  
65 cancer confirmed by clinical, histological, and pathological examination (malignant tumor) and  
66 18 patients with benign breast disease (benign tumor), such as fibroadenomas, fibrocystic  
67 changes, papilloma, and typical or atypical ductal hyperplasia. We used the tumor-node-  
68 metastasis (TNM) cancer classification, which is according to the American Joint Committee  
69 on Cancer (AJCC) and the International Union for Cancer Control (UICC). This classification  
70 evaluates the extent of the primary tumor (T), regional lymph nodes (N), and distant metastases  
71 (M) and provides staging based on T, N, and M [21].

72 Blood samples were collected between July 2020 and November 2020 of all patients  
73 before routine exams or surgery. The samples remained at room temperature for a maximum of  
74 2h, from blood collection to centrifugation (5000 r.p.m, 10 min). The serum was aliquoted and  
75 stored at -80° C until the analysis was processed [22].

76 Raman spectra were measured by Raman Spectroscopy LabRAM HR Evolution

77 microscope - HORIBA (LabRAM HR Evolution - HORIBA), software HORIBA Scientific's  
78 LabSpec (LabSpec 6 Spectroscopy Suite). The equipment uses a coupled optical microscope,  
79 model: Olympus BX41, and we use the x10Vis lens, with a resolution of 600 gr/mm. Excitation  
80 of Raman scattering was performed by the laser with wavelength 532 nm and maximum power  
81 78 mW. From each sample, 3  $\mu$ l of serum was used and the spectra were measured in 100  $\text{cm}^{-1}$   
82 and 4000  $\text{cm}^{-1}$  wave number region. Two spectra were obtained for each sample and 66 Raman  
83 spectra were collected from all serum samples. The spectral acquisition occurred in 15 minutes  
84 per sample at different points [14].

85           To determine the differences between the demographic characterization variables  
86 of the breast cancer and benign tumor groups, the Statistical Package of Social Science (SPSS)  
87 software version 26.0.0 was used. The quantitative variables were subjected to the normality  
88 (Kolmogorov-Smirnov) and homoscedasticity (Levene) tests to perform the hypothesis test, and  
89 qualitative variables were compared using Fischer's exact test.

90           For all spectra acquired, the 100  $\text{cm}^{-1}$  and 4000  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber regions were  
91 selected for analysis. Further analysis was carried out to assess the amplitude of some peaks of  
92 interest in the spectra using the Origin 9.1 software. After the spectral analysis, the amplitude  
93 of peaks was used for the statistical analysis. Values of amplitude at specific peaks were  
94 submitted to the normality test and afterward, Student's t-test was performed. A confidence  
95 interval of 0.95 and P values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical  
96 analyses were carried out using GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software, USA).

97

## 98 **Results and Discussion**

99

100           Table 1 shows the demography characterization of patients of both groups. The  
101 mean age of the malignant breast cancer group was  $56.57 \pm 11.17$  (IC95%: 50,12–63,02), and

102 the benign tumor group was  $53.33 \pm 14.61$  (IC95%: 46,07–60,60). The age data were similar in  
 103 both groups (T-test = 0.687;  $p = 0.477$ ). Age is one of the risk factors involved that increase the  
 104 chance of developing breast cancer in proportion to age. The accumulation of exposures of risk  
 105 factors over the years and the biological changes of aging contributes to the development of  
 106 breast cancer (one in fifteen women) [22,23]. The BMI was also similar between the  
 107 participants of both groups (Test T = -1.580;  $p = 0.125$ ). The mean of the malignant breast  
 108 cancer group was  $24.05 \pm 04.78$  and the benign tumor group of  $27.16 \pm 5.93$ . The weight/height  
 109 ratio indicated that only the benign tumor group was above the body mass index (Table 1).

110

111 **Table 1.** Evaluation of the mean anthropometric values of patients with malignant tumor (n  
 112 = 15) and benign breast tumor (n = 18).

113

114

115

Anthropometric measurements	Malignant tumor patients	Benign tumor patients	Test T	p-Value	IC95% Malignant tumor	IC95% Benign tumor
Age	56,57±11,17	53,33±14,61	0,687	0,497	50,12-63,02	46,07-0,60
Weight (kg)	63,94±11,42	69,12±16,20	-1,005	0,323	57,35-0,54	60,79-7,45
Height (m)	1,63±0,05	1,59±0,09	1,416 <sup>#</sup>	0,169	1,60-1,66	1,54-1,64
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	24,05±4,78	27,16±5,93	-1,580	0,125	21,30-6,82	24,11-0,21

116

#T value for equal variances not assumed.

117

118

119

120

121

122

123

124

About the races of the participants, in the malignant tumor group: 9 were white

(60%), 4 brown (26.6%), 1 black (6.7%), and 01 unreported (6.7%) and in the tumor group

benign: 10 were white (55.6%), 07 brown (38.9%) and 01 black (5.9%) (Table 2). The

hypothesis test did not show differences in the frequencies of the races between the groups ( $X^2$

= 1.611;  $p = 0.777$ ). In general, the incidence of breast cancer was described as lower in black

women than in white women [24].



125 **Table 2.** Ratio of patients with malignant tumor (n = 15) and benign tumor (n = 18)  
 126 on race, personal habits and family history of cancer.

127

Variable	Description of the variable	Malignant tumor patients		Benign tumor patients		Total		Fischer's test	p-Value
		N	%	n	%	n	%		
Race	White	9	60	10	55,6	19	59,4	1,611	0,787
	Black	1	6,7	1	5,9	2	6,3		
	Parada	4	26,6	7	38,9	11	34,4		
	NR	1	6,7			1			
	Total	15	100	18	100	33	100		
Tabagism	Abstain	2	13,33	2	11,1	4	12,5	2,599	0,518
	No	12	80	14	77,8	26	81,3		
	Yes	0	0	2	11,1	2	6,3		
	NR	1	6,7			1			
	Total	15	100	18	100	33	100		
Alcohol consumption	Abstain	1	6,7	0	0	1	3,1	3,810	0,629
	No	13	86,6	16	88,9	29	90,6		
	Yes	0	0	1	5,6	1	3,1		
	Socially	0	0	1	5,6	1	3,1		
	NR	1	6,7			1			
	Total	15	100	18	100	33	100		
Physical activity	No	11	73,33	12	66,7	23	71,9	1,701	0,577
	Yes	3	20	6	33,3	9	28,1		
	NR	1	6,7			1			
	Total	15	100	18	100	33	100		
Family history of cancer	No	13	86,6	15	83,3	28	87,5	1,762	0,454
	Yes	1	6,7	3	16,7	4	12,5		
	NR	1	6,7			1			
	Total	15	100	18	100	33	100		

128

129

130

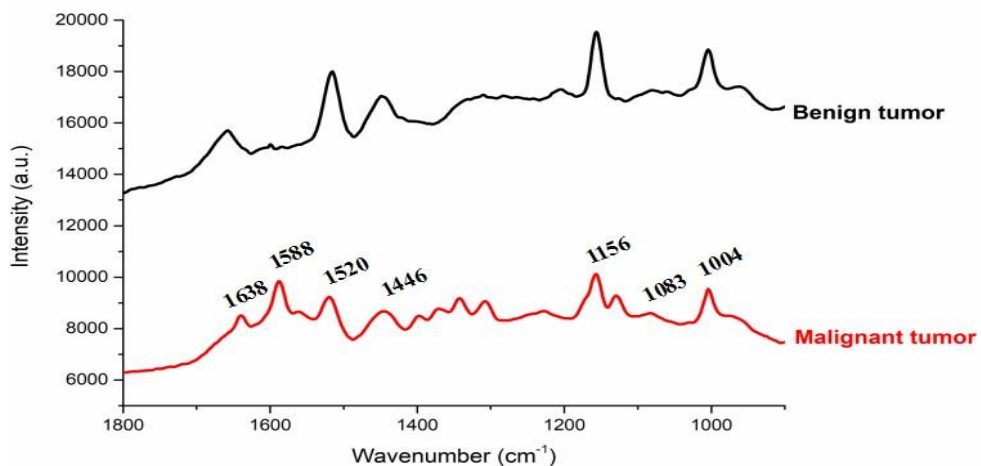
131

The smoking, regular alcohol use, the practice of physical activity, and family history of breast cancer were similar ( $P > 0.05$ ) in both groups (Table 2). A family history of breast cancer was reported in one patient of malignant tumor (6.7%) and three patients of benign

132 tumor (16.7%). Additional patient information of the clinical, hormonal, diagnostic, and therapy  
 133 characteristics of patients with a malignant tumor and benign tumor are summarized in  
 134 supplementary table (S1).

135 The representative spectra of serum at patients with malignant tumor and benign  
 136 tumor are represented in Figure 1. The main wavelengths detected and their molecular sources  
 137 were  $1638\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching vibrations of proteins, amide I,  $\alpha$ -helix) [25,26],  $1588\text{ cm}^{-1}$   
 138 (C=C of lipids, unsaturated fatty acid) [25,26],  $1520\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta$ -carotene) [27],  $1446\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>  
 139 deformation of proteins and lipids) [25,26],  $1156\text{ cm}^{-1}$  (C-C polyene chain,  $\beta$ -  
 140 carotene)[25,26,28],  $1083\text{ cm}^{-1}$  (PO - symmetric of DNA and RNA)[25,27] and  $1004\text{ cm}^{-1}$   
 141 (amino acids, phenylalanine) [25,27].

142



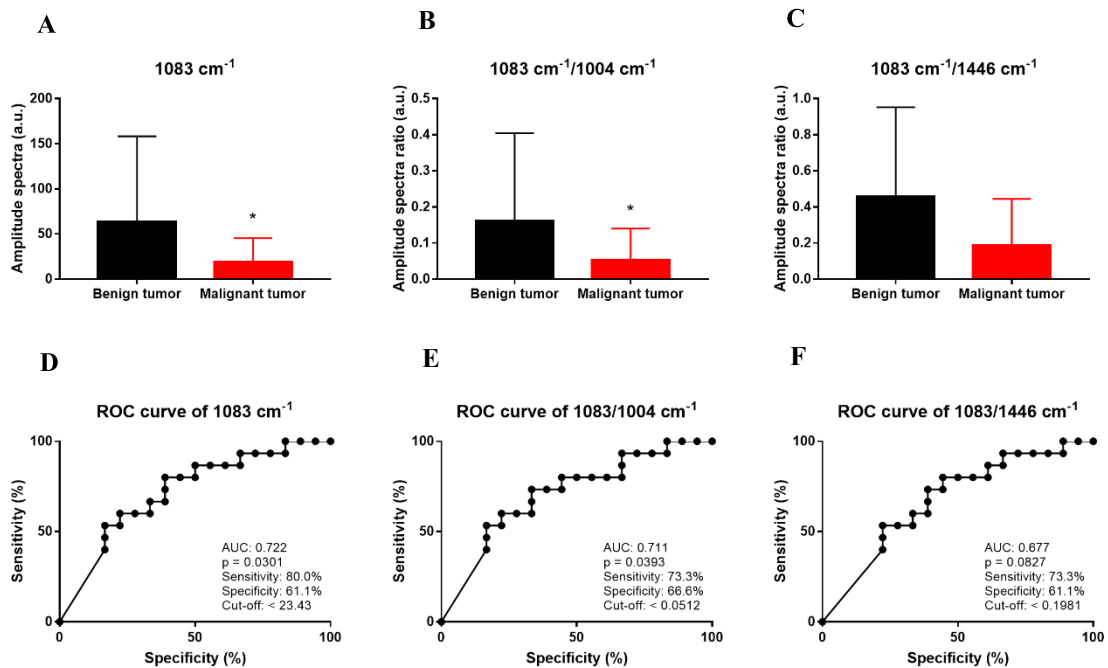
143

144 **Fig 1.** Raman spectra of serum of malignant tumor and benign tumor patients. Representative original  
 145 spectra with the intensity bands of the major functional groups in biomolecules indicated between  
 146 wavenumbers  $1800\text{ cm}^{-1}$  and  $900\text{ cm}^{-1}$  for malignant tumor (red line) and benign tumor (black line).

147

148 As is evident from Fig. 1, contributions of proteins, DNA,  $\beta$ -carotene, lipids, and  
 149 several amino acids were observed in the representative spectra of malignant tumor and benign  
 150 tumor groups. The changes in the intensity of peaks and shifts in the peaks were observed across  
 151 the spectra. Among the analyzed peaks intensities, the peak at  $1083\text{ cm}^{-1}$  was reduced ( $p < 0.05$ )  
 152 in malignant tumor than benign tumor patients (Fig 2A). The ratio between the amplitude of

153  $1083\text{ cm}^{-1}$  and  $1004\text{ cm}^{-1}$  were also reduced in malignant tumor than benign tumor patients  
 154 (Fig 2B). The ratio between the amplitude of  $1083\text{ cm}^{-1}$  and  $1446\text{ cm}^{-1}$  was similar ( $p > 0.05$ )  
 155 (Fig 2C) in both groups.  
 156



157

158 **Fig 2.** Comparison of the amplitude value of the  $1083\text{ cm}^{-1}$  between malignant tumor and benign tumor  
 159 patients. (A) Amplitude spectra of  $1083\text{ cm}^{-1}$ . (B) Amplitude spectra of  $1083\text{ cm}^{-1}/1004\text{ cm}^{-1}$ . (C)  
 160 Amplitude spectra of  $1083\text{ cm}^{-1}/1446\text{ cm}^{-1}$ . (D) ROC curve analyses of  $1083\text{ cm}^{-1}$ . (E) ROC curve  
 161 analyses of  $1083\text{ cm}^{-1}/1004\text{ cm}^{-1}$ , (F) ROC curve analyses of  $1083\text{ cm}^{-1}/1446\text{ cm}^{-1}$ . Statistically  
 162 significant difference is represented by \* ( $P < 0.05$ ).  
 163

164

165 In this study, the most significant difference between the malignant tumor and  
 166 benign tumor was the decrease of the PO - symmetric in nucleic acids ( $1083\text{ cm}^{-1}$ ), pointing to  
 167 an important role of alterations in the secondary structure of DNA in chromatin [25,29].  
 168 Symmetric modes of PO - have been attributed to DNA structure [30], and these signals can be  
 169 absent in differentiated or metabolically inactive cells [31]. In this context, it was observed a  
 170 malignant transformation of the gastric mucosa associated with the symmetrical stretching of  
 171 PO<sub>2</sub>- in nucleic acids that shifted from  $1088\text{ cm}^{-1}$  to  $1083\text{ cm}^{-1}$  in cancerous tissues [25].  
 172

172

Considering that, sensitivity and specificity are basic characteristics to determine

173 the accuracy of a diagnostic test, ROC analysis and the area under the curve were used to  
174 ascertain the potential diagnosis of 1083  $\text{cm}^{-1}$  spectral amplitude (Fig 2D-F). The ROC curve  
175 analysis showed a reasonable accuracy of Raman spectroscopy tool to discriminate malignant  
176 tumor and benign tumor patients, with an AUC of 0.722 for 1083  $\text{cm}^{-1}$  (Fig 2D) and an AUC  
177 of 0.711 for 1083/1004  $\text{cm}^{-1}$  (Fig 2E). The cutoff value to 1083  $\text{cm}^{-1}$  peak was 23.43, and the  
178 corresponding sensitivity and specificity were 80.0% and 61.1%, respectively. The value of  
179 cutoff the relation 1083/1004  $\text{cm}^{-1}$  was 0.0512 with 73.3% of sensitivity and 66.6% of  
180 specificity. The ROC analysis of the amplitude of 1083/1446  $\text{cm}^{-1}$  peaks ratio was not  
181 significant ( $p > 0.05$ ) (Fig 2F).

182           Considering that mammography, ultrasound, and magnetic resonance imaging, the  
183 conventional methods used in clinical practice, showed sensitivities of 67.8%, 83%, and 94.4%  
184 and specificities of 75%, 34%, and 26.4%, respectively [11], we believe that the present results  
185 indicate a potential novel spectral alternative to discriminate breast cancer patients with  
186 attractive accuracy. Besides, label-free vibrational spectroscopy does not require patient  
187 exposure to radiation or the addition of exogenous contrast agents, as in conventional and gold  
188 standard diagnostics methods [32,33]. Furthermore, in order to perform the conventional  
189 diagnosis, the facilities are required with significant clinical costs [34].

190           Other studies have evaluated the potential use of Raman spectroscopy for screening  
191 and diagnosing breast cancer [18,35,37]. However, these studies evaluated breast cancer  
192 patients and healthy individuals [36,37]. In this research, we evaluated patients with malignant  
193 and benign tumors following clinical conditions. Besides, it is important to highlight that we  
194 used ultra-low values of serum (2ul) in Raman spectroscopy, which differs from other studies  
195 that used larger amounts of samples and other biological materials, such as plasma, whole  
196 blood, and biological tissues [18,35,37].

197           Our present data support our hypothesis that Raman Spectroscopy vibrational

198 modes of serum may discriminate between malignant tumor and benign tumor patients. The  
199 1083 cm<sup>-1</sup> vibrational mode could potentially be used as a serum biomarker to discriminate  
200 malignant tumors from benign tumor patients with reasonable accuracy. However, the sample  
201 size of our study was constrained by experimental conditions and maybe not large enough to  
202 explore more differences. More studies for multicenter are needed to confirm our results and  
203 evaluate the diagnostic performance of this biomarker in clinical practice.

204

## 205 **Conclusions**

206

207 In this study, we showed that Raman Spectroscopy in the serum could differentiate  
208 malignant tumor and benign tumor patients. It was found a lower amplitude level of 1083 cm-  
209 1 in malignant tumors compared to benign tumor patients, and reasonable accuracy of this peak  
210 by ROC curve. In conclusion, this serum result indicates that Raman Spectroscopy can be used  
211 as a tool to distinguish malignant tumor and benign breast tumor, with potential applicability of  
212 diagnosis.

213

## 214 **References**

215

- 216 1. WHO. *World Health Organization*, <<https://www.who.int/>> (2021).  
217
- 218 2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer  
219 statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36  
220 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi:  
221 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020  
222 Jul;70(4):313. PMID: 30207593

- 223 3. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates  
224 and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Jan;25(1):16-27. doi:  
225 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578. Epub 2015 Dec 14. PMID:26667886.
- 226 4. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ,  
227 Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a  
228 systematic analysis. *Lancet.* 2011 Oct 22;378(9801):1461-84. doi: 10.1016/S0140-  
229 6736(11)61351-2. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21924486.
- 230 5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates  
231 of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*  
232 2021; 71:209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660> PMid:33538338
- 233 6. Koh EH, Cho YW, Mun YJ, Ryu JH, Kim EJ, Choi DS, Maeng KY, Han J, Kang D.  
234 Upregulation of human mammaglobin reduces migration and invasion of breast cancer  
235 cells. *Cancer Invest.* 2014 Jan;32(1):22-9. doi: 10.3109/07357907.2013.861473. Epub  
236 2013 Dec 14. PMID: 24328556.
- 237 7. Nkondjock A, Ghadirian P. Facteurs de risque du cancer du sein [Risk factors and risk  
238 reduction of breast cancer]. *Med Sci (Paris).* 2005 Feb;21(2):175-80. French. doi:  
239 10.1051/medsci/2005212175. PMID: 15691489.
- 240 8. Sree SV, Ng EY, Acharya RU, Faust O. Breast imaging: A survey. *World J Clin Oncol.* 2011  
241 Apr 10;2(4):171-8. doi: 10.5306/wjco.v2.i4.171. PMID: 21611093; PMCID:PMC3100484.
- 242 9. Brandt J, Garne JP, Tengrup I, Manjer J. Age at diagnosis in relation to survival  
243 following breast cancer: a cohort study. *World J Surg Oncol.* 2015 Feb 7; 13:33. doi:  
244 10.1186/s12957-014-0429-x. PMID: 25889186; PMCID: PMC4344734.
- 245 10. Pereira RO, Luz LAD, Chagas DC, Amorim JR, Nery-Júnior EJ, Alves ACBR, Abreu-  
246 Neto FT, Oliveira MDCB, Silva DRC, Soares-Júnior JM, Silva BBD. Evaluation of the  
247 accuracy of mammography, ultrasound and magnetic resonance imaging in suspect breast

- 248 lesions. *Clinics (Sao Paulo)*. 2020;75:e1805. doi: 10.6061/clinics/2020/e1805. Epub 2020  
249 Jul 22. PMID: 32725074; PMCID: PMC7362717.
- 250 11. Wang L. Early Diagnosis of Breast Cancer. *Sensors (Basel)*. 2017 Jul 5;17(7):1572.doi:  
251 10.3390/s17071572. PMID: 28678153; PMCID: PMC5539491.
- 252 12. Kumamoto Y, Harada Y, Takamatsu T, Tanaka H. Label-free Molecular Imaging and  
253 Analysis by Raman Spectroscopy. *Acta Histochem Cytochem*. 2018 Jun 26;51(3):101-  
254 110. doi: 10.1267/ahc.18019. Epub 2018 Jun 20. PMID: 30083018;PMCID:  
255 PMC6066646.
- 256 13. Huang Z, Lui H, McLean DI, Korbelik M, Zeng H. Raman spectroscopy in combination  
257 with background near-infrared autofluorescence enhances the in vivo assessment of  
258 malignant tissues. *Photochem Photobiol*. 2005 Sep-Oct;81(5):1219-26.doi:  
259 10.1562/2005-02-24-RA-449. PMID: 15869327.
- 260 14. A. Synytsya, M. Judexova, D. Hoskovec, M. Miskovicova, L. Petruzelka, Raman  
261 spectroscopy at different excitation wavelengths (1064, 785 and 532 nm) as a tool for  
262 diagnosis of colon cancer, *Journal of Raman Spectroscopy*. 45 (2014) 903–911.  
263 doi:10.1002/jrs.4581.
- 264 15. Park JJ, Kim DK, Lee S, Choi Y, Kim YH, Lee JH, Kim KH, Kim JH. Diagnostic  
265 accuracy of Raman spectroscopy for prostate cancer: a systematic review and meta-  
266 analysis. *Transl Androl Urol*. 2021 Feb;10(2):574-583. doi: 10.21037/tau-20-924. PMID:  
267 33718060; PMCID: PMC7947438.
- 268 16. Di L, Eichberg DG, Huang K, Shah AH, Jamshidi AM, Luther EM, Lu VM, Komotar RJ,  
269 Ivan ME, Gultekin SH. Stimulated Raman Histology for Rapid Intraoperative Diagnosis  
270 of Gliomas. *World Neurosurg*. 2021 Mar 5: S1878- 8750(21)00315-6. doi:  
271 10.1016/j.wneu.2021.02.122. Epub ahead of print. PMID:33684587.
- 272

- 273 17. Bhattacharjee A, Hole A, Malik A, Sahu A, Singh SP, Deshmukh A, Nair S, Chaturvedi  
274 P, Murali Krishna C. Risk prediction by Raman spectroscopy for disease-free survival in  
275 oral cancers. *Lasers Med Sci*. 2021 Mar 4. doi: 10.1007/s10103-021-03276-3. Epub  
276 ahead of print. PMID: 33661401.
- 277 18. Kothari R, Jones V, Mena D, Bermúdez Reyes V, Shon Y, Smith JP, Schmolze D, Cha  
278 PD, Lai L, Fong Y, Storrie-Lombardi MC. Raman spectroscopy and artificial intelligence  
279 to predict the Bayesian probability of breast cancer. *Sci Rep*. 2021 Mar 22;11(1):6482.  
280 doi: 10.1038/s41598-021-85758-6. PMID: 33753760; PMCID: PMC7985361.
- 281 19. Teh SK, Zheng W, Ho KY, Teh M, Yeoh KG, Huang Z. Near-infrared Raman  
282 spectroscopy for early diagnosis and typing of adenocarcinoma in the stomach. *Br J Surg*.  
283 2010 Apr;97(4):550-7. doi: 10.1002/bjs.6913. PMID: 20155786.
- 284 20. Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR. CDH1  
285 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer.  
286 *BMC Cancer*. 2006 Mar 2;6:48. doi: 10.1186/1471-2407-6-48. PMID: 16512896;  
287 PMCID: PMC1523210.
- 288 21. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL,  
289 Winchester DJ, Hortobagyi GN. Breast Cancer-Major changes in the American Joint  
290 Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jul  
291 8;67(4):290-303. doi: 10.3322/caac.21393. Epub 2017 Mar 14. Erratum in: *CA Cancer J*  
292 *Clin*. 2017 Jul 8;67(4):345. PMID: 28294295.
- 293 22. Zelig U, Barlev E, Bar O, Gross I, Flomen F, Mordechai S, Kapelushnik J, Nathan I,  
294 Kashtan H, Wasserberg N, Madhala-Givon O. Early detection of breast cancer using total  
295 biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study. *BMC Cancer*.  
296 2015 May 15;15:408. doi: 10.1186/s12885-015-1414-7. PMID: 25975566; PMCID:  
297 PMC4455613.



- 298 23. Siegel RL, Fedewa SA, Miller KD, Goding-Sauer A, Pinheiro PS, Martinez-Tyson D,  
299 Jemal A. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015 Nov-  
300 Dec;65(6):457-80. doi: 10.3322/caac.21314. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26375877.
- 301 24. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and  
302 Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 151:1-32. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.002.  
303 Epub 2017 Oct 10. PMID: 29096890.
- 304 25. Chen Y, Dai J, Zhou X, Liu Y, Zhang W, Peng G. Raman spectroscopy analysis of the  
305 biochemical characteristics of molecules associated with the malignant transformation of  
306 gastric mucosa. *PLoS One.* 2014 Apr 7;9(4): e93906. doi: 10.1371/journal.pone.0093906.  
307 PMID: 24710050; PMCID: PMC3977959.
- 308 26. Lopes J, Correia M, Martins I, Henriques AG, Delgadillo I, da Cruz E Silva O, Nunes A.  
309 FTIR and Raman Spectroscopy Applied to Dementia Diagnosis Through Analysis of  
310 Biological Fluids. *J Alzheimers Dis.* 2016 Apr 8;52(3):801-12. doi: 10.3233/JAD-  
311 151163. PMID: 27079713.
- 312 27. Sahu A, Sawant S, Mangain H, Krishna CM. Raman spectroscopy of serum: an  
313 exploratory study for detection of oral cancers. *Analyst.* 2013 Jul 21;138(14):4161-74.  
314 doi: 10.1039/c3an00308f. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23736856.
- 315 28. Medipally DKR, Cullen D, Untereiner V, Sockalingum GD, Maguire A, Nguyen TNQ,  
316 Bryant J, Noone E, Bradshaw S, Finn M, Dunne M, Shannon AM, Armstrong J, Meade  
317 AD, Lyng FM. Vibrational spectroscopy of liquid biopsies for prostate cancer diagnosis.  
318 *Ther Adv Med Oncol.* 2020 Jul 30; 12:1758835920918499. doi:  
319 10.1177/1758835920918499. PMID: 32821294; PMCID: PMC7412923.
- 320 29. Atkins CG, Buckley K, Blades MW, Turner RFB. Raman Spectroscopy of Blood and  
321 Blood Components. *Appl Spectrosc.* 2017 May;71(5):767-793. doi:  
322 10.1177/0003702816686593. Epub 2017 Apr 11. PMID: 28398071.

- 323 30. Chiriboga, L., Yee, H. & Diem, M. Infrared Spectroscopy of Human Cells and Tissue.  
324 Part VII: FT-IR Microspectroscopy of DNase- and RNase-Treated Normal, Cirrhotic, and  
325 Neoplastic Liver Tissue. *Applied spectroscopy* 54, 480-485,  
326 doi:10.1366/0003702001949889 (2000).
- 327 31. Mohlenhoff B, Romeo M, Diem M, Wood BR. Mie-type scattering and non-Ber-  
328 Lambert absorption behavior of human cells in infrared microspectroscopy. *Biophys J*.  
329 2005 May;88(5):3635-40. doi: 10.1529/biophysj.104.057950. Epub 2005 Mar 4. PMID:  
330 15749767; PMCID: PMC1305510.
- 331 32. Feng Xu, J. Moy Austin, K. Markey Mia, C. Fox Matthew, S. Reichenberg Jason,  
332 W. Tunnell. James *Biophysical basis for noninvasive skin cancer detection using Raman*  
333 *spectroscopy*. vol. 9704 PWB (SPIE, 2016).
- 334 33. Mahadevan-Jansen A, Richards-Kortum RR. Raman spectroscopy for the detection of  
335 cancers and precancers. *J Biomed Opt*. 1996 Jan;1(1):31-70. doi: 10.1117/12.227815.  
336 PMID: 23014644.
- 337 34. Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG,  
338 Santos DW, Goulart LR, Sabino-Silva R, Maia YCP. Attenuated Total Reflection-Fourier  
339 Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer  
340 Diagnosis. *J Oncol*. 2020 Feb 10;2020:4343590. doi: 10.1155/2020/4343590. PMID:  
341 32104176; PMCID: PMC7035572.
- 342 35. Nargis HF, Nawaz H, Ditta A, Mahmood T, Majeed MI, Rashid N, Muddassar M, Bhatti  
343 HN, Saleem M, Jilani K, Bonnier F, Byrne HJ. Raman spectroscopy of bloodplasma  
344 samples from breast cancer patients at different stages. *Spectrochim Acta AMol Biomol*  
345 *Spectrosc*. 2019 Nov 5; 222:117210. doi: 10.1016/j.saa.2019.117210. Epub 2019 May 27.  
346 PMID: 31176149.
- 347 36. Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Diagnosing  
348 breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug  
349 30;102(35):12371-6. doi: 10.1073/pnas.0501390102. Epub 2005 Aug 22. PMID:  
350 16116095; PMCID: PMC1194905.
- 351 37. Bilal M, Bilal M, Tabassum S, Saleem M, Mahmood H, Sarwar U, Bangush H, Munir

352 F, Aslam Zia M, Ahmed M, Shahzada S, Ullah Khan E. Optical Screening of Female  
 353 Breast Cancer from Whole Blood Using Raman Spectroscopy. Appl Spectrosc. 2017  
 354 May;71(5):1004-1013. doi: 10.1177/0003702816667516. Epub 2016 Sep 15. PMID:  
 355 27634888.

356

## 357 **Supporting information**

358 **Supplementary Table 1.** Clinical, hormonal and diagnostic characterization of the malignant tumor  
 359 group (n = 15)

Variable	Description of the variable	Absolute frequency (n)	Relative frequency (%)
<b>TNM staging</b>	II	9	60
	III	3	20
	NR	3	20
<b>Histological grade</b>	Gx	2	13,4
	G2	5	33,3
	G3	3	20
	NR	5	33,3
<b>Histological subtype</b>	In situ ductal carcinoma	2	13,4
	Invasive ductal carcinoma	12	80
	Mucinous carcinoma	1	6,6
<b>Distant metastases</b>	pMO	10	66,7
	cM1	1	6,6
	NR	4	26,7
<b>Primary tumor</b>	pTis	2	13,4
	T1	1	6,6

	T1c	3	20
	T2	2	13,4
	T3	1	6,6
	T4	1	6,6
	NR	5	33,4
<b>Status ER</b>	Positive	10	66,6
	Negative	3	30
	NR	2	13,4
<b>Status HER2</b>	Positive	7	46,7
	Negative	5	33,3
	NR	3	20
<b>Status PR</b>	Positive	9	60
	Negative	4	26,6
	NR	2	13,4
<b>Regional lymph nodes</b>	pNx	2	13,4
	pN0	5	33,3
	pN1	3	20
	NR	5	33,3
<b>p53</b>	Positive	9	60
	Negative	3	20
	NR	3	20
<b>Ki67</b>	≤14%	2	13,4
	>14%	12	80
	NR	1	6,7

360

361 Note: Gx, not evaluable; G1, grade 1; G2, grade 2; G3, grade 3; NR, not reported; ER, estrogen receptor;

362 HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PR, progesterone receptor; p53, tumor protein p53;

363 ki67, antigen ki67.

1 **Artigo 2**  
2 **Blood serum molecular spectroscopy: A high-throughput**  
3 **and sustainable ATR-FTIR platform for breast cancer**  
4 **screening**

5

6 Eva Mendes Monteiro<sup>1, \*</sup>; Alinne Tatiane Faria Silva<sup>2, \*</sup>; Douglas C. Caixeta<sup>1</sup>; Murillo  
7 Guimarães Carneiro<sup>3</sup>, Mario Machado Martins<sup>4</sup>, Luiz Ricardo Goulart<sup>4</sup>, Yara Cristina de  
8 Paiva Maia<sup>2</sup>, Robinson Sabino-Silva<sup>1</sup>.

9

10 <sup>1</sup>Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanotheranostics, Department of Physiology,  
11 Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

12 <sup>2</sup> Medical Faculty, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

13 <sup>3</sup> Faculty of Computing, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

14 <sup>4</sup>Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University  
15 of Uberlandia, Uberlandia, 38405-302, Brazil

16

17 **\* Corresponding authors:**

18 Robinson Sabino-Silva

19 Innovation Center in Salivary Diagnostics and Nanotheranostics, Federal University of  
20 Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720,  
21 Campus Umuruama, Brazil, e-mail: robinsonsabino@gmail.com

22 & Yara C. P. Maia,

23 Medical Faculty, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil, email:

24 yaracpmaia@gmail.com

## 1 **ABSTRACT**

2  
3 Conventional techniques used in clinical practice in the screening of breast cancer present some  
4 limitations in sensitivity and specificity and relative high cost. Consequently, the search for a  
5 reagent-free, sustainable and more cost-effective tools to discriminate breast cancer is of great  
6 interest. Infrared spectroscopy with attenuated total reflection Fourier transform (ATR-FTIR)  
7 using a sustainable aluminum device with high-throughput capability coupled to a machine  
8 learning algorithm could be an alternative to breast cancer screening. In this context, we applied  
9 ATR-FTIR tool associated with the linear discriminant analysis (LDA) classifier in order to  
10 identify changes in the serum of patients with breast cancer and benign breast disease to  
11 investigate its potential on breast cancer diagnosis. The classification of serum infrared spectra  
12 by LDA showed a sensitivity of 89 %, specificity of 74% and accuracy of 84% between breast  
13 cancer and benign breast disease. This spectral area of serological ATR-FTIR has been pre-  
14 validated as a potential biomarker for diagnosis and LDA analysis confirmed its potential due  
15 to its accuracy, sensitivity and specificity to significantly differentiate breast cancer. Herein, we  
16 have showed that ATR-FTIR spectroscopy coupled to a LDA-based classification machine  
17 learning algorithms using a sustainable aluminum devices with high-throughput capability can  
18 be used in serum samples to discriminate breast cancer and benign breast disease.

19 **Keywords:** spectroscopy, ATR-FTIR, chemometry analysis, LDA. breast cancer

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

## 32 INTRODUCTION

33 Breast cancer (BC) is considered a public health problem. It was the most commonly  
34 diagnosed malignant neoplasm in 2020, with estimates of 2,261,419 new cases worldwide in  
35 both sexes and ages <sup>1</sup>.

36 Breast cancer is a complex and heterogeneous disease caused by several factors, and the  
37 full extent of breast cancer heterogeneity is being recognized through genomic analysis,  
38 although its visible manifestations have been essential to the histopathological classification for  
39 many decades and its dissemination involves a succession of clinical and pathological stages  
40 beginning with carcinoma in situ, progressing to invasive lesion and culminating in metastatic  
41 disease <sup>2-5</sup>. The clinical manifestations of breast cancer are mainly orange-like changes in the  
42 skin and contour of the breast, although lumps in the breast, nipple discharge and swollen lymph  
43 nodes can also occur <sup>6</sup>.

44 The most important risk factors for breast cancer development are: sex, age, family  
45 history, specific benign breast conditions in the breast, ionizing radiation, and lifestyle <sup>7</sup>. The  
46 main advantages of breast cancer screening tests are an early diagnosis and proper treatment.  
47 Basically, breast cancer can be diagnosed for four conventional techniques: histopathology,  
48 mammography, ultrasonography, and magnetic resonance imaging (MRI) even though in  
49 general, these techniques have critical limitations related to efficacy and production of false  
50 positive or false negative results <sup>8</sup>, due to the fact that routine laboratory tests have a lack of  
51 the sensitivity to be considered a golden standard <sup>9-11</sup>.

52 Consequently, there is a need for a reliable and easily performed quantitative diagnostic  
53 test that presents a good cost-effective, and high-throughput method that may predict an  
54 increasing tumor in the patient <sup>9</sup>. In this way, serum biomarkers might be an attractive and a  
55 rapid serum screening regime would significantly reduce current diagnosis times and greatly  
56 increase the chance of a successful treatment <sup>12, 13</sup>.

57 Blood serum is a primary carrier of small molecules in the body; it holds all secreted  
58 molecules from different tissues in response to different physiological needs, dysfunctions and  
59 pathological states and ATR-FTIR is an excellent vibrational spectroscopic technique for the  
60 analysis of biofluids (e.g., serum) <sup>12</sup>. Due to its speed and use in the clinical environment, i.e.  
61 ATR-FTIR requires no elaborate sample preparation when analyzing serum <sup>14</sup>.

62 Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy is a  
63 global, sensitive and highly reproducible physicochemical analytical technique that identifies  
64 structural molecules on the basis of their IR absorption <sup>15</sup>. Considering that a bio molecule is

65 determined by its unique structure, each one will exhibit a unique ATR-FTIR spectrum,  
66 representing the vibrational modes of the constituent structural bonds <sup>15, 16</sup>.

67 In the present study, we tested the hypothesis that non-invasive spectral biomarkers can  
68 be identified in the serum to discriminate patients with breast cancer from benign patients and  
69 we also analyzed how specific vibrational modes can be used as serum biomarkers for breast  
70 cancer diagnosis and monitoring. In this manner, the aim of our study was to identify infrared  
71 spectral signatures to establish specific vibrational modes analyzed by ATR-FTIR  
72 spectroscopy, in order to detect breast cancer fingerprints that are suitable for diagnosis. For  
73 this, the profile of the serum vibrational mode of breast cancer was evaluated using artificial  
74 intelligence to verify accuracy, sensitivity and specificity.

75

## 76 **METHODS**

77

### 78 *Study patients and ethical approval*

79 The ethical committee of Federal University of Uberlandia (UFU) Research Ethics  
80 Committee (protocol number 4.047.065) approved this project. For this study, 72 patients at the  
81 Cancer Hospital of Uberlandia (HC-UFU, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil) were included and  
82 written informed consent was provide from all the patients of this study, following the relevant  
83 guidelines and with based on the standards of the Declaration of Helsinki.

84 Patients were grouped into two groups, 22 with benign tumor and 50 with malignant  
85 tumor. Inclusion criteria were age over 18 years and patients confirmed malignant tumor  
86 confirmed by clinical, histological and pathological examination (breast cancer) and benign  
87 tumor, such as fibroadenomas, fibrocystic changes, papilloma and typical or atypical ductal  
88 hyperplasia. In this study was used the tumor-node-metastasis (TNM) cancer classification,  
89 which is according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) and the International  
90 Union for Cancer Control (UICC). This classification evaluates the extent of the primary tumor  
91 (T), regional lymph nodes (N), and distant metastases (M) and provides staging based on T, N,  
92 and M <sup>17</sup>. Exclusion criteria were age below 18 years, primary tumor site other than the breast,  
93 and physical and/or mental inability to respond to the tools necessary for data collection.

94

95

### 96 *Collection of samples*

97 Before to routine exams or surgery, all patients included in this study had their blood



98 collected by peripheral venipuncture with the aid of a disposable hypodermic syringe (June-  
99 November 2020). Then the collected sample was transferred to siliconized tubes without  
100 anticoagulant (BD Vacutainer®, Becton-Dickson, New Jersey, USA). The samples were  
101 centrifugation (5000 r.p.m., 10 min) and serum were aliquoted and stored at -80° C until the  
102 analysis was processed. Clinical information was collected from the medical records of the  
103 study patients.

104

### 105 ***FTIR spectroscopy***

106 Infrared spectroscopy was used with the attenuated total reflection accessory Cary 630  
107 (Agilent) and using the MicroLab (Agilent) software, using a micro component attenuated total  
108 reflectance (ATR), the crystal material in the ATR unit, which consists of a platinum diamond  
109 as an internal reflection element. The samples were applied in aluminum pellets (10µL) and  
110 heated to 80°C in a dry bath for three minutes. The spectra were analyzed in the wavenumber  
111 region from 4000 cm<sup>-1</sup> to 600 cm<sup>-1</sup>, 32 scans were performed per analysis with a resolution of  
112 4 cm<sup>-1</sup>.

113

### 114 ***Discrimination Analysis Method***

115 The infrared spectral data analysis was divided into two stages: pre-processing and  
116 classification. Pre-processing consisted of aggregation, attribute selection and data  
117 transformation. The arithmetic mean of the three spectral readings of each patient was  
118 performed in aggregation. The spectral data were truncated with lipidic region (3050-2800  
119 cm<sup>-1</sup>) associated with the biofingerprint region (1800-900 cm<sup>-1</sup>). Then, the Savitzky-Golay  
120 smoothing filter was applied to each spectrum followed by a first order derivative and pre-  
121 processed by vector normalization.

122 The classification was tested with state-of-the-art machine learning algorithms of  
123 feature extraction coupled to discriminant analysis tools. Logistic Regression (LR), Linear  
124 Discriminant Analysis (LDA), Random Forest (RF) and Support Vector Machine (SVM) were  
125 used as spectra discrimination tools. To analyze the predictive differentiated performance of  
126 the machine learning algorithms, ten times stratified cross-validation was used. The samples  
127 were divided into ten subsets, with each iteration; nine of them were used to train the algorithm  
128 and one exclusively to test it, so that each subset was part of the test once. In addition, the  
129 procedure was repeated three times with changes in the samples configurations in these subsets  
130 to achieve a closer estimate the real performance of the model, thus totaling thirty executions.  
131 To measure the results obtained, three performance measures consolidated in the literature were

132 used: sensitivity, specificity, and accuracy. The sensitivity or true positive rate is the proportion  
 133 of positives (breast cancer) that were correctly classified, and the specificity or true negative  
 134 rate is the proportion of negatives (benign tumor) that were correctly classified. The accuracy  
 135 is defined as the total number of samples correctly classified considering true and false  
 136 negatives <sup>18</sup>.

137

## 138 RESULTS

### 139 *Clinical and demographic characterization*

140 Table 1 shows the clinical, hormonal and diagnostic characteristics of the malignant  
 141 tumor group. The classification evaluated the extension of the primary tumor (T), regional  
 142 lymph nodes (N) and distant metastases (M), providing information on staging based on TNM  
 143 <sup>17</sup>. Briefly, the mean of anatomical grade I had a frequency of 7 (14 %), grade II was 20 (40%),  
 144 grade III was 10 (20%), and unreported was 13 (26%).

145 Regarding the histological grade, Gx was present in 10 (20%), G1 in 6 (12%), G2 in  
 146 21 (42%), and G3 in 10 (20%) women. It was not described in 3 women (6 %). Histological  
 147 classification indicates ductal carcinoma in situ in 10 women (20%), invasive ductal carcinoma  
 148 in 31 women (62%), and metastatic carcinoma in 9 women (18%). The mean of the evaluation  
 149 of regional lymph nodes were pNx in 2 (4%), pN0 in 21 (42%), pN1 in 9 (18%), pN2 in 5 (10%),  
 150 pN3 in 5 (10%), and not reported in 12(24%) women. The distant metastases, the primary tumor  
 151 measurements and type of tumor are also presented in table 1.

152

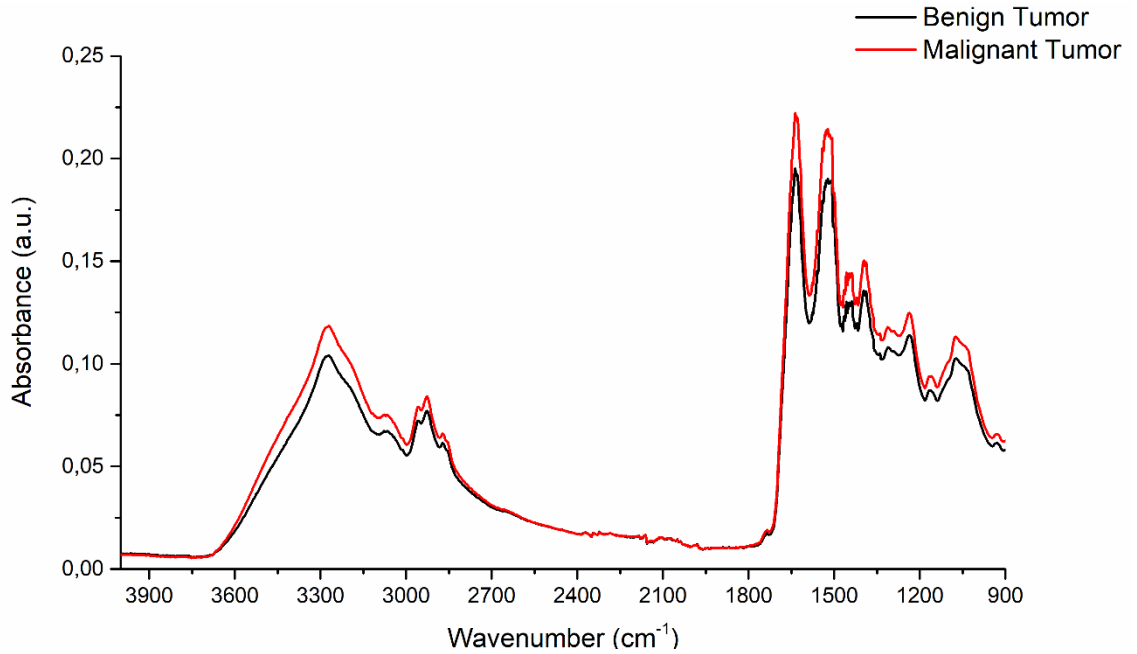
153 **Table 1.** Clinical, hormonal, diagnostic and therapy characteristic of malignant tumor (n = 50)

Variable	Description of the variable	Absolute frequency (n)	Relative frequency (%)
<b>TNM staging</b>	I	7	14 (%)
	II	20	40 (%)
	III	10	20 (%)
	NR	13	26 (%)
<b>Histological grade</b>	Gx	10	20 (%)
	G1	6	12 (%)
	G2	21	42 (%)
	G3	10	20 (%)
	NR	3	6 (%)
<b>Histological subtype</b>	In situ ductal carcinoma	10	20 (%)
	Invasive ductal carcinoma	31	62(%)
	Mucinous carcinoma	9	18 (%)
<b>Regional lymph</b>	PNx	2	4 (%)

<b>nodes</b>	pN0	21	42 (%)
	pN1	9	18 (%)
	pN2	5	10(%)
	pN3	1	2 (%)
	NR	12	24 (%)
<b>Distant metastases</b>	MO	22	44 (%)
	cM1	1	2 (%)
	NR	27	54 (%)
<b>Primary tumor</b>	Tis	10	20 (%)
	T1	3	6 (%)
	T1a	2	4 (%)
	T1b	2	4 (%)
	T1c	4	8 (%)
	T2	9	18 (%)
	T3	6	12 (%)
	T4	1	2 (%)
	T4b	1	2 (%)
	NR	12	24 (%)
<b>Status ER</b>	Positive	36	72 (%)
	Negative	3	6 (%)
	NR	11	22 (%)
<b>Status HER2</b>	Positive	5	10 (%)
	Negative	33	66 (%)
	NR	12	24 (%)
<b>Status PR</b>	Positive	36	72(%)
	Negative	3	6 (%)
	NR	11	22 (%)
<b>Ki67</b>	≤14%	15	30 (%)
	>14%	21	42 (%)
	NR	14	28 (%)

154 G1, grade 1; G2, grade 2; G3, grade 3; NR, not reported; ER, estrogen receptor; PR,  
 155 progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; ki67, antigen ki67.  
 156 *Blood plasma infrared spectroscopy*

157 The mean infrared raw spectra of blood serum the 4000 – 900 cm<sup>-1</sup> was analyzed in  
 158 benign tumor patients and malignant tumor patients indicating a detection of blood components  
 159 as proteins, lipids, DNA/RNA, and carbohydrates (Figure 1).



160

161 Figure 1. Representative average ATR-FTIR original spectra (1800–800  $\text{cm}^{-1}$ ) in serum of  
 162 malignant tumor and benign tumor.

163

164 The classification of machine learning algorithms showed the better discrimination of  
 165 serum spectra of benign tumor and breast cancer by linear discriminant analysis (LDA). The  
 166 spectra performed with FS - Raw data (1800-900 $\text{cm}^{-1}$  and 3050-2800 $\text{cm}^{-1}$ ) showed the higher  
 167 discrimination. In this context, LDA analysis indicates 89% of sensitivity, 74% of specificity  
 168 and 84% accuracy between benign tumor and breast cancer (Table 2). The others evaluated  
 169 discrimination of machine learning algorithms tested are described in table 2.

170

171 **Table 2.** Machine learning algorithms applied to classify malignant tumor and benign tumor.

Algorithm	Pre-processing (band)	Sensibility	Specificity	Mean	Accuracy
Logistic Regression	Raw data (1800-900 $\text{cm}^{-1}$ ; 3050-2800 $\text{cm}^{-1}$ )	0.74	0.35	0.55	0.62
	FS - Raw data (1800-900 $\text{cm}^{-1}$ ; 3050-2800 $\text{cm}^{-1}$ )	0.82	0.41	0.62	0.69
	Rubberband+amida1 (1800-900 $\text{cm}^{-1}$ ; 3050-2800 $\text{cm}^{-1}$ )	0.82	0.27	0.55	0.66
	FS - Rubberband+amida1 (1800-900 $\text{cm}^{-1}$ ; 3050-2800 $\text{cm}^{-1}$ )	0.88	0.38	0.63	0.73
	1st deriv. Savgolay (1800-900 $\text{cm}^{-1}$ ; 3050-2800 $\text{cm}^{-1}$ )	0.86	0.27	0.57	0.68
	FS - 1st deriv. Savgolay (1800-900 $\text{cm}^{-1}$ ; 3050-2800 $\text{cm}^{-1}$ )	0.92	0.32	0.62	0.74

<b>Linear Discriminant Analysis</b>	Raw data (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.71	0.32	0.52	0.59
	FS - Raw data (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	<b>0.89</b>	<b>0.74</b>	<b>0.82</b>	<b>0.84</b>
	Rubberband+amidal (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.58	0.30	0.44	0.50
	FS - Rubberband+amidal (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.80	0.58	0.69	0.73
	1st deriv. Savgolay (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.73	0.50	0.62	0.66
	FS - 1st deriv. Savgolay (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.77	0.68	0.73	0.74
	<b>Random Forest</b>	Raw data (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.76	0.20	0.48
FS - Raw data (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )		0.66	0.42	0.54	0.59
Rubberband+amidal (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )		0.82	0.20	0.51	0.63
FS - Rubberband+amidal (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )		0.85	0.38	0.62	0.71
1st deriv. Savgolay (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )		0.69	0.33	0.51	0.58
FS - 1st deriv. Savgolay (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )		0.76	0.52	0.64	0.69
<b>Support Vector Machine</b>		Raw data (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.69	0.50	0.60
	FS - Raw data (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.69	0.58	0.64	0.65
	Rubberband+amidal (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.65	0.70	0.68	0.66
	FS - Rubberband+amidal (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.30	0.91	0.61	0.48
	1st deriv. Savgolay (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.73	0.50	0.62	0.66
	FS - 1st deriv. Savgolay (1800-900cm <sup>-1</sup> ; 3050-2800cm <sup>-1</sup> )	0.66	0.64	0.65	0.65

172

173

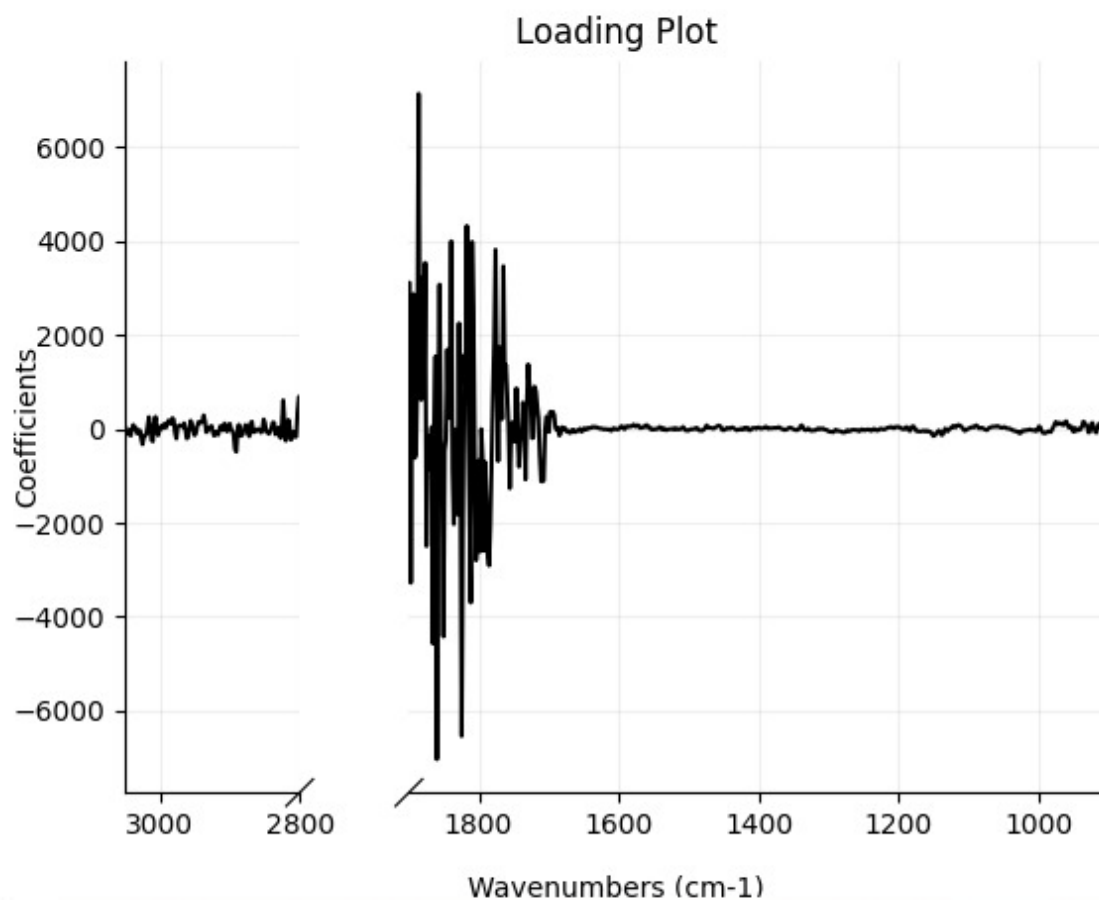
174

175

The loading plot with spectral wavenumbers responsible for discrimination between benign tumor and malignant tumor are represented in Figure 2 to explain the sensitivity and specificity obtained

176 for FS - Raw data ( $1800\text{-}900\text{cm}^{-1}$  and  $3050\text{-}2800\text{cm}^{-1}$ ).

177



178

179 Figure 2. LDA loading plot to for FS - Raw data ( $1800\text{-}900\text{cm}^{-1}$  and  $3050\text{-}2800\text{cm}^{-1}$ ) to discriminate  
180 breast cancer the benign breast.

181

182

## 183 **DISCUSSION**

184 Although the mammography is recognized as valuable breast cancer screening tests, the  
185 presence of false-negative and false-positive results have been described. Here, we explored the  
186 potential of ATR-FTIR to develop a novel, high-throughput and sustainable screening tool for  
187 breast cancer detection. ATR-FTIR detected the region between  $1800\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  as the spectral  
188 region capable to discriminate breast cancer and benign breast disease. In our point of view, the  
189 discriminatory power of the blood ATR-FTIR analysis is suitable to be applied as screening  
190 tool for malignant tumor detection.

191 The anatomical tumor growth can predict the behavior of the tumor and assist the  
192 medical staff in decision making<sup>19</sup>. In a data collected from 22,616 women with breast cancer,  
193 the presence of histologic Grade 1 tumors with less than 2 cm in size were related to a 5-year

194 survival rate of 99%. As expected, when breast cancer increase in size, this change is  
195 accompanied by parallel changes in histologic grade, which can reduce the 5-year survival  
196 rate<sup>20</sup>.

197 Mammography, ultrasound and magnetic resonance imaging are conventional  
198 techniques used during clinical practice for the detection, diagnosis and management of breast  
199 diseases, with high sensitivity and specificity. These techniques, however, have some  
200 limitations, such as high cost and no indication for young women <sup>21</sup>. In addition, novel  
201 technologies have been applied in the breast cancer diagnosis, such as Positron Emission  
202 Tomography (PET), computed tomography, tomosynthesis and ultrasound with contrast<sup>10, 22, 23</sup>.

203 Currently, circulating serum markers are used to monitor progression and recurrence of  
204 neoplasia such as CEA, CA 15-3 or CA 27-29, however, none of these markers has  
205 demonstrated clinical applicability as an independent predictive marker, making it difficult to  
206 diagnose breast cancer <sup>10</sup>. Infrared spectroscopy allows analyzing the entire biochemical  
207 structure of a biological sample, not focusing only on a single molecule <sup>24</sup>. Thus, this LDA-  
208 based classification protocol applied in serum ATR-FTIR spectra was used to discriminate  
209 breast cancer and benign breast disease. In this set of data, the ATR-FTIR was capable to  
210 discriminate both samples with 89% of sensitivity, 74% of specificity and 84% accuracy,  
211 suggesting that this infrared platform coupled to machine learning algorithms could be an  
212 interesting alternative in breast cancer screening. The data reported here support the hypothesis  
213 that biochemical changes occur in the serum from breast cancer and benign breast disease,  
214 which can be detected by FTIR associated with LDA algorithms. Therefore, the results of this  
215 research suggest that this serum ATR-FTIR spectral biomarker is a possible potential to  
216 improve the breast cancer diagnosis.

217 Malignant tumor can show changes in several biochemical, metabolic and lipid  
218 molecules [21]. Previously, it was showed the potential of ATR-FTIR technology to  
219 discriminate malignant tumor than healthy subjects using 5  $\mu$ l of blood serum sample in the  
220 ATR device. The sample was dried at the room temperature during 10 min [31]. Besides, it was  
221 also described that ATR-FTIR platform coupled to principal component regression was capable  
222 to discriminate malignant tumor than healthy subjects using 15  $\mu$ l of blood serum when samples  
223 were dried at room temperature during 10 min directly in ATR device [30]. To the best of our  
224 knowledge, this report is pioneer to reveal the potential of ATR-FTIR to discriminate malignant  
225 tumor and benign tumor disease using a high-throughput and sustainable device. We used 10  
226  $\mu$ l of blood serum under aluminum pellets and heated to 80°C in a dry bath for three minutes.  
227 In this context, this versatile sustainable aluminum pellets demonstrates ability to perform high-

228 throughput analysis.

229 It is important to mention that ATR-FTIR has been performed in biological fluids of  
230 previous studies <sup>18, 27-29</sup>. Other studies evaluated the potential use of FTIR spectroscopy for  
231 malignant tumor screening using serum as the screening sample. However, these studies  
232 evaluated malignant tumor patients and healthy individuals <sup>30, 31</sup> and in the present study we  
233 evaluated patients with malignant tumor and benign tumor which is more reliable in the clinical  
234 settings. More multicenter studies with large clinical trials are needed to confirm our results and  
235 evaluate the diagnostic performance of this infrared platform in clinical practice. In this context,  
236 the serum ATR-FTIR spectroscopy coupled with LDA classification could provide a novel  
237 alternative for biomedical screening.

238

## 239 **CONCLUSION**

240

241 Herein, we have showed that ATR-FTIR spectroscopy coupled to a LDA-based  
242 classification machine learning algorithms using a sustainable aluminum devices with high-  
243 throughput capability can be used in serum samples to discriminate malignant tumor and benign  
244 tumor. In summary, these innovative results suggest that blood analysis by ATR-FTIR  
245 spectroscopy has the potential to provide an alternative to the malignant tumor screening, and  
246 can be a tool to assist in a medical decision-making.

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256



257 **REFERENCES**

258

- 259 1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates  
 260 of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*  
 261 2021;71:209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>  
 262 PMID:33538338
- 263 2. W. D. Foulkes, I. E. Smith and J. S. Reis-Filho, *The New England journal of medicine*,  
 264 2010, **363**, 1938-1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>  
 265 PMID:21067385
- 266 3. E. H. Koh, Y. W. Cho, Y. J. Mun, J. H. Ryu, E. J. Kim, D. S. Choi, K. Y. Maeng, J. Han  
 267 and D. Kang, *Cancer investigation*, 2014, **32**, 22-  
 268 29. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.861473>  
 269 PMID:24328556
- 270 4. S. Ghersevich and M. P. Ceballos, *Advances in clinical chemistry*, 2014, **64**, 241-  
 271 268. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800263-6.00006-9>  
 272 PMID:24938021
- 273 5. P. H. Tan, I. Ellis, K. Allison, E. Brogi, S. B. Fox, S. Lakhani, A. J. Lazar, E. A. Morris,  
 274 A. Sahin, R. Salgado, A. Sapino, H. Sasano, S. Schnitt, C. Sotiriou, P. van Diest, V. A.  
 275 White, D. Lokuhetty and I. A. Cree, *Histopathology*, 2020, **77**, 181-  
 276 185. <https://doi.org/10.1111/his.14091>  
 277 PMID:32056259
- 278 6. A. A. Onitilo, J. M. Engel, R. T. Greenlee and B. N. Mukesh, *Clinical medicine &*  
 279 *research*, 2009, **7**, 4-13. <https://doi.org/10.3121/cm.2008.825>
- 280 7. M. Tria Tirona, *American family physician*, 2013, **87**, 274-278.
- 281 8. J. Depciuch, E. Kaznowska, I. Zawlik, R. Wojnarowska, M. Cholewa, P. Heraud and J.  
 282 Cebulski, *Applied spectroscopy*, 2016, **70**, 251-  
 283 263. <https://doi.org/10.1177/0003702815620127>  
 284 PMID:26903561
- 285 9. D. Crivellari, K. N. Price, M. Hagen, A. Goldhirsch, R. D. Gelber, M. Castiglione, A.  
 286 S. Coates, C. M. Rudenstam, J. Collins, J. Lindtner and *et al.*, *Annals of oncology :*  
 287 *official journal of the European Society for Medical Oncology*, 1995, **6**, 769-  
 288 776. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a059314>  
 289 PMID:8589013
- 290 10. C. Van Poznak, L. N. Harris and M. R. Somerfield, *Journal of oncology practice*, 2015,  
 291 **11**, 514-516. <https://doi.org/10.1200/JOP.2015.005215>  
 292 PMID:29424583
- 293 11. F. Clatot, A. Perdrix, L. Beaussire, J. Lequesne, C. Lévy, G. Emile, M. Bubenheim, S.  
 294 Lacaille, C. Calbrix, L. Augusto, C. Guillemet, C. Alexandru, M. Fontanilles, D.  
 295 Sefrioui, L. Burel, S. Guénot, D. Richard, N. Sarafan-Vasseur and F. Di Fiore, *Breast*  
 296 *cancer research : BCR*, 2020, **22**, 56. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01290-x>  
 297 PMID:32466779 PMCID:PMC7254698
- 298 12. I. P. Santos, E. M. Barroso, T. C. Bakker Schut, P. J. Caspers, C. G. F. van Lanschot,  
 299 D. H. Choi, M. F. van der Kamp, R. W. H. Smits, R. van Doorn, R. M. Verdijk, V.  
 300 Noordhoek Hegt, J. H. von der Thüsen, C. H. M. van Deurzen, L. B. Koppert, G. van  
 301 Leenders, P. C. Ewing-Graham, H. C. van Doorn, C. M. F. Dirven, M. B. Busstra, J.  
 302 Hardillo, A. Sewnaik, I. Ten Hove, H. Mast, D. A. Monserez, C. Meeuwis, T. Nijsten,  
 303 E. B. Wolvius, R. J. Baatenburg de Jong, G. J. Puppels and S. Koljenović, *The Analyst*,  
 304 2017, **142**, 3025-3047. <https://doi.org/10.1039/C7AN00957G>

- 305 PMID:28726868
- 306 13. J. R. Hands, G. Clemens, R. Stables, K. Ashton, A. Brodbelt, C. Davis, T. P. Dawson,  
307 M. D. Jenkinson, R. W. Lea, C. Walker and M. J. Baker, *Journal of neuro-oncology*,  
308 2016, **127**, 463-472. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2060-x>  
309 PMID:26874961 PMCID:PMC4835510
- 310 14. K. M. Dorling and M. J. Baker, *Trends in biotechnology*, 2013, **31**, 327-  
311 328. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.010>  
312 PMID:23602151
- 313 15. J. J. Ojeda and M. Dittrich, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2012, **881**,  
314 187-211. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8)  
315 PMID:22639215
- 316 16. F. Severcan, O. Bozkurt, R. Gurbanov and G. Gorgulu, *Journal of biophotonics*, 2010,  
317 **3**, 621-631. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>  
318 PMID:20575104
- 319 17. A. E. Giuliano, J. L. Connolly, S. B. Edge, E. A. Mittendorf, H. S. Rugo, L. J. Solin, D.  
320 L. Weaver, D. J. Winchester and G. N. Hortobagyi, *CA: a cancer journal for clinicians*,  
321 2017, **67**, 290-303. <https://doi.org/10.3322/caac.21393>  
322 PMID:28294295
- 323 18. D. C. Caixeta, E. M. G. Aguiar, L. Cardoso-Sousa, L. M. D. Coelho and S. W. Oliveira,  
324 *PLoS One*, 2020, **15**, e0223461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>  
325 PMID:32182246 PMCID:PMC7077825
- 326 19. N. Harbeck, F. Penault-Llorca, J. Cortes, M. Gnant, N. Houssami, P. Poortmans, K.  
327 Ruddy, J. Tsang and F. Cardoso, *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, **5**,  
328 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>  
329 PMID:31548545
- 330 20. D. E. Henson, L. Ries, L. S. Freedman and M. Carriaga, *Cancer*, 1991, **68**, 2142-2149.  
331 [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19911115\)68:10<2142::AID-  
332 CNCR2820681010>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19911115)68:10<2142::AID-CNCR2820681010>3.0.CO;2-D)
- 333 21. L. Wang, *Sensors*, 2017, **17**, 1572. <https://doi.org/10.3390/s17071572>  
334 PMID:28678153 PMCID:PMC5539491
- 335 22. X. Xiao, B. Ou, H. Yang, H. Wu and B. Luo, *PLoS One*, 2014, **9**,  
336 e105517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105517>  
337 PMID:25133534 PMCID:PMC4136879
- 338 23. C. E. Comstock, C. Gatsonis, G. M. Newstead, B. S. Snyder, I. F. Gareen, J. T. Bergin,  
339 H. Rahbar, J. S. Sung, C. Jacobs, J. A. Harvey, M. H. Nicholson, R. C. Ward, J. Holt,  
340 A. Prather, K. D. Miller, M. D. Schnall and C. K. Kuhl, *Jama*, 2020, **323**, 746-  
341 756. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0572>  
342 PMID:32096852 PMCID:PMC7276668
- 343 24. G. Bellisola and C. Sorio, *American journal of cancer research*, 2012, **2**, 1-21.
- 344 25. D. A. Scott, D. E. Renaud, S. Krishnasamy, P. Meric, N. Buduneli, S. Cetinkalp and K.  
345 Z. Liu, *Diabetology & metabolic syndrome*, 2010, **2**, 48. [https://doi.org/10.1186/1758-  
346 5996-2-48](https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-48)  
347 PMID:20630088 PMCID:PMC2914662
- 348 26. J. R. Hands, K. M. Dorling, P. Abel, K. M. Ashton, A. Brodbelt, C. Davis, T. Dawson,  
349 M. D. Jenkinson, R. W. Lea, C. Walker and M. J. Baker, *Journal of biophotonics*, 2014,  
350 **7**, 189-199. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300149>  
351 PMID:24395599
- 352 27. B. R. Smith, K. M. Ashton, A. Brodbelt, T. Dawson, M. D. Jenkinson, N. T. Hunt, D.  
353 S. Palmer and M. J. Baker, *The Analyst*, 2016, **141**, 3668-  
354 3678. <https://doi.org/10.1039/C5AN02452H>

- 355 PMid:26818218  
356 28. F. Bonnier, G. Brachet, R. Duong, T. Sojinrin, R. Respaud, N. Aubrey, M. J. Baker, H.  
357 J. Byrne and I. Chourpa, *Journal of biophotonics*, 2016, **9**, 1085-1097.  
358 <https://doi.org/10.1002/jbio.201600015>  
359 PMid:27507567  
360 29. I. C. C. Ferreira, E. M. G. Aguiar, A. T. F. Silva, L. L. D. Santos, L. Cardoso-Sousa, T.  
361 G. Araujo, D. W. Santos and L. R. Goulart, 2020, **2020**,  
362 4343590.<https://doi.org/10.1155/2020/4343590>  
363 PMid:32104176 PMCID:PMC7035572  
364 30. V. E. Sitnikova, M. A. Kotkova, T. N. Nosenko, T. N. Kotkova, D. M. Martynova and  
365 M. V. Uspenskaya, *Talanta*, 2020, **214**, 120857.  
366 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120857>  
367 PMid:32278436  
368 31. F. Elmi, A. F. Movaghar, M. M. Elmi, H. Alinezhad and N. Nikbakhsh, *Spectrochimica*  
369 *acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 2017, **187**, 87-  
370 91.<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.021>  
371 PMid:28666157  
372

## Referências

- ALLAKHVERDIEV, K. R. *et al.*. Confocal Raman microscopy: non-destructive materials analysis with micrometer resolution. **Reviews on advanced materials science**, v. 20, p. 77–84, 2009.
- AL-SAEED, T. A.; KHALIL, D. A. Signal-to-noise ratio calculation in a moving-optical wedge spectrometer. **Appl Opt**, v.51, n. 30, p. 7206-7213, Oct 20 2012. <https://doi.org/10.1364/AO.51.007206> PMid:23089773
- ARPINO, G.; MILANO, M. PLACIDO, S. Features of aggressive breast cancer. **The Breast**, v. 24, n.5, p. 594-600, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.06.001> PMid:26144637
- BAIN, B.J. **Células Sanguíneas: um guia prático**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1767, n. 9, p. 1073-1101, Sep 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004> PMid:17692815
- BASSAN, P. **Light scattering during infrared spectroscopic measurements of biomedical samples**, The University of Manchester (United Kingdom), 2011.
- BEASLEY, M. M. *et al.* Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. **Journal of Archaeological Science**, v. 46, p. 16-22, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.03.008>.
- BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Vet Microbiol**, v. 123, n. 4, p. 305-319, Aug 31 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.010> PMid:17540519
- BERNANDES, A. Anatomia da mama feminina. **Manual de Ginecologia**, p. 1–8, 2010.
- BILAL, M. *et al.* Optical Screening of Female Breast Cancer from Whole Blood Using Raman Spectroscopy. **Applied spectroscopy**, v. 71, p.1004-1013, 2017. <https://doi.org/10.1177/0003702816667516> PMid:27634888
- BORGES, A. R. Exames De Imagem No Rastreo E Diagnóstico Do Câncer De Mama : Ressonância Magnética Das Mamas. **Psicologia e Saúde em Debate**, v. 1, p. 19–38, 2015. <https://doi.org/10.22289/2446-922X.V1N1A3>
- BRASIL, M. DA S. S. DE A. À S. I. N. DE C. Portaria nº 874, de 16 de maio de 2013. **Ministério da Saúde**, p. 1–13, 2013.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, p.394-424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492> PMid:30207593
- BUNACIU, A. A.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 156-165, 2015/04/032015. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.904733> PMid:25558776

BUNACIU, A. A.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Vibrational Micro-Spectroscopy of Human Tissues Analysis: Review. **Crit Rev Anal Chem**, 47, n. 3, p. 194-203, May 4 2017. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1253454> PMID:27786540

BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 21, n.2, p. 101-117, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2006.11.001> PMID:17397761  
PMCID:PMC7125842

CAIXETA, D. C. *et al.* Salivary molecular spectroscopy: a sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. **Plos One**, v. 15, n. 3, p. 1-18, 17 mar. 2020. Public Library of Science (PLoS).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461> PMID:32182246 PMCID:PMC7077825

CALDEIRA, J. R. F. *et al.* CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. **BMC Cancer**, [S. L.], v. 48, n. 6, p. 1-9, Marc. 2006. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-48> PMID:16512896 PMCID:PMC1523210

CATARZI, S. *et al.* A multicenter study for the evaluation of the diagnostic efficiency of mammography and echography in nonpalpable breast neoplasms. **La Radiologia Medica**. v.84, n.3, p.193-197, 1992.

CHAN, A. K. L.; KAZARIAN, S. G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. **Chem Soc Rev**, v. 45, n. 7, p. 1850-1864, Apr 07 2016. <https://doi.org/10.1039/C5CS00515A> PMID:26488803

CHENG, F. *et al.* Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Clin Chim Acta**, v. 447, p. 23-31, Jul 20 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.05.008> PMID:25987308

CHOUKROUN, J. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**. v. 101, p. 299-303, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.012> PMID:16504861

CLEMENS, G. *et al.* Vibrational spectroscopic methods for cytology and cellular research. **Analyst**, v.139, n. 18, p. 4411-4444, Sep 21 2014. <https://doi.org/10.1039/C4AN00636D> PMID:25028699

COMSTOCK, C. E. *et al.* Comparison of Abbreviated Breast MRI vs Digital Breast Tomosynthesis for Breast Cancer Detection Among Women With Dense Breasts Undergoing Screening. **Jama**, [S.L.], v. 323, n. 8, p. 746-756, 25 fev. 2020. American Medical Association (AMA). <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0572> PMID:32096852  
PMCID:PMC7276668

DAY, J.S.; EDWARDS, H.G.M. & DOBROWSKI, A. M. S. A. Voice, The Detection of Drugs of Abuse in Fingerprints Using Raman Spectroscopy II: Cyanoacrylate-fuming Fingerprints. **Spectrochim Acta**, v. 60, n. 3 p. 1725-1730, 2004.

DECARLO, T. M. Characterizing coral skeleton mineralogy with Raman spectroscopy. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-3, dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07601-3> PMID:30552319 PMCID:PMC6293996

DEPCIUCH, J. *et al.* Monitoring breast cancer treatment using a Fourier transform infrared spectroscopy-based computational model. **J Pharm Biomed Anal**, v. 143, p. 261-268, Jun 08 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.039> PMID:28618342

DEPCIUCH, J. *et al.* Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer. **Appl Spectrosc**, v. 70, n. 2, p. 251-263, Feb 2016. <https://doi.org/10.1177/0003702815620127> PMID:26903561

DEPCIUCH, J. *et al.* Phospholipid-protein balance in affective disorders: Analysis of human blood serum using Raman and FTIR spectroscopy. A pilot study. **J Pharm Biomed Anal**, v. 131, p. 287-296, nov. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-48> PMID:16512896 PMCID:PMC1523210

DORLING, K. M.; BAKER, M. J. Highlighting attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for rapid serum analysis. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 6, p. 327-328, Jun 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.010> PMID:23602151

DOWSETT, M. *et al.* Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? **Eur J Cancer**. v.36, n.2, p.170-176., 2000. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00264-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00264-6)

DUFFY, S. W. *et al.* Screen detection of ductal carcinoma in situ and subsequent incidence of invasive interval breast cancers: A retrospective population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 1, p. 109–114, 2016. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00446-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00446-5)

EDWARDS, H. G. M. Modern Raman Spectroscopy: a practical approach. **J. Raman Spectrosc.** v. 36, p.835–835, 2005. <https://doi.org/10.1002/jrs.1320>

ELKINS, K. M. Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy. **J Forensic Sci**, v. 56, n. 6, p. 1580-1587, nov. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01870.x> PMID:21827466

ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 131, n. 8, p. 875-885, Aug 2006. <https://doi.org/10.1039/b602376m> PMID:17028718

ELMI, F. *et al.* Application of FT-IR spectroscopy on breast cancer serum analysis. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 187, n. 5, p. 87-91, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.021> PMID:28666157

EROLE, P. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 698-707, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005> PMID:22178455

FABIAN, H. *et al.* Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR microspectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 7, p. 874-882, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.015> PMID:16814743

FEIG, A. S. Screening mammography: a successful public health initiative. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, DC, v. 20, no. 2/3, p.125–133, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892006000800009> PMID:1719990

FENG, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v.5, p. 77-106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001> PMID:30258937  
PMCID:PMC6147049

FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2. ed. Elsevier, 2003. ISBN: 978-0-12-254105-6.

FERREIRA, I. C. C. *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. **Journal of Oncology**, [S.L.], 2020, p. 1-11, 10 fev. 2020. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/4343590> PMID:32104176 PMCID:PMC7035572

FOROUZANFAR, M. H. *et al.* Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **Lancet** (London, England), v.378, p. 1461-1484, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61351-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61351-2)

GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A.; JONES, D. E. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: **Characterization of Materials**, 2012. p. 1- 33. <https://doi.org/10.1002/0471266965.com107.pub2>

GEBRIM, L. H. A detecção precoce do câncer de mama no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, 2016. <https://doi.org/10.1590/0102-311XCO010516> PMID:27253460

GHERSEVICH, S.; CEBALLOS, M. P. Mammaglobin A: review and clinical utility. **Adv Clin Chem**, v. 64, p.241-268, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800263-6.00006-9> PMID:24938021

GIULIANO, A. E. *et al.* Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA Cancer J Clin**, Mar. 14 2017. <https://doi.org/10.3322/caac.21393> PMID:28294295

GONZÁLEZ-SOLÍS, J. L. *et al.* Cervical cancer detection based on serum sample Raman spectroscopy. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 979-985, 3 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1447-6> PMID:24197519

HAKA, A. S. *et al.* Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 5, 2009. <https://doi.org/10.1117/1.3247154> PMID:19895125 PMCID:PMC2774977

HANDS, J. R. *et al.* Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of neuro-oncology**, v. 127, n. 3, p. 463-472, May 2016. ISSN 1573-7373 (Print) 0167-594X. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2060-x> PMID:26874961 PMCID:PMC4835510

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clin Anat**, v. 26, n. 1, p. 29-48, Jan 2013. <https://doi.org/10.1002/ca.22165> PMID:22997014

HERRERO, A.M., "Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review". **Food Chem.** v.107, n. 4, 1642 p., 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.014>

HIRATA, B. K. *et al.* Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. **Dis Markers**, v. 2014, p. 513158, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/513158> PMID:24591761 PMCID:PMC3925609

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R., **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed., Porto Alegre: Bookman, 2009.

HUANG, Z. *et al.* Raman spectroscopy in combination with background near-infrared autofluorescence enhances the in vivo assessment of malignant tissues. **Photochemistry and photobiology**, v. 81, p.1219-1226, 2005. <https://doi.org/10.1562/2005-02-24-RA-449> PMID:15869327

HUGHES, C. *et al.* Assessing the challenges of Fourier transform infrared spectroscopic analysis of blood serum. **J Biophotonics**, v. 7, n. 3-4, p. 180-188, Apr 2014. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300167> PMID:24488587

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2019 Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em 27 dez. 2020.

JESINGER, R.A. Breast anatomy for the interventionalist. **Tech Vasc Interv Radiol**. v.17, n.1, p.3-9, 2014. <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002> PMID:24636325

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**: Junqueira e Carneiro. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KATON, J. E. Applications of vibrational microspectroscopy to chemistry. **Vibrational Spectroscopy**, v.7, p. 201-229, 1994. [https://doi.org/10.1016/0924-2031\(94\)85012-7](https://doi.org/10.1016/0924-2031(94)85012-7)

KEEN, J. C.; DAVIDSON, N. E. The biology of breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 3 Suppl, p. 825-833, Feb 1 2003. <https://doi.org/10.1002/cncr.11126> PMID:12548582



KENDALL, C. *et al.* Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics. **Analyst**, v. 134, n. 6, p. 1029-1045, Jun 2009. <https://doi.org/10.1039/b822130h> PMid:19475128

KOH, E. H. *et al.* Upregulation of human mammaglobin reduces migration and invasion of breastcancer cells. **Cancer Invest**, v. 32, n. 1, p. 22-29, Jan 2014. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.861473> PMid:24328556

KOTHARI, R. *et al.* Raman spectroscopy and artificial intelligence to predict the Bayesian probability of breast cancer. **Scientific reports**, v. 11, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85758-6> PMid:33753760 PMCID:PMC7985361

KRAFFT, C. *et al.* Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. **J Biophotonics**, v. 2, n. 1- 2, p. 13-28, Feb 2009.

KUMAMOTO, Y. *et al.* Label-free Molecular Imaging and Analysis by Raman Spectroscopy. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 51, p. 101-110, 2018. <https://doi.org/10.1267/ahc.18019> PMid:30083018 PMCID:PMC6066646

LANE, R.; SEE, S. S. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy method to differentiate between normal and cancerous breast cells. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 12, n. 9, p. 7395- 7400, Sep. 2012. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6582> PMid:23035482

LANIGAN F. *et al.* Molecular links between mammary gland development and breast cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 3161-3184, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7386-2> PMid:17955178

LAW, J *et al.* Risk factors for induction of breast cancer by X-rays and their implications for breast screening. **The British Journal Of Radiology**, [S.L.], v. 80, n. 952, p. 261-266, abr. 2007. British Institute of Radiology. <https://doi.org/10.1259/bjr/20496795> PMid:17038413

LEWIS, P. D. *et al.* Evaluation of FTIR Spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 640, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-640> PMid:21092279 PMCID:PMC3000851

LIMA, C. A. *et al.* ATR-FTIR spectroscopy for the assessment of biochemical changes in skin due to cutaneous squamous cell carcinoma. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 4, p. 6621-6630, Mar. 24 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms16046621> PMid:25811925 PMCID:PMC4424979

LIMA, K. M. *et al.* Segregation of ovarian cancer stage exploiting spectral biomarkers derived from blood plasma or serum analysis: ATR-FTIR spectroscopy coupled with variable selection methods. **Biotechnol Prog**, v. 31, n. 3, p. 832-839, May-Jun 2015. <https://doi.org/10.1002/btpr.2084> PMid:25832726

LIN, K.; CHENG, D. L. P.; HUANG, Z. Optical diagnosis of laryngeal cancer using high wave number Raman spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 213-217, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.02.050> PMid:22465448

LIN, Y. *et al.* MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2, SALL4 and Twist1. **Scientific Reports**, v. 5, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep09995> PMID:25919570 PMCID:PMC4412117

MACIAS, H.; HINCK L. Mammary Gland Development. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v.1 (4), p. 533-557, 2012. <https://doi.org/10.1002/wdev.35> PMID:22844349 PMCID:PMC3404495

MAHDAVI, Morteza; NASSIRI, Mohammadreza; KOOSHYAR, Mohammad Mahdi; VAKILI-AZGHANDI, Masoume; AVAN, Amir; SANDRY, Ryan; PILLAI, Suja; LAM, Alfred King-Yin; GOPALAN, Vinod. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 234, n. 5, p. 5741-5750, 14 dez. 2018. Wiley. <https://doi.org/10.1002/jcp.27464> PMID:30552672

MARSHALL, E. Dare to do less. **Science**, v. 343, 2014, p. 1454-1456. <https://doi.org/10.1126/science.343.6178.1454> PMID:24675949

MEHROTRA, R. *et al.* Infrared spectroscopic analysis of tumor pathology. **Indian J Exp Biol**, v. 45, n. 1, p. 71-76, Jan 2007.

MESCHER, A.L. **Junqueiras's Basic Histology**. 13. ed. Bloomington, Indiana: McGraw Hill, 2013.

MICHELIN, J. *et al.* Aspectos físico e técnico do exame. In: MICHELIN, J. *et al.* **Ultrasonografia da mama: diagnóstica e intervencionista**. Ribeirão Preto: MEDSI, 2001. p.3-10.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Médica Missau, 2003. 419p.

NARGIS, H. F. *et al.* Raman spectroscopy of blood plasma samples from breast cancer patients at different stages. **Spectrochimica acta**. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, v.222, 2019.117210. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117210> PMID:31176149

NAWROCKA, A. *et al.* Effect of dietary fibre polysaccharides on structure and thermal properties of gluten proteins—A study on gluten dough with application of FT-Raman spectroscopy, TGA and DSC. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 410-421, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.012>

NETTER FH: **Interactive Atlas of Human Anatomy**. In.: Ciba Medical Education & Publications; 1995.

NOREEN, R. *et al.* Detection of collagens in brain tumors based on FTIR imaging and chemometrics. **Anal Bioanal Chem**, v. 401, n. 3, p. 845-852, Aug. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4899-1> PMID:21455651

NOREEN, R. *et al.* FTIR spectro-imaging of collagen scaffold formation during glioma tumor development. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, n. 27, p. 8729-8736, Nov. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7337-8> PMID:24068168

OLIVEIRA, G. M. **Simetria de Moléculas e Cristais: Fundamentos da espectroscopia vibracional**. Bookman Editora, 2009.

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast development and anatomy. **Clin Obstet Gynecol**, v. 54, n. 1, p. 91-95, Mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.meddro.2010.10.012>

PARASKEVAIDI, M. *et al.* Raman Spectroscopy to Diagnose Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies in Blood. **Acs Chemical Neuroscience**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 2786-2794, 4 jun. 2018. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00198> PMID:29865787

PEAIRS, K. S. *et al.* Screening for breast cancer. **Semin Oncol**, v. 44, n. 1, p. 60-72, Feb 2017. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.02.004> PMID:28395765

PEREIRA, E. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de urânio em compostos do ciclo do combustível nuclear por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier(ftir)**. 2016. 181 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-04032016-112713/publico/2016PereiraDesenvolvimento.pdf06>. Acesso em: 06 abr. 2021.

PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406 2000, p. 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093> PMID:10963602

POLYAK, K. Breast câncer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 3155-3163, 2007. <https://doi.org/10.1172/JCI33295> PMID:17975657  
PMCID:PMC2045618

PSYCHOGIOS, N. *et al.* The Human Serum Metabolome. **Plos One**, v. 6, n. 2, p. 1-23, 16 fev. 2011. Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957> PMID:21359215 PMCID:PMC3040193

RODRIGUES, J. F. S. *et al.* Monitoring of Peripheral Blood Leukocytes and Plasma Samples: a pilot study to examine treatment response to leflunomide in rheumatoid arthritis. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 2, p. 14-106, 29 jan. 2021. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph14020106> PMID:33573015 PMCID:PMC7910893

ROZEN, W.M.; ASHTON, M.W.; TAYLOR, G.I. Defining the role for autologous breast reconstruction after mastectomy: social and oncologic implications. **Clin Breast Cancer**. v. 8, n.2, 2008, p.134-142. <https://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.013> PMID:18621609

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**.Unesp, 2008.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho**; UNESP, Ed.; 2.ed. São Paulo, 1996, 276 p.

SANTOS, A. *et al.* Aplicação da espectroscopia raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. **Química Nova**, São Carlos, v. 42, n. 5, p. 489-496, 18 abr. 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170358>

SANTOS, I.P. *et al.* Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics. **Analyst**, v.142, p. 3025–3047, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7AN00957G>  
PMid:28726868

SHARMA, G. *et al.* Various types and management of breast cancer: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 2, p. 109-126, April 1, 2010.

SHAZ, B.H., *et al.* **Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397164-7.01002-8>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**, 7. ed. Wiley, 2005.

SIMONOVA, D.; KARAMANCHEVA, I. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Tumor Diagnosis. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 27, n. 6, 2013, p. 4200-4207. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0106>

SITNIKOVA, V. E. *et al.* Breast cancer detection by ATR-FTIR spectroscopy of blood serum and multivariate data-analysis. **Talanta**, v. 214, n. 1, p. 120857, jul. 2020. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120857> PMid:32278436

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Principles of instrumental analysis. **Cengage learning**, 2017. 1305577213

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SLEDGE, G. W. *et al.* Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 19, jul. 2014, p. 1979–1986. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.4139>  
PMid:24888802 PMCID:PMC4879690

SMITH, B. C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. Boca Raton, FL.: CRC Press LC, 1999.

STUART WILLIAMS, D. A. & BONAWI-TAN, W. Online quality control with Raman spectroscopy in pharmaceutical tablet manufacturing. **Journal of Manufacturing Systems**, v. 23, 2004, p. 299–308. [https://doi.org/10.1016/S0278-6125\(04\)80042-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6125(04)80042-6)

STUART, B. H. Biological Applications. In: (Ed.). **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**: John Wiley & Sons, Ltd, p.137-165. 2005. ISBN 9780470011140. <https://doi.org/10.1002/0470011149.ch7>

SUN, X. *et al.* Detection of lung cancer tissue by attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy-a pilot study of 60 samples. **J Surg Res**, v. 179, n. 1, p. 33-38, Jan 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.08.057>  
PMid:23020954

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>  
PMid:33538338

SYNYTSYA, A. *et al.* Raman spectroscopy at different excitation wave lengths (1064, 785 and 532 nm) as a tool for diagnosis of colon cancer. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.45, 2014. <https://doi.org/10.1002/jrs.4581>

TATULIAN, S. A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids. **Biochemistry**, 42, n. 41, p. 11898-11907, Oct 21 2003. <https://doi.org/10.1021/bi034235>

TEH, S. K. *et al.* Near-infrared Raman spectroscopy for early diagnosis and typing of adeno carcinoma in the stomach. **The British journal of surgery**, v. 97, p. 550-557, 2010  
<https://doi.org/10.1002/bjs.6913> PMid:20155786

TIRONA, T. M. Breast cancer screening update. **Am Fam Physician**, v. 87, n. 4, p. 274-278, Feb 15, 2013.

TORRE, L. A. *et al.* Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. **Cancer Epidemiology Biomarkers; Prevention**, v.25, 2016, p. 16-27.  
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578> PMid:26667886

TOSS, A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches inbreast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 17, 60 p., Apr 23 2015.  
<https://doi.org/10.1186/s13058-015-0560-9> PMid:25902832 PMCID:PMC4407294

TREVISAN, J. *et al.* Measuring similarity and improving stability in biomarker identification methods applied to Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. **J Biophotonics**, v. 7, n. 3-4, Apr 2014, p. 254-265. <https://doi.org/10.1002/jbio.201300190>  
PMid:24604880

VARGAS-OBieta, E. *et al.* Breast cancer detection based on serum sample surface enhanced Raman spectroscopy. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v. 31, n. 7, 11 jun. 2016, p. 1317-1324. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1976-x>. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1976-x> PMid:27289243

VERDONCK, M. *et al.* Characterization of human breast cancer tissues by infrared imaging. **Analyst**, v. 141, n. 2, Jan 21 2016, p. 606-619. <https://doi.org/10.1039/C5AN01512J>  
PMid:26535413

VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clinica.** São Paulo: Atheneu, 2005. 303 p.

VIVAS, W. **Manual prático de hematologia.** Files.Blog-Da-Rosania.Webnode.Com, p.1–33, 2008. Disponível em: <http://files.blog-da-rosania.webnode.com/200000431-779c6798fd/Manual de Hematologia.pdf>, Acesso em: 12 abr.2021.

VUONG, D. *et al.* Molecular classification of breast cancer. **Virchows Arch**, v. 465, n. 1, p. 1-14, Jul 2014. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7> PMID:24878755

WEBSTER, J.; BELL-SYER, S.; FOXLEE, R. Skin preparation with alcohol versus alcohol followed by 1. any antiseptic for preventing bacteraemia or contamination of blood for transfusion. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2009, Issue 3. Art. No.: CD007948. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007948>

WILLIAMS, D. A. S.; BONAWI-TAN, W. Online quality control with Raman spectroscopy in pharmaceutical tablet manufacturing. **Journal of Manufacturing Systems**, v. 23, 2004, p. 299– 308. [https://doi.org/10.1016/S0278-6125\(04\)80042-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6125(04)80042-6)

XIAO, X. *et al.* Breast Contrast-Enhanced Ultrasound: is a scoring system feasible? A preliminary study in china. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 8, 18 ago. 2014, p. 105517-105517. Public Library of Science (PLoS). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105517> PMID:25133534 PMCID:PMC4136879

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2013.

ZHANG, H. *et al.* Laser stimulating ST36 with optical fiber induce blood component changes in mice: a Raman spectroscopy study, **J. Biophot.**, 2018. e201700262. <https://doi.org/10.1002/jbio.201700262> PMID:29446873

ZHANG, L. *et al.* Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. **PLoS One**, v. 5, n. 12, Dec. 31 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015573> PMID:21217834 PMCID:PMC3013113

ZHANG, X. *et al.* Intraoperative detection of thyroid carcinoma by fourier transform infrared spectrometry. **J Surg Res**, v. 171, n. 2, p. 650-656, Dez 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.05.031> PMID:20828740

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, X. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 404, n. 4, 31 maio 2012, p. 1239-1245. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6117-1> PMID:22648167