

Genecy Calado de Melo

**Análise Salivar através de Espectroscopia Raman para o Diagnóstico do
Cancro de Boca: Uma Revisão Sistemática**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2018

Genecy Calado de Melo

**Análise Salivar através de Espectroscopia Raman para o Diagnóstico do
Cancro de Boca: Uma Revisão Sistemática**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2018

Genecy Calado de Melo

**Análise Salivar através de Espectroscopia Raman para o Diagnóstico do
Cancro de Boca: Uma Revisão Sistemática**

Assinatura: 

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária.

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2018

Resumo

O cancro de boca, ou carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CCEO) é uma das neoplasias malignas mais comum no mundo todo. O diagnóstico precoce e monitorização desse tipo de lesão maligna são importantes fatores para a prevenção da progressão do cancro de boca. Atualmente, o método diagnóstico do cancro de boca e lesões premalignas padrão-ouro ainda é o exame histopatológico, que muitas vezes é limitado por erros inter e intra observador e erros de coleta/biopsia. Nesse sentido, a espectroscopia Raman é um método que oferece, de maneira sensível e não invasiva, informação sobre o conteúdo biológico da saliva, através de vibrações únicas respectivas ao constituinte molecular. O objetivo principal deste trabalho é realizar uma revisão sistemática sobre a aplicação da espectroscopia Raman na análise da saliva humana para o diagnóstico de CCEO através da análise de ensaios clínico-científicos publicados envolvendo esse tipo de técnica. No processo de seleção dos artigos, apenas 7 estudos foram completamente capazes de se alinharem a temática proposta, incluindo aqueles que não envolviam o diagnóstico do cancro de boca especificamente (n=3) mas utilizavam amostras salivares submetidas a espectroscopia Raman. O tipo de laser mais aplicado na tecnologia Raman foi 785 nm enquanto PCA-LDA pareceu ser o método estatístico mais indicado para análise do espectro salivar grande maioria dos estudos analisados, capaz de obter valores em sensibilidade, especificidade e/ou eficiência classificatória maiores que 90%. A saliva líquida, sem maiores aditivos e com componentes espectrais relativos a proteínas, lípidos e açúcares foram procedimentos e achados comuns na grande maioria dos estudos analisados. Por fim, a espectroscopia Raman possui uma aplicação promissora no processo diagnóstico de cancro oral, mesmo diante de diferenças nos modelos de instrumentação e análise estatística nos artigos.

Palavras-chave: Cancro oral, Lesões potencialmente malignas, espectroscopia Raman, saliva, espectroscopia vibracional.

Abstract

Oral cancer, Oral squamous cell carcinoma (OSCC), is one of the most common malignancies worldwide. The early diagnosis and surveillance of this type of malignant lesion are important factors in preventing progression to oral cancer. Currently, the gold standard for screening and diagnosis of oral cancer and premalignant lesions is histopathological diagnosis, which is limited by errors like inter and intra observer and sampling/biopsing errors, for example. In this sense, Raman spectroscopy is a method that can provide sensitive and non-invasive real time detailed information on the biological content of a sample like saliva, through the unique vibrations of its constituent molecules. The main objective of this study is to systematically review the available scientific articles related to Raman spectroscopy use for diagnosis of OSCC through human saliva samples spectral analysis. As initial results, only 7 articles were completely aligned to the proposed topic, including those that were not entirely correlated to OSCC diagnostics (n=3), however have used saliva samples through Raman spectroscopy. The most suitable laser line applied to Raman spectroscopy was 785 nm, while PCA-LDA seemed to be the most used statistical tool capable of achieving a 90% of sensitivity, specificity and/or accuracy. Thus, according to the studies included, the main salivary components possibly associated with the presence of OSCC were proteins, lipids and sugars. Saliva in liquid physical state and without any enhancer contribution were methods that tend to conserve qualitatively this kind of sample. Even though, Raman spectroscopy and its clinical applicability for OSCC diagnosis have differences related to instrumentation and statistics that were evident. Still, this vibrational technique holds a promising future in dentistry, mainly for early detection of OSCC.

Keywords: Oral cancer, premalignant lesions, saliva, Raman spectroscopy, vibrational spectroscopy.

Dedicatória

*A todos os profissionais de saúde e,
em especial, aos pacientes.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por tantas oportunidades que me são oferecidas tanto de crescimento pessoal quanto crescimento acadêmico.

Agradeço por todo apoio, dedicação e incentivo dos meus queridos pais, Quitéria e Absolon (*in memoriam*). Certamente sem eles eu não estaria onde estou. Muito obrigada pelo alicerce a cada dia e por sempre acreditarem em mim e por não deixarem que eu desista de meus sonhos. Carrego-os no coração onde quer que vá.

Aos meus amados irmãos pelo auxílio, paciência e carinho.

Aos meus amigos, em especial Clara Tirone e Isha Behl, pela amizade e apoio constante.

Aos meus orientadores de pós-graduação, Fiona Lyng e Hugh Byrne, que certamente sem eles nada disso seria possível.

Ao Adam, por me segurar e por estar comigo sempre.

E finalmente, não menos importante, a todos os meus professores da Universidade Tiradentes, principalmente Ricardo Luis Albuquerque, Sandra Barretto e Rosenely Pereira-Filho, que contribuíram de forma imprescindível para minha formação acadêmica e crescimento pessoal.

*“Mais cedo ou mais tarde, os que
vencem são aqueles que acreditam
que conseguem...”*

Richard Bach

Índice Geral

Resumo	v
Abstract	vi
Dedicatória	vvii
Agradecimentos	viii
Índice de Tabelas	xi
Índice de Figuras	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiii
I INTRODUÇÃO	1
II DESENVOLVIMENTO	5
1. Materiais e Métodos	5
2. Resultados	6
3. Discussão.....	12
III CONCLUSÃO	15
IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

Índice de Tabelas

Tabela 1. Características gerais dos estudos incluídos na revisão sistemática.....	7
Tabela 2. Características sobre instrumentação e estatística dos estudos incluídos na revisão sistemática.....	8
Tabela 3. Resultados estatísticos dos modelos matemáticos no processo de classificação de amostra salivares de pacientes com CCEO.....	8
Tabela 4. Posição dos picos (cm^{-1}) associados a composição salivar em pacientes com cancro de acordo com cada estudo	8

Índice de Figuras

Figura 1. Flowchart mostrando os resultados da pesquisa e processo seleção de artigos científicos incluídos na revisão sistemática.....	6
---	---

Lista de Siglas e Abreviaturas

CCEO – Carcinoma de Células Escamosa da Cavidade Oral

LDA – *Linear Discriminat Analysis*

PCA – *Principal Component Analysis*

PLSDA - *Partial Least-squares-discriminant analysis*

SERS – *Surfaced ehanced Raman Spectroscopy*

I INTRODUÇÃO

Com uma incidência de aproximadamente 350 mil novos casos por ano, o cancro de boca é um das neoplasias malignas mais frequentes em todo o mundo (OMS, 2012). Em 2012, o carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CCEO), variante histopatológica presente em mais de 90% dos casos de tumores malignos na região, foi responsável por aproximadamente 150 mil mortes (OMS, 2012). Além disso, um crescimento exponencial no índice de mortalidade correlacionado com essa entidade patológica é previsto para os próximos anos (Warnakulasuriya, 2009).

Juntamente ao cancro de orofarige, o CCEO representa o sexto tipo de cancro mais comum mundialmente. Também, há uma clara prevalência pelo sexo maculino (numa razão de 1,5:1) que pode ser atribuída a uma exposição mais frequente a fatores de risco, como tabaco e álcool (Warnakulasuriya, 2009; OMS, 2012).

A detecção precoce seguida de tratamento adequado pode aumentar as taxas de cura em 80 a 90% dos casos de CCEO e melhorar significativamente a qualidade de vida do paciente, minimizando a necessidade de tratamentos extensos e debilitantes (Mager *et al.* 2005). Além disso, a comunidade médica e científica atual reconhece que sem o desenvolvimento e a implementação de novos procedimentos de rastreio padronizados, a grande maioria dos casos de cancro de boca são encontrados em estágio tardio, apresentando muitas vezes metástases periféricas e infiltração da cadeia linfonodal regional, geralmente localizada no pescoço (Papamarkakisa *et al.*, 2010; Scully, 2011).

Usualmente, o diagnóstico clínico de neoplasias de cabeça e pescoço, incluindo o cancro de boca, é realizado através de biópsias invasivas seguidos por um dispendioso exame histopatológico no tecido excisado, que pode representar não só um trauma psicológico e risco de infecção para os pacientes, como também este tipo de método de diagnóstico está condicionado à uma gradação histológica subjetiva da patologia em questão (De Carvalho *et al.*, 2011). Além disso, a detecção de lesões pré-malignas clinicamente inócuas, ou até mesmo lesões "escondidas" (a exemplo das lesões localizadas na região retromolar), podem facilmente passar despercebidas ao exame clínico de rotina.

As técnicas adjuvantes para a detecção precoce e diagnóstico do câncer oral incluem citologia esfoliativa, coloração com azul de toluidina, quimioluminescência e mapeamento óptico. Embora alguns desses meios auxiliares de diagnóstico mostrem alguma promessa de aplicação no quotidiano clínico, nenhuma demonstrou, ainda, comprovadamente um melhor desempenho que o exame visual convencional. Assim, o método aceite como padrão-ouro para diagnóstico de cancro bucal e lesões potencialmente malignas ainda é resguardado ao exame clínico e exame histopatológico do tecido biopsiado (Ram e Siar, 2005; Fedele, 2009; Schwarz, 2011);

Por outras palavras, dada a dificuldade de detecção precoce do cancro de boca e o aumento da prevalência deste tipo de neoplasia mundialmente, qualquer método que melhore ou contribua para o processo diagnóstico deve também melhorar a capacidade de rastreio numa vasta população. Nisso, técnicas ópticas que são eficientes, precisas, de baixo custo, portáteis e de fácil manuseio parecem contornar grande parte das atuais dificuldades presentes neste processo e se mostram de grande valor nas aplicações clínicas (Ram e Siar, 2005; Ferlay *et al.* 2008).

Associado a esse panorama, grandes esforços tem sido aplicados na tentativa de desenvolver modalidades de diagnóstico menos invasivas e, ao mesmo tempo, eficazes – cada dia mais desejadas para o diagnóstico precoce do cancro de boca (Kah *et al.*, 2007; Olivo, Bhuvaneswari e Keogh, 2011).

Nesse sentido, a saliva humana tem gradualmente ganhado interesse por parte dos pesquisadores e cientistas como um meio de diagnóstico por representar uma fonte complexa e não invasiva de informação biomolecular, segura e de baixo custo que pode ser facilmente obtida a partir da cavidade oral (Fabián *et al.*, 2008). Estudos recentes tem demonstrado que a saliva pode ser empregada como meio diagnóstico não só para doenças da cavidade oral, como também para doenças de fundo sistémico, exibindo versatilidade e mérito no âmbito diagnóstico (Fabián *et al.* 2008, Hu *et al.* 2008; Sahu *et al.*, 2013)

Métodos ópticos, tais como espectroscopia Raman, são quantitativos e qualitativamente mais económicos financeiramente e laboralmente (Singh *et al.*, 2016).

Já conhecida como um meio de estudo de propriedades estruturais moleculares de sólidos, líquidos e gases desde 1928, pelo pesquisador Dr. C. V. Raman, a espectroscopia Raman é uma técnica que consiste basicamente na análise da dispersão da luz (Raman, 1928). O impacto da luz em moléculas, tem como consequência um processo de dispersão da mesma e pode produzir dois tipos de fenômenos dispersivos sobre as amostras analisadas: a dispersão elástica (mesma frequência que a luz incidente) e a dispersão não elástica (frequência diferente da luz incidente). Devido a essa vibração, o fóton disperso pode, então, perder energia (fenômeno conhecido como *Stokes*) ou ganhar energia (este segundo conhecido como *anti-Stokes*). Por fim, o espectro Raman exibe a diferença de energia entre fótons incidentes e fótons dispersos com variação na intensidade da dispersão inelástica (Raman, 1928; Singh *et al.*, 2016).

A assinatura espectroscópica Raman multidimensional é um conjunto de vários espectros característicos que representam as variações espectrais mais importantes e específicas do objeto em estudo. Para a identificação de um objeto desconhecido é necessário procurar a melhor correspondência entre as assinaturas multidimensionais disponíveis e os dados experimentais já publicados. O potencial de aplicação destas assinaturas multidimensionais obtidas é quase ilimitado podendo, também, serem utilizadas para a tipificação espectral de uma amostra heterogênea, como o componente salivar.

Usualmente, um espectrómetro é empregado para a análise da amostra salivar. Simplificadamente, tal equipamento, acoplado a um microscópio de luz, é capaz de induzir a excitação das partículas dos componentes salivares através da incidência de luz (*laser*) em um específico comprimento de onda, ao mesmo tempo em que detecta a energia que é dispersa decorrente da vibração das respectivas moléculas salivares e bloqueia a energia advinda da incidência inicial (Singh *et al.*, 2016). A energia vibracional dispersa pode ser, então, diretamente relacionada com a composição bioquímica da saliva. Como resultado, uma assinatura espectral específica (ou *fingerprint*) é adquirida contendo picos/bandas (representados em cm^{-1} ou nm) que em conjunto, poderiam ser levadas em consideração no desenvolvimento de um algoritmo para classificação, e consequente diagnóstico, de pacientes com CCEO, por exemplo (Singh *et al.*, 2016).

Quanto ao cancro de boca especificamente, alguns estudos recentes têm desenvolvido um método de espectroscopia Raman com especificidade e sensibilidade superior a 95% na determinação dos tecidos normais e componentes neoplásicos de tumores malignos da boca em tecidos orais fixados em formalina ou até mesmo secções epiteliais frescas (Olivo, Bhuvanewari e Keogh, 2011). Esta elevada especificidade baseia-se em atipias celulares presentes num grande número de proteínas plasmáticas e tecidulares indicativas de malignidade, suportando a aplicação da espectroscopia Raman com a finalidade diagnóstica para esse tipo de neoplasia maligna (Malini *et al.*, 2006; Krishna *et al.*, 2013).

Sabendo da importancia e urgencia na implementação de métodos diagnósticos mais precisos e menos onerosos, como a espectroscopia Raman, e da versatilidade clínica da amostra salivar, torna-se importante desenvolver metodologias e conceitos que abranjam a comunhão desse tipo de tecnica e amostra. Contudo, estudos envolvendo análise spectral da saliva humana através da tecnologia Raman para o diagnostico do cancro de boca ainda são pontuais e heterogénios em termos de metodologia e resultados. Por isso, este trabalho tem como objetivo principal realizar uma revisão sistemática sobre a aplicação da espectroscopia Raman na análise da saliva humana para o diagnostico de CCEO através da análise de ensaios clinico-científicos publicados nesta área. Tem também como objetivo descrever aspectos que concernem o processo de instrumentação e preparação da saliva, como também descrever componentes salivares espectrais de real importância para aplicabilidade dessa técnica no diagnóstico do quotidiano clinico em medicina dentária.

II DESENVOLVIMENTO

1. Materiais e Métodos

Os parâmetros adotados no processo de revisão sistemática foram baseados no sistema PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses*) de revisão. Contudo, devido à natureza individual deste trabalho (Tese de conclusão de Mestrado) alguns aspectos mais complexos, como dupla revisão dos estudos rastreados, não foram aplicados na revisão sistemática dos artigos científicos disponíveis.

Uma vasta pesquisa eletrônica foi realizada nos domínios Pubmed, B-On e outros (ex., Google e Google Scholar) usando os seguintes termos: “*Raman Spectroscopy*”, “*Oral Cancer*”, “*Oral dysplasia*” e “*Saliva*”. Além disso os termos Booleanos “*and*” e “*or*” também foram utilizados na pesquisa dos artigos. Apenas artigos científicos em língua inglesa foram levados em consideração para esta revisão bibliográfica. Todos os artigos identificados foram inicialmente avaliados pelo título e seu respectivo resumo disponíveis. Quando incoerentes ou não disponíveis tais elementos anteriormente citados, os artigos foram então avaliados na íntegra. Estudos que apareceram em mais de uma base de dados ou apareceram mais de uma vez na mesma base de dados foram considerados apenas uma única vez. A pesquisa bibliográfica foi realizada entre Março e Junho de 2018.

Para os critérios de exclusão, artigos de revisão, artigos de opinião e artigos que não estavam relacionados ao cancro oral/displasia epitelial oral diagnosticado com espectroscopia raman através de amostras salivares foram inicialmente excluídos da revisão sistemática proposta. Devido a escassez do tema proposto, não foram aplicados quaisquer critérios de restrição temporal da publicação dos artigos escolhidos.

Artigos científicos que envolviam o uso de saliva como amostra biológica no diagnóstico de algum tipo de cancro através do uso da espectroscopia Raman foram incluídos para a análise sistemática do tratamento (metodologia) da amostra (saliva). Contudo, apenas estudos que se dirigiam ao diagnóstico do cancro de boca ou de displasia epitelial oral foram analisados em relação ao componente biológico do perfil

espectral salivar como também para a sensibilidade, especificidade e/ou eficácia classificatória (precisão) dos modelos matemáticos.

2. Resultados

A procura bibliográfica indentificou um total de 827 artigos científicos. Estudos duplicados foram então excluídos (n= 65), resultando num total de 762 artigos. Após uma minuciosa análise do título e/ou resumos, forão excluídos um total de aproximadamente 524 artigos por não estarem alinhados com a proposta da revisão sistemática. Associado a isto, revisões de literatura de qualquer natureza também foram excluídas da análise sistemática final (n=238). Por fim, apenas 7 estudos foram completamente capazes de se alinharem a temática proposta, incluindo aqueles que não envolviam o diagnóstico do cancro de boca especificamente (n=3) mas utilizavam amostras salivares submetidas a espectroscopia Raman (Figura 1).

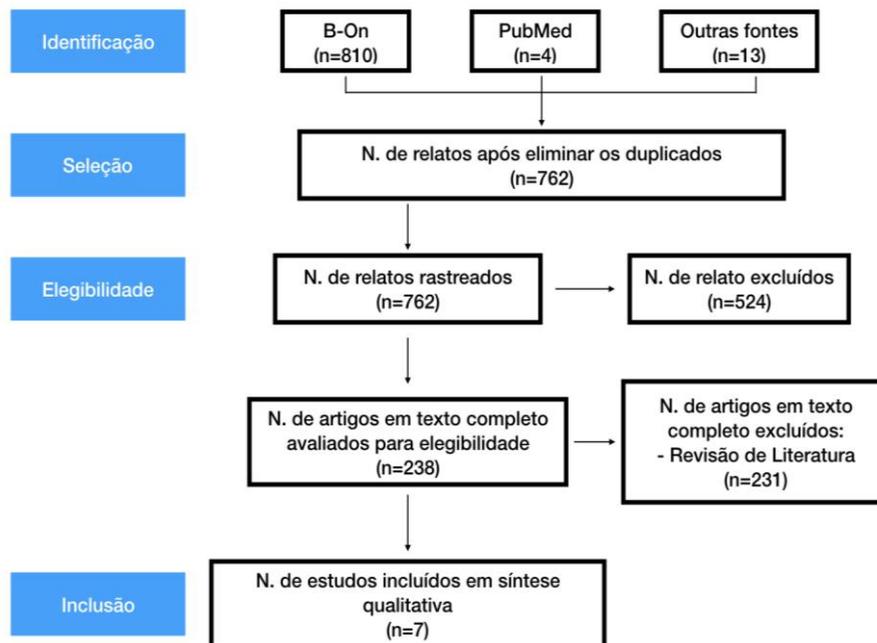


Figura 1. Flowchart mostrando os resultados da pesquisa e processo seleção de artigos científicos incluídos na revisão sistemática.

A tabela 1 apresenta os artigos que formaram essa revisão sistemática, de acordo com o ano de publicação e o número de objetos em cada estudo. Também, foram

coletadas informações em relação a natureza da amostra salivar em questão, se estimulada ou não estimulada, e o estado físico da amostra no momento da análise.

Tabela 1. Características gerais dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Autores	Ano	Numero de amostras	Tipo de Coleta salivar	Estado físico da amostra
Feng <i>et al.</i>	2014	92	Não mencionado	Líquida (membrana)
Feng <i>et al.</i>	2015	97	Não mencionado	Líquida (membrana)
Qiu <i>et al.</i>	2015	62	Não mencionado	Seco
Connolly <i>et al.</i>	2016	36	Não mencionado	Seco
Jaychandran, Meenapriya e Ganesan	2016	158	Não estimulado	Não mencionado
Rekha <i>et al.</i>	2016	83	Não mencionado	Líquida
Calado <i>et al.</i>	2017	40	Estimulada e Não estimulada	Líquida

Outros aspectos importantes de cada estudo no que diz respeito aos procedimentos de instrumentação, como o uso ou não de nano partículas de metal como *enhancers* (SERS) e o tipo análise estatística adotada por cada estudo, também foram dados que se apresentaram em cada estudo analisado e que puderam ser distribuídos em tabela (Tabela 2). Já resultados estatísticos relacionados com a diferenciação matemática entre o grupo de pacientes com CCEO e grupo controle de cada estudo (Tabela 3) foram definidos como sensibilidade e especificidade (estas sempre em conjunto quando apresentadas) e/ou eficiência classificatória (precisão) ou *accuracy* (não necessariamente presente, mas de obrigatoriedade quando a sensibilidade e a especificidade não foram citadas). Além disso, o perfil espectral dos componentes salivares preponderantes para diferenciação matemática dos mesmos grupos (Tabela 4) foram também indicados e, através de uma tentativa baseada no perfil espectral de componentes isolados, foram correlacionados com possíveis associações salivares bioquímicas.

Tabela 2. Características sobre instrumentação e estatística dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Autores	Tipo de espectroscopia Raman	Análise estatística	Região selecionada (fingerprint) do espectro (cm⁻¹)
Feng <i>et al.</i> (2014)	SERS	PCA-LDA	500–1750
Feng <i>et al.</i> (2015)	SERS	PLSDA	500-1800
Qiu <i>et al.</i> (2015)	SERS	PCA-LDA	400-1750
Connolly <i>et al.</i> (2016)	SERS	PCA-LDA	400-1750
Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016)	Convencional	PCA-LDA	600-1000
Rekha <i>et al.</i> (2016)	Convencional	PCA-LDA	800-1800
Calado <i>et al.</i> (2017)	Convencional	PCA-LDA	400-1800

Table 3. Resultados estatísticos dos modelos matemáticos no processo de classificação de amostra salivares de pacientes com CCEO.

Autores	Sensibilidade/Especificidade (%)	Eficiência Classificatória (accuracy)
Connolly <i>et al.</i> (2016)	89 / 57	Não mencionado
Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016)	Não mencionado	91%
Rekha <i>et al.</i> (2016)	Não mencionado	55%
Calado <i>et al.</i> (2017)	96 / 86	87%

Tabela 4. Posição dos picos (cm⁻¹) associados a composição salivar em pacientes com cancro de boca de acordo com cada estudo.

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Associação biológica	Autores
444	Mucina	Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016)
752	Hemocianina	Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016)

870	Amino ácidos	Reka <i>et al.</i> (2016)
885	Dissacarídeo	Connolly <i>et al.</i> (2016)
918	Histidina	Reka <i>et al.</i> (2016)
948	Valina	Reka <i>et al.</i> (2016)
969	Valina	Reka <i>et al.</i> (2016)
986	Amino ácidos	Reka <i>et al.</i> (2016)
1015	Triptofano	Reka <i>et al.</i> (2016)
1126	Proteínas	Connolly <i>et al.</i> (2016)
1158	Carotenóides	Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016)
1204	Fenilalanina (C-H)	Connolly <i>et al.</i> (2016)
1224	Amido III	Connolly <i>et al.</i> (2016)
1275	Amido III	Connolly <i>et al.</i> (2016)
1288	Amido III	Reka <i>et al.</i> (2016)
1409	ν^s COO (IgG)	Connolly <i>et al.</i> (2016)
1417	Ligações C=C (IgG)	Connolly <i>et al.</i> (2016)
1525	Carotenóides	Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016)
1636	Amido I	Reka <i>et al.</i> (2016)

De maneira geral, Calado *et al.* (2017) foi o único grupo a classificar e analisar a saliva de acordo com o método de colecta – estimulada ou não estimulada. A saliva em estado líquido foi usada por quatro grupos (Feng *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2015; Reka *et al.*, 2016; Calado *et al.*, 2017) enquanto a saliva seca (após evaporação da água da amostra) foi utilizada por Qiu *et al.* (2015) e Connolly *et al.* (2016). Um dos grupos não mencionou o estado físico das amostras analisadas (Reka *et al.*, 2016).

O comprimento de onda de 785 nm foi escolhido para a excitação da amostra em quase todos os estudos de amostra salivares. Apenas Calado *et al.* (2017) utilizaram um comprimento de onda de 532nm (verde) dotado, assim, de uma maior frequência de ondas e, consenquente, maior excitação vibracional das moléculas das amostras.

Em relação ao uso de nano partículas de aprimoramento spectral (ou *suface enhanced Raman spectroscopy* – SERS), Feng *et al.* (2014), Feng *et al.*(2015), Qiu *et al.* (2015) e Connolly *et al.* (2016) utilizaram nano partículas de metal para aumentar a recepção do sinal spectral advindo da saliva. Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016), Reka *et al.* (2016) e Calado *et al.* (2017) não fizeram uso de SERS para o aumento do sinal Raman de suas amostras.

O uso do teste Análise dos Componentes Principais ou *Principial componets Analysis* (PCA) associado com Análise discriminante linear ou *Linear Discriminant Analysis* (LDA) foi quase que unanime em todos os estudos envolvendo a análise de saliva para o diagnóstico de cancro através do uso da espectroscopia Raman. Apenas Feng *et al.* (2014) utilizaram PLSDA como o método estatístico de escolha.

A área de análise do espectro obtido foi, contudo, bem diverso em todos os estudos. Calado *et al.* (2017) utilizaram um *fingerprint* mais abrangente (entre 400-1800nm) enquanto Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016) utilizaram o *fingerprint* mais curto de todos os estudos analisados (600-1000nm).

Os estudos que envolveram o uso de amostras de saliva para o diagnóstico do cancro de boca através da espectroscopia Raman ficaram restritos a quatro diferentes pesquisas: Connolly *et al.* (2016), Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016), Rekha *et al.* (2016) e Calado *et al.* (2017).

Connolly *et al.* (2016) foram capazes de obter uma sensibilidade e especificidade de 89 e 57%, respectivamente, quando utilizando Raman para a diferenciação matemática entre amostras de pacientes com cancro de boca e grupo controle (amostras salivares de pessoas saudáveis). Além disso, de acordo com essa análise, alguns componentes salivares foram apontados como responsáveis para a classificação matemática obtida – 870 (dissacarídeos), 1126 (proteínas), 1204 (fenilalanina), 1224, 1275, (amido), 1409 (IgG) e 1417 cm^{-1} (ligações C=C /IgG).

Por outro lado, Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016) referem as seguintes bandas como estabelecendo a diferença entre pacientes com cancro de boca (ou algum tipo de displasia epitelial oral) e grupo controle: 444 (mucina), 752 (hemocianina),

1158 e 1525 cm^{-1} (carotenóides). Ainda assim, uma eficiência classificatória de aproximadamente 91% foi obtida entre os dois grupos.

A menor eficiência classificatória (ou precisão) obtida entre os grupos foi detectada por Rekha *et al.* (20016) de aproximadamente 55%. Mesmo não havendo uma estatisticamente significativa, esse estudo apontou que as bandas espectrais associadas a amino ácidos (870, 986 cm^{-1}), histidina (918 cm^{-1}), valina (948, 969 cm^{-1}), triptofano (1015 cm^{-1}), amido III (1288 cm^{-1}) e amido I (1636 cm^{-1}) pareciam estar associadas a presença de CCEO.

Por fim, Calado *et al.* (2017) não fizeram qualquer referencia a bandas/picos espectrais que estariam associados malignização do epitélio oral encontrados na saliva ou que fizeram parte do processo classificatório das amostras utilizadas. Contudo, uma alta sensibilidade e especificidade de 96 e 86%, respectivamente, foram alcançadas através PCA-LDA através das amostras analisadas pela espectroscopia Raman.

3. Discussão

A saliva tem vindo a ser descrita como um biofluido com capacidade de aplicação diagnóstica, uma vez que representa um meio não invasivo, seguro e económico de complexa informação biomolecular podendo ser facilmente obtido (Zhang, Sun e Wang, 2012).

Além disso, a saliva humana é considerada um “espelho” da saúde corporal e possui um papel importante no processo de reparação e lubrificação de tecidos moles e duros, formação e ingestão do bolo alimentar, digestão, paladar e controle da população microbiana (Miller, 2012).

Um desenvolvimento das ferramentas diagnósticas de análise salivar para monitorizar doenças do complexo oro-maxilo-mandibular foi testemunhado nos últimos anos. Contudo, o principal desafio do diagnóstico clínico a partir da saliva prende-se com a descoberta do variado potencial desse tipo de amostra e a

uniformização/confirmação de técnicas analíticas para o correto uso desse biofluido (Wong, 2006).

Métodos ópticos, tais como a espectroscopia Raman, são quantitativos e menos onerosos em termos de custo laboral. A literatura tem reportado que o uso da espectroscopia Raman para análise de saliva pode ser aplicado para a detecção de narcóticos, em medicina forense e doença periodontal (Gonchukov *et al.*, 2012; Dana *et al.*, 2015; Muro, Fernandes e Lednev, 2016).

Recentes estudos têm desenvolvido métodos de espectroscopia Raman com especificidade e sensibilidade maiores que 95% na classificação de espécimens de cancro oral em tecido fixados em formalina de tecidos normais (Olivo, Bhuvaneshwari e Keogh, 2011).

Foi determinado que o método de colecta salivar parece de alguma maneira ser muito importante para variabilidade e concentração de proteínas e substâncias detectadas em cada tipo de saliva (Schipper *et al.*, 2007). Calado *et al.* (2017) apresentaram uma análise abrangente do tipo de saliva utilizada, sendo considerada por esse estudo a saliva do tipo estimulada como o tipo de amostra de escolha na análise com espectroscopia Raman. Outros estudos não foram concludentes ou utilizaram apenas uma forma de colheita salivar para análise, limitando assim um análise mais detalhada do perfil spectral de cada tipo de amostra.

O estado físico da amostra também seria um elemento muito importante no processo de instrumentação e análise. Feng *et al.* (2014), Qiu *et al.* (2015), Connolly *et al.* (2015), Jaychandran, Meenapriya e Ganesan (2016) utilizaram amostras em estado sólido (seco) ou líquidas com o uso de de SERS. Todos esses estudos que desenvolveram metodologias utilizando partículas de aprimoramento (SERS) ou modificando o estado físico da saliva, acrescentam complexidade na preparação da amostra e/ou comportam indiscutível perda da qualidade salivar quando em outro estado físico que não o de origem (Gonchukov *et al.*, 2012; Bonnier *et al.*, 2014).

Análise dos componentes principais ou *Principal component analysis* (PCA) associado a análise linear discriminante ou *Linear discriminant Analysis* (LDA) foram os métodos de escolha para o processamento estatístico dos espectros obtidos. Em

espectroscopia Raman, PCA é usado para reduzir uma matriz matemática baseada nos dados espectrais de objectos mensurados (neste caso os espectros individualizados), cotendo um grande número de variáveis (comprimento de onda de cada pico/banda), enquanto retém a variabilidade dentro dos dados probabilísticos (Gautam *et al.*, 2015).

O método LDA, quando utilizado em conjunto com PCA, usa os *scores* (disposição das amostras no espaço) do PCA como variáveis latentes para encontrar um hiperplano linear que melhor classifica uma ou duas populações do PCA *scores* (Gautam *et al.*, 2015).

Um outro método de análise, análise discriminante por mínimos quadrados parciais ou *Partial Least-squares-discriminant analysis* (PLSDA), pode também representar um meio de classificação – em “um” ou “zero” – maximizando as variações entre grupos ou amostras (Liu *et al.*, 2016).

Mesmo com o uso generalizado de PCA-LDA na análise de saliva humana dos estudos analisados, outros grupos já demonstraram que PLSDA pode também fornecer uma eficiência classificatória excelente, ou até mesmo superior a PCA-LDA, entre amostras analisadas através de espectroscopia Raman - 90% quando no diagnóstico de cancro ce cólon retal, por exemplo (Bergholt *et al.*, 2015). Porém, tal recurso talvez seja inviabilizado pela natureza altamente heterogénia da amostra salivar, explicando assim a quase unanimidade dos estudos no uso de PCA-LDA.

Os componentes espectrais de saliva são usualmente complexos, e mostram contribuições de múltiplos compostos químicos. As bandas espectrais correlacionadas com a composição salivar de todos os estudos são sugestões baseadas na literatura disponível sobre componentes específicos previamente isolados e analisados.

Nos estudos incluídos na análise, picos relacionados com Amido I e Amido III foram um dos principais componentes associados a diferenciação entre amostras de pacientes com CCEO ou displasia oral e grupo controle por estarem presentes em todos os estudos levantados. Além disso, tais picos podem ser associados com a forte presença de glicoproteínas e proteínas típicas de amostras salivares, como mucina.

Muitas proteínas e glicoproteínas salivares tem sido reportadas como potenciais biomarcadores para o diagnóstico de CCEO. Por exemplo, Wong (2012) relatou um aumento no antígeno CA15-3 e proteínas supressoras de tumor, como c-erbB2, CA-125 e P53, na saliva que poderiam ser considerados potenciais biomarcadores para o CCEO e outros carcinomas. Além disso, outros estudos também detectaram uma superexpressão de zinco- α -2-glicoproteína na saliva de pacientes com cancro através de técnicas biomoleculares (Vidotto *et al.*, 2010).

Os picos indicativos de ligações C=C e vibrações C-H no espectro salivar já foram também previamente reportados no perfil espectral de células epiteliais orais usadas na detecção de cancro de pulmão (Simonova e Karamancheva 2013). Além disso, Feng *et al.* (2015) relataram que picos correlacionados com dissacarídeos se mostraram alterados na composição espectral da saliva de pacientes com cancro de mama quando comparado ao grupo controle (saliva de sujeitos saudáveis) .

É importante ressaltar que, mesmo sendo uma técnica vibracional muito precisa e sensível, as correlações sugeridas através do perfil espectral adquirido pelos estudos analisados não puderam ou podem com exatidão definir cada componente salivar *per si* (ou quimicamente isolado). A técnica Raman, diferentemente de técnicas como a espectroscopia de massa ou outras técnicas de biologia molecular, quando direcionadas para a análise salivar, analisa integralmente o perfil molecular salivar, tendo como resultante um espectro definido da amostra. Esse espectro resultante demonstra, assim, a composição bioquímica espectral complexa e interativa da amostra no momento da análise não podendo ser usada para a indicação de um unico biomarcador salivar especificamente. Contudo, a maior vantagem da espectroscopia Raman, muitas vezes negligenciada/desconhecida por especialistas que atuam na área da microscopia/biologia molecular, está na definição da própria saliva como um todo para a determinação, através de modelos matemáticos, da presença de CCEO em estágio inicial (lesões pre-malignas) sem maiores alterações clínicas e/ou histopatológicas visíveis, abrindo possibilidades para o desenvolvimento de tecnologias derivadas para aplicação *in vivo* não só no o diagnóstico de CCEO como também para direcionamento, no caso de biopsias por exemplo.

III CONCLUSÃO

O atual levantamento sistemático vem a servir como base para uma abordagem diagnóstica de amostras salivares através da espectroscopia Raman de forma mais completa em termos metodológicos para futuras investigações, além de sinalizar sua promissora aplicação no processo diagnóstico de cancro oral, mesmo diante de diferenças nos modelos de instrumentação e análise estatística nos artigos presentes nesta revisão.

Em relação ao processo de colheita das amostras, amostras salivares de carácter estimulada parecem ser uma mais valia em termo de componentes biológicos presentes e de maior aplicabilidade clínica para análise através de espectroscopia Raman de acordo com os resultados obtidos, mesmo sendo tal característica analisada apenas por um único grupo de pesquisadores. Além disso, é previsível que metodologias que usaram aditivos (ex., SERS) ou secaram a amostra antes da análise, consequentemente, abriram precedente a uma perda da qualidade dos componentes salivares e/ou tornaram tal técnica mais onerosa para uma possível aplicação no cotidiano clínico.

O comprimento de onda mais utilizado para aplicação da tecnologia Raman foi 785nm de acordo com a grande maioria dos estudos analisados. Também, ficou ratificado que PCA-LDA pareceu ser o método estatístico mais indicado para análise do espectro salivar, capaz de obter valores em sensibilidade, especificidade e/ou eficiência classificatória maiores que 90% quando no diagnóstico de CCEO em alguns estudos.

Os picos/bandas correlacionados com os componentes salivares como proteínas, sacarídeos e lipídios não foram muitas vezes coincidentes em nos trabalhos selecionados. Contudo, todos esses componentes que pareceram estar alterados foram possivelmente correlacionados com a presença de CCEO.

Por fim, o médico dentista deve estar sempre se atualizando quanto às alternativas de diagnóstico de CCEO. Uma vez que cientificamente estabelecida, uma metodologia baseada na análise salivar através de espectroscopia Raman pode contribuir para implementação dessa técnica no quotidiano da medicina dentária direcionada ao diagnóstico precoce de CCEO.

IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bergholt, M. S. *et al.* (2015). Characterizing variability of in vivo Raman spectroscopic properties of different anatomical sites of normal colorectal tissue towards cancer diagnosis at colonoscopy. *Analytical Chemistry*, 87(2), pp. 960–966.

Bonnier, F. *et al.* (2014) Improved protocols for vibrational spectroscopic analysis of body fluids. *J Biophotonics*, 7(3-4), pp. 167-79.

Calado, G. *et al.* (2017). Development of new methodologies for raman spectral analysis of human saliva for detection of oral cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 124(2), p.138-142.

Connolly, J. M. *et al.* (2016). Non-invasive and label-free detection of oral squamous cell carcinoma using saliva surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(6), pp. 1593-1601.

Dana, K. *et al.* (2015) Rapid Analysis of Cocaine in Saliva by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of analytical & bioanalytical techniques*, 6(6), pp. 1-5.

De Carvalho, L. F. C. S. *et al.* (2011). Diagnosis of inflammatory lesions by high-wavenumber FT-Raman spectroscopy, *Theor Chem Acc*, 130(2011), pp. 1221–1229.

Fabián, T. K., Fejérdy, P. e Csermely, P. (2008). Salivary Genomics, Transcriptomics and Proteomics: The Emerging Concept of the Oral Ecosystem and their Use in the Early Diagnosis of Cancer and other Diseases, *Current Genomics*, 9 (1), pp. 11-21.

Fedele, S. (2009). Diagnostic aids in the screening of oral cancer, *Head Neck Oncol.* 1(1), p. 5.

Feng, S. *et al.* (2014). Saliva analysis combining membrane protein purification with surface-enhanced Raman spectroscopy for nasopharyngeal cancer detection.

Feng, S. *et al.* (2015). Surface-enhanced raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors. *International Journal of Nanomedicine*, 10(1), pp. 537-47.

Ferlay, J. *et al.* (2008). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int J Cancer*. 127, pp. 2893-2917.

Gautam, R. *et al.* (2015) Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy, *EPJ Techniques and Instrumentation*, 2(8), pp.1-38.

Gonchukov, S. *et al* (2012) Raman spectroscopy of saliva as a perspective method for periodontitis diagnostics. *Laser Phys. Lett.*, 9(1), pp. 73-77.

Hu, S. *et al.* (2008). Salivary proteomics for oral cancer biomarker Discovery, *Clin Cancer Res.*, 14(19), pp. 6246–6252

Jaychandran, S., Meenapriya, P. K. e Ganesan S. (2016). Raman Spectroscopic Analysis of Blood, Urine, Saliva and Tissue of Oral Potentially Malignant Disorders and Malignancy-A Diagnostic Study. *Int J Oral Craniofac Sci*, 2(1), pp. 11-14.

Kah, J. C. Y. *et al.* (2007). Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), pp. 785–798.

Krishna, H. *et al.* (2013). in vivo Raman spectroscopy for detection of oral neoplasia: A pilot clinical study, *J Biophotonics*, 7(9), pp. 690-702.

Liu, W. *et al.* (2016). Raman Spectroscopy in Colorectal Cancer Diagnostics: Comparison of PCA-LDA and PLS-DA Models. *Journal of Spectroscopy*, 2016(1), pp. 1-6.

Mager, D. L. *et al.* (2005). The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: A descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects, *Journal of Translational Medicine*, 3(27), pp.1-8.

Malini, R. (2006). Discrimination of Normal, Inflammatory, Premalignant, and Malignant Oral Tissue: A Raman Spectroscopy Study, *Biopolymers*, 81(2006), pp. 179-193.

Miller, N. (2012). *Ten Cate's oral histology*, 8th edition. *BDJ*, 213(4), pp. 194-194.

Muro, C. K., Fernandes, L. S. e Lednev, I. K. (2016) Sex Determination Based on Raman Spectroscopy of Saliva Traces for Forensic Purposes. *Anal. Chem.*, 88(24), pp. 12489–12493.

Olivo, M., Bhuvaneswari, R. e Keogh I. (2011). Advances in Bio-Optical Imaging for the Diagnosis of Early Oral Cancer, *Pharmaceutics*, 3, pp.354-378.

Papamarkakisa, K. *et al.* (2010). Cytopathology by Optical Methods: Spectral Cytopathology of the Oral Mucosa, *Lab Invest*, 90(4), pp. 589–598.

Qiu, S. *et al.* (2015). Non-invasive detection of nasopharyngeal carcinoma using saliva surface-enhanced Raman spectroscopy. *Oncology Letters*, 11(1), pp. 884-90.

Ram, S. e Siar C. H. (2005). Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 34, pp. 521-527.

Raman, C. V. (1928). A change of wave-length in light scattering. *Nature*, 121, p. 619.

Rekha, P. *et al.* (2016). Near-infrared Raman spectroscopic characterization of salivary metabolites in the discrimination of normal from oral premalignant and malignant conditions. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(7), pp. 763-772.

Sahu A. *et al.* (2013). Raman spectroscopy of serum: an exploratory study for detection of oral cancers, *Analyst*, 138(2013), pp. 4161–4174.

Sahu, A. *et al.* (2013) Raman spectroscopy of serum: an exploratory study for detection of oral cancers, *Analyst*, 138, pp. 4161–4174

Schipper, R. *et al.* (2007). SELDI TOF-MS of saliva: Methodology and pre-treatment effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 15(847/1), pp. 45-53.

- Schwarz, R. A. *et al.* (2011). Prospective evaluation of a portable depth-sensitive optical spectroscopy device to identify oral neoplasia, *Biomedical Optics Express*, 2(1), pp. 89-99.
- Scully, C. (2011). Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 1(16/3), pp. 306-311.
- Simonova, D. e Karamancheva, I. (2013). Application of fourier transform infrared spectroscopy for tumor diagnosis. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 27(6), pp. 4200-7.
- Singh, S. P. *et al.* (2016). Recent advances in optical diagnosis of oral cancers: Review and future perspectives. *Head Neck*, 38(Suppl 1), pp. 2403-11.
- Vidotto, A. *et al.* (2010). Salivary and serum proteomics in head and neck carcinomas: before and after surgery and radiotherapy. *Cancer Biomark*, 8(2), pp. 95–107.
- Warnakulasuriya S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.*, 45(4-5), pp. 309-16.
- Wong, D. T. (2006). Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc.*,137(3), pp. 313-21.
- Wong, D. T. (2012). Salivary diagnostics. *Oper Dent*, 37(6), pp. 562–570.
- World Health Organization. (2012) World Health Organization: The GLOBOCAN database, <http://globocan.iarc.fr>.
- Zhang, A., Sun, H. e Wang X. (2012) Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Appl Biochem Biotechnol*, 168(6), pp. 1718-27.