

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

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA DE DIAGNÓSTICO
SALIVAR PARA O CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS
ACOPLADA COM ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

DANIELA BELLORIN

UBERLANDIA-MG
NOVIEMBRE 2021

DANIELA BELLORIN

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA DE DIAGNÓSTICO
SALIVAR PARA O CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS
ACOPLADA COM ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

Dissertação 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 Mestre em Ciências
da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Robinson Sabino da Silva

Co-orientador: Murillo Guimarães Carneiro

UBERLANDIA-MG

NOVEMBRO 2021



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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 011/PPCSA				
Data:	16.11.2021	Hora de início:	08:00h	Hora de encerramento:	12:00h
Matrícula do Discente:	11912CSD006				
Nome do Discente:	Daniela Sarai Bellorin Nuñez				
Título do Trabalho:	DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA DE DIAGNÓSTICO SALIVAR PARA O CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS ACOPLADA COM ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL				
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:	DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS E DOENÇAS DA TIREÓIDE				

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: Professores Doutores: Douglas Carvalho Caixeta, Tales Lyra de Oliveira (USCS) 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 Mestre.

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=3553015&infra_sistema=100000100&infra_unidade_atual=110000414&infra_hash=9ed9d... 1/2

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 **Tales Lyra de Oliveira, Usuário Externo**, em 16/11/2021, às 09:46, 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 **Douglas Carvalho Caixeta, Usuário Externo**, em 16/11/2021, às 09:57, 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 16/11/2021, às 09:57, 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, informando o código verificador **3160579** e o código CRC **3AAAC95D**.

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

- B447d
2021 Bellorin, Daniela, 1993-
 Desenvolvimento de plataforma biofotônica de diagnóstico salivar para o carcinoma oral de células escamosas acoplada com algoritmos de inteligência artificial [recurso eletrônico] / Daniela Bellorin. - 2021.
- Orientador: Robinson Sabino da Silva.
 Coorientador: Murillo Guimarães Carneiro.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5306>
 Inclui bibliografia.
1. Ciências médicas. I. Silva, Robinson Sabino da, 1981-, (Orient.). II. Carneiro, Murillo Guimarães, 1988-, (Orient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Glória Aparecida
Bibliotecária - CRB-6/2047

DANIELA BELLORIN

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOFOTÔNICA DE DIAGNÓSTICO
SALIVAR PARA O CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS
ACOPLADA COM ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL**

Dissertação 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 Mestre em Ciências
da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Robinson Sabino da Silva

Co-orientador: Murillo Guimarães Carneiro

Banca Examinadora

Presidente da Banca: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva – Universidade Federal de Uberlândia

Titular: : Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Uberlândia

Titular: Prof. Dr. Tales Lyra de Oliveira - Faculdade de Medicina da Universidade Municipal de São Caetano do Sul (USCS)

Titular: Prof. Dr. Douglas Carvalho Caixeta - Universidade Federal de Uberlândia

*“Em nossas mãos não temos a solução para todos os problemas do mundo,
más enfrentando os problemas do mundo nós temos nossas mãos”*

AGRADECIMENTOS

Primeramente, a Dios por hacer todo posible.

A mi madre por su amor infinito, sacrificio y apoyo en cada decisión de mi vida, a mi padre por sus enseñanzas, apoyo y comprensión.

A mis hermanos por siempre aconsejarme y apoyarme.

Al magnifico Profesor, Doctor y Orientador Robinson Sabino da Silva a quien admiro y estimo por su paciencia, amabilidad y enseñanzas, por ser una inspiración, un ejemplo para la investigación y por su ayuda infinita para con sus alumnos, un gracias nunca será suficiente.

A la querida Doctora Leia Cardoso de Sousa por su ayuda, amistad y orientación durante este proceso.

Al Doctor Douglas Caixeta, por la paciencia y ayuda siempre.

Al Profesor y Doctor Luiz Ricardo Goulart por el apoyo y comprensión.

A estas personas maravillosas en Brasil, Victor Flores e Ivonne García, por su amor y lealtad, con ustedes todo fue menos difícil.

A todas esas personas en el laboratorio que de cierta forma me ayudaron directa e indirectamente en mi investigación.

Al Centro de Innovación en Diagnóstico Salival y Nanoteranósticos, Departamento de Fisiología, Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Federal de Uberlândia. Al Instituto de Genética y Bioquímica de la Universidad Federal de Uberlândia. Al Departamento de Microbiología e Inmunología Médica de la Universidad de California Davis, California, EE. UU. Por las herramientas necesarias para desarrollar este trabajo.

A CNPq y FAPEMIG por el incentivo financiero para el desarrollo de este proyecto.

A la OEA y grupo COIMBRA por la ayuda y la concesión de la bolsa en Brasil.

Y finalmente a todos los pacientes envueltos en esta pesquisa, muchísimas gracias.

RESUMO

Introdução: Os métodos diagnósticos para diversos tipos de câncer na atualidade continuam sendo os mesmos usados nos últimos anos, altamente invasivos e desconfortável para os pacientes. Uma série de inovadoras plataformas de diagnóstico salivar com menor produção de resíduos, menor custo, não-invasiva e sem utilização de reagentes tem potencial aplicação para doenças orais e sistêmicas. **Objetivo:** Neste estudo investigou-se a utilização da espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) acoplada a algoritmos da inteligência artificial em amostras de saliva de pacientes com câncer oral de células escamosas como método diagnóstico. **Materiais e métodos:** O estudo incluiu 39 pacientes OCSS e 27 controles previamente saudáveis sem antecedentes de nenhum tipo de câncer, a saliva foi coletada diretamente da cavidade oral dos participantes, com coletores de polipropileno após higiene intraoral, sequentemente foram armazenadas e congeladas. O processamento em ATR-FTIR do perfil espectral infravermelho da saliva foi avaliado quanto à capacidade diagnóstica pela curva ROC. **Resultados:** As áreas da banda lipídica de $2894-2834\text{ cm}^{-1}$ e $2948-2896\text{ cm}^{-1}$ foram maiores na saliva de pacientes com OCSS em comparação com os controles. O desempenho diagnóstico desses marcadores potenciais foi avaliado posteriormente para a detecção de OCSS. A área sob a curva (AUC) de ambas as regiões $2894-2834\text{ cm}^{-1}$ e $2948-2896\text{ cm}^{-1}$ foi significativa, indicando esses parâmetros como potenciais biomarcadores para discriminar pacientes OCSS e não OCSS. Além disto, os algoritmos Random Forest e Support Vector Machine foram capazes de discriminar pacientes OSCC patients de sujeitos controles com moderada acurácia. **Conclusão:** O presente estudo indicou que algoritmos de inteligência artificial e os modos vibracionais lipídicos $2894-2834\text{ cm}^{-1}$ e $2948-2896\text{ cm}^{-1}$ da saliva podem ser usados para discriminar pacientes OCSS de pacientes controles usando plataformas biofotônicas em ambientes médicos e odontológicos.

Palavras-chave: Câncer oral, carcinoma espinocelular, saliva, diagnóstico, ATR-FTIR, biomarcador.

ABSTRACT

Introduction: The diagnostic methods for many types of cancer continue to be the same used in recent years, to be invasive and uncomfortable for patients, today we have advanced and a lot of innovative research for development tools with less waste production, lower costs, no invasive and reagent-free. **Objective:** In this study, we evaluate the potential of ATR-FTIR associated with artificial intelligence algorithms to discriminate OSCC from matched healthy controls. **Materials and methods:** The study included 39 OCSS patients and 27 healthy controls with no history of any type of cancer, all, saliva was collected directly from the oral cavity with plastic tube after rinsing mouths with water and following the manufacturer instructions, subsequently they were placed on ice and then stored, later processed in the ATR-FTIR, the salivary profile was analysed by ATR-FTIR spectroscopy and the vibrational modes were evaluated for diagnostic capability by the ROC curve. **Results:** The lipidic band areas of 2894-2834 cm^{-1} and 2948-2896 cm^{-1} were higher in saliva of OCSS patients compared with the controls. These potential markers were further evaluated for detection of OCSS. The ROC curve was performed to predict a threshold value for both infrared biomarkers. The area under the curve (AUC) of both 2894-2834 cm^{-1} and 2948-2896 cm^{-1} regions was significant, indicating these parameters as potential biomarkers to discriminate OCSS and non-OCSS patients. Besides, two algorithms obtained by Random Forest and Support Vector Machine analysis were also useful to discriminate OSCC patients than healthy subjects with moderate accuracy. **Conclusion:** The present study indicated that machine learning algorithms and the salivary lipid vibrational modes 2894-2834 cm^{-1} and 2948-2896 cm^{-1} of saliva can be used to discriminate patients with OCSS than controls using photonic platforms in medical and dental environments.

Keywords: Oral cancer, squamous cell carcinoma, saliva, diagnosis, ATR-FTIR, biomarker.

Lista de Figuras

Figura	
1.....	21.
Figura 2.....	21.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

OCSS: Câncer oral de células escamosas

CEO: Câncer espinocelular

CEC: Carcinoma espinocelular

ATR: Reflexão total atenuada

ATR-FTIR: Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier

Curva ROC: Receiver operator characteristic curve

FTIR: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

IR: Espectroscopia de infravermelho

OMS: Organização Mundial da Saúde

TNM: Tumor primário, Nodulos, Metastasis

HPV: Human papiloma vírus

AJCC: American Joint Committee on Cancer

UICC: International Union Against Cancer

DNA: Acido desoxirribunocleico

ATP: Trifosfato de adenosina

INCA: Instituto nacional de câncer

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Fundamentação Teórica.....	17
2.1 Câncer de cabeça e pescoço.....	17
2.2 Glândulas Salivares e Secreção Salivar.....	20
2.3 Complicações	24
2.4 Saliva como Fluido Diagnóstico.....	25
2.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	27
3. Objetivo.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. Artigo.....	32
5. Referências Bibliográficas.....	55

1. INTRODUCAO

O câncer é uma das três causas mais importantes de mortalidade humana. A mais recente estimativa mundial, ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos (INCA 2020).

Para o Brasil, a estimativa anual do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (MATHERS et al. 2003). Os tipos de câncer mais frequentes em homens ocorrem próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, estão entre os mais comuns os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres (INCA 2020).

O câncer na região de cabeça e pescoço representa a 6ª região anatômica mais comum para o câncer.(PIRES; RAMOS; OLIVEIRA; TAVARES et al., 2013) . O carcinoma epidermóide oral (CEO) é o câncer oral mais prevalente, representando cerca de 90% nas neoplasias malignas descritas na cavidade oral (SCULLY; BAGAN, 2009). Os cânceres de lábio e de língua são as principais regiões afetadas na região anatômica intra-oral.

Os principais fatores de risco para este tipo de câncer são tabagismo, etilismo (cerca de 90% dos casos) e infecção pelo HPV (Papilomavírus Humano) são os mais frequentes para esse tipo de câncer. Também são fatores associados a má higiene bucal e a desnutrição. O diagnóstico precoce do CEO está fortemente relacionado com maior taxa de sobrevivência (SCULLY; BAGAN, 2009).

Um diagnóstico precoce é de extrema importância, uma vez que os estágios iniciais do câncer oral são identificados, já que permite tratamentos menos agressivos e, portanto, reduz a morbidade (EPSTEIN J. B. et al 1997).

Apesar da acessibilidade de exames clínicos para cavidade oral, os estudos mostram que o CEO é detectado frequentemente em estágio avançado da doença (Neville B. W 2002; MARTINEZ et al 2016; Boza Y. 2016).

Embora novas ferramentas de diagnóstico precisam ser descobertas para auxiliar potencialmente na triagem de pacientes, já que na atualidade o exame clínico associado à biópsia é a análise padrão-ouro para diagnóstico de CEO (SHIBAHARA, 2017; TRULLENQUE-ERIKSSON; MUÑOZ- CORCUERA; CAMPO-TRAPERO; CANO-SÁNCHEZ et al., 2009 ;BRITISH COLUMBIA ORAL 2008).

Pensando nesta urgência, consideramos avaliar a saliva, que é um fluido biológico dinâmico que contém ~99% de água e outros componentes importantes que participam da lubrificação, atividade antimicrobiana, digestão, homeostase do fosfato de cálcio, remineralização do esmalte, entre outras funções (SABINO-SILVA et al., 2012) . A saliva também contém cerca de 3.000 proteínas, um número ainda maior de peptídeos que derivam da ação de proteases na cavidade oral, uma série de lipídeos, mais de 3.000 RNAs mensageiros, pelo menos 50 microRNAs, centenas de metabólitos e cerca de 700 espécies de microorganismos (DAWES; WONG, 2019; RUHL, 2012). As alterações específicas nestes componentes salivares foram utilizadas para o diagnóstico não invasivo de várias doenças sistêmicas (DAWES; WONG, 2019). Vários biomarcadores específicos foram descritos na saliva de pacientes com CEO, o que reflete em alterações de análises genômicas, transcriptômicas e proteômicas (MARKOPOULOS; MICHAILIDOU; TZIMAGIORGIS, 2010; ROI; ROI; NEGRUȚIU; RIVIȘ et al., 2020) . Como esperado, várias citocinas salivares também foram aumentadas no CEO em comparação com indivíduos de controle saudáveis (CARVALHO; CAVALIERI; DO NASCIMENTO; LOURENÇO et al., 2019; RAI; PANDA; DAS; RAHMAN et al., 2021) . Embora alguns biomarcadores salivares indiquem uma melhoria no diagnóstico de CEO com base em ferramentas de biologia genética e molecular, a taxa significativa de mortalidade e morbidade demonstra claramente a necessidade de avanços importantes para métodos de triagem e diagnóstico (ROI; ROI; NEGRUȚIU; RIVIȘ et al., 2020) .

A espectroscopia vibracional de infravermelho (IR) é uma ferramenta versátil de análises de amostras, incluindo biofluidos. A impressão do espectro molecular é gerada pela interação de IR com as moléculas bioquímicas presentes em cada amostra. Esta impressão digital IR representa os movimentos vibracionais pelas ligações químicas na amostra, o que indica conjuntos de dados moleculares quantitativos e qualitativos (LILO; MORAIS; ASHTON; PARDILHO et al., 2020) . Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) é um método analítico usado para melhorar a triagem e o diagnóstico de doenças orais e sistêmicas devido às características atrativas como livre de reagentes, sustentável, custo-benefício, fácil de usar, rápido e não destrutivo (PARASKEVAIDI; MORAIS; RAGLAN; LIMA et al., 2018; SALA; ANDERSON; BRENNAN; BUTLER et al., 2020) . Na saliva, os componentes moleculares mais detectados são lipídios (vibração de alongamento assimétrico de CH₂ das cadeias de acila em 2924 cm⁻¹ e curvatura de CH₂ em ~ 1470 cm⁻¹), proteínas (Amida I em 1635 cm⁻¹ e Amida II em ~ 1550 cm⁻¹), ácidos nucleicos (DNA / RNA em ~ 1225 cm⁻¹ em 1080 cm⁻¹ e 995 cm⁻¹), carboidratos (alongamento simétrico de CO-O-C em ~ 1155 cm⁻¹) e glicogênio (Alongamento C–O em ~ 1030 cm⁻¹) (LILO; MORAIS; ASHTON; PARDILHO et al., 2020). Vários estudos mostraram que o ATR-FTIR é capaz de discriminar vários tipos de câncer em relação a indivíduos controle saudáveis usando sangue e tecidos (SALA; ANDERSON; BRENNAN; BUTLER et al., 2020; RODRIGUES et al., Rodrigues JFS et al 2021) . Também mostramos que o ATR-FTIR é capaz de discriminar câncer de mama usando amostras de saliva (CAIXETA et al., 2020, FERREIRA et al., 2020; RODRIGUES et al. 2020) . Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo testar a hipótese de que modos vibracionais de infravermelho associados a algoritmos de Inteligência Artificial poderiam ser usados para discriminar pacientes com CEO em comparação com pacientes saudáveis utilizando a saliva como fluido diagnóstico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CANCER DE CELULAS ESCAMOSAS

O principal tipo de câncer de boca é o carcinoma epidermóide ou espinocelular, que abrange mais de 90% dos casos de tumores nessa região. Entretanto, os tumores podem ter origem no epitélio, tecido conjuntivo, glândulas, melanócitos ou por metástase de um tumor distante. Os tipos menos comuns de câncer de boca são os carcinomas verrucosos, carcinomas das glândulas salivares e linfomas.

O carcinoma epidermóide (CEC) é uma neoplasia de origem epitelial mais comum na cavidade oral, geralmente afeta principalmente homens com mais de 40 anos de idade. Os locais mais frequentes são a língua e regiões da boca como lábios e mucosa oral. A etiologia é multifatorial sendo o tabaco, álcool e VPH, os fatores de risco mais importantes. A apresentação clínica é variável embora seja precedido por alterações visíveis na mucosa oral, os pacientes normalmente são diagnosticados no estágio geralmente tardio. O diagnóstico precoce é extremamente importante para melhorar a sobrevida, prognóstico e tratamento destes pacientes. O rastreamento do câncer oral é eficaz na redução da mortalidade e morbidade por câncer oral (BOZA Y., 2017)

Epidemiologia

O número de casos novos anuais de câncer da cavidade oral esperados para o Brasil no triênio 2020-2022 é de 11.180 casos em homens e de 4.010 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,69 casos novos a cada 100 mil homens ocupando a sexta posição na prevalência entre outros cânceres. Para as mulheres, corresponde a 3,71 para cada 100 mil mulheres, sendo a décima terceira mais frequente entre todos os cânceres (INCA 2020).

Carcinogênese

No crescimento normal de uma célula, distingue-se a interfase, na qual a célula cresce até atingir um determinado tamanho para se preparar para sua divisão posterior, e na divisão celular, na qual a célula se divide para formar células sólidas.

Este processo recebe o nome de mitose. A divisão celular é mediada por vários pontos de controle que são regulados por proteínas regulatórias (. Morange M.2012)

O desenvolvimento do câncer em humanos é um processo muito complexo que ocorre ao longo de muitas décadas (Hahn WC.2002). A carcinogênese é o mecanismo pelo qual uma malignidade se desenvolve (García-García V.2005). Nos últimos anos, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer têm sido estudados com maior profundidade, como a detecção molecular do marcador antiapoptótico bcl-2, o marcador pró-apoptótico caspase 3 e o marcador de proliferação celular Ki-67 que nós vão informar sobre a situação mais ou menos grave do paciente em relação ao seu processo cancerígeno. Nesse sentido, foi observado que as alterações nessas proteínas somadas aos estados pré-malignos epiteliais criam estados celulares hiperproliferativos que favorecem a aquisição de erros oncogênicos, conferindo capacidade invasiva (Bascones-Martínez A.2013). As células estão sobre constante ameaça de vários fatores citotóxicos e mutagênicos que danificam o DNA (Norbury CJ. 2001), podendo ser endógenos ou exógenos (Jané-Salas E. 2003)

Essa mutagenicidade é adquirida quando os genes e proteínas que detectam e reparam o DNA são inativados, resultando em células mutagênicas e possível supercrescimento da prole mutada, pois a apoptose, processo pelo qual as células danificadas são eliminadas, é inativa. A diferença entre uma célula normal e uma neoplásica é a estimulação mitogênica, ou seja, a proliferação celular normal depende de fatores de crescimento externos circundantes, enquanto as células neoplásicas têm uma dependência reduzida devido às atividades dos oncogenes que geram sua própria estimulação (Hahn WC, 2002; Katayama H, 2003). Numerosas observações indicam que muitas, se não todas, as células tumorais compartilham alterações fisiológicas, chamadas de capacidades adquiridas, suficientes para explicar o comportamento maligno que caracteriza as células cancerosas, uma vez que incluem habilidades como gerar seus próprios sinais mitóticos, evitar apoptose e capacidade de invadir e metastatizar (Hahn WC.2002; Bascones-Martínez A. 2013; Katayama H.2003). A primeira etapa do processo de

carcinogênese consiste em três etapas: iniciação (García-García V. 2005; Morange M.2012; Cairns J. 1975), promoção e progressão. Existem vários genes responsáveis pela homeostase celular, como oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA. Mas no desenvolvimento do câncer, estes mecanismos estão alterados (Hahn WC.2002; García-García V. 2005; Katayama H.2003). Observou-se que alterações na proteína P53, responsável por interromper temporariamente o ciclo celular para reparar danos moleculares e bioquímicos em células danificadas, assim como outras alterações que levam à inativação da maquinaria apoptótica, geralmente levam a uma transformação maligna (Hahn WC.2002; Bascones-Martínez A. 2013; Katayama H.2003).

Outro mecanismo de formação do tumor se deve à ação da proteína telomerase, que ativa uma série de mecanismos pelos quais se consegue a manutenção dos telômeros, necessários para a ocorrência do tumor (Hahn WC.2002, Katayama H. 2003).

Apresentação clínica

Esses tumores se apresentam mais frequentemente com invasão local, destruição de tecido e metástases em linfonodos. Eles raramente têm metástases distantes no momento da apresentação. A cavidade oral inclui os seguintes subsítios: mucosa oral, gengivas superior e inferior, trígono retromolar, assoalho da boca, palato duro e dois terços anteriores da língua. O envolvimento linfático regional na apresentação é evidente em aproximadamente 30% de pacientes, mas o risco varia de acordo cada subsítio. Por exemplo, as primárias da gengiva e palato duro afetam raramente o pescoço, enquanto as metástases cervicais oculta, são comuns em pacientes com câncer anterior da língua.

Sistema de estadiamento TNM

O estadiamento descreve aspectos do câncer, como localização, disseminação , e se está afetando as funções de outros órgãos do corpo. O estágio do tumor ajuda na definição do tipo de tratamento e no prognóstico do paciente.

O sistema de estadiamento TNM, da American Joint Committee on Cancer (AJCC) é determinado antes do início do tratamento e utiliza três critérios:

- T. Indica o tamanho do tumor primário e a disseminação para outras áreas.
- N. Descreve se ocorreu disseminação da doença para os linfonodos.
- M. Indica se existe presença de metástase em outras partes do corpo, como os pulmões.

Números ou letras após o T, N e M fornecem mais detalhes sobre cada um desses fatores. Números mais altos significam que a doença está mais avançada. Depois que as categorias T, N e M são determinadas, essas informações são combinadas em um processo denominado estadiamento geral.

O sistema descrito abaixo é o mais recente sistema da AJCC, vigente desde janeiro de 2018. Ele usa o estadiamento patológico (estadiamento cirúrgico), que é determinado pela análise da amostra removida na cirurgia. Caso a cirurgia não tenha sido realizada, pode ser realizado o estadiamento clínico do tumor baseado nos resultados do exame físico, exame de endoscopia, biópsia e exames de imagem. O estadiamento clínico pode ser usado para planejar o tratamento. Porém, o tumor pode ter se disseminado além das estimativas do estadiamento clínico, e pode não prever o prognóstico do paciente com a precisão de um estadiamento patológico.

Os tumores de orofaringe com DNA do HPV (denominado p16 positivo) tendem a ter um melhor prognóstico do que aqueles sem o HPV (p16 negativo). Como os tumores p16 positivos têm um prognóstico melhor que os p16 negativo são utilizados sistemas de estadiamento separados. Ambos os sistemas são descritos abaixo.

Estágios do câncer de boca e orofaringe e lábio p16 negativo

Estágio 0. Tis, N0, M0.

Estágio I. T1, N0, M0.

Estágio II. T2, N0, M0.

Estágio III. T3, N0, M0; T1, T2, T3, N1, M0.

Estágio IVA. T4a, N0 ou N1, M0; T1, T2, T3 ou T4a, N2, M0.

Estágio IVB. Qualquer T, N3, M0; T4b, qualquer N, M0.

Estágio IVC. Qualquer T, qualquer N, M1.

Observações:

- TX. O tumor principal não pode ser avaliado devido à falta de informação.
- T0. Sem evidência de tumor primário.
- NX. Os linfonodos não puderam ser avaliados devido à falta de informações.

Estágios do câncer de orofaringe p16 positivo

Estágio I. T0, T1 ou T2, N0 ou N1, M0.

Estágio II. T0, T1 ou T2, N2, M0; T3 ou T4, N0 ou N1, M0.

Estágio III. T3 ou T4, N2, M0.

Estágio IV. Qualquer T, qualquer N, M1.

Observações:

- TX. O tumor principal não pode ser avaliado devido à falta de informação.
- T0. Sem evidência de tumor primário.
- NX. Os linfonodos não puderam ser avaliados devido à falta de informações.

Recidiva

A recidiva não é um estágio no sistema TNM. Recidiva da doença significa que o câncer voltou após o tratamento. O câncer de boca e de orofaringe pode recidivar

na boca ou garganta (recidiva local), nos linfonodos próximos (recidiva regional) ou em outra parte do corpo, como os pulmões (recidiva à distância) (American Cancer Society, 2021)

Diagnóstico e avaliação.

Uma avaliação multidisciplinar, história médica completa e exame físico devem ser realizados. O teste de HPV é sugerido mais para câncer orofaríngeo. Estudos de imagem devem ser realizados na região mandibular associados a avaliação dentária global para avaliar se a biópsia é indicada. O tamanho do tumor, extensão e presença ou ausência de linfonodos afetados são críticos para o tratamento. A profundidade da invasão no câncer escamoso inicial, afetando a língua anterior é particularmente difícil de avaliar no pré-operatório. Cânceres na cavidade oral tendem a invadir ossos e tecidos moles no início de sua história natural. Portanto, estudos de imagem pré-operatórios são necessários, além de inspeção e palpação da cavidade. As múltiplas técnicas realizadas para o diagnóstico geralmente ocasionam desconforto, mal-estar além de ser muito invasivas para os pacientes.

Fatores de risco

A etiologia do câncer bucal é multifatorial. O fumo e o álcool são dois dos fatores mais importantes, mesmo usados em conjunto, pois aumentam drasticamente o risco de câncer oral e faríngeo, devido ao seu efeito sinérgico (PELUCCHI C 2007; OSUNA T. 2012). Aumento da idade em pessoas maiores de 40 anos, produtos químicos na dieta, higiene oral inadequada, má alimentação, entre outros (Katayama H 2003).

2.2 GLÂNDULAS SALIVARES E SECREÇÃO SALIVAR

As glândulas parótidas estão localizadas próximas aos primeiros molares superiores, e as glândulas submandibulares e sublinguais na base da língua. Além disso, existem glândulas salivares menores que são encontradas no lábio inferior, língua, palato, bochechas e faringe (Humphrey e Williamson, 2001; De Paula et al.,

2017) . As principais glândulas salivares são responsáveis por cerca de 90% da secreção, quando estimulada, produz uma saliva final aquosa rica em amilase. As glândulas submandibulares são mistas, constituídas de células acinares serosas e mucosas, embora sejam glândulas predominantemente serosas. Elas secretam uma saliva mais viscosa e rica em mucina. As glândulas sublinguais são formadas de células acinares mucosas, produzindo uma secreção viscosa. As glândulas salivares menores são responsáveis por grande parte da secreção total de proteínas salivares. Estas glândulas são mistas com predominância de células acinares mucosas, com exceção das glândulas palatinas, que são exclusivamente mucosas, e as linguais de Von Ebners, que são serosas (NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLÖF, 2005). De acordo com Whelton (2010), as glândulas parótidas contribuem com cerca de 25% do volume total da saliva não estimulada e as submandibulares com 60%. Quando o fluxo salivar é estimulado, a parótida contribui com cerca de 50% da saliva total e as submandibulares com 35%. Tanto na saliva total estimulada como na não-estimulada, as sublinguais e as glândulas salivares menores contribuem com menos de 10%.

A produção da saliva pelas glândulas salivares é iniciada por impulsos nervosos induzidos reflexamente que chegam ao núcleo salivar. O arco reflexo consiste em sinais aferentes de receptores sensoriais presentes na boca e transmitidos pelos nervos trigêmeo, facial e glossofaríngeo, que carregam impulsos nervosos dos mecanorreceptores ativados pela mastigação no ligamento periodontal (reflexo salivar mastigatório) e dos quimiorreceptores ativados pelo paladar nos botões gustativos das papilas linguais (reflexo salivar gustativo), para o núcleo salivar no tronco cerebral. O núcleo salivar leva informação para a parte eferente do arco reflexo, consistindo de feixes nervosos autônomos simpáticos e parassimpáticos, que ativam receptores específicos da membrana celular sobre a unidade final secretora da glândula, que é ricamente innervada, e sobre o tecido glandular ductal. Nos nervos parassimpáticos e simpáticos periféricos pós-ganglionares, os transmissores que ativam a secreção da saliva são, respectivamente, a acetilcolina e a norepinefrina. Entretanto, outras substâncias como trifosfato de adenosina (ATP), óxido nítrico, substância P, polipeptídeo intestinal vasoativo, neuropeptídeo

Y e certos neuropeptídeos transmissores, liberados das terminações dos nervos periféricos, também tem efeitos moduladores na formação da saliva. Em geral, o sistema parassimpático provê o principal controle das glândulas salivares, tendo como resultado uma saliva aquosa com alto fluxo e relativamente baixo conteúdo protéico. Já o estímulo simpático leva a um fluxo mais baixo, saliva mais viscosa devido ao seu maior conteúdo de mucina (NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLÖF, 2005). O arco-reflexo de secreção é também influenciado por um centro mais elevado no cérebro e a saliva pode ser secretada na ausência de estímulo (saliva não estimulada) (PEDERSEN et al., 2002)

A saliva é uma complexa mistura de fluido com contribuição das glândulas salivares maiores e menores, que banha os dentes e a mucosa bucal. É composta principalmente de água (99.5%), de matéria orgânica (0.3%) e inorgânica (0.2%) e também de bactérias residentes na cavidade bucal, células epiteliais descamadas e resíduos transitórios originados da alimentação (EDGAR, 1992; NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLÖF, 2005; SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007; NICOLAU, 2008) As funções da saliva estão relacionadas com sua composição e sua característica fluida. Entre as funções podemos destacar: lubrificação dos tecidos moles da cavidade bucal; pode facilitar a mastigação, deglutição e fonação; manutenção das concentrações supersaturadas de cálcio e fosfato em relação à hidroxiapatita; neutralização de ácidos através de sua capacidade tampão; limpeza e diluição dos alimentos introduzidos na cavidade bucal; ação antibacteriana; formação da película adquirida do esmalte; formação do bolo alimentar; digestão do amido; paladar; excreção; e equilíbrio hídrico (NICOLAU et al., 2003; NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLÖF, 2005; WHELTON, 2010). Em virtude de a saliva ter uma importância na manutenção da saúde bucal, ela é um material de pesquisa amplamente estudado (PEDERSEN, 2002). Padronizar a coleta salivar é importante quando a saliva é usada como fluido de diagnóstico pois a composição salivar varia grandemente inter e intraindivíduos. Metodologias não padronizadas têm parcialmente contribuído para a alta variabilidade nos dados publicados para parâmetros salivares (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007). 2.3 FLUXO, pH E CAPACIDADE TAMPÃO SA)

2.2 FISILOGIA DA SECREÇÃO SALIVAR

A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo (SNA). Sob o estímulo do SNA simpático, a secreção da saliva torna-se mais viscosa e rica em proteínas, porém em menor volume, enquanto que sob estímulo do SNA parassimpático o fluxo salivar é aumentado (Pedersen et al., 2002; Obayashi, 2013)

A estimulação pelo SNA parassimpático, e conseqüentemente liberação de acetilcolina promove, a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos M3 e M1, desencadeando uma cascata de sinalização com liberação intracelular de Ca^{2+} pelos retículos endoplasmáticos das células acinosas. O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular induz a abertura dos canais de Cl^- na membrana apical e conseqüente secreção de Cl^- no lúmen. A secreção de Na^+ e Cl^- promove um gradiente osmótico através dos ácinos, permitindo a passagem de água para o lúmen com o auxílio dos transportadores de água denominados Aquaporina 5. Este gradiente osmótico também permite o fluxo de água pela via paracelular. Desse modo, a saliva primária secretada no lúmen, embora seja isotônica em relação ao plasma é considerada rica em Na^+ , Cl^- e água devido a comparação com a saliva secretada na cavidade oral (estágio 1). Esta saliva primária é modificada durante a sua passagem ao longo do epitélio ductal, onde a maioria do Na^+ e Cl^- é reabsorvido, enquanto que o K^+ e HCO_3^- é secretado sem alterações significativas de fluxo de água (estágio 2). Desse modo, devido o epitélio ductal ser pouco permeável à água em situações fisiológicas, a saliva final é hipotônica em relação ao sangue. A saliva final possui constituintes inorgânicos os quais incluem principalmente Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+ e, em menor quantidade, Ca^{2+} , Mg^{2+} e fosfato (Dodds et al., 2005; Mese e Matsuo, 2007; Catalan et al., 2009; Carpenter, 2013; Sabino-Silva et al., 2013) .

A secreção de saliva sob o estímulo do SNA simpático, ocorre pela interação da noradrenalina e/ou adrenalina via receptores beta-adrenérgicos, o que induz uma reduzida ação dos transportadores aquaporinas 5, dessa forma, menos fluido é secretado. A ativação desses receptores aumenta os níveis intracelulares de

adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPC) que ativam proteínas quinases A (PKA), cujos alvos, embora ainda não estão completamente elucidados, sabe-se que o conteúdo liberado compreende uma ampla variedade de proteínas com funções biológicas importantes para a homeostasia da cavidade oral (Vatta et al., 2002; Melvin et al., 2005; Mese e Matsuo, 2007) .

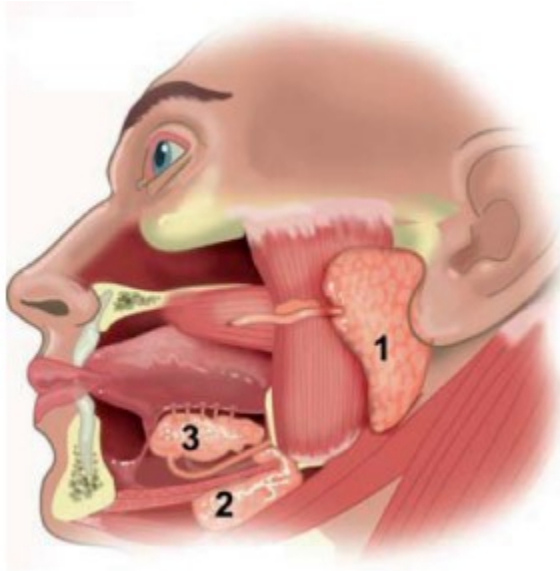


Figura 1. Localização anatômica de as três pares de glândulas salivares maiores : Glândulas parótidas (1)Glândulas submandibulares (2), e glândula sublingual (3).

Adaptação de: De Nieuw Amerongen 2004.

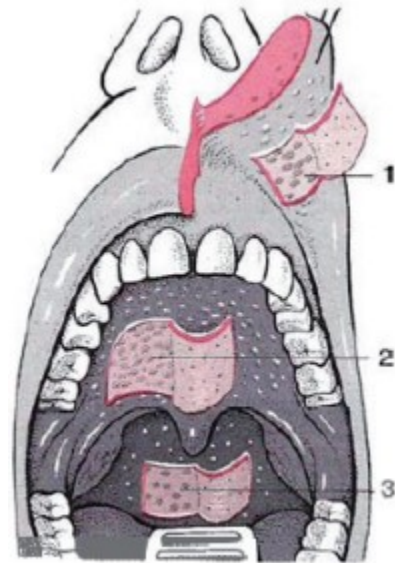


Figura 2. Localização anatômica dos tres pares de glândulas salivares menores: Glândula labial (1), glândula Palatina (2) y glândula faríngea (3) Adaptación de: sepeap.org. Sociedad Espanhola de Pediatría Extrahospitalaria e Atención Primaria. Disponível em: <http://www.sepeap.org/archivos/libros/OTORRINO/7.pdf>.

2.4 SALIVA COMO FLUÍDO DIAGNÓSTICO

A saliva é uma secreção exócrina mucosserosa composta principalmente por água (99%) e uma pequena parte de compostos orgânicos e inorgânicos (1%) (Lima et al., 2010) . Sendo assim, a saliva é constituída por água, enzimas, íons, hormônios, lipídeos e diversas proteínas, como amilase, aldolases, mucinas, imunoglobulinas,

proteínas ricas em prolina, albumina, fibronectina e cromogranina A (Humphrey e Williamson, 2001; De Almeida Pdel et al., 2008; Denny et al., 2008) .

Devido ao recente desenvolvimento tecnológico, a capacidade de utilizar a saliva para monitorar a saúde de um paciente apresenta grande potencial para utilização na saúde pública. Desta forma, nos últimos anos ocorreu um grande aumento de estudos focados na capacidade da saliva para refletir o espectro de estados de saúde e doenças. Já foi descrito que a saliva pode refletir níveis teciduais de substâncias fisiológicas e uma grande variedade de moléculas introduzidas no organismo por dependência terapêutica, estados emocionais, hormonais, imunológicos e influências metabólicas e nutricionais (Bandodkar e Wang, 2014; Saxena et al., 2017) .

Considerando que os componentes da saliva podem indicar alterações sistêmicas, a saliva pode ser um substituto do sangue em testes laboratoriais para diagnóstico de doenças. Além de contribuir na homeostase da cavidade oral, as proteínas salivares também apresentam grande potencial para serem utilizadas como diagnóstico e monitoramento de doenças (Rathnayake et al., 2013) . As proteínas podem mover-se a partir da circulação sanguínea em glândulas salivares através de transporte ativo, difusão passiva ou ultrafiltração. Além disso, outro mecanismo de secreção de proteínas ocorre diretamente pelas glândulas salivares (Melvin et al., 2005) . Independente do mecanismo de secreção, estas proteínas podem potencialmente serem utilizadas no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e monitoramento não-invasivos para diversas patologias (Rathnayake et al., 2013) .

A saliva é um fluido biológico que pode ser coletado de forma fácil, de forma indolor com desconforto reduzido (não-invasiva), de fácil manipulação e armazenamento, menor risco de contaminação quando comparado ao sangue, não necessita de equipamentos e profissionais especializados para a sua coleta, pode ser coletada com mais frequência, além de ser possível realizar a coleta em praticamente todos os tipos de doenças e faixas etárias (Pfaffe et al., 2011) .

A coleta de saliva pode ocorrer de forma não-estimulada com a coleta de forma passiva em algum recipiente adequado. Outra alternativa é a coleta por meio de drenagem da saliva diretamente dos canais de secreção das glândulas salivares. Além disso, a coleta salivar também pode ser realizada pelo método de absorção com o auxílio de materiais absorventes, o mais comum é o algodão, ou polietileno (Navazesh, 1993; Yoshizawa et al., 2013; Chojnowska et al., 2017) .

Atualmente não existe uma modelo ou um critério uniforme estabelecido para a coleta de saliva, desse modo, o processo de investigação e pesquisa fica restrito pois impede a reprodução de resultados. Desta forma, algumas variações de resultados são encontradas devido a influência do método de coleta na quantificação dos componentes presentes na saliva (Yoshizawa et al., 2013; Chojnowska et al., 2017) . Contudo, essa limitação é reduzida em comparação a diversas vantagens do uso da saliva como fluido diagnóstico para diversas patologias. O potencial da saliva para diagnóstico de diversas doenças sistêmicas já foi descrito para câncer de ovário (Lee et al., 2012) , câncer de pulmão (Xiao et al., 2012) , câncer de mama (Zhang et al., 2010, Ferreira et al., 2020) ; refluxo gastroesofágico (Dy et al., 2016) , malária (Buppan et al., 2010) , síndrome de Sjörgenm (Baldini et al., 2011) , diabetes mellitus (Reznick et al., 2006, Caixeta et al., 2020) e entre outras patologias. A partir desses parâmetros, evidencia-se a possibilidade de utilizar componentes s (Reznick et al., 2006; Balaji et al., 2017). O presente estudo apresenta diversas limitações mas dando continuidade nos estudos do câncer oral, esta poderia ser uma ferramenta que auxilie no diagnóstico com uma tecnologia verde livre de rótulos e minimamente invasiva, Entretanto, o desenvolvimento de plataformas diagnósticas utilizando análises espectroscópicas pode ser uma excelente alternativa para o diagnóstico rápido e baixo custo do câncer oral.

2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Define-se como espectroscopia o conjunto de técnicas de análise que utilizam a interação da radiação eletromagnética com a matéria com a finalidade de obter informações físicas e químicas de determinado material ou amostra biológica (Barth, 2007). Quando a luz (ou um fóton) interage com uma molécula, ela pode ser espalhada elasticamente ou inelasticamente. Quando o fóton perde ou ganha uma quantidade de energia relacionada ao espaçamento de energia vibracional na molécula, pode ser detectado por aparelhos espectroscópicos, incluindo a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Assim, a absorção de luz na região infravermelho do espectro eletromagnético proporciona um espectro correspondente aos modos vibracionais específicos que são exclusivos de cada estrutura molecular avaliada (Bunaciu et al., 2017). A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia compatível com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho, sendo por isso utilizada em estudos de modos vibracionais de materiais e amostras biológicas na espectroscopia de absorção no infravermelho, pois cada componente apresenta uma assinatura específica no espectro (Severcan et al., 2010). Atualmente os espectrofotômetros de absorção no infravermelho possuem em sua óptica o interferômetro de Michelson, o que permite uma melhor resolução e qualidade do espectro promovendo incremento da razão sinal/ruído e maior velocidade de varredura e aquisição dos espectros (Al-Saeed e Khalil, 2012). No interferômetro de Michelson, um beamsplitter divide o feixe de radiação infravermelha em dois e direciona parte destes a um espelho fixo e o outro para um espelho móvel. Após a reflexão nos espelhos, ambos os feixes voltam a se combinar e atingem a amostra (Al-Saeed e Khalil, 2009; 2012). A radiação emitida por uma fonte no infravermelho passa por um interferômetro antes de incidir na amostra. A radiação não absorvida pela amostra incide em um detector, e é gerado um interferograma que mostra a intensidade da radiação detectada em função do deslocamento do espelho móvel. O processamento de dados usados no FTIR segue a lei de Bouguer-Beer-Lambert,

ou simplesmente lei de Beer, relacionando a intensidade da banda à sua concentração (Khaustova et al., 2010) .

A configuração do aparelho para aquisição dos espectros FTIR pode ser feita de diferentes maneiras, dentre estas as mais utilizadas são a de transmissão, transflexão e reflexão total atenuada (ATR). As análises espectrais por reflexão geralmente são mais utilizadas em relação as de transmissão, uma vez que os espectros obtidos por transmissão devem ser corrigidos computacionalmente devido a ocorrência de interferências físicas (Chan e Kazarian, 2013; Beasley et al., 2014) . Ao contrário da transmissão e transflexão, medidas no ATR não requerem substratos especiais e nenhuma ou pouca preparação da amostra, necessitando apenas que o material estudado (sólido ou líquido) seja colocado em contato direto com o elemento de reflexão interna, tornando o processo de análise mais rápido e simples, sendo mais indicado para processos de diagnósticos de desordens patológicas (Tatulian, 2003; Dorling e Baker, 2013) . A região do infravermelho médio obtida com a espectroscopia FTIR ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) compreende os modos vibracionais associados a importantes componentes bioquímicos (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos), que podem ser utilizados como marcadores na identificação de alterações metabólicas decorrentes de diversas doenças, incluindo o DM (Scott et al., 2010; Bunaciu et al., 2017) .

A capacidade de diagnosticar de forma rápida, não-invasiva, livre de reagentes, volume muito reduzida de amostra e com alta especificidade alguma doença oferece diversos benefícios no desenvolvimento de estratégias de intervenções terapêuticas que possam minimizar as morbidades e reduzir a mortalidade, além de diminuir os recursos econômicos dos sistemas de saúde (Bunaciu et al., 2017) . Além disso, dentre as técnicas atualmente estudadas como possíveis ferramentas de diagnóstico, as análises de espectrômetria no infravermelho com transformada de Fourier é de especial interesse devido a sua alta sensibilidade na detecção de alterações bioquímicas e moleculares em amostras biológicas (Baker et al., 2014) .

A espectroscopia de infravermelho (IR) está emergindo como uma poderosa técnica quantitativa e qualitativa para caracterização de compostos biológicos podendo ser

utilizada como alternativa para diagnóstico (Bellisola e Sorio, 2012) . Considerando que uma molécula é determinada pela sua estrutura única, cada biomolécula exibirá um espectro ATR-FTIR único, representando o modo vibracional dessa ligação estrutural (Severcan et al., 2010; Ojeda e Dittrich, 2012) . Os modos de vibração IR de amostras biológicas, como saliva, podem ser considerados como impressões bioquímicas que podem se correlacionar com a presença ou ausência de doenças. Além disso, os modos vibracionais IR ainda fornecem a base para a determinação quantitativa de vários analitos que possuem potencial para diagnóstico (Khaustova et al., 2010; Caetano Júnior et al., 2015) .

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do ATR-FTIR associado a algoritmos de inteligência artificial para discriminar carcinoma oral de células escamosas de pacientes controle saudáveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Detectar perfil molecular da saliva por meio de ATR-FTIR em pacientes com câncer oral de células escamosas em pacientes saudáveis.
- ✓ Analisar os dados obtidos das áreas das bandas e modos vibracionais do espectro salivar de pacientes CEO e pacientes saudáveis.
- ✓ Avaliar, discriminar e validar a plataforma espectroscópica de amostras salivares de pacientes saudáveis e com CEO por meio de algoritmos de inteligência artificial.
- ✓ Avaliar o potencial diagnóstico destes possíveis biomarcadores espectrais da saliva.

Salivary molecular spectroscopy coupled to machine learning algorithms: a rapid and non-invasive diagnostic triage tool for oral squamous cell carcinoma

Daniela Sarai Bellorin Nuñez¹, Léia Cardoso-Sousa¹, Douglas Vieira Moura¹, Marco Guevara-Vega¹, Paula Cristina Batista Faria², Luiz Ricardo Goulart^{2,3}, Murillo Guimarães Carneiro⁴, Robinson Sabino-Silva^{1*}

¹ Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanotheranostics, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

² Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California Davis, California, USA.

***Corresponding Author:**

Robinson Sabino-Silva;

Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanotheranostics,

Av. Pará, 1720, Campus Umarama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil;

e-mail: robinsonsabino@gmail.com;

Introduction.

Head and neck cancer is a public health issue worldwide, which represents the 6th most common anatomical region for cancer [1]. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most prevalent oral cancer, reporting around 90% in malignant neoplasms described in the oral cavity. It was also described a higher prevalence in older males associated with alcohol consumption, tobacco use, human papillomaviruses (HPV), poor oral hygiene, and malnutrition. Lip and tongue cancer are the main regions affected in the intra-oral anatomical region. The early diagnosis of OSCC lesions is strongly related to a higher survival rate [2]. In this context, DNA mutation in oral keratinocytes is the main genetic mechanism related to OSCC [3]. Although novel diagnostic tools potentially contribute to the triage of patients, the clinical examination associated with biopsy is the golden standard analysis for OSCC [4-6].

Saliva is a dynamic biological fluid, which contains ~99% water and other critical components that participate in lubrication, antimicrobial activity, digestion, calcium-phosphate homeostasis, and enamel remineralization [7]. Saliva also contains >3,000 proteins, uncountable peptides, >3,000 messenger RNAs, at least 50 micro RNAs, >250 metabolites, and >700 microorganisms species [8, 9]. The specific changes in these salivary components had been used for the non-invasive diagnosis of several systemic diseases [9]. Several specific biomarkers were described in saliva of OSCC patients, which reflects in genomic, transcriptomic, and proteomic analyzes [10, 11]. As expected, several salivary cytokines were also increased in OSCC compared with healthy control subjects [12, 13]. Although some salivary biomarkers indicate an improvement to the OSCC diagnosis based on genetic and molecular biology tools, the significant mortality and morbidity rate clearly demonstrate the need for key advances to a profitable triage and diagnosis methods [10].

Infrared (IR) vibrational spectroscopy is a valuable tool for samples, including biofluids. The molecular spectrochemical fingerprint is generated by the interaction of IR with the biochemical molecules present in each sample. This IR fingerprint represents vibrational movements by the chemical bonds in the sample, which indicates valuable molecular

quantitative and qualitative datasets [14]. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy is an analytical method used to improve the triage and diagnosis of oral and systemic diseases due to attractive characteristics as label-free nature, sustainable, cost-effective, easy to use, rapid, and non-destructive [14, 15]. The main components detected in saliva are lipids (asymmetric stretching vibration of CH₂ of acyl chains at 2924 cm⁻¹ and CH₂ bending at ~1470 cm⁻¹), proteins (Amide I at 1635 cm⁻¹, and Amide II at ~1550 cm⁻¹), nucleic acids (DNA/RNA at ~1225 cm⁻¹, at 1080 cm⁻¹, and 995 cm⁻¹), carbohydrates (CO–O–C symmetric stretching at ~1155 cm⁻¹) and glycogen (C–O stretching at ~1030 cm⁻¹) [13]. Several studies have shown that ATR-FTIR is capable to discriminate several types of cancer using both blood and tissues [15]. We also showed that ATR-FTIR is profitable to detect breast cancer using saliva samples [16].

Here, we tested the hypothesis that unique infrared vibrational modes of salivary could be used for discriminating OSCC patients than controls. In this context, the present study aimed to evaluate the potential of ATR-FTIR associated with artificial intelligence algorithms to discriminate OSCC from matched healthy controls.

Material and methods

Participant Demographics

The Institutional Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia approved the study (IRB Number #249.200.9). All experiments were performed following relevant WHO guidelines and regulations. The differentiation degree was performed following the guidelines. The human case-control study included 39 OSCC patients and 27 age- and gender-matched healthy control subjects with a negative history of other types of cancer or oral diseases. All participants had an oral examination before saliva collection. The stage of oral cancer depends on the size of the primary lesion and the regional or distant spread of the disease. In this study was used the tumor-node-metastasis (TNM) cancer classification was according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) and the International Union for Cancer Control (UICC). This classification evaluates the extent of the primary tumor (T), regional lymph nodes (N), and distant metastases (M) and provides staging based on T, N, and M.

Saliva collection

Saliva samples were obtained from 39 OSCC patients and 27 healthy subjects at the Clinical Hospital at the Federal University of Uberlandia. Saliva was collected for the passive drool method between 9.00 AM to 11.00 AM to reduce the effects of circadian rhythms. After rinsing mouths with water and allowing the manufacturer instructions, saliva samples were collected directly from the mouth of every patient with the specific plastic tube (Salivette®, Sarstedt, Numbrecht, Germany). Saliva samples were immediately stored on ice until handling (approximately 1 hour), at which point the tubes were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C to remove debris. Thus, the samples were stored at -80°C [18].

Chemical profile of unstimulated saliva by ATR-FTIR Spectroscopy

The ATR-FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) assembled to a micro-attenuated total reflectance (ATR) device allowed to record the salivary spectral signature at 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} . The internal-reflection element performed with a diamond disc is used in the ATR system. Saliva is inserted directly onto the diamond disc. The infrared light is reflected at the interface toward the salivary pellicle sample in the diamond disc, resulting in a unique signature profile. All OCSS and control samples (1 μ L) were dried using airflow on ATR-crystal for 2 min before salivary spectra were recorded in triplicate. The air spectrum was considered as a background in all ATR-FTIR sample analyses. Salivary pellicle spectra and background were captured with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans [19].

Spectra data evaluation procedures

The data of spectra were processed using Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). To avoid missteps during the salivary sample spectra analysis, each spectrum was normalized by mean vector and the baseline was corrected before the generation of mean spectra and band areas. The band spot was measured using the frequency corresponding to the center of weight of each band. The band areas were calculated from normalized, and baseline corrected spectra using OPUS software. Sensitivity and specificity values were also calculated based on the external test set as follows: true negative rate is determined as the percentage of control subjects who are correctly identified as being healthy control subjects and the true positive rate is determined as the percentage of subjects who are correctly identified as OSCC patients. The second derivative spectra were acquired with the

Savitzky-Golay algorithm application using a polynomial order 5 and 20 points of the window. The spectral second derivative normalization was performed by mean and the amplitude of the second derivative indicated the intensity of each salivary component.

Discrimination Analysis Method

The photonic spectral data analysis of saliva samples was divided into two stages: pre-processing and classification. The pre-processing stage consisted of aggregation, attribute selection, and data transformation. The arithmetic mean of the three spectral readings of each patient was performed in aggregation. The spectral data were truncated to select only the lipidic region (3050-2800) associated with the biofingerprint region (1800-900 cm^{-1}). Then, several pre-processing parameters were performed previously to apply machine learning algorithms.

The classifications with each pre-processing parameter were tested with machine learning algorithms of feature extraction coupled to discriminant analysis tools as Linear Discriminant Analysis, Logistic Regression, Random Forest, and Support Vector Machine. To analyze the predictive performance of the machine learning algorithms, ten times stratified cross-validation was used. The samples were divided into ten subsets, with each interaction; nine of them were used to train the algorithm and one exclusively to test it so that each subset was part of the test once. In addition, the procedure was repeated three times with changes in the samples configurations in these subsets to achieve a closer estimate of the real performance of the model, thus totaling thirty executions. To measure the results obtained, three performance measures consolidated in the literature were used: sensitivity, specificity, and accuracy. The sensitivity or true positive rate is the proportion of positives (OSCC) that were correctly classified, and the specificity or true negative rate is the proportion of negatives (Controls) that were correctly classified. The accuracy is defined as the total number of samples correctly classified considering true and false negatives

Statistical analysis

The data of the band area were analyzed using Student's t-test was applied to compare groups in data defined as normality by the Shapiro-Wilk test. We also assembled the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and computed the area under the curve (AUC) value,

sensitivity, and specificity by numerical integration of the ROC curve. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to test the normality of the variables. All these analyses were performed using the software GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only values of $p < 0.05$ were considered significant and the results were expressed as mean \pm S.D.

Results

Both groups included male and female subjects. The OCSS (n: 39 patients) and control (n: 27 healthy subjects) participants consisted of 66 patients, each one with a mean age \pm standard deviation (SD) of 62.4 ± 12.9 and 38.9 ± 19.1 years, respectively. Smoking and alcoholism are not similar in OCSS and control patients. History of smoking had a frequency of 90% OCSS and 26% in controls. Family history of any type of cancer was reported only in cancer patients (55%). The clinical, diagnostic, and therapy characteristics of patients with OCSS are summarized in Table 1.

Table 1. Clinical and pathological diagnostic characteristics of OCSS patients.

<u>Patients (n=39)</u>			
Clinical Staging		Pathological Staging	
TNM Staging	Patients	TNM Staging	Patients
TX	2	TX	6
T1	9	T1	26
T2	13	T2	0
T3	9	T3	7
T4	6	T4	0
NX	2	NX	5
N0	25	N0	27
N1	8	N1	0
N2a	3	N2b	5
N3	1	N3	2
M0	39	M0	33
M1	0	M1	6

The infrared spectrum obtained in the saliva of control and OCSS patients are represented in Figure 1.

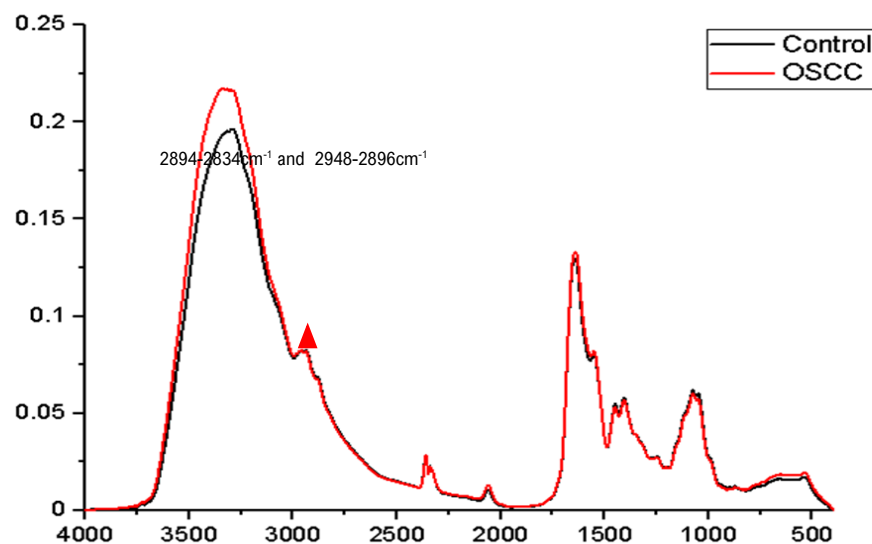


Figure 1. Comparison of the average FTIR spectrum in control subjects and OCSS patients. The second-derivative infrared spectra of the whole saliva of OCSS and control patients were analyzed in detail to identify specific spectral components.

The lipidic band areas of $2894\text{-}2834\text{ cm}^{-1}$ and $2948\text{-}2896\text{ cm}^{-1}$ were higher in saliva of OCSS patients compared with the controls (A and C, Figure 2). The diagnostic performance of these potential markers was further evaluated for the detection of OCSS. The ROC curve was performed to predict a threshold value for both infrared biomarkers. The area under the curve (AUC) of both $2894\text{-}2834\text{ cm}^{-1}$ and $2948\text{-}2896\text{ cm}^{-1}$ regions was significant, indicating these parameters as potential biomarkers to discriminate between OCSS and non-OCSS patients. The selected cut-off with related sensitivity and specificity are shown in Figure 2 (B and D). This analysis showed a sensitivity of 87.18%, specificity of 51.85%, and accuracy of 72.72% between controls and OSCC patients.

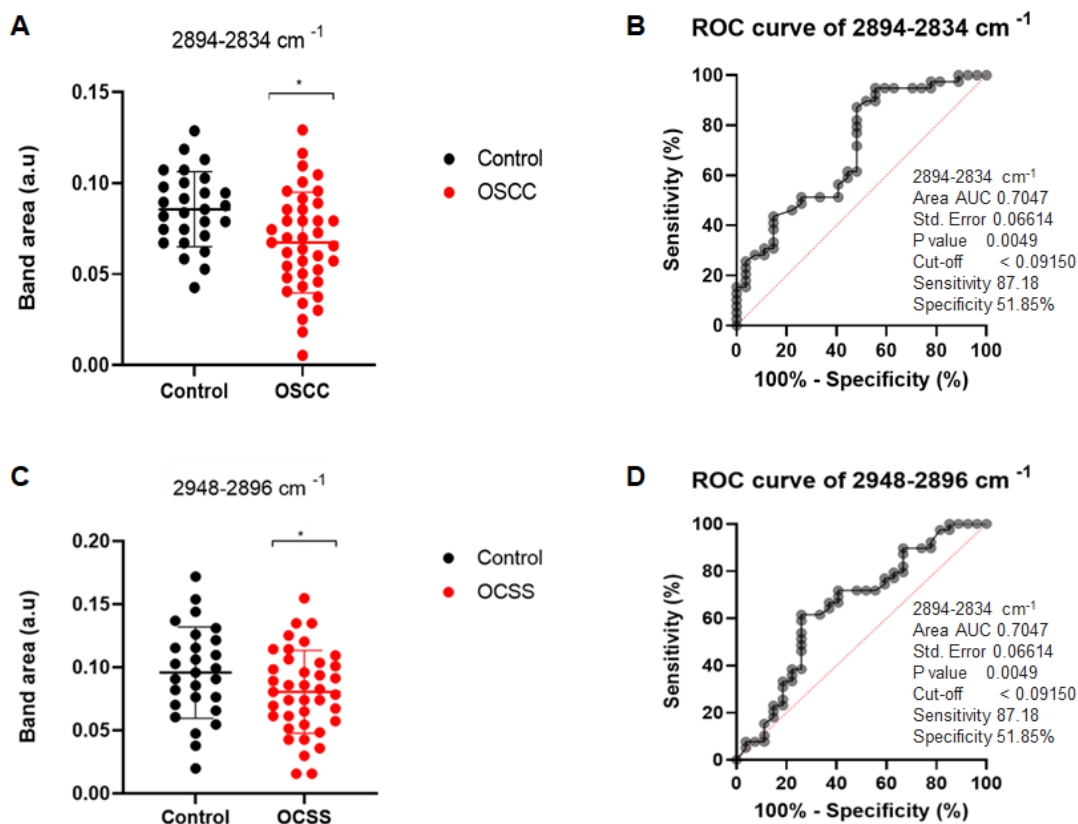


Figure 2. Band area and ROC curve for salivary 2894-2834 cm^{-1} and 2948-2896 cm^{-1} infrared vibrational modes in control and OCSS patients. $p < 0.05$ vs. control. Unpaired t-test.

The better classification of salivary infrared spectra using several parameters described in table 2 occurred by random forest algorithm in the analysis using second derivative Savitzky-Golay. This analysis showed a sensitivity of 80%, specificity of 53%, and accuracy of 69% between controls and OSCC patients.

Table 2. Discrimination of algorithms applied to classify OCSS and controls.

Algorithm	Pre-processing (band)	Sensitivity	Specificity	Accuracy
Linear Discriminant Analysis	Raw data (4000-400 cm^{-1})	0,66	0,46	0,58
	Amida1 (4000-400 cm^{-1})	0,57	0,49	0,54
	Raw data (1800-900 cm^{-1})	0,57	0,54	0,56
	Amida1 (1800-900 cm^{-1})	0,45	0,42	0,44
	1st deriv. Savgolay (1800-900 cm^{-1})	0,56	0,46	0,52
	2nd deriv. Savgolay (1800-	0,62	0,46	0,56

	900cm-1)			
	1st deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,57	0,46	0,53
	2nd deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,62	0,54	0,59
Logistic Regression	Raw data (4000-400cm-1)	0,52	0,67	0,58
	Amida1 (4000-400cm-1)	0,65	0,54	0,61
	Raw data (1800-900cm-1)	0,52	0,60	0,55
	Amida1 (1800-900cm-1)	0,73	0,44	0,61
	1st deriv. Savgolay (1800-900cm-1)	0,68	0,54	0,62
	2nd deriv. Savgolay (1800-900cm-1)	0,70	0,49	0,62
	1st deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,74	0,45	0,62
	2nd deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,65	0,49	0,58
Random Forest	Raw data (4000-400cm-1)	0,65	0,51	0,59
	Amida1 (4000-400cm-1)	0,67	0,44	0,57
	Raw data (1800-900cm-1)	0,69	0,47	0,61
	Amida1 (1800-900cm-1)	0,68	0,47	0,60
	1st deriv. Savgolay (1800-900cm-1)	0,75	0,56	0,68
	2nd deriv. Savgolay (1800-900cm-1)	0,80	0,53	0,69
	1st deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,79	0,44	0,65
	2nd deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,80	0,44	0,66
Support Vector Machine	Raw data (4000-400cm-1)	0,75	0,37	0,60
	Amida1 (4000-400cm-1)	0,55	0,40	0,49
	Raw data (1800-900cm-1)	0,68	0,41	0,57
	Amida1 (1800-900cm-1)	0,66	0,49	0,59
	1st deriv. Savgolay (1800-900cm-1)	0,60	0,71	0,64
	2nd deriv. Savgolay (1800-900cm-1)	0,63	0,63	0,63
	1st deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,54	0,73	0,62
	2nd deriv. Savgolay (3050-2800~1800-900cm-1)	0,64	0,55	0,61

4. Discussion

The salivary OSCC screening may contribute to detecting disease early and improve the treatment in lower-grade cancer. It can be critical to reduce mortality, decrease the time of treated patients to remain in hospital after tumor removal, improve quality of life, to saving health care costs as large investments in chemotherapy or radiotherapy, and reduce indirect costs related to reduced work productivity [20-23]. The improvement of ATR-FTIR platforms coupled to artificial intelligence algorithms to detect systemic diseases using saliva presents a significant potential to be used in an effective program for screening oral cancer.

The histopathological analysis and tissue biopsy are the main techniques used to detect oral cancer. The conventional analysis of oral tissues use toxic reagents and delay the diagnosis due to the time consumption of processing [23, 24]. In this framework, the application of a green technology as ATR-FTIR could be an alternative being fast, simple preparation, high-throughput, and cost-effective in a self-collection sample [19].

The lipidic salivary vibrational modes at $2894\text{-}2834\text{ cm}^{-1}$ and $2948\text{-}2896\text{ cm}^{-1}$ in saliva of OSCC patients compared to healthy subjects were capable to discriminate both samples. In this context, it was shown some downregulated proteins related to lipidic metabolism in OSCC patients, as the fatty acid-binding protein, suggesting a down-regulation in some lipidic components in saliva [27]. Besides, the salivary lipid damage in OSCC patients was linked to oral carcinogenesis [28].

In the context of salivary screening application, the sensitivity of 80% associated with moderate specificity of this photonic platform to OSCC indicates a capable translational potential to the Random Forest algorithm to second derivative Savitzky–Golay ($1800\text{-}900\text{cm}^{-1}$). Another algorithm based on the first derivative Savitzky–Golay ($1800\text{-}900\text{cm}^{-1}$) showed moderated sensitivity with 71% of specificity. Although the present results have some limitations, we believe that this data represents a significant step to performing non-invasive screening tests. It is important to point out that classical invasive unnecessary biopsies from oral samples are associated with harmful consequences as pain, psychological stress, and/or esthetic issues [22]. Based on a sustainable perspective, national or large population screening programs with the classical techniques have a great impact to generate health care waste [28]. The clinical assessment of a sustainable, reagent-free, and low-cost photonic

platform using only 1 uL of self-collected saliva with minimal specimen preparation could be critical to implementing novel public health measures for the population.

5. Conclusion

The present study indicated that lipidic vibrational modes of saliva can be used to discriminate OSCC patients than controls using photonic platforms in both medical and dentistry settings. Besides, two algorithms obtained by Random Forest and SVM analysis were also useful to discriminate OSCC patients than healthy subjects with moderate accuracy. Altogether, the present data highlight the potential of salivary photonic platforms coupled with machine learning algorithms as a fast, non-invasive, sustainable, and reagent-free tool to screening OSCC patients.

6. Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

7. Acknowledgements

This research was supported by a grant from CAPES/CNPq (#458143/2014), FAPEMIG (#APQ-02872-16), Federal University of Uberlandia, and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0). Nuñez, D.S.B. received a fellowship from CNPq, and Sabino-Silva, R received a fellowship from PrInt CAPES/UFU. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

8. References

1. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS and Santos TC (2013) Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci* 21:460-7. doi: 10.1590/1679-775720130317
2. Scully C and Bagan J (2009) Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 15:388-99. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x
3. Scully C, Field JK and Tanzawa H (2000) Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral oncol* 36:311-27. doi: 10.1016/s1368-8375(00)00021-x
4. Shibahara T (2017) [Oral cancer -diagnosis and therapy-]. *Clin calcium* 27:1427-1433. doi: CliCa171014271433
5. British Columbia Oral Cancer Prevention Program, BC Cancer Agency; College of Dental Surgeons of British Columbia. Guideline for the early detection of oral cancer in British Columbia 2008. *J Can Dent Assoc.* 2008; 74 (3): 245-253.
6. Trullenque-Eriksson A, Munoz-Corcuera M, Campo-Trapero J, Cano-Sanchez J and Bascones-Martinez A (2009) Analysis of new diagnostic methods in suspicious lesions of the oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14:E210-6.
7. Sabino-Silva R, Ceroni A, Koganezawa T, Michelini LC, Machado UF and Antunes VR (2012) Baroreceptor-mediated activation of sympathetic nerve activity to salivary glands. *Physiol Behav* 107:390-6. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.09.012
8. Ruhl S (2012) The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. *Expert Rev Proteomics* 9:85-96. doi: 10.1586/epr.11.80
9. Dawes C and Wong DTW (2019) Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res* 98:133-141. doi: 10.1177/0022034518816961
10. Markopoulos AK, Michailidou EZ and Tzimagiorgis G (2010) Salivary markers for oral cancer detection. *Open Dent J* 4:172-8. doi: 10.2174/1874210601004010172
11. Roi A, Roi CI, Negrutiu ML, Rivis M, Sinescu C and Rusu LC (2020) The Challenges of OSCC Diagnosis: Salivary Cytokines as Potential Biomarkers. *J Clin Med* 9. doi: 10.3390/jcm9092866
12. Carvalho M, Cavalieri D, Do Nascimento S, Lourenco TGB, Ramos DVR, Pasqualin DDC, Martins LAL, Rocha FA, Heller D and Marti L (2019) Cytokines Levels and Salivary Microbiome Play A Potential Role in Oral Lichen Planus Diagnosis. *Sci Rep* 9:18137. doi: 10.1038/s41598-019-54615-y
13. Rai AK, Panda M, Das AK, Rahman T, Das R, Das K, Sarma A, Katakai AC and Chattopadhyay I (2021) Dysbiosis of salivary microbiome and cytokines influence oral squamous cell carcinoma through inflammation. *Arch Microbiol* 203:137-152. doi: 10.1007/s00203-020-02011-w
14. Lilo T, Morais CLM, Ashton KM, Pardilho A, Davis C, Dawson TP, Gurusinghe N and Martin FL (2020) Spectrochemical differentiation of meningioma tumours based on attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 412:1077-1086. doi: 10.1007/s00216-019-02332-w
15. Sala A, Anderson DJ, Brennan PM, Butler HJ, Cameron JM, Jenkinson MD, Rinaldi C, Theakstone AG and Baker MJ (2020) Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection. *Cancer lett* 477:122-130. doi: 10.1016/j.canlet.2020.02.020
16. Paraskevaidi M, Morais CLM, Raglan O, Lima KMG, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch PL, Kyrgiou M and Martin FL (2018) Aluminium foil as an alternative substrate for the

- spectroscopic interrogation of endometrial cancer. *J Biophotonics* 11:e201700372. doi: 10.1002/jbio.201700372
17. Sri Santosh T, Parmar R, Anand H, Srikanth K and Saritha M (2020) A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus* 12:e7708. doi: 10.7759/cureus.7708
 18. Mandel AL, Ozdener H and Utermohlen V (2011) Brain-derived neurotrophic factor in human saliva: ELISA optimization and biological correlates. *J Immunoassay Immunochem* 32:18-30. doi: 10.1080/15321819.2011.538625
 19. Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS, Raniero L, Crosara KTB, Baker MJ, Siqueira WL and Sabino-Silva R (2020) Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS one* 15:e0223461. doi: 10.1371/journal.pone.0223461
 20. Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, Palmer DS, Smith BR and Baker MJ (2019) Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nat Commun* 10:4501. doi: 10.1038/s41467-019-12527-5
 21. Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, Ferlay J, Andersson TM, Myklebust TA, Tervonen H, Thursfield V, Ransom D, Shack L, Woods RR, Turner D, Leonfellner S, Ryan S, Saint-Jacques N, De P, McClure C, Ramanakumar AV, Stuart-Panko H, Engholm G, Walsh PM, Jackson C, Vernon S, Morgan E, Gavin A, Morrison DS, Huws DW, Porter G, Butler J, Bryant H, Curren DC, Hiom S, Parkin DM, Sasieni P, Lambert PC, Moller B, Soerjomataram I and Bray F (2019) Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995-2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study. *Lancet Oncol* 20:1493-1505. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30456-5
 22. Gilbert N (2020) The pros and cons of screening. *Nature* 579:S2-S4. doi: 10.1038/d41586-020-00841-8
 23. Brocklehurst PR and Speight PM (2018) Screening for mouth cancer: the pros and cons of a national programme. *British dental journal* 225:815-819. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.918
 24. Carreras-Torras C and Gay-Escoda C (2015) Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 20:e305-15. doi: 10.4317/medoral.20347
 25. Singla K, Sandhu SV, Pal R, Bansal H, Bhullar RK and Kaur P (2017) Comparative evaluation of different histoprocessing methods. *Int J Health Sci* 11:28-34.
 26. Csosz E, Markus B, Darula Z, Medzihradsky KF, Nemes J, Szabo E, Tozser J, Kiss C and Marton I (2018) Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population. *FEBS Open Bio* 8:556-569. doi: 10.1002/2211-5463.12391
 27. Kaur J, Politis C and Jacobs R (2016) Salivary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, malondialdehyde, vitamin C, and vitamin E in oral pre-cancer and cancer: diagnostic value and free radical mechanism of action. *Clin Oral Investig* 20:315-9. doi: 10.1007/s00784-015-1506-4
 28. Minelli C and Baio G (2015) Value of Information: A Tool to Improve Research Prioritization and Reduce Waste. *PLoS Med* 12:e1001882. doi: 10.1371/journal.pmed.1001882

REFERENCIAS

1. BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1767, n. 9, p. 1073-101, Sep 2007. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
PMid:17692815
2. Bascones-Martínez A, Rodríguez-Gutiérrez C, Rodríguez-Gómez E, Gil-Montoya JA, Gómez-Font R, González-Moles MA. Evaluation of P53, Caspase-3, Bcl-2, and Ki-67 markers in oral squamous cell carcinoma and premalignant epithelium in a sample from Álava province (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;18 (6):e846-50.
<https://doi.org/10.4317/medoral.18901>
PMid:23722133
3. British Columbia Oral Cancer Prevention Program, BC Cancer Agency; College of Dental Surgeons of British Columbia. Guideline for the early detection of oral cancer in British Columbia 2008. *J Can Dent Assoc.* 2008; 74 (3): 245-253.
4. BOZA Y., 2017: Carcinoma oral de células escamosas diagnosticado precozmente: Reporte de caso y revisión de literatura.-*ODOVTOS-Int. J. Dental Sc.*, 19-1 (January-April): 43-50.
5. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975; 255:197-200.
<https://doi.org/10.1038/255197a0>
PMid:1143315
6. Carreras-Torras C and Gay-Escoda C (2015) Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 20:e305-15. doi: 10.4317/medoral.20347
<https://doi.org/10.4317/medoral.20347>
PMid:25662554
7. Casino AR, Toledan IP, Jorge JF, Díez JMO, Llobet CC, Prat MA. Brachytherapy in lip cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E223-9.
8. Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS, Raniero L, Crosara KTB, Baker MJ, Siqueira WL, Sabino-Silva R. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One.* 2020 Mar 17;15(3):e0223461. doi: 10.1371/journal.pone.0223461. PMID: 32182246; PMCID: PMC7077825.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>
PMid:32182246

9. Cancer de boca, extrato de pagina da internet, INCA 2021. Link:
<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca>
10. Cohen E et al. DeCIDE: A phase III randomized trial of docetaxel (D), cisplatin (P), 5-fluorouracil (F) (TPF) induction chemotherapy (IC) in patients with N2/N3 locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr 5500).
https://doi.org/10.1200/jco.2012.30.15_suppl.5500
11. Dahlstrom K. R., Little J. A., Zafereo M. E., Lung M., Wei Q. Sturgis E. M. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker/never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck*. 2008; 30: 75-84.
<https://doi.org/10.1002/hed.20664>
PMid:17694557
12. Das B. R., Nagpal J. K. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 2002; 8:258-267.
13. Epstein J. B., Scully C. Assessing the patient at risk for oral squamous cell carcinoma. *Spec Care Dent*, 1997, 17:120-128.
<https://doi.org/10.1111/j.1754-4505.1997.tb00881.x>
PMid:9791290
14. Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG, Santos DW, Goulart LR, Sabino-Silva R, Maia YCP. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *J Oncol*. 2020 Feb 10;2020:4343590. doi: 10.1155/2020/4343590. PMID: 32104176; PMCID: PMC7035572.
<https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
PMid:32104176
15. García-García V, González-Moles MA, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. *Av Odontostomatol* 2005; 21(6):287-95.
<https://doi.org/10.4321/S0213-12852005000600002>
16. Hirata RM, Jaques D. A., Chambers R. G., Tuttle J. R., Mahoney W. D. Carcinoma of the oral cavity. An analysis of 478 cases. *Ann Surg*. 1975; 182:98-103.
<https://doi.org/10.1097/0000658-197508000-00002>
PMid:813586
17. Jané-Salas E, Chimenos-Küstner E, López-López J, Roselló-Llabrés X. Importancia de la dieta en el cáncer oral. *Med Oral* 2003;8:260-8.
18. Loyha K, Vatanasapt P, Promthet S, Parkin DM. Risk factors for oral cancer in Northeast Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:5087-90.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.10.5087>
PMid:23244115

19. Neville B. W., Day T. A. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52 (4): 195-215.
<https://doi.org/10.3322/canjclin.52.4.195>
PMid:12139232
20. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:367-401.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367>
PMid:11264462
21. MARTINEZ, Carolina; HERNANDEZ, Marcela; MARTINEZ, Benjamín y ADORNO, Daniela. Frecuencia de displasia epitelial y carcinoma escamoso en mucosa oral y orofaríngea en Chile, entre los años 1990 y 2009. *Rev. méd. Chile*. 2016; 144(2): 169-174.
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872016000200004>
PMid:27092670
22. Morange M. What history tells us XXVIII. What is really new in the current evolutionary theory of cancer. *J Biosci* 2012;37(4):609-12.
<https://doi.org/10.1007/s12038-012-9235-1>
PMid:22922186
23. Osuna T, Hopkins S. Oral cancer diagnostic Technologies. *CDHA Journal* 2012;24(1):12-8
24. Patel SG, Shah JP. TNM staging of Cancers of Head and Neck: Striving for Uniformity Among Diversity. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 242-58.
<https://doi.org/10.3322/canjclin.55.4.242>
PMid:16020425
25. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Research & Health* 2007; 29(3):193-8.
26. Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CC, Siqueira WL, Maia YCP, Cardoso SV, Sabino-Silva R. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz Dent J*. 2019 Oct 7;30(5):437-445. doi: 10.1590/0103-6440201902228. PMID: 31596327.
<https://doi.org/10.1590/0103-6440201902228>
PMid:31596327

27. Rodrigues JFS, da Silva LCM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Lückemeyer DD, Henrique AS, Pontes JP, da Silva LMG, Macedo JSS, Carvalho Júnior PS, Silva E Silva C, Martins MMRS, Monteiro-Neto V, Grisotto MAG, Fernandes AMR, Ferreira J, Calixto JB, Sabino-Silva R, Fernandes ES. Monitoring of Peripheral Blood Leukocytes and Plasma Samples: A Pilot Study to Examine Treatment Response to Leflunomide in Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Jan 29;14(2):106. doi: 10.3390/ph14020106. PMID: 33573015; PMCID: PMC7910893. <https://doi.org/10.3390/ph14020106>
PMid:33573015

28. Ruhl S (2012) The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. *Expert Rev Proteomics* 9:85-96. doi: 10.1586/epr.11.80
<https://doi.org/10.1586/epr.11.80>
PMid:22292826

29. Sankaranarayanan R., Ramadas K., Thomas G., Muwonge R., Thara S., Mathew B. and others. Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a clusterrandomised controlled trial. *The Lancet* 2005; 365(9475):1927-1933. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66658-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66658-5)

30. Sabino-Silva R, Ceroni A, Koganezawa T, Michelini LC, Machado UF and Antunes VR (2012) Baroreceptor-mediated activation of sympathetic nerve activity to salivary glands. *Physiol Behav* 107:390-6. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.09.012. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.09.012>
PMid:23022472

31. Urist MM, O'Brien CJ, Soong SJ, Visscher DW, Maddox WA. Squamous cell carcinoma of the the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *Am J Surg* 1987; 154: 411-4. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(89\)90014-7](https://doi.org/10.1016/0002-9610(89)90014-7)

32. 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, p. e15573, Dec 31 2010. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015573>
PMid:21217834.