

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA MARA FERREIRA LIMA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES SANGUÍNEAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
SAUDÁVEIS E ONCOLÓGICOS VISANDO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER
UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN**

TESE DE DOUTORADO

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, Abril/2023

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA MARA FERREIRA LIMA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES SANGUÍNEAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
SAUDÁVEIS E ONCOLÓGICOS VISANDO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER
UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN**

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos, 2023

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANA MARA FERREIRA LIMA

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES SANGUÍNEAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS SAUDÁVEIS E ONCOLÓGICOS VISANDO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

Orientador

Doutorado em Ciências (Fisiopatologia Experimental)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

Prof. Dr. Pedro Luiz de Brito (externo)

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profa. Dra. Nayana Pinheiro Machado de F. Coelho (externo)

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti (interno)

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Prof. Dr. Leandro Procópio Alves (interno)

Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO)

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)

Université des Sciences et Techniques du Languedoc, França

Prof. Dr. Egberto Munin (Suplente)

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Alderico Rodrigues de Paula Jr. (Suplente)

Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA)

São José dos Campos, 2023

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

ANA MARA FERREIRA LIMA

Graduada em Fisioterapia pela Universidade Estadual do Piauí (UESPI). Mestre em Bioengenharia na Universidade Brasil (SP), especialista em Fisioterapia Cardiorrespiratória (HCOR-SP), Educação e Promoção da Saúde (UnB) e em Terapia Intensiva (Assobrafir).

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM
Com os dados fornecidos pela autora

L696e	<p>Lima, Ana Mara Ferreira Estudo das alterações sanguíneas em pacientes pediátricos saudáveis e oncológicos visando diagnóstico de câncer utilizando a espectroscopia Raman / Ana Mara Ferreira Lima – 2023. 84f.: 30 cm.</p> <p>Orientador: Landulfo Silveira Jr. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembí Morumbi, São José dos Campos, 2023. Bibliografia: f. 72-81.</p> <p>1. Engenharia Biomédica. 2. Espectroscopia Raman. 3. Câncer. 4. Soro Sanguíneo. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 610.28</p>
-------	--

Bibliotecária Iara Neves CRB 8/8799

CDD:

AGRADECIMENTOS

Considerando que a fase de coleta de dados desta Tese aconteceu em meio a pandemia do COVID-19, bem como a recente perda da minha mãe, esta seção de agradecimentos se torna mais especial.

Primeiramente agradeço a Deus, por me conduzir e me permitir concluir este trabalho, me enviando forças que eu nem sabia que poderia ter, em momentos de muita dor, devido à ausência da minha mãe nesta dimensão, e aos problemas e desafios advindos em decorrência da pandemia.

Aos meus pais, Raimundo Lima e Lilian Lima (*in memorian*), por sempre acreditarem em mim, muito mais que eu mesma, e por fazerem dos meus sonhos os seus sonhos, por serem meu incentivo constante e por nunca me permitirem desistir. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos (Marcus e Rubens) e minhas cunhadas (Débora e Wellen) por sempre estarem comigo e me estenderem a mão, e por serem meu acaento e meu apoio de todos os dias.

Aos meus sobrinhos (Miguel, Ana Lis, Ana Clara e Melissa), que são como meus filhos, pelos quais sigo firme na minha rotina diária, em busca de melhores oportunidades. Espero que um dia eles sintam orgulho da titia, que estudem muito e trilhem seus caminhos rumo à integridade e ao sucesso.

À amiga Camila Ribeiro Daniel, agradeço de forma especial. Sou grata pelo incentivo, pelo compartilhamento de saber, pela mão sempre estendida, pela escuta amiga, pelo colo e pela cumplicidade. Por me fazer mais otimista e feliz quando eu nem lembrava essas opções. Sem você essa jornada é impensável e sem você eu não conseguiria!

À amiga Silvia Mobillie Awoyama, que dividiu a caminhada do doutorado comigo, gratidão! Seu companheirismo, carinho, colo de mãe e acolhimento familiar a fazem uma extensão da minha família. Obrigada por tanto amor!

Ao meu orientador, professor Dr. Landulfo Silveira Jr., sou muito grata pela paciência, confiança, dedicação (muita dedicação!) e ensinamentos, você é um grande professor-pesquisador e inspiração para os que convivem com o senhor.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação de Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi, agradeço a dedicação ao longo do curso.

E agradeço a todos, que de forma, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar à conclusão deste doutorado.

Financiadores:

Landulfo Silveira Jr. agradece à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo N° 2009/01788-5) pela aquisição do espectrômetro Raman e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Processo N° 306344/2017-3) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa. Ana Mara Ferreira Lima agradece à CAPES-PROSUP (Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares) pela Bolsa de Doutorado.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

Introdução: O câncer surge de uma multiplicação desordenada de células alteradas que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância. Nas crianças e adolescentes, o câncer costuma dar sinais e sintomas que são facilmente confundidos com doenças típicas da infância, sendo o diagnóstico precoce um desafio. A análise da morfologia citológica via aspirado medular e a identificação de alterações em proteínas específicas e alterações cromossômicas e genéticas são exames que podem ser utilizados para identificar os cânceres; no entanto, a liberação do laudo demora alguns dias, o que compromete o início do tratamento. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo identificar as diferenças apresentadas no espectro Raman do soro sanguíneo de grupos de sujeitos normais comparados a grupos de pacientes leucêmico e com outros tipos de câncer e as diferenças entre os grupos leucêmico e outros tipos de câncer, correlacionando as diferenças espectrais com as biomoléculas. **Materiais e métodos:** As amostras de soro sanguíneo de crianças e adolescentes (21 normais, 90 leucêmicos e 75 outros tipos de câncer) foram submetidas à espectroscopia Raman (830 nm, potência do laser 450 mW) e destas amostras foram obtidos 566 espectros, sendo 72 normais, 269 leucêmicos, 225 outros tipos de câncer. A análise exploratória dos espectros da amostra de soro foi realizada por meio da análise de componente principal (PCA) a fim de identificar as diferenças espectrais entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer e associar essas diferenças aos constituintes bioquímicos e suas intensidades entre os grupos. Em seguida foram desenvolvidos modelos de classificação baseados na análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para classificar os espectros em grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer; grupos leucêmico e outros tipos de câncer; grupos leucêmico entre si (LLA e LMA); grupos leucêmico e sarcoma, e grupos leucêmico e linfoma. **Resultados e discussão:** A análise exploratória mostrou componente principal com picos relacionados a albumina, aminoácidos, proteínas, lipídios e carotenoides, sendo as diferenças espectrais entre normal, leucêmico e outros tipos de câncer relacionadas principalmente a carotenoides, aminoácidos e proteínas, com picos mais intensos no grupo normal. O modelo PLS-DA classificou os espectros do grupo normal *versus* grupos leucêmico e outros tipos de câncer com sensibilidade de 98,5%, especificidade de 56,9% e acurácia de 66,4%. O PLS-DA discriminou os espectros dos grupos leucêmico e outros tipos de câncer com sensibilidade de 72,5%, especificidade de 60,0% e acurácia de 66,8%. Modelos comparando os espectros de LLA e LMA foram construídos e na classificação todas as amostras de LMA foram classificadas como LLA. Resultado similar foi obtido quando se comparou o grupo leucêmico (LLA e LMA) com os pacientes com linfoma, no qual todos os espectros de soro de pacientes com linfoma foram classificados como do grupo leucêmico. **Conclusão:** O estudo mostrou que a espectroscopia Raman é uma técnica que pode ser utilizada na discriminação dos grupos com leucemia e outros tipos de câncer comparados com o grupo normal utilizando soro. No entanto, ainda é necessário construir uma grande biblioteca de espectros Raman a partir de amostras de soro de normal, leucêmico e outros tipos de câncer para melhor compreender os achados.

Palavras-chave: espectroscopia Raman; câncer; soro sanguíneo; análise de componente principal (PCA); mínimos quadrados parciais (PLS); análise discriminante.

STUDY OF BLOOD CHANGES IN HEALTHY PEDIATRIC PATIENTS AND ONCOLOGICAL PATIENTS AIMING FOR CANCER DIAGNOSIS USING RAMAN SPECTROSCOPY

ABSTRACT

Introduction: Cancer arises from a disorderly multiplication of altered cells that can invade adjacent tissues or organs from a distance. In children and adolescents, cancer usually gives signs and symptoms that are easily confused with typical childhood diseases, making early diagnosis a challenge. The analysis of cytological morphology via medullary aspirate, identification of alterations in specific proteins and chromosomal and genetic alterations are tests that can be used to identify cancers; however, the release of the report takes a few days, which compromises the start of treatment or as quickly and early as possible. **Objective:** This study aimed to identify the differences presented in the Raman spectra of the blood serum of normal groups compared to leukemic groups and other types of cancers and the differences between the leukemic groups and other types of cancers, correlating the spectral differences with the biomolecules. **Materials and methods:** Blood serum samples from children and adolescents (21 normal, 90 leukemic and 75 other types of cancer) were submitted to Raman spectroscopy (830 nm, laser power 450 mW) and from these samples 566 spectra were obtained, 72 normal, 269 leukemic, 225 other types of cancers. The exploratory analysis of the serum sample spectra was performed using principal component analysis (PCA) in order to identify spectral differences between the normal, leukemic and other types of cancer groups and to associate these differences with biochemical constituents and their intensities between the groups. Classification models based on partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were developed to classify the spectra into normal, leukemic and other types of cancers; leukemic groups and other types of cancers; leukemic groups among themselves (ALL and AML); leukemic and sarcoma groups, and leukemic and lymphoma groups. **Results and discussion:** The exploratory analysis showed a principal component with peaks related to albumin, amino acids, proteins, lipids and carotenoids, with spectral differences between normal, leukemic and other types of cancer mainly related to carotenoids, amino acids and proteins, with more intense peaks in the normal group. The PLS-DA model classified the spectra of the normal group versus the leukemic and other types of cancer groups with a sensitivity of 98,5%, specificity of 56,9% and accuracy of 66,4%. The PLS-DA discriminated the spectra of the leukemic groups and other types of cancers with a sensitivity of 72,5%, specificity of 60,0% and accuracy of 66,8%. Models comparing ALL and AML spectra were built and in the classification all AML samples were classified as ALL. A similar result was obtained when comparing the leukemic group (ALL and AML) with patients with lymphoma, in which all serum spectra of patients with lymphoma were classified as from the leukemic group. **Conclusion:** The study showed that Raman spectroscopy is a technique that can be used to discriminate groups with leukemia and other types of cancer compared to the normal group. However, it is necessary to build a large library of Raman spectra from serum samples from normal, leukemic and other types of cancers to better understand the findings.

Keywords: Raman spectroscopy; cancer; blood serum; principal component analysis (PCA); partial least squares (PLS); discriminant analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O surgimento do câncer.....	21
Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma.....	22
Figura 3: Imagem de uma ressonância magnética sagital T1W mostrando a presença de um manto de neuroblastoma no paciente.....	29
Figura 4: Exame de imagem feita pelo equipamento F-FDG PET mostrando diversos pontos focais de linfomas no paciente.....	31
Figura 5: Espectrômetro Raman com “Raman probe” (modelo Dimension P1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA).....	44
Figura 6: Espectros Raman médio do soro dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer e espectros da diferença, normal – leucêmico e normal – outros tipos de câncer. Os espectros foram deslocados para melhor visualização.....	48
Figura 7: Gráficos das variáveis componentes principais PCs e Escores do conjunto de dados do soro Raman para análise exploratória. As letras sobrescritas a, b e c nos PCs indicam significância estatística [teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico) para PC1, PC2, PC3, PC5, PC7 e PC8 e teste ANOVA (teste paramétrico) para PC4 e PC6, ($p < 0,05$)] entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer, respectivamente. <i>NS</i> : estatisticamente não significativo ($p > 0,05$).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de contingência para validação de teste diagnóstico com duas variáveis.....	40
Tabela 2: Número de amostras e número de espectros Raman em cada grupo histopatológico e o tipo de câncer diagnosticado.....	42
Tabela 3: Posição dos picos das principais bandas Raman do soro sanguíneo, atribuição de acordo com a literatura publicada e significância estatística (p -valor) das intensidades dos picos entre os grupos normais, leucêmico e outros tipos de câncer.....	50
Tabela 4: Tabela de contingência com os resultados da discriminação baseada em PLS (PLS-DA) aplicada aos espectros Raman de grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer usando duas classes (normal e leucêmico + outros tipos de câncer), com cinco VLs e sem processamento, usando três classes (normal, leucêmico e outros tipos de câncer) com seis VLs e usando SNV e com sete classes (normal, LLA, LMA, sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma) com oito VLs e sem processamento.....	59
Tabela 5: Tabela de contingência com os resultados da discriminação baseada em PLS (PLS-DA) aplicada aos espectros Raman dos grupos leucêmico e outros tipos de câncer (2 classes, 5 VLs e sem processamento), discriminação entre o grupo leucêmico, LLA e LMA (2 classes, 1 VL e sem processamento), entre o grupo leucêmico e sujeitos com linfoma (2 classes, com 3 VLs e sem processamento) e entre o grupo leucêmico e sujeitos com sarcoma (2 classes, com 4 VLs e sem processamento).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CITÉ	Centro de Inovação, Tecnologia e Educação
CAAE	Certificado de Avaliação e Apreciação Ética
CTFM	Centro de Tratamento Infantojuvenil Fabiana Macedo de Moraes
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDA	Análise discriminante linear
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLA-B	Leucemia linfóide aguda – doença precursora de células B
LLA-T	Leucemia linfóide aguda – doença precursora de células T
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
MO	Medula óssea
NS	Estatisticamente não significativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais
PCA	Análise de componente principal
PC	Componente principal
PCs	Componentes principais
PLS	Mínimos quadrados parciais
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PRRX1	Homeobox relacionado ao emparelhado 1
RPM	Rotação por minuto
SNC	Sistema nervoso central
UAM	Universidade Anhembi Morumbi

VL

Variável latente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Objetivo geral.....	19
1.2 Objetivos específicos.....	19
1.3 Hipótese.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Câncer: aspectos gerais.....	21
2.2 Etiologia do câncer infantojuvenil.....	23
2.3 Caracterização dos principais tipos de câncer infantil.....	24
2.3.1 Leucemias.....	24
2.3.2 Tumores cerebrais do sistema nervoso central.....	27
2.3.3 Linfoma.....	30
2.3.4 Rbdomiossarcoma e tumores ósseos.....	32
2.4 Espectroscopia Raman.....	32
2.5 Diagnóstico de leucemias e cânceres infantojuvenis por meio de espectroscopia Raman.....	34
2.6 Análise estatística dos dados.....	36
2.6.1 Análise de componente principal (PCA).....	36
2.6.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	37
2.6.3 Análise de variância (ANOVA).....	38
2.6.4 Tabela de contingência.....	39
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	42
3.1 Comitê de ética.....	42
3.2 Seleção dos pacientes.....	42
3.3 Espectrômetro Raman.....	44
3.4 Coleta dos espectros.....	45
3.5 Análise estatística e análise exploratória por PCA.....	46
3.6 Análise discriminante por PLS.....	46
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Espectros Raman.....	48
4.2 Análise exploratória dos espectros do soro sanguíneo por PCA.....	54
4.3 Análise discriminante dos espectros do soro sanguíneo por PLS.....	58
5. DISCUSSÃO.....	64

5.1 Comparação dos dados dos espectros Raman do soro sanguíneo com outros trabalhos.....	64
5.2 Análise exploratória por PCA comparada a outros trabalhos.....	65
5.3 Análise discriminante por PLS-DA comparada a outros trabalhos.....	67
5.4 Estudos futuros e perspectivas da técnica Raman.....	71
CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	82
ANEXO A: Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP.....	82
APÊNDICES.....	83
APÊNDICE A: Figura com marcações coloridas para melhor visualização, com as posições dos picos das principais bandas Raman do soro sanguíneo, atribuição de acordo com a literatura publicada e significância estatística (valor de p) das intensidades dos picos entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer.....	83

1. INTRODUÇÃO

O câncer surge de uma multiplicação desordenada de células alteradas que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância. Comumente é constituído de uma massa de limites imprecisos e de bordas irregulares, chamada de tumor; a leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos, geralmente de origem desconhecida, e não apresenta formação tumoral. As neoplasias podem ser desencadeadas por fatores externos que estão relacionados com as alterações ambientais e os hábitos de vida, e os fatores internos que são representados por um conjunto de instabilidades genéticas heterogêneas unidas por alterações em múltiplas vias de sinalização celular e por condições imunológicas (ALLAVERDIYEV *et al.*, 2018; INCA, 2022).

O câncer é um importante problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos) na maioria dos países (BRASIL, 2017; SUNG *et al.* 2021). Ao contrário do câncer adulto, o câncer infantil geralmente afeta as células do sistema sanguíneo e os tecidos de suporte. Por serem predominantemente de natureza embrionária, os tumores em crianças e adolescentes são constituídos por células indiferenciadas, o que geralmente proporciona uma melhor resposta aos tratamentos propostos. No entanto, o câncer em crianças é difícil de detectar e apresenta uma variedade de sinais e sintomas, muitos dos quais são confundidos com doenças comuns da infância (INCA, 2022; OLIVEIRA, 2021; WHO, 2003).

O câncer é considerado um problema crônico de saúde pela Organização Mundial da Saúde (OMS), assim como a hipertensão e o diabetes, e por isso seu tratamento busca a cura, a melhoria da qualidade de vida, o prolongamento da sobrevida e a atenuação dos efeitos colaterais do tratamento e da instalação da doença (BRASIL, 2013; WHO, 2003). Em 2020 o câncer é a segunda causa mais comum de morte entre crianças de 1 a 14 anos nos Estados Unidos. Em 2021, a *American Cancer Society* estimou que 10.500 crianças (do nascimento aos 14 anos), e 5.090 adolescentes (15-19 anos) serão diagnosticados com câncer, e 1.190 e 590, respectivamente, morrerão da doença (SUNG *et al.*, 2021). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a previsão de incidência de câncer no Brasil para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2022).

O câncer representa uma importante barreira para o aumento da expectativa de vida no mundo (SUNG *et al.*, 2021). O impacto da pandemia da doença do coronavírus (COVID-19) em 2019, bem como a sua extensão em diferentes partes do mundo, ainda é desconhecido, mas supõe-se que atrasos no diagnóstico e no tratamento, associados às preocupações dos indivíduos e ao fechamento dos sistemas de saúde, com cuidados reduzidos, provocou um declínio de curto prazo na incidência de câncer, seguido por aumentos nos diagnósticos em estágio avançado e mortalidade por câncer em alguns cenários (SUNG *et al.*, 2021).

Os principais tipos de câncer que ocorrem em crianças são leucemias, tumores do SNC e linfomas. A leucemia é o câncer infantil mais comum, sendo a primeira maior causa de doenças malignas na infância, representando 28% dos casos, seguido por tumores cerebrais e outros tumores do sistema nervoso (27%). Os tipos de câncer e sua distribuição em adolescentes diferem daqueles em crianças; por exemplo, tumores cerebrais e outros tumores do sistema nervoso são os mais comuns, correspondendo a 21%, e destes, mais da metade são benignos/malignos limítrofes, seguidos pelo linfoma (19%). Além disso, há quase duas vezes mais casos de linfoma Hodgkin do que não Hodgkin entre adolescentes, enquanto entre crianças é o inverso (SUNG *et al.* 2021).

Os cânceres infantis são raros e não há testes de rastreamento amplamente recomendados para diagnosticar o câncer em crianças. O diagnóstico precoce geralmente é baseado em sintomas, história clínica, exames laboratoriais e de imagem (radiografias, tomografias e ressonância magnética). A confirmação é feita por biópsia incisional para seguimento anatomopatológico (GARCIA-MANERO, CHEIN, MONTALBAN-BRAVO, 2020; INCA, 2022; SUNG *et al.*, 2021). No caso de leucemias e linfomas, além da análise histopatológica do tecido (biópsia), é coletado um aspirado de medula óssea, o que permite uma avaliação detalhada da morfologia celular e da porcentagem de blastos. A biópsia da medula óssea também permite a determinação da celularidade e arquitetura da medula óssea (BERTINETTO; ENGEL; JANSEN, 2020; BRASIL, 2017; GARCIA-MANERO, CHEIN, MONTALBAN-BRAVO, 2020; INCA, 2022; SUNG *et al.*, 2021).

Estudos têm sido feitos a fim de demonstrar técnicas ópticas como ferramenta que possibilite diagnóstico rápido e preciso do câncer, destacando-se a espectroscopia Raman (EBERHARDT *et al.*, 2020). A espectroscopia Raman é capaz de determinar a composição bioquímica do tecido biológico e fluidos corporais com

análises qualitativa (diferenciação na composição bioquímica) e quantitativa (diferenças na concentração de marcadores bioquímicos teciduais selecionados) (GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; HANLON *et al.*, 2000; KONG *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019), podendo ser usado para diagnóstico de câncer (BAHREINI *et al.*, 2019; IKEDA *et al.*, 2018; KAST *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2019; PACHECO *et al.*, 2021; PLANTE *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2015), sendo considerado promissor por mostrar as diferenças e usá-las para discriminação tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, entre tecidos benignos e malignos em diferentes patologias, incluindo próstata (KAST *et al.*, 2014; PLANTE *et al.*, 2021), estômago (BAHREINI *et al.*, 2019; IKEDA *et al.*, 2018), câncer de mama (PACHECO *et al.*, 2021) e pele (BODANESE *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2019; SILVEIRA *et al.*, 2015;), entre outros cânceres (GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; KONG *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2015). A técnica Raman não requer preparação complicada de amostras, é não invasiva e não destrutiva, fornece informações sobre os modos de energia vibracional das moléculas em tempo real, permitindo análises *in situ* de tecidos biológicos com alta precisão (EBERHARDT *et al.*, 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; HANLON *et al.*, 2000; KONG *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019;) e sem remoção de tecido (BARROSO *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2015; KONG *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2019; PARACHALIL *et al.*, 2019). O uso de excitação baseada em radiação proveniente de fonte laser no infravermelho próximo (entre 785 e 830 nm) em espectrômetros Raman aplicado em medidas de tecidos biológicos tem como vantagem a baixa emissão de fluorescência devido à baixa absorção deste comprimento de onda por esses tecidos (KONG *et al.*, 2015; MITCHELL; ULRICH, 2020).

As características espectrais do soro sanguíneo apresentadas em pacientes dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer combinadas com a análise discriminante multivariada dos dados Raman usando análise de componente principal (PCA) foram capazes de mostrar as diferenças nos componentes principais entre os grupos (normal, leucêmico e outros tipos de câncer) e pode ser usado no diagnóstico de leucemias e cânceres por meio da espectroscopia Raman (ATKINS *et al.*, 2017; BRASIL, 2017; GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014).

Em uma revisão de literatura, Atkins *et al.* (2017) apresentaram estudos que utilizaram a espectroscopia Raman para caracterização bioquímica do sangue e seus componentes. Em estudo com amostras de soro sanguíneo, González-Solís *et*

al. (2014) usaram a espectroscopia Raman e PCA para diferenciar soro de normal e leucêmico pacientes e identificar os diferentes tipos de leucemia com base na composição bioquímica do soro. Silva *et al.* (2018) usaram amostras de sangue total e plasma de indivíduos saudáveis e leucêmicos com base em espectros Raman e PCA para diferenciar pacientes leucêmicos e não leucêmicos de acordo com alterações bioquímicas.

González-Solís *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2018) mostraram um aumento na concentração de carotenoides plasmáticos no grupo normal (picos Raman de carotenoides aumentados) e associaram este composto a um papel protetor contra neoplasias. Martínez-Espinosa *et al.* (2009) coletaram espectros Raman de amostras de soro de pacientes com leucemia e voluntários saudáveis para discriminá-los e usando PCA nos espectros Raman e foram capazes de diferenciar as amostras. Bai *et al.* (2020) usaram a espectroscopia Raman para analisar as características do plasma sanguíneo de pacientes com linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e leucemia linfocítica crônica (LLC) em comparação com o plasma de pacientes saudáveis, e usando análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA), obtiveram boa discriminação entre os grupos LDGCB, LLC e voluntários saudáveis (controle). Os autores também encontraram bandas Raman específicas para pacientes com LDGCB e LLC.

1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi identificar, por meio da espectroscopia Raman (excitação em 830 nm), as diferenças espectrais no soro sanguíneo de crianças e adolescentes saudáveis (grupo normal) do soro de pacientes leucêmicos (grupo leucêmico) e com outros tipos de câncer (grupo de outros tipos de câncer).

1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do estudo são:

- Avaliar as diferenças espectrais entre pacientes pediátricos com doença neoplásica e pacientes saudáveis;
- Correlacionar os principais picos espectrais das amostras com a composição química do soro sanguíneo, conforme descrição da literatura;

- Identificar os picos Raman que possibilitem a diferenciação entre pacientes com leucemias e com outros tipos de câncer (sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma) de pacientes saudáveis;
- Desenvolver modelos de classificação dos espectros das amostras de soro sanguíneo de pacientes saudáveis (grupo normal), leucêmicos (grupo leucêmico) e com outros tipos de câncer (grupo outros tipos de câncer) por discriminação utilizando análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

1.3 Hipótese

A hipótese levantada nesta Tese é de que alterações na composição bioquímica do soro sanguíneo de crianças e adolescentes dos grupos leucêmico (LLA e LMA) e outros tipos de câncer (blastoma, carcinoma, linfoma e sarcoma), em comparação com o grupo normal (pacientes saudáveis), podem ser identificadas pela espectroscopia Raman, visto que esta técnica fotônica vem demonstrando, de acordo com a revisão de literatura, possibilidade de identificar estas diferenças bioquímicas em fluidos biológicos com significância estatística.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer: aspectos gerais

Instabilidades genéticas heterogêneas unidas por alterações comuns em múltiplas vias de sinalização celular podem levar a uma multiplicação desordenada de células e promover o desenvolvimento do câncer, que frequentemente está associado ao aparecimento de tumor (Figura 1). Já a leucemia é uma doença que atinge as células do sangue cuja principal característica é o acúmulo de células doentes na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais e não formam tumor (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2018; INCA, 2022).

O câncer é uma patologia complexa e multifatorial. Sua etiologia presume mutações genéticas que conferem capacidade ilimitada de proliferação celular, perda de resposta a fatores de inibição de crescimento, evasão de apoptose, possibilidades de invadir outros tecidos corpóreos (metástases) e produção de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (ALTICE *et al.*, 2016; INCA, 2022).

Inúmeros marcadores têm sido apontados como importantes mediadores em células cancerígenas, sendo a evasão apoptótica relatada como uma das principais alterações que determinam o crescimento tumoral (MOROZOV, KARPOV, 2019). Além disso, outras características podem ser incluídas, tais como: autossuficiência na sinalização de crescimento, desajuste da energia celular, angiogênese sustentada, evasão da detecção imune e metástase (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2018; VON WAGNER, VERSTRAETE, STOFFEL, 2019).



Figura 1: Representação do surgimento do câncer a partir da multiplicação desordenada de células alteradas. Fonte: adaptado de INCA, 2022.

O câncer representa uma importante barreira para o aumento da expectativa de vida no mundo. De acordo com a OMS, em 2019 o câncer foi a primeira ou a segunda causa de morte antes dos 70 anos de idade, em 112 dos 183 países. O impacto da pandemia provocado pela COVID-19, bem como sua extensão em diferentes partes do mundo, ainda é desconhecida, mas presume-se que atrasos no diagnóstico e tratamento, associados às preocupações dos indivíduos e fechamento dos sistemas de saúde, com redução dos cuidados, cause um declínio de curto prazo na incidência de câncer, seguido por aumento nos diagnósticos em estágio avançado e na mortalidade por câncer em alguns cenários. Em 2019, houve uma estimativa de 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, 18,1 milhões excluindo o câncer de pele não melanoma, exceto o carcinoma basocelular (SUNG *et al.*, 2021).

De acordo com o INCA, as estimativas da incidência de câncer no Brasil no triênio de 2023 a 2025 indicam a ocorrência de aproximadamente 704.000 novos de câncer, 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária, são mostradas na Figura 2 e são consideradas intermediárias e compatíveis com as apresentadas para países em desenvolvimento (INCA, 2022).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.760	26,5%	Homens	Mulheres	Mama feminina	2.410	22,4%
Estômago	1.200	11,5%			Colo do útero	1.980	18,4%
Traqueia, brônquio e pulmão	880	8,5%			Cólon e reto	740	6,9%
Cólon e reto	690	6,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	650	6,0%
Cavidade oral	440	4,2%			Estômago	630	5,9%
Leucemias	440	4,2%			Leucemias	350	3,3%
Fígado	430	4,1%			Ovário	340	3,2%
Sistema nervoso central	320	3,1%			Fígado	320	3,0%
Esôfago	270	2,6%			Glândula tireoide	320	3,0%
Laringe	260	2,5%			Sistema nervoso central	270	2,5%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma. Fonte: adaptado de INCA, 2022.

O câncer é considerado um problema crônico de saúde pela OMS, similar à hipertensão e diabetes, e, portanto, os efeitos ótimos do tratamento envolvem melhorar a qualidade de vida, prolongar o tempo de sobrevivência e aliviar os efeitos colaterais. Dessa forma, o conceito de “sobrevivência com câncer” tem sido sugerido (Qi *et al.*, 2015). Agentes dietéticos naturais, em particular especiarias e ervas, têm

atraído relevante atenção devido às suas várias propriedades na promoção da saúde, incluindo a supressão do câncer (VON WAGNER; VERSTRAETE; STOFFEL, 2019).

2.2 Etiologia do câncer infantojuvenil

O câncer na criança e no adolescente (entre 0 e 19 anos), ou câncer infantojuvenil, corresponde a um grupo de várias doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células anormais, que pode ocorrer em qualquer local do organismo. Diferentemente do câncer do adulto, o infantojuvenil é predominantemente de natureza embrionária e, geralmente, afeta as células do sistema sanguíneo e os tecidos de sustentação. Nas últimas quatro décadas, o progresso no tratamento do câncer na infância e na adolescência foi extremamente significativo. Atualmente, cerca de 80% das crianças e dos adolescentes acometidos pela doença podem ser curados; no entanto, faz-se necessário diagnóstico precoce e tratamento em centros especializados (INCA, 2022). Muitos estudos procuraram identificar as causas do câncer infantil, mas muito poucos cânceres em crianças são causados por exposição ambiental ou fatores de estilo de vida, e sim por fatores genéticos. O câncer é causado por certas mudanças nos genes, as unidades físicas básicas de herança genética, levando ao aumento indiscriminado no número de mitoses celulares (BAUER, 2017; OHTSURU *et al.*, 2019). Os genes são organizados em longas fitas de DNA fortemente compactadas chamadas cromossomos (BAUER, 2017).

O câncer pode ser difícil de detectar em crianças, apresentando uma variedade dos sinais ou sintomas, muitos dos quais são semelhantes a doenças infantis comuns. Além disso, às vezes as crianças com câncer não apresentam nenhuma dessas alterações, ou a causa de um sintoma pode ser uma condição médica completamente diferente que não seja câncer (WON *et al.*, 2018).

Quando identificado precocemente, o câncer tem maior probabilidade de responder a um tratamento eficaz e resultar em uma maior probabilidade de sobrevivência, menos sofrimento, e muitas vezes, um tratamento menos caro e menos intensivo (BHAKTA *et al.*, 2019; HONG *et al.*, 2018). Melhorias significativas podem ser feitas na vida de crianças com câncer a partir da detecção precoce do câncer, evitando atrasos no início do tratamento. Um diagnóstico correto é essencial para tratar crianças com câncer porque cada câncer requer um regime de tratamento

específico que pode incluir cirurgia, radioterapia e quimioterapia (BHAKTA *et al.*, 2019).

2.3 Caracterização dos principais tipos de câncer infantojuvenil

A cada ano, cerca de 400 mil crianças e adolescentes são diagnosticados com câncer e os seus tipos mais comuns incluem leucemias, cânceres cerebrais, linfomas e tumores sólidos, como neuroblastoma e tumores de Wilms (BHAKTA *et al.*, 2019; STELIAROVA-FOUCHER *et al.*, 2017).

A nomenclatura dos tumores é baseada em sua histogênese e histopatologia. Quando sua origem é nos tecidos de revestimento externo e interno, os tumores são chamados de carcinomas. Quando o epitélio de origem é glandular, são chamados de adenocarcinomas. Por outro lado, para tumores malignos originários de tecidos conjuntivos ou mesenquimais, o sufixo sarcoma é adicionado à palavra que corresponde ao tecido. Por sua vez, os tumores originados de células blásticas, que ocorrem com mais frequência na infância, têm o sufixo blastoma acrescentado à palavra que corresponde ao tecido original. Os tumores derivados do tecido hemolinfopoietico, de acordo com a linhagem celular afetada, podem ser leucemias ou linfomas (BRASIL, 2021).

De modo geral, entre crianças e adolescentes, os tipos mais comuns de câncer são leucemias, tumores cerebrais e do sistema nervoso central e linfomas. Entre as crianças (de 0 a 14 anos), os tipos de câncer mais comuns são as leucemias, seguidas de tumores cerebrais e outros do sistema nervoso central, linfomas, neuroblastoma, tumores renais e tumores ósseos malignos (COOPER *et al.*, 2017). Entre os adolescentes (de 15 a 19 anos), os tipos mais comuns de câncer são tumores e linfomas cerebrais e outros do sistema nervoso central, seguidos por leucemias, câncer de tireoide, gonadal (testicular e ovário), tumores de células germinativas e tumores ósseos malignos (ISAEVSKA *et al.*, 2017; VAN MAELE-FABRY; GAMET-PAYRASTRE; LISON, 2018).

2.3.1 Leucemias

A leucemia é um tipo de neoplasia maligna proveniente das células hematopoiéticas. Essa patologia se inicia na medula-óssea, local onde as células

sanguíneas são produzidas, e em seguida invadem o sangue periférico, podendo atingir vários órgãos (NIH, 2014). A leucemia é a neoplasia mais comum na infância, responsável por um terço de todos os cânceres infantis (INCA, 2022).

Na leucemia, uma célula sanguínea que ainda não atingiu a maturidade sofre uma mutação genética que a transforma em uma célula cancerosa, que consiste em uma célula anormal que não funciona de forma adequada, multiplica-se mais rápido e morre menos do que as células normais. Dessa forma, as células sanguíneas saudáveis da medula óssea vão sendo substituídas por células anormais, cancerosas (INCA, 2022).

A leucemia é geralmente descrita como aguda, que se dissemina rapidamente, ou crônica, que cresce lentamente. A grande maioria das leucemias infantis é aguda, e as leucemias crônicas são mais comuns em adultos do que em crianças (VAN MAELE-FABRY; GAMET-PAYRASTRE; LISON, 2019).

Os três subtipos principais de leucemia são: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC). A maioria das leucemias infantis são LLA, com quase 80% dos casos. A maioria dos casos restantes são LMA. As leucemias crônicas, como a LLC, são raras em crianças. Há muitos subgrupos de LLA e LMA, tais subgrupos apresentam características biológicas, prognóstico e tratamento variáveis. As crianças geralmente apresentam citopenias ou infiltrações leucêmicas da medula óssea e de outros órgãos, como o baço, fígado, testículos e sistema nervoso central (SNC) (KAPLAN, 2019).

Como citado acima, a forma mais comum de leucemia infantil é LLA, que constitui entre 75 e 80% dos diagnósticos de leucemia infantil, sendo uma forma de leucemia que afeta os linfócitos, um tipo de glóbulos brancos que combate infecções. Quando um paciente está acometido por LLA, a medula óssea produz muitos glóbulos brancos imaturos e eles não amadurecem corretamente, comprometendo a produção de hemácias, plaquetas e neutrófilos. As células de origem desses blastos está na linhagem de desenvolvimentos dos linfócitos e podem infiltrar o SNC, sangue periférico, linfonodos, baço, fígado e rins. Esses glóbulos brancos também não funcionam corretamente para combater infecções (BORDBAR *et al.*, 2021; KAPLAN, 2019).

A LLA é uma doença de rápida progressão, que faz com que glóbulos brancos em excesso e imaturas, os blastos, proliferem no osso à custa de células hematopoiéticas normais. Dentro dos subtipos de LLA, a doença precursora de

células B (LLA-B) é mais comum do que a doença de células T (LLA-T). A presença de leucocitose e massa mediastinal anterior em adolescentes com queixas de dispnéia em posição supina, taquipneia e estridor pode sugerir o diagnóstico de LLA-T. A LLA-B é tratada com quimioterápico em cinco fases: indução, manutenção provisória, intensificação tardia e manutenção. Em termos de prognóstico, a LLA-T apresenta pior desfecho (prognóstico ruim) em comparação com a LLA-B (KAPLAN, 2019).

Outro tipo de leucemia aguda é a LMA, que assim como a LLA, apresenta rápida progressão, e é responsável pela maioria dos casos restantes de leucemia em crianças, compreendendo a cerca de 18% das leucemias infantis. Ocorre proliferação de blastos na medula óssea e no sangue, e podem atingir vários sistemas do corpo. As células de origem são da linhagem mieloide: granulócitos, monócitos, eritrócitos e megacariócitos podem originar a célula imatura, promovendo uma grande variação morfológica para esse tipo de leucemia. Os cuidados de suporte são indispensáveis, visto que as terapias propostas podem ser bastante tóxicas e mielossupressoras, culminando com longos períodos de dependência de transfusão sanguínea e neutropenia grave. A LMC é rara, e, quando diagnosticada, apresenta maior prevalência em adolescentes (BROWN *et al.*, 2021; KAPLAN, 2019; LABUHN *et al.*, 2019).

Além da observação clínica, o diagnóstico da leucemia baseia-se em um conjunto de exames complementares, bem como investigação dos antecedentes pessoais e familiares do doente. Dos exames laboratoriais, o hemograma completo com contagem celular diferencial tem grande importância, visto que a maioria dos pacientes com leucemia tem mais de uma linhagem celular afetada. No caso de neutropenia isolada, anemia ou trombocitopenia, o diagnóstico diferencial deve ser considerado; já no caso de mais de uma linhagem celular atingida, o diagnóstico de leucemia deve ser fortemente considerado. Supressão viral, citopenia induzida por drogas, púrpura, anemia hemolítica autoimune ou neutropenia, Síndrome de Evan, eritroblastopenia transitória da infância, anemia aplásica, sequestro esplênico e artrite reumatoide idiopática juvenil são diagnósticos que podem ser comumente confundidos com leucemia (KAPLAN, 2019).

A citogenética convencional está sendo amplamente utilizada para diagnosticar e tratar neoplasias hematológicas. A aplicação de hibridização fluorescente *in situ* (do inglês “*fluorescence in situ hybridization*” – FISH) associada à

fita de DNA cromossômico específico auxilia a definir subclasses moleculares e categorias de risco citogenético para essas doenças, além de proporcionar a análise de células proliferativas e não proliferativas, sendo importante para estabelecer a porcentagem de células neoplásicas antes e após terapêutica. Essa técnica pode também permitir a identificação de anomalias cromossômicas importantes no linfoma, sendo esse um dos critérios para confiáveis para a classificação dos linfomas malignos segundo a OMS (DEWALD *et al.*, 2003).

Outro exame realizado é a biópsia da medula óssea. Tal exame é doloroso e realizado com anestesia geral, por meio de uma agulha introduzida no osso íliaco do paciente escolhido para a realização da aspiração de uma parte da medula óssea. Dessa forma pode-se realizar o mielograma (análise morfológica e a produção de células sanguíneas pela medula óssea) e a retirada de um pequeno fragmento ósseo, normalmente o osso do quadril, podendo ser também do osso íliaco, esterno ou tíbia, esta última mais utilizada em crianças. Esse fragmento ósseo é encaminhado para laboratório e um patologista pesquisa a presença de células malignas que afetam os glóbulos brancos, vermelhos ou plaquetas. Com o material colhido para o mielograma, pode ser realizada a imunofenotipagem, que analisa a linhagem celular comprometida, auxiliando no diagnóstico e no tratamento (KAPLAN, 2019).

2.3.2 Tumores cerebrais de sistema nervoso central

Os tumores do SNC incluem tumores não malignos e malignos do cérebro e da medula espinhal. Os tumores malignos primários do SNC são a segunda maior causa de doenças malignas na infância, depois das malignidades hematológicas, e representam o tumor de órgão sólido pediátrico mais comum (STOCCO *et al.*, 2017). Embora tenha havido progresso no tratamento de tumores infantis, ainda estão associadas aos tumores cerebrais malignos elevadas mortalidade e morbidade (LADRA; MACDONAL; TEREZAKIS, 2018).

Pouco se sabe sobre a patogênese da maioria dos tumores cerebrais em crianças. Existem síndromes genéticas que podem predispor os pacientes a desenvolver tumores cerebrais, como neurofibromatose tipo 1, esclerose tuberosa, síndrome de Li-Fraumeni e outras condições hereditárias menos comuns, como síndrome de Gorlin ou síndrome de Turcot. Dados recentes demonstram que mais de 8% dos cânceres infantis e adolescentes surgem no contexto de síndromes de

predisposição germinativa, e é provável que esse número aumente à medida que as investigações aumentam. Além das síndromes hereditárias, o único outro fator de risco ambiental uniformemente aceito que tem demonstrado consistentemente que aumenta o risco de desenvolver tumores cerebrais é a exposição à radiação (UDAKA; PACKER, 2018).

A distribuição geral dos tumores cerebrais infantis de acordo com sua aparência histológica difere marcadamente do padrão observado em adultos. Meningiomas, tumores de células de Schwann, hipófise e metástases de fora do cérebro, relativamente comuns em adultos, são raros em crianças (LADRA; MACDONAL; TEREZAKIS, 2018; UDAKA; PACKER, 2018). Os tumores supratentoriais são mais comuns em lactentes e crianças até três anos de idade e novamente após os 10 anos de idade, enquanto entre os quatro e 10 anos de idade os tumores infratentoriais são mais comuns (BROWN *et al.*, 2021; INDELICATO *et al.*, 2017/ UDAKA; PACKER, 2018).

Embora a taxa de mortalidade para essas neoplasias exceda as taxas de muitos outros tumores infantis, os avanços terapêuticos recentes, juntamente com o refinamento das técnicas de neuroimagem, que facilitaram o diagnóstico precoce e melhoraram o planejamento do tratamento, aumentaram a porcentagem de crianças afetadas que sobrevivem até a idade adulta (INDELICATO *et al.*, 2017; UDAKA; PACKER, 2018).

O neuroblastoma é um tipo de câncer ocorre em lactentes e bebês e se inicia precocemente nas células nervosas encontradas em um embrião ou feto em desenvolvimento, correspondendo de 8 a 10% dos casos de cânceres infantis. Raramente é diagnosticado em crianças com mais de 10 anos. Esse tumor pode começar em qualquer local, mas geralmente é diagnosticado no abdome, sendo percebido pelo aparecimento de inchaço na região. Também pode causar dor óssea e febre (AHMED *et al.*, 2017).

O neuroblastoma afeta as células neuroectodérmicas indiferenciadas que estão presentes na crista neural (Figura 3), que tem sua função alterada apesar de ainda apresentar o neurotransmissor acetilcolinesterase em todas as células clonais produzidas. Ainda possui como uma das principais características extrema heterogeneidade molecular, podendo ser derivada de diversas cristas, e diante disso, tem-se um direcionamento de diagnóstico. Por essa pluralidade, alguns pesquisadores levantaram a hipótese de que o neuroblastoma se origina de células

tronco residuais malignas (AMANO; RICHELSON; NIRENBERG, 1972; SCHWAB *et al.*, 2003; WALTON *et al.*, 2004).

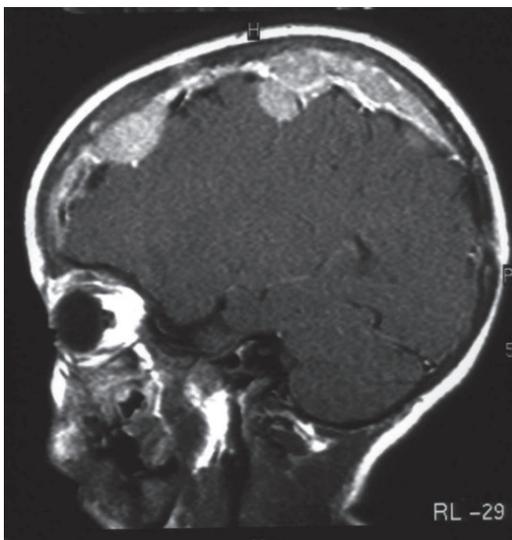


Figura 3: Imagem de uma ressonância magnética sagital T1W mostrando a presença de um manto de neuroblastoma em um paciente. Fonte: MEHTA; HALLER; LEGASTO, 2003.

Na questão genética há uma alteração cromossômica quantitativa, que está diretamente interligada ao prognóstico que o paciente pode vir a ter, em especial aberrações segmentares que afetam regiões ligadas ao câncer ou focais, e que estão ligados diretamente ao desenvolvimento do neuroblastoma (DEPUYDT *et al.*, 2018).

Os neuroblastomas costumam apresentar dois tipos fenotipicamente principais de células na sua formação, as mesenquimais indiferenciadas e as adrenérgicas comprometidas. Além disso, a alta expressão do gene fator transcricional, o homeobox (segmentos de genes reguladores que codificam proteínas nucleares, as quais atuam como fatores de transcrição, regulando a morfogênese e a diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário) está relacionado ao emparelhado 1 (PRRX1), o que faz com que as células adrenérgicas diferenciadas tenham a capacidade de se transformar em células mesenquimais (VAN GRONINGEN *et al.*, 2017). Dentre as alterações metabólicas, se destaca a taurina, por ser um dos metabolitos mais presentes nos tumores neuroblastoma embrionários, podendo esse aminoácido ser utilizado como um indicativo para diagnóstico (KOHE *et al.*, 2018).

O diagnóstico precoce aumenta a probabilidade de o tumor ser operável. Particularmente no caso de tumores de baixo grau, podem se passar anos antes que as dores de cabeça, macrocefalia e deficiência de crescimento se juntem a outros

sintomas, por exemplo, déficits endócrinos ou deficiência visual (BARNHOLTZ-SLOAN; OSTROM; COTE, 2018). Os sintomas inespecíficos persistentes devem levar ao exame por um médico com experiência em tumores do SNC e a investigação oportuna de sintomas gerais e/ou locais persistentes pode facilitar o diagnóstico precoce (BROWN, *et al.*, 2021).

2.3.3 Linfoma

Em um parâmetro epidemiológico infantil, linfomas são classificados como o terceiro câncer que mais afeta crianças com idade menor ou igual a 15 anos, com um avanço na melhora de prognóstico com o passar dos anos, apesar de ainda se ter diversos relatos de recidivas ou células refratárias, que acabam por deixar mais difíceis e complexos os casos (BRADLEY; CAIRO, 2007).

A classificação inicial desse tipo de câncer foi realizada de forma controversa, gerando grandes controvérsias sobre ele, porém em 1994 a criação do Grupo Internacional de Estudos de Linfoma estabeleceu uma determinação específica no documento “Classificação Europeia-Americana Revisada de Neoplasias Linfoides”, onde tem-se que fazer uma correlação morfológica, imunofenotípica, genética e anamnese clínica para a determinação de diagnóstico. Porém o grau de importância de cada um dos parâmetros é variável de caso para caso, sendo todos indispensáveis (HARRIS *et al.*, 2000).

Um dos tipos de linfomas mais preocupantes é o Linfoma não Hodgkin, em que se tem uma explosão clonal das células do tecido linfático, que, por sua vez, conseguem infiltrar na medula óssea ou em outros tecidos. Apesar de suas classificações já serem bem definidas, com procedimentos e diagnóstico já estabelecidos, a etiologia desta doença ainda não foi bem esclarecida, havendo algumas hipóteses de fatores genéticos, ambientais e diabetes estarem correlacionadas com ela; por ter essa gama de possíveis fatores, sua detecção precoce é um fator crucial no prognóstico (FREITAG; AMADUCCI; ORSO, 2019; MÍSSIO; SILVA, 2019).

Além do método de diagnóstico, o acompanhamento dos casos em tratamento também é feito por meio de exames, no caso, os exames de imagem são os mais utilizados para a sua realização e a análise do estadiamento do câncer (Figura 4). Esse monitoramento faz com que os tratamentos possam ser mais

específicos e a fim de se instituir cuidados adicionais da forma mais rápida, aumentando a possibilidade de sucesso no tratamento (LU, 2005).

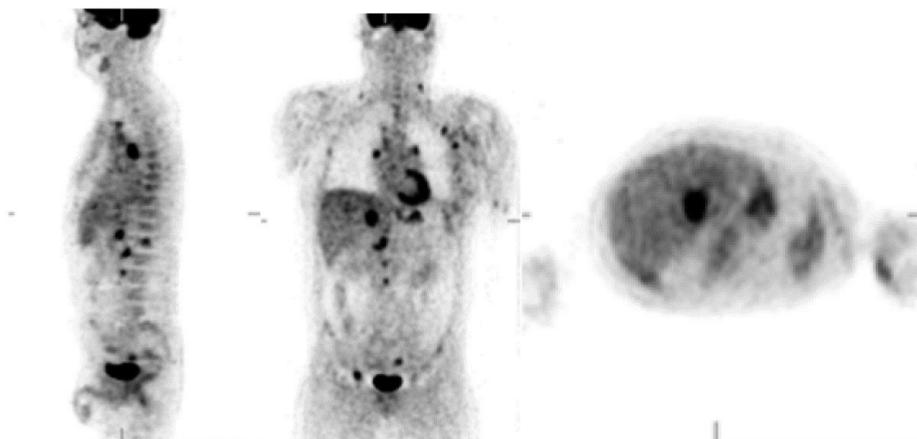


Figura 4: Exame de imagem feita pelo equipamento F-FDG PET mostrando diversos pontos focais de linfomas no paciente. Fonte: LU, 2005.

A diferenciação dos linfomas para os demais tipos de cânceres é essencial, em especial com as leucemias, com as quais são muitas vezes confundidos. A determinação entre eles se dá principalmente pela marcação com anticorpos monoclonais, que conseguem detectar especificamente qual é o tipo celular que apresentou a anomalia e conseqüentemente desenvolveu o câncer (FOON; TODD, 1986).

2.3.4 Rabdomyossarcoma e tumores ósseos

O rabdomyossarcoma é um tipo de neoplasia que acomete os tecidos moles, em especial o tecido conjuntivo (músculos esqueléticos). É o tipo mais comum de sarcoma de partes moles em crianças, representando cerca de 4 a 5% dos tumores malignos na faixa etária pediátrica (INCA, 2022). Por se tratar de um tecido de sustentação para os órgãos, esse tipo de câncer pode aparecer em qualquer parte do corpo. Os principais locais de acometimento são: cabeça e pescoço, sistema urinário e extremidades, podendo ainda apresentar metástase no momento do diagnóstico (cerca de 15 a 25%) (INCA, 2022). O diagnóstico do rabdomyossarcoma pode ser feito por tomografia computadorizada, ressonância magnética, cintilografia óssea, tomografia por emissão de pósitrons (PET-TC) e/ou biópsia incisional do tumor para análise histológica (COSTA *et al.*, 1990; SOUZA; SIQUEIRA, 2014).

Os cânceres ósseos apresentam sua maior incidência em crianças devido principalmente pela alta divisão celular que ocorre durante o desenvolvimento dos ossos, o que os torna mais propensos a alterações indesejadas na sua genética. Existem diversos cânceres, sendo o osteossarcoma e sarcomas de Ewing os mais prevalentes (BIELACK *et al.*, 2008). O osteossarcoma é o tumor maligno ósseo mais frequente na infância e adolescência, comumente associado a dor local, como também alterações ósseas. Esse apresenta maior prevalência nos membros inferiores, e a alteração na marcha é uma das principais queixas. O sarcoma de Ewing é o segundo tumor ósseo mais frequente na infância e adolescência (INCA, 2022). O diagnóstico dos tumores ósseos é feito por meio de radiografia simples, tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética e/ou cintilografia óssea (INCA, 2022). O diagnóstico histológico é feito principalmente através de biópsia óssea corada por duas metodologias, coloração com hematoxilina/eosina (H&E) e por imunohistoquímica (NAWALE *et al.*, 2016).

2.4 Espectroscopia Raman

Com o avanço tecnológico alcançado nos últimos anos e o desenvolvimento de ferramentas para auxiliar na medicina diagnóstica, os laudos dos exames tornaram-se mais precisos e são liberados com maior rapidez e segurança. A implementação de métodos automatizados e padronizados na rotina laboratorial, proporcionada pela modernização e informatização dos laboratórios, bem as inovações tecnológicas, têm contribuído de forma significativa para auxiliar os médicos nos diagnósticos (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2007). Essas ferramentas tecnológicas de suporte à área da medicina favorecem, tanto para a equipe médica quanto para o paciente, mais precisão, uma vez que minimiza as chances de erro, fornecem dados mais confiáveis e direcionam o clínico para o tratamento mais adequado para cada tipo de doença. Aplicações de espectroscopia óptica, tais como fluorescência, refletância e espalhamento Raman, podem fornecer informações sobre a composição molecular dos tecidos de forma rápida, precisa e específica, sem preparação das amostras ou com mínima preparação, o que pode encurtar o intervalo entre o diagnóstico e a instituição do tratamento (HANLON *et al.*, 2000; LIMA *et al.* 2018; SILVA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2015).

A partir da incidência de um feixe de luz monocromático em um material, podem ocorrer dois tipos de espalhamento: o espalhamento de natureza elástica, no qual o fóton espalhado tem frequência correspondente à frequência do feixe de luz incidente, conhecido como espalhamento Rayleigh, e o espalhamento de natureza inelástica, neste caso o fóton espalhado tem frequência diferente da frequência do feixe de luz incidente, conhecido como efeito Raman, e o espalhamento resultante corresponde ao espalhamento Raman (AUNER *et al.*, 2018; HANLON *et al.*, 2000).

A luz espalhada é coletada por um espectrômetro e exibida como um espectro no qual sua intensidade é plotada em função das frequências vibracionais da amostra. O espectro Raman de uma amostra consiste em uma série de bandas com picos característicos. Dessa forma, a espectroscopia Raman é uma técnica óptica conhecida por fornecer uma impressão digital molecular da amostra, fornecendo informações tanto da composição bioquímica de tecidos e fluidos biológicos quanto quantitativas, relacionadas à patologia estudada (AUNER *et al.*, 2018; HANLON *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2015).

Na Biomedicina, a espectroscopia Raman tem aplicação recente, mas já apresenta grande utilização na investigação da base molecular das patologias, e uma grande vantagem no fornecimento de diagnósticos, que é feito por meio da análise espectral, utilizando o conteúdo completo das informações presentes no espectro Raman, sendo sua análise realizada em três níveis distintos: estatística, bioquímica e morfológica (BARROSO *et al.*, 2015; HANLON *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2015).

Outra vantagem da espectroscopia Raman que a diferencia das demais técnicas de diagnóstico é a liberação dos resultados de forma mais rápida, sendo todas as detecções realizadas pelo espectrômetro. Há também a possibilidade de criação de um banco de dados, que pode ser utilizado tanto para a realização de diagnóstico em tempo real de tecidos vivos, quanto para o auxílio durante os procedimentos cirúrgicos, através da análise *in situ* da amostra coletada durante o procedimento (AUNER *et al.*, 2012; AUNER *et al.*, 2018).

2.5 Diagnóstico de leucemias e cânceres infantojuvenis por meio da espectroscopia Raman

A fim de fornecer um diagnóstico de câncer de forma mais precoce e precisa possível, com testes com maiores valores de sensibilidade e especificidade, muitos esforços estão sendo feitos visando o desenvolvimento de técnicas ópticas com essa finalidade. A espectroscopia Raman está ganhando destaque em várias áreas da Medicina, com vantagens como rapidez, avaliação *in situ* direta e ausência da necessidade de preparação das amostras e utilização de pequena quantidade desta, além de ser um método não invasivo. Essas características, associadas à capacidade de detectar alterações bioquímicas teciduais provocadas por lesões malignas, quando comparadas a tecidos normais, tornam a técnica Raman uma ferramenta promissora para discriminar a progressão em diferentes patologias, tendo aplicabilidade para o diagnóstico de doenças do soro sanguíneo, podendo identificar alterações nas células sanguíneas e em seus constituintes bioquímicos (ATKINS *et al.*, 2017; BARROSO *et al.*, 2015; HANLON *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2015).

A evolução das doenças provoca alterações bioquímicas nas células e nos tecidos, bem como alterações do metabolismo, especialmente nas neoplasias; essas alterações relacionam-se principalmente com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e provocam significativas alterações nos espectros Raman. Essa técnica pode ser usada para o diagnóstico e para o prognóstico das doenças, bem como ser uma ferramenta valiosa de auxílio na avaliação de novas terapias, sendo considerada promissora para a discriminação das diferenças tanto *in vivo* quanto *in vitro*, entre tecidos benignos e malignos em diferentes patologias, incluindo próstata, estômago, mama, câncer de pele, leucemias dentre outros, sem a necessidade de preparo da amostra ou com mínimo preparo (BODANESE *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2015; HANLON *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018).

Os estudos com espectroscopia Raman para investigações relacionadas ao sangue tiveram início na década de 1970 quando Goheen *et al.* (1977) compararam espectros Raman (excitação de 514,5 nm) de membranas de eritrócitos intactos com espectros de membranas das quais essencialmente todas as proteínas periféricas foram extraídas. Várias doenças, como o diabetes, malária, anemia falciforme e câncer podem ser caracterizadas por mudanças bioquímicas

apresentadas no sangue (ATKINS *et al.*, 2017). Como resultado, muitos pesquisadores vêm usando a espectroscopia Raman para caracterizar o sangue e seus componentes celulares, visto que estes conseguem analisar o sangue total e seus componentes individuais, de forma rápida e não invasiva. Essa ferramenta vem se destacando no diagnóstico dos diferentes tipos de leucemias (ATKINS *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009).

Martínez-Espinosa *et al.* (2009) utilizaram amostras de sangue de seis pacientes com leucemia e seis pacientes saudáveis para realizar medições por meio da microscopia Raman confocal, e, utilizando métodos estatísticos multivariados de análise de componente principal (PCA) e análise discriminante linear (LDA), conseguiu obter alterações na intensidade de algumas bandas espectrais que correspondem a proteínas, fosfolípidios e polissacarídeos. Com estes resultados, os autores sugerem a espectroscopia Raman como uma técnica para estudos da medula óssea por meio de amostras sanguíneas.

Bai *et al.* (2020) estudaram as características do plasma sanguíneo de pacientes com linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e leucemia linfocítica crônica (LLC) por espectroscopia Raman com o objetivo de detectar LDGCB e LLC de maneira não invasiva. Foi analisado o plasma sanguíneo de 33 pacientes com LDGCB, 39 pacientes com LLC e 30 voluntários saudáveis. Por meio da análise discriminante por quadrados mínimos parciais ortogonais (OPLS-DA), foi desenvolvido um modelo no qual se conseguiu boa discriminação entre os grupos LDGCB, LLC e os voluntários saudáveis (controle), com sensibilidade e especificidade acima de 80% para LDGCB e LLC, além de que foi possível a identificação de bandas espectrais específicas para os cânceres.

Outros autores também avaliaram a espectroscopia Raman visando análise qualitativa e quantitativa do sangue humano, bem como dos seus elementos bioquímico, objetivando encontrar diferenças espectrais entre amostras de pacientes leucêmicos e saudáveis por meio de alterações apresentadas no espectro Raman e análise estatística associada (FÉRÉ *et al.*, 2019; LASCH, 2012; SILVA *et al.*, 2018).

Os espectros Raman do soro sanguíneo apresentam características espectrais provenientes das proteínas albumina e globulinas, visto que essas são as biomoléculas mais abundantes neste fluido corporal. Tais características podem representar uma dificuldade na visualização espectral de outros biomarcadores, por estarem presentes em menor concentração e por isso possuírem menor intensidade

espectral (MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009; PARACHALIL *et al.*, 2019). Importante destacar que no soro, as posições dos picos Raman das globulinas são muito semelhantes às da albumina (ANASTASIA; DMITRY; BRATCHENKO, 2017; DINGARI *et al.*, 2012; PARACHALIL *et al.*, 2019). Picos Raman que correspondem a aminoácidos, proteínas, lipídios e carotenoides são visualizados no espectro do soro humano, sendo imprescindíveis para a discriminação dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer, e foram referenciados de acordo com a literatura (ANASTASIA; DMITRY; BRATCHENK, 2017; BAI *et al.*, 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; HU; SMITH; SPIRO, 1986; MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2018; SJÖBERG *et al.*, 2014).

2.6 Análise estatística dos dados

2.6.1 Análise de componente principal (PCA)

A PCA é um método matemático que reduz a dimensionalidade dos dados e preserva o máximo de variabilidade possível dentro do conjunto de dados, sendo considerada ideal para trabalhar com dados grandes e de natureza multivariada. A PCA determina novas variáveis que são funções lineares do conjunto de dados original e maximiza sucessivamente a variância, não correlacionando as variáveis entre si. As novas variáveis dependem da variância do conjunto de dados em vez de serem funções predefinidas e, portanto, são adaptativas em sentido amplo (JOLLIFFE; CADIMA, 2016; RINGNÉR, 2008).

Cada componente principal pode ser interpretado como um eixo que possui maior variância que o eixo anterior, e que por isso possui uma direção não correlacionada com os componentes anteriores, sendo a PCA capaz de identificar direções de maior variação, e não as direções mais relevantes para discriminar as amostras (a técnica PLS em maior capacidade de determinar as variâncias correlacionadas com os grupos), possibilitando a análise dos dados de diferentes aspectos. O primeiro componente principal corresponde à direção ao longo da qual as amostras apresentam a maior variância espectral; o segundo componente principal é a direção não correlacionada com o primeiro componente ao longo do qual as amostras apontam para a segunda maior variância, e assim por diante. A PCA é uma

ferramenta descritiva e pode ser usada em dados numéricos de vários tipos (JOLLIFFE; CADIMA, 2016; RINGNÉR, 2008).

A PCA extrai as informações mais importantes do conjunto de dados e gera duas novas variáveis: os Escores dos componentes principais, que se assemelham ao espectro Raman, e os componentes principais (PCs), que indicam a intensidade de cada Escore presente nos dados originais. A partir da análise dessas duas variáveis, as diferenças e semelhanças entre os grupos estudados podem ser identificadas. O primeiro componente principal (de fato o par de variáveis Escore1 e PC1) apresenta a maior variação espectral, sendo seguido pelos demais componentes principais, até o componente de menor variância, sendo todos os pares Escores e PCs ortogonais entre si (JOLLIFFE; CADIMA, 2016; LASH, 2012; RINGNÉR, 2008; SILVA *et al.*, 2018).

Na PCA, as variações intragrupos são diferentes das variações intergrupos, e a discriminação é realizada concentrando-se na observação das variações entre os grupos, resultando na identificação das diferenças mais relevantes nas amostras de soro sanguíneo, e usando essas diferenças para discriminar os espectros de pacientes dos grupos leucêmico e outros tipos de câncer das amostras saudáveis. Dessa forma, os componentes gerados a partir dessas diferenças podem ser usados como parâmetros de diagnóstico ou classificação (JOLLIFFE; CADIMA, 2015). Importante observar que a determinação de quais variáveis (PCs) indicam essas diferenças intergrupos é feita por métodos estatísticos como por exemplo, teste análise de variância – ANOVA aplicada nas variáveis.

2.6.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

A análise discriminante linear por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) é uma ferramenta estatística de discriminação amplamente utilizada para classificação devido à sua capacidade de adequação para lidar com matrizes com um grande número de variáveis, muitas vezes altamente correlacionadas, e com a possibilidade de operar com muitas variáveis correlacionadas (BARKER; RAYENS, 2003; BEVILACQUA; MARINI, 2014; STÅHLE; WOLD, 1987).

Para a realização da regressão PLS, as variáveis conhecidas devem possuir relação direta com as variáveis que se deseja treinar. Este procedimento ocorre em duas etapas: calibração e validação. Na etapa de calibração, há uma

decomposição entre a matriz \mathbf{X} (variáveis independentes) e matriz \mathbf{Y} dependente (amostras). A partir da decomposição destas matrizes, há redução do conjunto de dados da qual se obtém as variáveis originais e os componentes principais, capazes de determinar o quanto uma variável original contribui para um determinado componente principal, conhecidos como variável latente. Na etapa de validação, as variáveis latentes, obtidas da decomposição das matrizes durante a calibração, servem de base para o modelamento das amostras a serem treinadas. A fim de se realizar a validação destes dados, utiliza-se a validação cruzada do tipo “deixa uma amostra de fora” (em inglês *leave-one-out*), indicada para amostras pequenas, na qual uma amostra do conjunto de calibração é extraída e as demais amostras formam um novo modelo, em seguida, a amostra inicialmente extraída é inserida no conjunto de dados para se definir sua correlação com os demais dados, e assim calcular o erro de previsão. Para uma validação completa, todas as amostras devem ser excluídas, uma a uma, e posteriormente reinseridas para formação dos modelos de classificação (ANDRIES; HEYDEN, 2021; GELADI; KOWALSKI, 1986).

A PLS-DA cria um modelo no qual qualquer correlação entre as variáveis preditas (grupos: normais, leucêmico e outros tipos de câncer) e preditoras (intensidades espectrais Raman) no conjunto de dados espectrais são estimadas e maximizadas e, portanto, usadas para prever a saída (classes: normal, leucêmico e outros tipos de câncer) de uma nova amostra, determinando a qual classe esta amostra pertence. Isso significa que as variações “dentro dos grupos” são diferenciadas das variações “entre grupos” e a discriminação é alcançada concentrando-se nas variações “entre grupos” (ANDRIES; HEYDEN, 2021).

2.6.3 Análise de variância (ANOVA)

A análise de variância (ANOVA) é uma técnica estatística utilizada para comparar as variâncias entre as médias de três ou mais grupos diferentes, fornecendo uma estimativa de variância entre as variáveis analisadas. Essa análise busca investigar se existem diferenças significativas entre as médias dos grupos estudados e se os fatores analisados exercem influência em alguma variável dependente (BERTINETTO; ENGEL; JANSEN, 2020).

Um valor do nível de significância p no teste ANOVA é a razão da variabilidade entre grupos com a variabilidade das observações dentro dos grupos.

Um valor p significativo do teste ANOVA indica que para pelo menos um par, a diferença da média foi estatisticamente significativa. Para identificar esses pares significativos é utilizado um teste *post-hoc* (comparações múltiplas entre pares). Antes de aplicar o teste *post-hoc*, primeiro é preciso testar a homogeneidade das variâncias entre os grupos (teste de Levene). A maioria dos testes paramétricos tem um teste não paramétrico alternativo, o teste não paramétrico ANOVA mais utilizado é o Kruskal-Wallis. Existem dois tipos de teste ANOVA: a ANOVA de uma via (*one-way* ANOVA), no qual apenas uma variável é independente, e a ANOVA de duas vias (*two-way* ANOVA), sendo usadas duas variáveis independentes. A ANOVA de duas vias é uma extensão da ANOVA de uma via e é usada para entender se existe alguma relação entre as duas variáveis independentes em uma variável dependente (FERREIRA; ROCHA; MEQUELINO, 2012).

Se as variações são homogêneas ($p > 0,05$), seleciona-se qualquer método de comparação múltipla de diferença menos significativa, como teste de Bonferroni, Tukey-Kramer, dentre outros. Se as variações não forem homogêneas ($p < 0,05$), seleciona-se qualquer método de comparação múltipla como teste de Games-Howell, T2 de Tamhane, Dunn, dentre outros. O nível de significância de cada um dos métodos de comparação múltipla varia de outros métodos, conforme situação específica em que cada teste utilizado para análise (FERREIRA; ROCHA; MEQUELINO, 2012).

2.6.4 Tabela de contingência

Em Medicina, ao se desenvolver novos métodos diagnósticos, a validação destes métodos busca identificar seu poder discriminativo em relação à patologia ou à condição a qual se procura discriminar. Tal avaliação objetiva determinar se um procedimento ou método é adequado ou não a determinada análise, com certa chance de erro. A quantificação dessas chances de erro é, basicamente, o objetivo destes métodos estatísticos (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003; SABBATINI, 1995). O desempenho de um teste diagnóstico depende da ausência de viés e da precisão, correspondendo, respectivamente, à validade e reprodutibilidade do teste (MOREIRA *et al.*, 2011).

A fim de validar um teste diagnóstico, compara-se os resultados do teste com os de um teste padrão que sirva de referência a fim de determinar, quantitativa e

qualitativamente, se tal teste é apropriado para diagnosticar um evento ou para predizê-lo (MOREIRA *et al.*, 2011). Tal comparação é feita através da tabela de contingência ou matriz de confusão (Tabela 1), isto é, uma tabela com duas entradas, cada entrada relativa a uma das variáveis, a fim de testar a existência de relação entre elas. Os melhores testes diagnósticos são aqueles com poucos resultados falso-positivos e falso-negativos. Considera-se verdadeiro positivo (*VP*) os indivíduos onde o teste é positivo em pacientes doentes; verdadeiro negativo (*VN*) os indivíduos onde o teste é negativo em paciente saudáveis; falso positivo (*FP*) os indivíduos onde o teste é positivo em pacientes saudáveis; e falso negativo (*FN*) representa os indivíduos onde o teste é negativo em pacientes doentes (MOREIRA *et al.*, 2011; VIEIRA, 2011).

Tabela 1: Tabela de contingência para validação de teste diagnóstico com duas variáveis.

Resultado verdadeiro (padrão ouro)	Resultado esperado (teste diagnóstico)	
	Positivo	Negativo
Positivo	<i>VP</i> (verdadeiro positivo)	<i>FN</i> (falso negativo)
Negativo	<i>FP</i> (falso positivo)	<i>VN</i> (verdadeiro negativo)

As tabelas de contingência mais simples são tabelas com duas amostras, que contam as respostas por duas variáveis. No entanto, pode-se categorizar os dados por três ou mais variáveis, cruzando-as. Uma análise de correspondência simples pode detectar associações em tabelas de contingência que categorizam dados por mais de duas variáveis (AGRESTI, 2007).

Da comparação dos resultados da Tabela 1, obtém-se os seguintes indicadores:

- Sensibilidade (*S*): é definida como a probabilidade do teste ser positivo dado que o paciente examinado é doente. Mede a capacidade de reação do teste em um paciente doente.

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

- Especificidade (E): é definida como a probabilidade do teste ser negativo dado que o paciente examinado não é doente, ou seja, o teste é específico para a patologia em questão.

$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

- Acurácia (A) ou precisão: é a proporção de predições corretas, ou seja, o total de verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos, em relação à amostra estudada. Informa se os resultados representam a “verdade” ou o quanto se afastam dela (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003; VIEIRA, 2011).

$$A = \frac{VP + VN}{VP + VN + FN + FP}$$

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi – UAM, com Certificado de Avaliação e Apreciação Ética (CAAE) No. 23457019.9.0000.5492 seguindo as diretrizes brasileiras para pesquisa em seres humanos. Todos os pacientes submetidos à pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que informava todo o procedimento a ser realizado, bem como os riscos e benefícios da pesquisa.

3.2 Seleção dos pacientes

Para o estudo foram avaliadas 186 amostras de soro: 21 amostras do grupo normal (72 espectros), 90 amostras do grupo leucêmico (233 espectros de LLA e 36 espectros de LMA, totalizando 234 espectros do grupo leucêmico) e 75 amostras do grupo outros tipos de câncer (81 espectros de sarcoma, 81 espectros de blastoma, 36 espectros de carcinoma e 27 espectros de linfoma, totalizando 225 do grupo outros tipos de câncer) (Tabela 2). Tais amostras de soro sanguíneo de crianças e adolescentes foram selecionadas no laboratório de análises clínicas do Centro de Tratamento Infantojuvenil Fabiana Macedo de Moraes (CTFM) em São José dos Campos, SP e do Hospital Municipal Infantil Menino Jesus em São Paulo, SP.

O estudo incluiu amostras de soro sanguíneo de crianças e adolescentes com idade entre 0 e 19 anos ($9,81 \pm 6$ anos – crianças e adolescentes), submetidos à tratamento oncológico (leucemias – LLA e LMA, sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma) e cirúrgico, de patologias oncológicas e não oncológicas, e soro sanguíneo de crianças sabidamente saudáveis sob o ponto de vista hematológico, provenientes de cirurgias eletivas sem processo infeccioso e inflamatório estabelecido e atendidos no CTFM e no Hospital Municipal Infantil Menino Jesus.

Tabela 2: Número de amostras e número de espectros Raman em cada grupo histopatológico e o tipo de câncer diagnosticado.

Classificação histopatológica	Número de amostras	Número de espectros Raman
Normal	21 amostras	72 espectros
Leucêmico	LLA – 78 amostras	LLA – 233 espectros
	LMA – 12 amostras	LMA – 36 espectros
Outros tipos de câncer	Sarcoma – 27 amostras	Sarcoma – 81 espectros
	Blastoma – 27 amostras	Blastoma – 81 espectros
	Carcinoma – 12 amostras	Carcinoma – 36 espectros
	Linfoma – 9 amostras	Linfoma – 27 espectros

Foram excluídas do estudo as amostras de soro sanguíneo de pacientes que não possuíam material em condições adequadas para análise e em quantidade suficiente para análise e amostras de soro do grupo normal que apresentavam doença infecciosa associada.

A obtenção das amostras se deu por coletas sanguíneas realizadas de veias periféricas de crianças e adolescentes pelo método de sistema fechado a vácuo em tubos de ensaio sem anticoagulante e com ativador de coágulo contendo gel. Um volume de 5 mL de sangue periférico foi coletados e então centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos para obtenção do soro. No CTFM, as amostras foram avaliadas pelos métodos tradicionais de análises e foram identificadas como saudáveis (grupo normal) ou oncológicas (grupos leucêmicas ou outros tipos de câncer).

Estas amostras foram acondicionadas em caixas térmicas (temperatura entre 2 e 8 °C) de forma a evitar interferência da temperatura nas amostras sanguíneas e em seus elementos bioquímicos, e estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Espectroscopia Raman do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ), associado à Universidade Anhembi Morumbi (UAM) no Parque Tecnológico de São José dos Campos-SP, para a realização dos experimentos. No CITÉ as amostras foram armazenadas em freezer (temperatura entre -25°C e -18°C) para evitar alterações na constituição bioquímica sérica devido às variações de temperatura, mantendo as amostras íntegras.

No dia da aquisição dos espectros Raman, as amostras de soro sanguíneo foram descongeladas em temperatura ambiente e foram separadas em três grupos: grupo normal (pacientes hígidos), grupo leucêmico (pacientes com leucemia

linfoblástica aguda – LLA e leucemia mieloide aguda – LMA) e grupo outros tipos de câncer (pacientes com sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma), de acordo com os diagnósticos anatomopatológicos (método diagnóstico convencional) extraídos dos prontuários.

Para a coleta do espectro Raman e análise das amostras foram utilizados 80 μL de soro sanguíneo, sendo usada uma micropipeta monocal de volume até 200 μL (modelo P200, Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda., SP, Brasil) com ponteira descartável. As amostras foram depositadas em um porta amostras de alumínio com orifícios de 80 μL , sendo limpo antes de cada uso.

3.3 Espectrômetro Raman

Os espectros das amostras de soro sanguíneo foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Raman dispersivo no infravermelho próximo (modelo Dimension P1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA), como mostrado na Figura 5. O espectrômetro utiliza laser de diodo em 830 nm como fonte de excitação, acoplado a uma sonda Raman por um cabo de fibras ópticas (modelo Vector Probe, Lambda Solutions Inc.), obtendo-se 400 mW de potência laser na saída de excitação da sonda Raman. O espectrômetro possui uma grade de difração que promove a dispersão da luz espalhada na faixa espectral (faixa de comprimento de onda) entre 400 e 1800 cm^{-1} , e a direciona ao detector *back thinned, deep-depletion CCD (charge coupled device)* de 1340 x 100 pixels, refrigerada por Peltier a $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, fornecendo resolução espectral de aproximadamente 2,5 cm^{-1} .

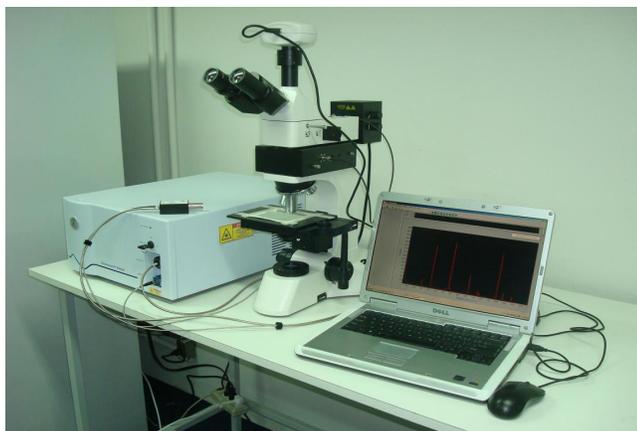


Figura 5: Espectrômetro Raman com “Raman probe” (modelo Dimension P1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA).

A verificação da calibração do deslocamento Raman foi realizada no início do experimento tomando o espectro de naftaleno, e a correção da resposta espectral do espectrômetro e sonda foi realizada utilizando uma lâmpada de tungstênio com intensidade calibrada, procedimentos descritos em Silveira *et al.* (2002).

3.4 Coleta dos espectros

Os espectros Raman foram obtidos a partir de amostras de soro sanguíneo sem qualquer preparação. O volume de 80 μL do soro armazenado no tubo de ensaio foi pipetado, colocado em um porta amostras e submetido à espectroscopia Raman. O tempo de exposição da amostra para a obtenção de cada espectro foi de 3 s com 10 acumulações (30 s de tempo total de exposição), e o espectro de cada amostra foi tomado de três (amostras dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer) a seis repetições (amostras do grupo normal) movendo-se o porta amostras lateralmente em diferentes pontos, para fins estatísticos.

Os espectros Raman coletados foram submetidos a pré-processamento para remoção da fluorescência e espalhamento de fundo (sinal de *background* Raman), ajustando e subtraindo um polinômio de ordem seis em toda a faixa espectral de 400 a 1800 cm^{-1} ; a cada espectro uma rotina foi implementada no *software* MatLab 7.01 (versão 2007a, The MathWorks Inc., MA, EUA). Picos de raios cósmicos foram removidos manualmente e então os espectros foram normalizados pela área sob a curva (LASH, 2012). O pré-processamento é importante para diminuir possíveis interferências coletados durante a aquisição dos espectros, maximizando o sinal obtido para análise. Após o processamento, um espectro do grupo leucêmico foi excluído devido à baixa relação sinal-ruído, totalizando 233 amostras neste grupo. O conjunto de dados final correspondeu a um total de 566 espectros Raman de 186 amostras de soro, já descritos na Tabela 2.

3.5 Análise estatística e análise exploratória por PCA

Neste estudo, a análise exploratória foi realizada com a PCA para identificar quais Escores (Escore 1 a Escore 8) apresentaram diferenças espectrais entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer e quais componentes principais (PC) apresentaram diferenças estatisticamente significativas em suas

intensidades entre os grupos. O *software* Chemoface (versão 1.65, UFLA, MG, Brasil) foi utilizado para realizar a PCA.

Os picos mais intensos no espectro Raman médio dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer foram marcados. O teste ANOVA de uma via (*one way* ANOVA, $p < 0,05$) foi aplicado aos picos com distribuição gaussiana, e o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) foi aplicado aos picos com distribuição não gaussiana a fim de avaliar os picos estatisticamente significativos (picos descritos na Tabela 3). Esses picos foram atribuídos aos elementos bioquímicos do soro sanguíneo, de acordo com a literatura publicada (ANASTASIA; DMITRY; BRATCHENKO, 2017; BAI *et al.*, 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; HU; SMITH; SPIRO, 1986; MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2018; SJÖBERG *et al.*, 2014).

Para PCs com distribuição gaussiana (PC4 e PC6) foi aplicado o teste ANOVA, e para PCs com distribuição não gaussiana (PC1, PC2, PC3, PC5, PC7 e PC8), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para aceitar a hipótese nula foi utilizado valor de $p > 0,05$, e para rejeitar a hipótese nula foi considerado o valor de $p < 0,05$.

3.6 Análise discriminante por PLS

Neste estudo, a PLS foi usada para discriminar os espectros em grupos: normal, leucêmico e outros tipos de câncer (ANDRIES; HEYDEN, 2021). O *software* Chemoface (versão 1.65, UFLA, MG, Brasil) foi usado para construir modelos de discriminação baseado em PLS-DA aplicado a espectros Raman com validação cruzada dos espectros do tipo “deixe um de fora” (*leave-one-out*) e em alguns modelos foi utilizado normalização dos dados por variação normal padrão (*standard normal variate* – SNV) (NUNES *et al.*, 2012).

Foram desenvolvidos sete modelos de discriminação baseados em PLS-DA para classificar os dados Raman: modelo no qual foram usados os espectros de soro sanguíneo de todos os grupos e criadas duas classes: normal e leucêmico + outros tipos de câncer, sem processamento e com cinco variáveis latentes (VLs); modelo com três classes: normal, leucêmico e outros tipos de câncer, utilizando SNV com seis variáveis latentes (VLs); modelo em que foram usados os espectros de soro sanguíneo de todos os grupos e criadas sete classes: normal, LLA, LMA, sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma, sem nenhum processamento e com oito VLs; modelo em que foram utilizados os espectros de soro sanguíneo dos grupos leucêmico e

outros tipos de câncer, com duas classes, sem processamento SNV e com cinco VLs; modelo no qual se propôs a discriminação dos espectros do grupo leucêmico, com duas classes, LLA e LMA, sem processamento e uma VL; modelo no qual foi usado os espectros do grupo leucêmico e espectros de sujeitos com sarcoma, sem processamento e quatro VLs e modelo que propôs a diferenciação dos espectros do grupo leucêmico e sujeitos com linfoma, sem processamento e com três VLs.

Com os resultados obtidos a partir das discriminações do soro sanguíneo, seis matrizes de confusão foram criadas; em seguida, e a partir dos modelos de discriminação construídos, a sensibilidade, a especificidade e a acurácia foram calculadas para cada modelo. As comparações realizadas em cada modelo desenvolvido foram:

- Grupo normal x grupo câncer (leucêmico + outros tipos de câncer) – 2 classes;
- Grupo normal x grupo câncer (leucêmico + outros tipos de câncer) – 3 classes;
- Grupo normal x grupo câncer (LLA + LMA + carcinoma + blastoma + sarcoma + linfoma) – 7 classes;
- Grupo leucêmico x outros tipos de câncer
- LLA x LMA;
- Grupo leucêmico x sarcoma;
- Grupo leucêmico x linfoma.

4. RESULTADOS

4.1 Espectros Raman

A Figura 6 apresenta os espectros Raman médios obtidos do soro dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer e os espectros da diferença: normal – leucêmico e normal – outros tipos de câncer; estes espectros estão deslocados no eixo y para melhor visualização. Os picos mais intensos foram marcados nos espectros médios e nos espectros da diferença e suas significâncias estatísticas foram analisadas.

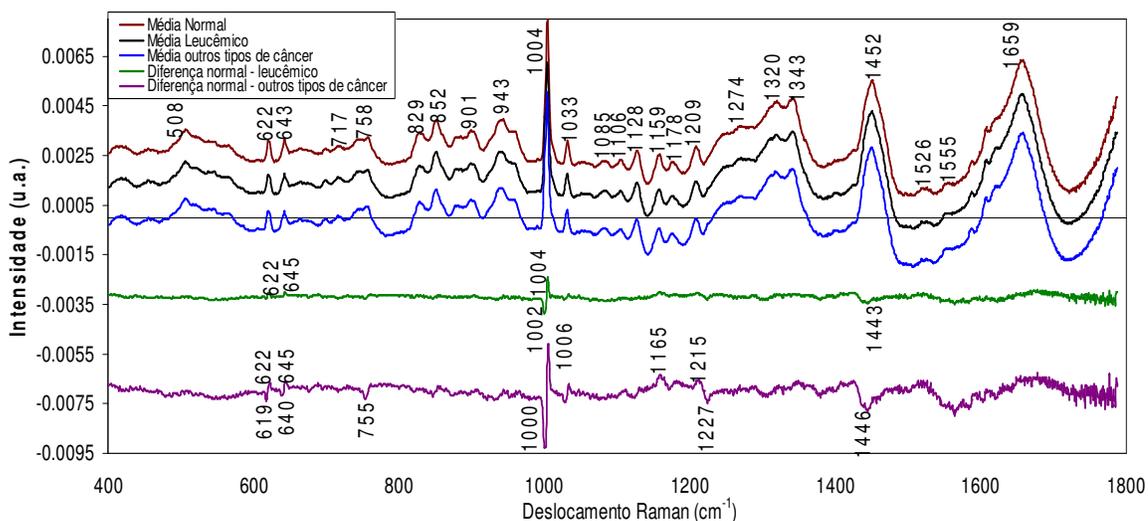


Figura 6: Espectros Raman médio do soro dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer e espectros da diferença, normal – leucêmico e normal – outros tipos de câncer. Os espectros foram deslocados para melhor visualização.

Analisando os espectros médios do soro sanguíneo dos grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer apresentados na Figura 6, verificou-se que eles são dominados por picos característicos das proteínas: albumina e globulinas. Essas proteínas estão representadas pelos picos: 829 e 852, 943, 1004, 1343, 1452 e 1659 cm^{-1} .

No espectro da diferença normal – leucêmico (Figura 6) foram marcados os picos mais intensos e realizada a análise estatística. Os picos em 622 cm^{-1} (fenilalanina), 1002 cm^{-1} (fenilalanina e β -caroteno), 1004 cm^{-1} (fenilalanina e β -caroteno) e 1443 cm^{-1} (proteína, fosfolipídios e aminoácidos) apresentaram intensidade com distribuição gaussiana, sendo utilizado o teste ANOVA ($p < 0,05$);

todos esses picos apresentaram diferença estatisticamente significativa na média das intensidades. O pico 645 cm^{-1} apresentou distribuição não gaussiana, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e apresentou diferença estatisticamente significativa. Analisando o espectro da diferença, observou-se que os picos em 622 e 1004 cm^{-1} são mais intensos no grupo normal e os picos em 1002 cm^{-1} e 1443 cm^{-1} são mais intensos no grupo leucêmico.

No espectro da diferença normal – outros tipos de câncer também foram marcados e os picos mais intensos e suas significâncias estatísticas foram avaliadas. Os picos em 619 cm^{-1} (fenilalanina), 640 cm^{-1} (tirosina), 645 cm^{-1} (tirosina), 755 cm^{-1} (triptofano), 1165 cm^{-1} (β -caroteno), 1215 cm^{-1} (triptofano, fenilalanina, amida III, adenina e timina) e 1446 cm^{-1} (proteínas, fosfolipídios e aminoácidos) apresentaram distribuição gaussiana e o teste ANOVA ($p < 0,05$) foi aplicado, sendo que todos eles apresentaram diferença estatisticamente significativa. Os picos em 622 cm^{-1} (fenilalanina), 1000 cm^{-1} (fenilalanina), 1006 cm^{-1} (β -caroteno) e 1227 cm^{-1} (proteínas e fosfolipídios) apresentaram distribuição não gaussiana, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e com todos eles apresentando diferença estatisticamente significativa. Os picos em 622 , 645 , 1006 , 1165 e 1215 cm^{-1} foram mais intensos no grupo normal e os picos em 619 , 640 , 755 , 1000 , 1227 e 1446 cm^{-1} foram mais intensos no grupo outros tipos de câncer.

A Tabela 3 apresenta as posições dos picos Raman do soro sanguíneo, a constituição bioquímica e as atribuições conforme pesquisa da literatura publicada (ANASTASIA; DMITRY; BRATCHENK, 2017; BAI *et al.*, 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; HU; SMITH; SPIRO, 1986; MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2018; SJÖBERG *et al.*, 2014), bem como a significância estatística (valor de p) das intensidades dos picos entre grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer. No Apêndice A é apresentada figura com marcações coloridas para melhor visualização, com as posições dos picos das principais bandas Raman do soro sanguíneo, atribuição de acordo com a literatura publicada e significância estatística (valor de p) das intensidades dos picos entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer.

Tabela 3: Posição dos picos das principais bandas Raman do soro sanguíneo, atribuição de acordo com a literatura publicada e significância estatística (valor de p) das intensidades dos picos entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer.

Posição do pico (cm^{-1})	Atribuição	Referências	Significância estatística (valor de p)
622	Fenilalanina [t(C–C)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; MARTÍNEZ-ESPINOSA <i>et al.</i> , 2009)	$p < 0,0001^{**}$
643	Tirosina [δ (anel aromático)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0001^*$
717	Polissacarídeos (C–H); DNA – adenina [δ (anel aromático)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0,0003^*$
758	Triptofano [δ (anel aromático)], [δ (esqueleto)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0212^*$
829	Triptofano/tirosina (anel aromático); glutaciona [γ (C _m H)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014, SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0,00126^*$
852	Prolina (estiramento C–C); proteínas (colágeno)	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	NS*
901	Triptofano/tirosina (anel aromático); glutaciona (estiramento C–C); DNA [δ (anel aromático)]	(SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	NS*
943	Lipídios (estiramento C–C)	(ANASTASIA; DMITRY; BRATCHENKO, 2017; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	NS*

(Continua)

(Continuação)

1004	Fenilalanina (respiração do anel); β -caroteno (estiramento C–C do anel aromático)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; HU; SMITH; SPIRO, 1996)	$p < 0,0001^{**}$
1033	Fenilalanina; Triptofano/tirosina (anel aromático)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	NS*
1085	Fosfolipídios (vibração C–C), DNA (O–P–O)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0001^*$
1106	Fenilalanina (respiração do anel); triptofano/tirosina (anel aromático)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	NS*
1128	Proteínas (estiramento C–C); fosfolipídios	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	NS*
1159	β -caroteno [δ (C–C–H)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0001^{**}$
1178	Tirosina (anel aromático); fenilalanina [(respiração do anel, ν (meio do anel de pirrol) _{assim}]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; HU; SMITH; SPIRO, 1996)	$p < 0,0001^*$
1320	Triptofano (anel aromático); lipídios (fosfolipídio) [t(C–H)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0001^*$
1343	Colágeno; lipídios (CH ₃ /CH ₂)	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0,0002^{**}$

(Continua)

(Continuação)

1452	Proteína [$\delta(\text{CH}_2)$]; fosfolipídios [$t(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$]; aminoácidos [$\delta(\text{C-N-H})$]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0113^*$
1526	β -caroteno [$\nu(\text{C-N})$]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0022^{**}$
1555	Triptofano (anel aromático); amida II [$\nu(\text{C-N})$], [$\beta(\text{N-H})$]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0001^*$
1659	Proteínas, colágeno, [$\delta(\text{anel})$]; amida I [$\nu(\text{C=O})$]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0,0001^{**}$

Abreviaturas: DNA – ácido desoxirribonucleico, NS^* – estatisticamente não significativo com distribuição gaussiana (teste ANOVA), NS^{**} – estatisticamente não significativo com distribuição não gaussiana (teste Kruskal-Wallis).

Símbolos para vibrações: ν – estiramento, t – torção, δ – deformação, γ – forte, β – flexão.
Símbolos: * distribuição gaussiana (teste ANOVA), ** distribuição não gaussiana (teste Kruskal-Wallis).

Analisando estatisticamente os picos marcados nos espectros médios e apresentados na Tabela 3, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer nos seguintes picos: 643 cm^{-1} (tirosina), 717 cm^{-1} (adenina), 758 cm^{-1} (triptofano), 829 cm^{-1} (triptofano/tirosina, glutatona), 1085 cm^{-1} (tirosina e fenilalanina), 1178 cm^{-1} (tirosina, fenilalanina), 1274 cm^{-1} (proteínas – amida III), 1320 cm^{-1} (triptofano e fosfolipídios), 1452 cm^{-1} (proteínas, fosfolipídios e aminoácidos), 1555 cm^{-1} (proteínas – amida II e triptofano) e 1659 cm^{-1} [proteínas – colágeno (α -hélice, e amida I)] (teste ANOVA, $p < 0,05$), e nos picos: 622 cm^{-1} (fenilalanina), 1004 cm^{-1} (fenilalanina, β -caroteno), 1159 cm^{-1} (β -caroteno), 1209 cm^{-1} (proteínas – amida III, fenilalanina e triptofano, adenina e timina), 1343 cm^{-1} (triptofano, fosfolipídios, adenina e guanina) e 1526 cm^{-1} (β -caroteno) (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$); todos esses picos no espectro do grupo normal foram mais intensos quando comparados aos grupos leucêmico e outros tipos de câncer.

Os picos em 1085 cm^{-1} (pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; normal *versus* leucêmico $p > 0,001$; normal *versus* outros tipos de câncer $p > 0,001$ e leucêmico *versus* outros tipos de câncer $p > 0,001$) e 1178 cm^{-1} (pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; normal *versus* leucêmico $p > 0,001$; normal *versus* outros tipos de câncer $p > 0,001$ e leucêmico *versus* outros tipos de câncer $p > 0,05$) apresentaram distribuição gaussiana e possibilitaram diferenciar os três grupos: normal, leucêmico e outros tipos de câncer, sendo mais intensos no grupo normal. O pico em 1159 cm^{-1} (pós-teste de múltiplas comparações de Dunn, normal *versus* leucêmico $p > 0,001$; normal *versus* outros tipos de câncer $p > 0,001$ e leucêmico *versus* outros tipos de câncer $p > 0,05$) apresentou distribuição não gaussiana e possibilitou diferenciar os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer, com maior intensidade no grupo normal. Os picos com distribuição gaussiana em 643 , 1320 , 1452 cm^{-1} (pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, $p < 0,05$) apresentaram diferença estatisticamente significativa na discriminação dos grupos normal *versus* leucêmico e normal *versus* outros tipos de câncer. Os picos em 1004 , 1209 e 1343 cm^{-1} (pós-teste de múltiplas comparações de Dunn, $p > 0,05$) também possibilitaram diferenciar os grupos normal *versus* leucêmico e normal *versus* outros tipos de câncer com diferença estatisticamente significativa. Já os picos em 758 e 1274 cm^{-1} com distribuição gaussiana (pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, $p > 0,05$) e o pico em 1526 cm^{-1} com distribuição não gaussiana (pós-teste de múltiplas comparações de Dunn, $p > 0,05$) apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos leucêmico *versus* outros tipos de câncer.

Os picos em 852 , 901 , 943 , 1033 , 1106 e 1128 cm^{-1} (teste ANOVA, $p > 0,05$) e o pico em 508 cm^{-1} (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos, sugerindo que não são significativos para diferenciar os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer.

4.2 Análise exploratória dos espectros do soro sanguíneo por PCA

A técnica de PCA foi utilizada para identificar as características espectrais que apresentavam diferenças entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer. A PCA extrai as informações mais significativas (com base na variância) de um conjunto de dados original, gerando duas novas variáveis: os componentes principais PC e Escore. Os PCs indicam as intensidades de cada carregamento que

está presente nos dados originais e os Escores representam os eixos de variância espectral e se assemelham aos espectros Raman. As diferenças espectrais podem estar correlacionadas às alterações bioquímicas em amostras de soro sanguíneo de pacientes com leucemias e com outras neoplasias (grupo outros tipos de câncer) em relação às amostras dos sujeitos normais. A Figura 7 mostra o gráfico de PCs e Escores de amostras de soro; são apresentadas as primeiras oito variáveis de PCA. Essas variáveis representam cerca de 98,8% da variância total observada nos dados espectrais (96,8%, 0,71%, 0,48%, 0,33%, 0,19%, 0,12%, 0,09% e 0,07 % para Escore 1 a Escore 8, respectivamente).

Foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer em alguns PCs. Os PC1, PC2, PC3 e PC7 (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) e PC6 (teste ANOVA, $p < 0,05$) apresentaram diferenças estatisticamente significativas, enquanto os PC4 (teste ANOVA, $p < 0,05$), PC5 e PC8 (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

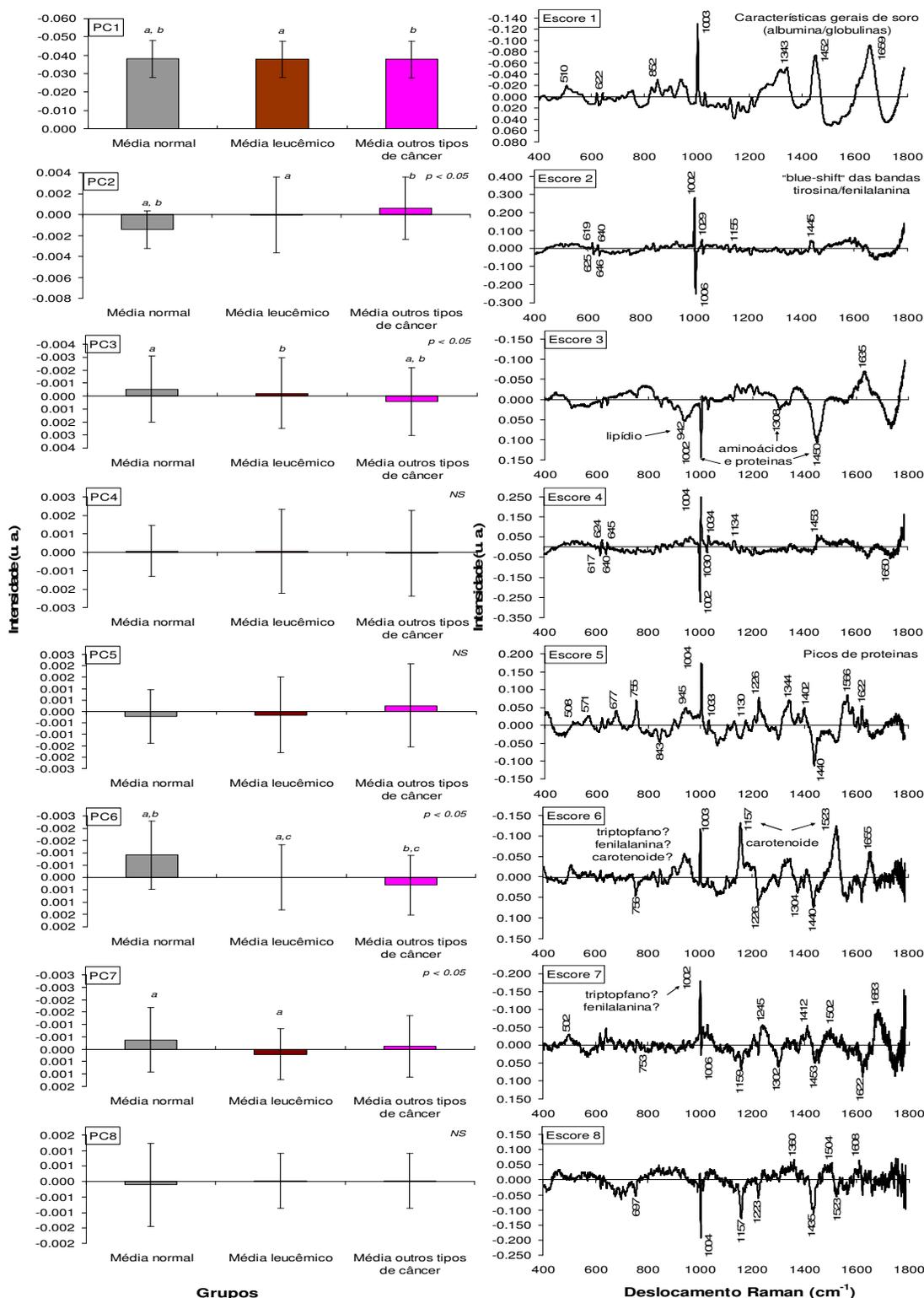


Figura 7: Gráficos das variáveis: componentes principais PCs e Escores do conjunto de dados do soro Raman para análise exploratória. A letras sobrescritas *a*, *b* e *c* nos PCs indicam significância estatística [teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico) para PC1, PC2, PC3, PC5, PC7 e PC8 e teste ANOVA (teste paramétrico) para PC4 e PC6 ($p < 0,05$)] entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer, respectivamente. *NS*: estatisticamente não significativo ($p > 0,05$).

O Escore 1 (Figura 7) apresentou picos positivos característicos da albumina sérica (852, 1452 e 1659 cm^{-1}) (IVANOV *et al.*, 2002; SAHA; YAKOVLEV, 2010) com diferenças estatisticamente significativas no PC1, sugerindo que as quantidades de albumina são diferentes nos grupos; o PC1 sugeriu que o soro de amostras do grupo normal tinha maior quantidade de albumina do que o soro de amostras leucêmicas e dos outros tipos de câncer (pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, normal *versus* leucêmico, $p < 0,01$, normal *versus* outros tipos de câncer, $p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa no PC1 do grupo leucêmico *versus* o grupo outros tipos de câncer (pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, normal *versus* leucêmico, $p > 0,05$), sugerindo que tal componente não foi relevante para diferenciar os grupos de câncer.

No Escore 2 da Figura 7, ocorreu o “deslocamento para o azul” (deslocamento para alta energia vibracional) nos picos em 1004 cm^{-1} (picos invertidos em 1002 e 1006 cm^{-1}) e em 619 e 640 cm^{-1} (picos invertidos em 619/625 e 640/646 cm^{-1}) das amostras do grupo leucêmico e outros tipos de câncer em relação ao grupo normal. No PC2, há diferença estatisticamente significativa entre os grupos normal e leucêmico (teste de Dunn, $p < 0,001$), no entanto os dados apresentados pelo grupo leucêmico foram considerados zero, e observa-se também diferença estatisticamente significativa entre os grupos normal e outros tipos de câncer (teste de Dunn, $p < 0,001$).

O Escore 3 (Figura 7) apresentou pico positivo em 1635 cm^{-1} nos grupos normal e leucêmico e é atribuído a aminoácidos (tirosina e triptofano); os picos negativos em 942 cm^{-1} (atribuído a lipídios) e em 1002, 1308 e 1450 cm^{-1} (atribuídos a proteínas e aminoácidos) estão presentes no grupo outros tipos de câncer. No PC3, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos normal e outros tipos de câncer (teste de Dunn, $p < 0,01$) e entre os grupos leucêmico e outros tipos de câncer (teste de Dunn, $p < 0,05$). Na comparação entre os grupos normal e leucêmico, não houve diferença estatisticamente significativa (teste de Dunn, $p > 0,05$).

A informação espectral apresentada no Escore 4 (Figura 7): picos positivos em 624, 645, 1004, 1034, 1134 e 1453 cm^{-1} e picos negativos em 617, 640, 1002, 1030 e 1650 cm^{-1} , Escore 5: picos positivos em 508, 571, 677, 755, 945, 1004, 1033, 1130, 1226, 1344, 1402, 1566 e 1622 cm^{-1} e picos negativos em 843 e 1440 cm^{-1} , e Escore 8: picos positivos em 1360, 1504 e 1608 cm^{-1} e picos negativos em 697, 1004, 1157, 1223, 1435 e 1523 cm^{-1} , podem ser associados aos picos de proteínas e

aminoácidos nas amostras de soro; embora presentes em quantidades diferentes no soro dos três grupos analisados, esses compostos não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas intensidades de PC4, PC5 e PC8 (teste ANOVA, $p = 0.7849$; teste de Kruskal-Wallis, $p = 0.0600$; e teste de Kruskal-Wallis, $p = 0.6082$, respectivamente), portanto, tais picos não foram relevantes para a diferenciação dos grupos estudados.

O Escore 6 (Figura 7) apresentou picos positivos em 1003, 1157, 1523 e 1655 cm^{-1} e picos negativos em 756, 1226, 1304 e 1440 cm^{-1} com diferença estatisticamente significativa no PC6 (teste ANOVA, $p < 0,05$). Os picos positivos podem ser atribuídos a carotenoides (BANKAPUR *et al.*, 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS; ESPINOSA; ROMÁN; ANDA, 2014; MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009), sugerindo que esses compostos são maiores no grupo normal quando comparado ao grupo outros tipos de câncer, com diferença estatisticamente significativa (PC6, pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, $p < 0,001$); os picos negativos são maiores no grupo outros tipos de câncer e podem ser atribuídos a aminoácidos e proteínas, apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo normal (PC6, pós-teste de Tukey-Kramer, $p < 0,001$). Foi considerando que os dados apresentados pelo grupo leucêmico são zero.

O Escore 7 (Figura 7) apresentou picos positivos em 502, 1002, 1245, 1412, 1502 e 1683 cm^{-1} nos grupos normal e outros tipos de câncer, os quais podem ser atribuídos a proteínas e aminoácidos; e picos negativos em 753, 1006, 1159, 1302, 1453 e 1622 cm^{-1} que estão presentes no grupo leucêmico e também podem ser atribuídos a proteínas e aminoácidos; PC7 mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos normal e leucêmico (pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, $p < 0,001$) e entre os grupos leucêmico e outros tipos de câncer (pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, $p < 0,001$). Os picos negativos de proteínas e aminoácidos presentes no SC7 são mais intensos no grupo normal, sugerindo que esses compostos são mais frequentes em indivíduos saudáveis do que em indivíduos com câncer (grupos leucêmico e outros tipos de câncer).

4.3 Análise discriminante dos espectros do soro sanguíneo por PLS

Os resultados dos modelos de discriminação dos espectros do soro sanguíneo foram tabulados nas tabelas de contingência (Tabelas 4 e 5), nas quais

foram calculadas a sensibilidade, especificidade e acurácia para cada modelo construído.

A Tabela 4 apresenta a discriminação baseada em PLS-DA com todos os grupos (normal, leucêmico e outros tipos de câncer), usando duas classes (normal e leucêmico + outros tipos de câncer), sem processamento e com cinco variáveis latentes (VLs); usando três classes (normal, leucêmico e não leucêmico) com normalização SNV e seis VLs e usando sete classes, usando três classes (normal, leucêmico e outros tipos de câncer), com normalização SNV e seis VLs e usando sete classes (normal, LLA, LMA, sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma), sem nenhum processamento e com oito VLs. Com duas classes (cinco VLs e sem processamento), a sensibilidade foi de 99%, a especificidade foi de 67% e a acurácia foi de 95%, com três classes (seis VLs e SNV) a acurácia máxima (sucesso de classificação) foi de 66,4%, com sensibilidade de 98,5% e especificidade de 56,9%. Com sete classes (oito VLs e sem processamento) a acurácia máxima foi de 59,5%, com sensibilidade de 88,0% e especificidade de 81,9%.

Tabela 4: Tabela de contingência com os resultados da discriminação baseada em PLS (PLS-DA) aplicada aos espectros Raman de grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer usando duas classes (normal e leucêmico + outros tipos de câncer), com cinco VLs e sem processamento, usando três classes (normal, leucêmico e outros tipos de câncer) com seis VLs e usando SNV e com sete classes (normal, LLA, LMA, sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma) com oito VLs e sem processamento.

Diagnóstico Raman (PLS-DA) com cinco VLs sem			
Diagnóstico (método convencional)	processamento		
	Normal	Leucêmico + Outros tipos de câncer	
Normal ($n = 72$)	48	24	
Leucêmico ($n = 269$)			
+ Outros tipos de câncer ($n = 225$)	3	491	
Sensibilidade*		99,3%	
Especificidade*		67,6%	
Acurácia		95,2%	
Diagnóstico Raman (PLS-DA) com seis VLs usando SNV			
Diagnóstico (método convencional)	Normal	Leucêmico	Outros tipos de câncer
Normal ($n = 72$)	41	14	17
Leucêmico ($n = 269$)	3	199	67
Outros tipos de câncer ($n = 225$)	2	87	136
Sensibilidade*		98,5%	
Especificidade*		56,9%	
Acurácia		66,4%	

(Continua)

(Continuação)

Diagnóstico (método convencional)		Diagnóstico Raman (PLS-DA) com oito VLs sem processamento						
		Normal	Leucêmico		Outros tipos de câncer			
			LLA	LMA	Sarc	Blast	Carc	Linf
Normal	(n = 72)	59	9	0	4	0	0	0
Leucêmico	LLA (n = 233)	6	202	0	18	7	0	0
	LMA (n = 36)	4	27	0	5	0	0	0
	Sarc (n = 81)	6	35	0	33	7	0	0
Outros tipos de câncer	Blast (n = 81)	15	49	0	6	11	0	0
	Carc (n = 36)	7	18	0	9	2	0	0
	Linf (n = 27)	0	19	0	4	4	0	0
Sensibilidade*					88,0%			
Especificidade*					81,9%			
Acurácia					59,5%			

Abreviaturas: LLA – Leucemia linfóide aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda; Sarcoma – Sarc; Blastoma – Blast; Carcinoma – Carc; Linfoma – Linf; SNV – *standard normal variate*. Símbolo: * Sensibilidade e especificidade calculadas com base na comparação do grupo normal *versus* grupo câncer (leucêmico + outros tipos de câncer).

A Tabela 5 apresenta a discriminação baseada em PLS-DA entre os cânceres, sendo processadas discriminações entre os grupos leucêmico e outros tipos de câncer (duas classes, com cinco VLs e sem processamento), entre o grupo leucêmico, separando-o em duas classes, LLA e LMA (duas classes, com uma VL e sem processamento), entre o grupo leucêmico e indivíduos com linfoma (duas classes, com três VLs e sem processamento) e entre o grupo leucêmico e indivíduos com sarcoma (duas classes, com quatro VLs e sem processamento).

Tabela 5: Tabela de contingência com os resultados da discriminação baseada em PLS (PLS-DA) aplicada aos espectros Raman dos grupos leucêmico e outros tipos de câncer (duas classes, cinco VLs e sem processamento), discriminação entre o grupo leucêmico, LLA e LMA (duas classes, uma VL e sem processamento), entre o grupo leucêmico e sujeitos com sarcoma (duas classes, com quatro VLs e sem processamento) e entre o grupo leucêmico e sujeitos com linfoma (duas classes, com três VLs e sem processamento).

Diagnóstico (método convencional)	Diagnóstico Raman (PLS-DA) com cinco VLs sem processamento	
	Leucêmico	Outros tipos de câncer
Leucêmico (<i>n</i> = 269)	195	74
Outros tipos de câncer (<i>n</i> = 225)	90	135
Sensibilidade		72,5%
Especificidade		60,0%
Acurácia		66,8%

Diagnóstico (método convencional)	Diagnóstico Raman (PLS-DA) com uma VL sem processamento	
	LLA	LMA
LLA (<i>n</i> = 233)	233	0
LMA (<i>n</i> = 36)	36	0
Sensibilidade		100,0%
Especificidade		0,0%
Acurácia		86,6%

Diagnóstico (método convencional)	Diagnóstico Raman (PLS-DA) com quatro VLs sem processamento	
	Leucêmico	Sarcoma
Leucêmico (<i>n</i> = 269)	250	19
Sarcoma (<i>n</i> = 81)	45	36
Sensibilidade		92,9%
Especificidade		44,4%
Acurácia		81,7%

Diagnóstico (método convencional)	Diagnóstico Raman (PLS-DA) com três VLs sem processamento	
	Leucêmico	Linfoma
Leucêmico (<i>n</i> = 269)	269	0
Linfoma (<i>n</i> = 27)	27	0
Sensibilidade		100,0%
Especificidade		0,0%
Acurácia		90,9%

Abreviaturas: LLA – Leucemia linfóide aguda; LMA – Leucemia mieloide aguda.

Na discriminação entre o grupo leucêmico e outros tipos de câncer foi obtida acurácia máxima nas primeiras cinco VLs, sem nenhum processamento de 66,8%, sensibilidade de 72,5% e especificidade de 60,0%. Na discriminação entre o grupo leucêmico, estratificado em duas classes, LLA e LMA, obteve-se acurácia máxima de 86,6% com uma VL, sem processamento, sensibilidade de 100,0% e especificidade de 0,0%. A discriminação entre o grupo leucêmico e pacientes com sarcoma tem acurácia de 81,7% com quatro VLs, sem processamento e sensibilidade de 92,9% e especificidade de 44,4%. A discriminação entre o grupo leucêmico e sujeitos com linfoma tem acurácia de 90,9% com três VLs, sem processamento e sensibilidade de 100,0% e especificidade de 0,0%.

5. DISCUSSÃO

5.1 Comparação dos dados dos espectros Raman do soro sanguíneo com outros trabalhos

O soro sanguíneo humano é um fluido corporal complexo, composto por uma faixa dinâmica de biomoléculas, como água, proteínas (principalmente albumina e α - e β -globulinas), aminoácidos, lipoproteínas, hormônios, vitaminas, glicose e sais inorgânicos (MESCHER, 2016). Sabe-se que a análise molecular do soro sanguíneo pode fornecer informações sobre os processos metabólicos que ocorrem no organismo, e há um interesse crescente em utilizar a espectroscopia Raman para desenvolver sensores soro-específicos para biomoléculas para diagnóstico e monitoramento (MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009).

De acordo com dados da literatura publicada, os espectros do soro são dominados por características espectrais próprias das proteínas do soro sanguíneo, principalmente, albumina e globulinas (MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009; PARACHALIL *et al.*, 2019), fato este observado nos espectros Raman do soro sanguíneo obtidos no presente trabalho e apresentados na Figura 6. Martínez-Espinosa *et al.* (2009) também observaram tais características em seu trabalho, no qual obtiveram espectros Raman provenientes do soro sanguíneo de pacientes com leucemia e de voluntários saudáveis e perceberam que a presença dessas proteínas dificulta a visualização das características espectrais de compostos menos abundantes e pequenas moléculas que podem funcionar como biomarcadores, fato este também constatado neste estudo.

A literatura científica publicada mostra que as posições dos picos Raman das globulinas são semelhantes às da albumina e estão descritas nas seguintes posições: 828 e 850 cm^{-1} (dubleto da tirosina); 950 cm^{-1} (lipídio – modo de estiramento C–C); 1002 cm^{-1} (fenilalanina – $\delta(=\text{C}_b\text{H}_2)_4$, o triptofano pode dar uma pequena contribuição para a intensidade desta banda); 1350 cm^{-1} (lipídios e proteínas – modo de deformação CH_2); 1450 cm^{-1} (proteínas – modo de deformação CH_2); e 1650 cm^{-1} (proteínas – amida I, conformação α -hélice) (ANASTASIA; DMITRY; BRATCHENKO, 2017; DINGARI *et al.*, 2012; PARACHALIL *et al.*, 2019). Tais picos apresentam correspondência aos encontrados no presente estudo, sendo marcados

os seguintes picos relacionados à albumina e globulina nos espectros médios: 829 e 852, 943, 1004, 1343, 1452 e 1659 cm^{-1} .

Em estudo com amostra de soro sanguíneo de indivíduos saudáveis e leucêmicos, GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, (2014) verificaram que os picos Raman em 1338 cm^{-1} (triptofano, proteínas – α -hélice, fosfolipídios), 1447 cm^{-1} (lipídios), 1523 cm^{-1} (β -caroteno), 1556 cm^{-1} (triptofano), 1587 cm^{-1} (proteínas, tirosina), 1603 cm^{-1} (tirosina, fenilalanina) e 1654 cm^{-1} (proteínas – amida I, α -hélice, fosfolipídios) foram menos intensos nos leucêmicos em comparação aos indivíduos saudáveis. Esses achados corroboram com os deste estudo, visto que os picos em 1343, 1452, 1555 e 1659 cm^{-1} do presente estudo foram mais intensos no grupo normal (saudáveis) em comparação ao grupo leucêmico.

SILVA *et al.*, (2018) aplicaram a espectroscopia Raman em amostras de sangue total e plasma para identificar diferenças espectrais entre indivíduos saudáveis e pacientes com leucemia aguda com base em seus componentes bioquímicos (proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios e carotenoides). Diferenças estatísticas foram observadas nos picos em 510 cm^{-1} (triptofano), 721 cm^{-1} (polissacarídeos), 760 cm^{-1} (tirosina), 837 cm^{-1} e 947 cm^{-1} (tirosina, triptofano e glutationa), 1004 cm^{-1} (fenilalanina), 1132 cm^{-1} (proteínas), 1160 cm^{-1} (β -caroteno), 1210 cm^{-1} (triptofano, fenilalanina, tirosina e proteínas – amida III), 1269 cm^{-1} (proteínas – amida III), 1334 cm^{-1} (triptofano), 1344 cm^{-1} (proteínas e triptofano), 1407 cm^{-1} (glutaciona), 1448 cm^{-1} (proteínas), 1455 cm^{-1} (proteínas), 1525 cm^{-1} (β -caroteno), 1630 cm^{-1} (tirosina e triptofano), 1659 cm^{-1} (fosfolipídios) e 1666 cm^{-1} (fosfolipídios) e todos os picos do espectro do grupo normal foram mais intensos quando comparados ao grupo leucêmico. Esses picos foram semelhantes aos encontrados no presente estudo e são atribuídos a proteínas, aminoácidos e β -caroteno sendo mais intensos no grupo normal (saudável) quando comparados aos grupos leucêmico e outros tipos de câncer.

5.2 Análise exploratória por PCA comparada a outros trabalhos

No Escore 1 apresentado na Figura 7 foram observados picos característicos de albumina com diferenças estatisticamente significativas no PC1, o que sugere que as quantidades de albumina são diferentes nos três grupos analisados, estando em maior quantidade no soro de amostras do grupo normal

quando comparada às amostras dos grupos leucêmico e outros tipos de câncer. Tang *et al.* (2012), relataram que indivíduos com câncer apresentam comprometimento dos sistemas de defesa, associados a processos inflamatórios que se instalam no organismo, o que culmina na redução da quantidade de albumina plasmática. Parachalil *et al.*, (2019) relataram que uma concentração normal de albumina nos fluidos corporais é considerada um sinal de boa saúde. Pesquisadores mostraram que baixos níveis de albumina sérica afetam adversamente o prognóstico do câncer (BAI *et al.*, 2020; IVANOV *et al.*, 2002). A albumina é a proteína sérica de fração de alto peso molecular mais abundante no corpo humano e é sintetizada no fígado (IVANOV *et al.*, 2002). A principal função fisiológica da albumina é manter a pressão coloidosmótica, mas nos últimos anos muitas outras funções foram reconhecidas, incluindo ligação de ligantes e transporte de várias moléculas, além de ações antioxidantes e anti-inflamatórias (ARROYO, 2002; LEE, 2012; PARACHALIL *et al.*, 2019). Vários estudos demonstraram que as funções da albumina, como ligação de ligantes e transporte de várias moléculas, podem ser aplicadas no tratamento de pacientes cirróticos (que podem evoluir para câncer) e pacientes que sofrem de outras doenças hepáticas em estágio terminal (PARACHALIL *et al.*, 2019).

No Escore 2 (Figura 7), observou-se “deslocamento para o azul” nos picos em 1004 cm^{-1} e em 619 e 640 cm^{-1} com diferença estatisticamente significativa entre os grupos normal e leucêmico no PC2. Os picos em 625 e 1002 cm^{-1} são atribuídos à fenilalanina (ARROYO, 2002; SJÖBERG *et al.*, 2014), um aminoácido aromático com picos de assinatura óbvios em um espectro Raman devido à vibração do anel benzênico. Chen *et al.* (2014) e Sjöberg *et al.* (2014) descrevem que o “deslocamento para o azul” pode ser devido à alteração conformacional da fenilalanina próxima ao anel aromático. As frequências das bandas Raman pertencentes às cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos são frequentemente deslocadas para o azul em relação às bandas correspondentes dos aminoácidos livres, especialmente no caso dos aminoácidos aromáticos. Este achado sugere que tanto a variedade de espécies de proteínas quanto a conformação das proteínas mudam em amostras de soro de grupos com cânceres (CHEN *et al.*, 2014), o que pode ter ocorrido no presente estudo no grupo outros tipos de câncer devido à observação do “deslocamento para o azul” nas amostras desse grupo.

Os achados observados no Escore 3/PC3 podem indicar que a conformação e a variedade de espécies de proteínas estão alteradas em amostras de

soro de pacientes com câncer (grupo outros tipos de câncer), como já sugerido no Escore2/PC2 (CHEN *et al.*, 2014; SANDRI, 2016; VANNA *et al.*, 2014) e o aumento nos níveis de aminoácidos pode ser explicado pela alteração no metabolismo energético de pacientes com câncer, levando à síntese de proteínas musculares e teciduais esqueléticas (gliconeogênese hepática derivado do catabolismo muscular para produção de energia) e consequente liberação de aminoácidos no soro sanguíneo, como observado nas amostras do grupo outros tipos de câncer e predispondo ao desenvolvimento da caquexia comumente observada em pacientes com câncer, comprometendo o prognóstico e a qualidade de vida desses pacientes (SANDRI, 2016).

No Escore 6/PC6, os picos atribuídos à carotenoides apresentam-se maiores no grupo normal quando comparado aos grupos com cânceres (leucêmico e outros tipos de câncer); de acordo com a literatura, os níveis mais altos de carotenoides no sangue (soro/plasma) estão associados a uma diminuição do risco de surgimento de câncer, doenças cardiovasculares, doenças cardíacas e outras causas de mortalidade conforme descrito em outros estudos (GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; PARACHALIL *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018). González-Solís *et al.* (2014) usaram a espectroscopia Raman para diferenciar o soro sanguíneo normal e leucêmico e identificar os diferentes tipos de leucemia com base nos compostos bioquímicos do soro. No espectro do grupo normal (indivíduos saudáveis) foi demonstrada a presença de maiores quantidades de carotenoides (picos em 1003, 1157 e 1523 cm^{-1}). Em um estudo com amostras de plasma sanguíneo para diferenciação entre indivíduos leucêmicos e saudáveis, Silva *et al.* (2018) encontraram picos característicos de carotenoides em concentrações mais altas no grupo normal (1004, 1159/1160 e 1520/1525 cm^{-1}) com diferença estatisticamente significativa, principalmente nos SC2/PC2 e SC4/PC4. Tais achados concordam com os encontrados no presente estudo.

5.3 Análise discriminante por PLS-DA comparada a outros trabalhos

Modelos de discriminação baseados em PLS (PLS-DA) aplicados a dados espectrais têm sido usados como preditores para a discriminação ou diferenciação entre tecidos saudáveis e neoplásicos (BARKER; RAYENS, 2003; FENG *et al.*, 2015;

HARRIS *et al.*, 2000; NGUYEN; ROCKE, 2002; PARACHALIL *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018).

Modelos de discriminação associados aos cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia foram utilizados a fim de realizar a discriminação das amostras de soro sanguíneo dos grupos analisados. A sensibilidade é a probabilidade de que o teste classifique corretamente os indivíduos com a doença (resultados positivos). A especificidade é a probabilidade de que o teste classifique corretamente indivíduos saudáveis (resultado negativo). Ao aplicar um teste diagnóstico, existe a possibilidade de classificar incorretamente os indivíduos, por exemplo, pessoas supostamente doentes que são saudáveis (falsos positivos) e pessoas supostamente saudáveis que estão doentes (falsos negativos). Por isso, os exames diagnósticos devem estar sempre associados à avaliação da história clínica do paciente, investigação da semiologia como os sinais e sintomas presentes no exame físico e resultados de exames complementares (laboratoriais, procedurais ou de imagem) para determinar a presença ou ausência de uma doença (PÉREZ *et al.*, 2021).

Na Tabela 4 foram apresentados os resultados dos modelos PLS-DA aplicados aos espectros de soro sanguíneo quando se discriminam três classes (normal, leucêmico e outros tipos de câncer) e sete classes (normal, LLA, LMA, blastoma, sarcoma, carcinoma e linfoma). De acordo com os modelos criados, observou-se que com maior número de classes (sete classes) a especificidade apresentou-se melhor, com 81,9%, e com duas classes a especificidade foi de 67,6%, e com três classes a especificidade foi de 56,9%; isto pode ser justificado pelo fato de que, com mais classes, consegue-se minimizar a variância dentro dos grupos e maximizar as diferenças entre os grupos.

Na tentativa de discriminar os cânceres entre si, alguns modelos foram desenvolvidos e apresentados na Tabela 5. Quando se propôs a discriminação entre os espectros Raman do soro de crianças e adolescentes com LLA e com LMA, observou-se que a especificidade foi de 0,0%, sendo todas as amostras de LMA classificadas com LLA; isso sugere que há uma grande semelhança entre os espectros de soro sanguíneo dessas amostras, sendo os espectros de soro de LMA muito parecidos com os de LLA. Vale ressaltar que nas leucemias agudas há um bloqueio completo da maturação das células do sangue, de modo que as células indiferenciadas (blastos) predominam no sangue do paciente. As leucemias agudas das linhagens mieloide e linfoide se originam de mutações em células indiferenciadas

que seriam precursores de linfócitos e de células mieloide (hemácias, plaquetas, neutrófilos, entre outros). No entanto, o soro sanguíneo não contém células (HOFFBRAND; MOSS, 2018; MESCHER, 2016), o que pode dificultar a discriminação dessas leucemias por avaliação de espectros Raman obtidos a partir de soro.

Na discriminação entre o grupo leucêmico (LLA e LMA) e crianças com sarcoma, a maior confusão aconteceu entre os sujeitos com diagnóstico de sarcoma, em aproximadamente 55,6% da amostra (45 espectros Raman) classificados como grupo leucêmico. Na discriminação entre o grupo leucêmico (LLA e LMA) e crianças com linfoma, obteve-se resultados similar ao obtido com o grupo leucêmico, sendo todas as amostras de linfoma classificadas como pertencentes ao grupo leucêmico. Os linfomas são doenças semelhantes às leucemias agudas, exceto que a célula que sofre as mutações (linfócito) é mais madura do que os precursores acometidos no caso das leucemias agudas (blastos). Com isso, a proliferação não será de células indiferenciadas, mas sim de linfócitos maduros. No entanto, por derivarem da mesma célula progenitora e por apresentarem alterações funcionais, elas deixam de exercer sua função normal na defesa, além de crescerem de forma descontrolada (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

A literatura disponível até o momento ainda é escassa em publicações que comparam, por meio de espectroscopia Raman e análise discriminante, pacientes saudáveis e pacientes com diferentes tipos de neoplasias, analisados por meio de soro sanguíneo, assim como são poucas as publicações em que os cânceres se diferenciam entre si pela análise no sangue, plasma ou amostras de soro. Silva *et al.* (2018) utilizaram a espectroscopia Raman no plasma sanguíneo de indivíduos saudáveis e leucêmicos e obtiveram acurácia de 97,1%, sensibilidade de 95,7% e especificidade de 98,0% nas amostras por meio da discriminação PLS-DA. Esse resultado é superior ao encontrado neste estudo, porém o conjunto de amostras utilizado no presente estudo é mais heterogêneo, os agrupamentos foram realizados entre pacientes saudáveis, pacientes com leucemias (LLA e LMA) e pacientes com outros tipos de câncer, categorizados de acordo com ao tecido que originou a neoplasia (histologia) em sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma.

Bai *et al.* (2020) estudaram as características do plasma sanguíneo em pacientes com linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e leucemia linfocítica crônica (LLC) por espectroscopia Raman com o objetivo de desenvolver um exame de sangue simples para detecção não invasiva de DLBCL e LLC. Para a discriminação,

foi utilizada a análise discriminante por mínimos quadrados ortogonais parciais (OPLS-DA), que consegue construir dois agrupamentos com quase nenhuma sobreposição entre DLBCL/CLL e normal. Para o modelo com LLC, a sensibilidade foi de 92,9% e a especificidade de 100%, enquanto para o modelo com DLBCL, a sensibilidade foi de 80,0% e a especificidade de 92,3%. Este modelo construído por Bai *et al.* (2020) não agrupa os tipos de câncer para análise de discriminação, apesar de utilizar análise estatística semelhante ao presente estudo.

Alguns estudos com sangue ou fragmentos de sangue utilizaram PCA-DA (ATKINS *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; MANAGÒ *et al.*, 2018; MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009; SJÖBERG *et al.*, 2014) em vez de PLS-DA para análise discriminante dos espectros Raman. No entanto, a PLS-DA se destaca por identificar as diferenças entre os grupos e reconhecer as variâncias obtidas dentro de cada grupo; portanto, a PLS-DA pode levar a um melhor desempenho na classificação das amostras quando comparado à PCA-DA (BEVILACQUA; MARINI, 2014).

Ao comparar a espectroscopia Raman com as técnicas convencionais e atualmente disponíveis para o diagnóstico de câncer, podem ser observadas vantagens significativas na análise do padrão espectral. A avaliação pode ser realizada de forma não invasiva ou minimamente invasiva, sem preparo de amostra, sem uso de reagentes e utilizando apenas uma pequena quantidade de soro sanguíneo (GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018). Com isso, é possível gerar um espectro Raman e diferenciar entre pacientes saudáveis e pacientes com câncer (grupos leucêmico e outros tipos de câncer) com base nas diferenças na composição bioquímica das amostras. De acordo com estudos já disponíveis na literatura, a espectroscopia Raman em amostras de sangue é uma técnica promissora, tanto para diagnóstico quanto para acompanhamento terapêutico (GONZÁLEZ-SOLÍS *et al.*, 2014; HARRIS *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2019; MARTÍNEZ-ESPINOSA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2018).

O presente trabalho reforça a utilidade da espectroscopia Raman e abre novas perspectivas para seu uso na obtenção de informações sobre alterações biomoleculares que ocorrem no corpo humano a partir do soro sanguíneo. O método pode ter uma ampla aplicação na compreensão da bioquímica básica de doenças relacionadas a doenças do sangue como LLA, LMA, sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma. No entanto, mais pesquisas são necessárias com um número maior de

amostras de indivíduos saudáveis para construir um banco de dados espectral grande o suficiente para minimizar erros de classificação, tornando os dados fornecidos pela espectroscopia Raman mais robustos para uso na prática clínica.

5.4 Estudos futuros e perspectivas da técnica Raman

O presente trabalho reforça a utilidade da espectroscopia Raman como ferramenta médica para caracterização e diferenciação de processos oncológicos e abre novas perspectivas para seu uso, visto que possibilita a obtenção de informações acerca das alterações biomoleculares que ocorrem no corpo humano em resposta ao câncer, do ponto de vista do soro sanguíneo. No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas, nas quais amostras com maior número sejam utilizadas, principalmente de indivíduos saudáveis (controle), a fim de se construir um banco de dados espectral grande o suficiente para minimizar erros de classificação; tornando as informações fornecidas pela espectroscopia Raman mais robustas para assim serem implementada na prática clínica.

A indústria vem se empenhando em desenvolver espectrômetros Raman cada vez mais compactos e de fácil utilização e manutenção, no entanto faz-se necessário equipamentos de alta sensibilidade e resolução espectral que sejam financeiramente acessíveis aos laboratórios e equipes médicas, mantendo a qualidade da coleta dos espectros e facilidade no processamento do sinal coletado. Outro importante fator a ser considerado é a simplificação da interpretação dos resultados, visto que a partir da análise dos dados colhidos por meio espectroscopia Raman, os laudos diagnósticos poderão ser liberados de forma rápida, segura e produzidos a partir de amostras minimamente invasiva, e que pode conter informação bioquímica fornecida pela interpretação dos picos Raman e ser mais uma informação auxiliar ao diagnóstico do tipo de câncer.

CONCLUSÃO

Neste estudo, a espectroscopia Raman foi aplicada em amostras de soro sanguíneo de crianças e adolescentes para identificar as diferenças espectrais apresentadas nos grupos normal (saudável), leucêmico (LLA e LMA) e outros tipos de câncer (sarcoma, blastoma, carcinoma e linfoma). Os espectros Raman médios dos grupos apresentaram picos característicos de albumina e globulinas, que são constituintes do soro humano e conferem características espectrais marcante do soro humano. Picos de proteínas, aminoácidos e β -caroteno também foram identificados e estes foram mais intensos no grupo normal.

A análise exploratória por PCA aplicada aos espectros revelou que no Escore 1 existem picos característicos de albumina sérica (852, 1452 e 1659 cm^{-1}), corroborando com os achados na marcação feira nos espectros médio; no PC1, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos normal e leucêmico e normal e outros tipos de câncer (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$); no Escore 2, observou-se “deslocamento para o azul” nos picos em 1002 e 1006 cm^{-1} , em 619/625 e em 640/646 cm^{-1} em amostras de soro do grupo outros tipos de câncer; carotenoides foram identificados no Escore 6 (picos em 1004, 1159 e 1526 cm^{-1}) que são significativamente mais evidentes no grupo normal em comparação com os grupos leucêmico e outros tipos de câncer (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

O modelo PLS-DA aplicado aos espectros de soro sanguíneo com maior número de classes (sete classes) apresentou maior especificidade, de 81,9%, já com duas classes a especificidade foi de 67,6%, e com três classes a especificidade foi de 56,9%. Quando o PLS-DA foi aplicado objetivando a discriminação entre os cânceres, constatou-se que os espectros de soro de pacientes com LMA e linfoma foram 100,0% confundidos com os espectros de soro dos sujeitos com LLA, o que sugere similaridade nas características espectrais destes grupos. A discriminação entre os grupos leucêmico e outros tipos de câncer apresentou acurácia de 66,8%, sensibilidade de 72,5% e especificidade de 60,0%.

De acordo com os dados obtidos, constatou-se que a espectroscopia Raman pode ser uma ferramenta com potencial para diagnóstico diferencial entre as leucemias e os outros tipos de câncer (sarcomas, linfomas, blastomas e carcinomas) por meio de amostras de soro sanguíneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. *et al.* Neuroblastoma in children: update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. **Pediatric Hematology and Oncology**, Kansas City, v. 34, n. 3, p. 165-185, jun. 2017. DOI: 10.1080/08880018.2017.1330375.

ALLAHVERDIYEV, A. M. *et al.* Current aspects in treatment of breast cancer based of nanodrug delivery systems and future prospects. **Artificial Cells Nanomedicine Biotechnology**, Esenler, v. 46, n. Supl. 3, p. S755-S762, set. 2018. DOI: 10.1080/21691401.2018.1511573.

ALTICE, C. K. *et al.* Financial hardships experienced by cancer survivors: a systematic review. **National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information**, Bethesda, v. 109, n. 2, p.1-17, out. 2016. DOI: 10.1093/jnci/djw2 05.

AMANO, T.; RICHELSON, E.; NIRENBERG, M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Oxford, v. 69, n. 1, p. 258-263, jan. 1972. DOI: 10.1073/pnas.69.1.258.

ANASTASIA, A.; DMITRY, A.; BRATCHENKO, I. Analysis of albumin Raman scattering registration efficiency from different volume and shape cuvette. **J Biomed Photonics Eng.** [s. l.], v. 3, n. 2, p. 020309, maio. 2017. DOI: 10.18287/JBPE17.03.020309

ANDRIES, J. P. M.; HEYDEN, Y. V. Improved multi-class discrimination by common-subset-of-independent-variables partial-least-squares discriminant analysis. **Talanta**, [s. l.], v. 234, p. 1-7, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.talanta. 2021.122595.

ARROYO, V. Review article: albumin in the treatment of liver diseases-new features of a classical treatment. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], n. 16, Suppl 5, p. 1-5, dec. 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2036.16.s5.1.x.

ATKINS, C. G. *et al.* Raman spectroscopy of blood and blood components. **Applied Spectroscopy**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 767-793, abr. 2017. DOI: 10.1177/0003702816686593.

AUNER, A. W. *et al.* Conclusions and data analysis: a 6-year study of Raman spectroscopy of solid tumors at a major pediatric institute. **Pediatric Surgery International**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 129-140, nov. 2012. DOI: 10.1007/s00383-012-3211-6.

AUNER, G. W. *et al.* Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 691-717, 2018. DOI: 10.1007/s10555-018-9770-9.

BAHREINI, M. *et al.* A Raman-based serum constituents' analysis for gastric cancer diagnosis: *in vitro* study. **Talanta**, [s. l.], n. 204, p. 826-832, nov. 2019. DOI: 101016/j.talanta.2019.06.068.

BAI, Y. *et al.* Raman spectroscopy-based biomarker screening by studying the fingerprint characteristics of chronic lymphocytic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 190, p. 1-7, out. 2020. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113514.

BANKAPUR, A. *et al.* Raman tweezers spectroscopy of live single red and white blood cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e10427, abr. 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0010427.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 166-173, mar. 2003. DOI: 10.1002/cem. 785.

BARNHOLTZ-SLOAN, J. S.; OSTROM, Q. T.; COTE, D. Epidemiology of brain tumors. **Neurologic clinics**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 395-419, ago. 2018. DOI: 10.1016/j.ncl.2018.04.001

BARROSO, E. M. *et al.* Discrimination between oral cancer and healthy tissue based on water content determined by Raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 2419-2426, fev. 2015. DOI: 10.1021/ac504 362y.

BAUER, A. J. Molecular genetics of thyroid cancer in children and adolescents. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 389-403, fev. 2017. DOI: 10.1016/j.ecl.2017.01.014.

BHAKTA, N. *et al.* Childhood cancer burden: a review of global estimates. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. e42-e53, jan. 2019. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30761-7.

BIELACK, S.S. *et al.* Bone tumors in adolescents and young adults. **Current Treatment Options in Oncology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 67-80, feb. 2008. DOI: 10.1007/s11864-008-0057-1.

BORDBAR, M. M. *et al.* A non-invasive tool for early detection of acute leukemia in children using a paper-based optoelectronic nose based on an array of metallic nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1141, p. 28-35, jan. 2021. DOI: 10.1016/j.aca.2020.10.029.

BERTINETTO, C.; ENGEL J.; JANSEN, J. ANOVA simultaneous component analysis: a tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 6, p. 1- 15, nov. 2020. DOI: 10.1016/j.acax.2020.100061.

BEVILACQUA, M.; MARINI, F. Local classification: locally weighted-partial least squares-discriminant analysis (LW-PLS-DA). **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], n. 838, p. 20-30, ago. 2014. DOI: 10.1016/j.aca.2014.05.057.

BODANESE, B. *et al.* Differentiating normal and basal cell carcinoma human skin tissues *in vitro* using dispersive Raman spectroscopy: a comparison between principal components analysis and simplified biochemical models. **Photomedicine and Laser Surgery**, [s. l.], v. 28, n. S1, p. S-119-S-127, ago. 2010. DOI: 10.1089/ pho.2009.2565.

BRADLEY, M. B.; CAIRO, M. S. Stem cell transplantation for pediatric lymphoma: past, present and future. **Bone Marrow Transplant**, [s. l.] v. 41, n. 2, p: 149-158, dez. 2007. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705948.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Early diagnosis protocol for pediatric oncology**. Brasília, 2017. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolodiagnostico_precoce_cancer_pediatico.pdf. Acesso em: 7 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guidelines for the care of people with chronic diseases in health care networks and in priority care lines**. Brasília, 2013. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/geral/documento_norteador.pdf. Acesso em: 5 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual of oncology technical bases – SIA / SUS ambulatory information system**. Brasília, 2021. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=1529. Acesso em: 5 jan. 2022.

BROWN, P. A. *et al.* Effect of postreinduction therapy consolidation with blinatumomab vs chemotherapy on disease-free survival in children, adolescents, and young adults with first relapse of B-cell acute lymphoblastic leukemia: a randomized clinical trial. **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, [S. l.], v. 325, n. 9, p. 833-842, mar. 2021. DOI: 10.1001/jama.2021.0669.

CHEN, Y. *et al.* Raman spectroscopy analysis of the biochemical characteristics of molecules associated with the malignant transformation of gastric mucosa. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e93906, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0093906.

COOPER, T. E. *et al.* Opioids for chronic non-cancer pain in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. CD012538, jul. 2017. DOI: 10.1002/14651858.CD012538.pub2.

COSTA, V. P. *et al.* Rbdomiossarcoma ocular: estudo clínico de 12 casos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 67-76, mar./abr. 1990. DOI: 10.5935/0004-2749.19900038.

DEWALD, G. B. *et al.* Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: Correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **British journal of haematology**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 287-295, abr. 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04265.x.

DEPUYDT, P. *et al.* Meta-mining of copy number profiles of high-risk neuroblastoma tumors. **Scientific Data**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1-9, out. 2018. DOI: 10.1038/sdata.2018.240.

DINGARI, N. C. *et al.* Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 2, e32406, feb. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0032406.

EBERHARDT, K. *et al.* Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 773-787, jun. 2015. DOI: 10.1586/14737159.2015.1036744.

FENG, S. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy of saliva proteins for the noninvasive differentiation of benign and malignant breast tumors. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 537-547, jan. 2015. DOI: 10.2147/IJN.S71811.

FÉRÉ, M. *et al.* Implementation of a classification strategy of Raman data collected in different clinical conditions: application to the diagnosis of chronic lymphocytic leucemia. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 412, n. 4, p. 949–962, dez. 2019. DOI: 10.1007/s00216-019-02321-z.

FERREIRA, E. B.; ROCHA, M. C.; MEQUELINO, D. B. Monte Carlo evaluation of the ANOVA's F and Kruskal-Wallis tests under binomial distribution. **Sigmae**, Alfenas. v. 1, n.1, p. 126-139, dez. 2012.

FOON, K. A.; TODD, R. F. 3rd. *et al.* Immunologic classification of leukemia and lymphoma. **Blood**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 1-31. jul. 1986.

FREITAG, M. A.; AMADUCCI, A.; ORSO, I. R. B. Linfoma não-Hodgkin de células B: relato de caso. **Revista Thêma et Scientia**, Cascavel, v. 9, n. 1E, p. 200-208, jan/jun. 2019.

GARCIA-MANERO, G.; CHIEN, K. S.; MONTALBAN-BRAVO, G. Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. **American Journal of Hematology**, [s. l.], v. 95, n. 11, p. 1399-1420, nov. 2020. DOI: 10.1002/ajh.25950.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 185, p.1-17, 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80028-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9).

GOHEEN, S. C. *et al.* The effect on Raman spectra of extraction of peripheral proteins from human erythrocyte membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], p. 805-814, v. 79, n. 3, dez. 1977. DOI: 10.1016/0006-291X(77)91183-4.

GONZÁLEZ-SOLÍS, J. L. *et al.* Monitoring of chemotherapy leukemia treatment using Raman spectroscopy and principal component analysis. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 1241-1249, maio. 2014. DOI: 10.1007/s10103-013-1515-y.

HANLON, E. B. *et al.* Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. R1-R59, fev. 2000. DOI: 10.1088/0031-9155/45/2/201.

HARRIS, N. L. *et al.* Lymphoma classification: from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms. **Annals of Oncology**, [s. l.], n. 11 Suppl 1, p. 3-10, jan. 2000. DOI: 10.1093/annonc/11.Suppl 1.S3.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em Hematologia**. 7^a ed: Artmed, 2018.

HONG, K. T. *et al.* Therapy-related acute myeloid leukemia after the treatment of primary solid cancer in children: a single-center experience. **Journal of Pediatric Hematology / Oncology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. e23-e28, jan. 2018. DOI: 10.1097/MPH.0000000000001019.

HU, S.; SMITH, K.M.; SPIRO, T. G. Assignment of protoheme resonance Raman spectrum by heme labeling in myoglobin. **Journal of American Chemical Society**, [s. l.], v. 118, n. 50, p. 12638-12646, dez. 1996. DOI: 10.1021/ja962239e.

IKEDA, H. *et al.* Raman spectroscopy for the diagnosis of unlabeled and unstained histopathological tissue specimens. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 439-448, nov. 2018. DOI: 10.4251/wjgo.v10.i11.439.

INDELICATO, D. J. *et al.* Clinical outcomes following proton therapy for children with central nervous system tumors referred overseas. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 64, n. 12, p. e26654, dez. 2017. DOI: 10.1002/pbc.26654.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES SILVA (INCA). **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2022.

ISAEVSKA, E. *et al.* Cancer incidence rates and trends among children and adolescents in Piedmont, 1967–2011. **PloS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. e0181805, Jul. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181805.

IVANOV, A. I. *et al.* Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 408, n. 1, p. 69-77, dec. 2002. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00533-7.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **The Philosophical Transactions of the Royal Society**, [s. l.], v. 374, n. 2065, p. 1471-2962, abr. 2016. DOI: 10.1098/rsta.2015.0202.

KAST, R. E. *et al.* Emerging technology: applications of Raman spectroscopy for prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 2 / 3, p. 673-693, set. 2014. DOI: 10.1007/s10555-013-9489-6.

KAPLAN, J. A. Leukemia in children. **Pediatrics in Review**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 319-331, jul. 2019. DOI: 10.1542/pir.2018-0192.

KOHE, S. E. *et al.* Metabolic profiling of the three neural derived embryonic pediatric tumors retinoblastoma, neuroblastoma and medulloblastoma, identifies distinct metabolic profiles. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 13, p. 11336-11351, fev. 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.24168.

KONG, K. *et al.* Raman spectroscopy for medical diagnostics: from in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 89, p. 121-134, jul. 2015. DOI: 10.1016/j.addr.2015.03.009.

KUHAR, N. *et al.* Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials. **Royal Society of Chemistry Advances**, [s. l.], v. 8, n. 46, p. 25888-25908, jul. 2018. DOI: 10.1039/C8RA04491K.

LABUHN, M. *et al.* Mechanisms of progression of myeloid preleukemia to transformed myeloid leukemia in children with Down syndrome. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 123-138, e10, Ago. 2019. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.06.007.

LADRA, M. M.; MACDONALD, S. M.; TEREZAKIS, S. A. Proton therapy for central nervous system tumors in children. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 65, n. 7, p. e27046, jul. 2018. DOI: 10.1002/pbc.27046.

LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 117, p. 100-114, ago. 2012. DOI: 10.1016/j.chemolab.2012.03.011

LAZARO-PACHECO, D. *et al.* Elucidating the chemical and structural composition of breast cancer using Raman micro-spectroscopy. **EXCLI Journal**, [s. l.], v. 20, p. 1118-1132, jul. 2021. DOI: 10.17179/excli2021-3962.

LEE, J. S. Albumin for end-stage liver disease. **The Korean Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 13-19, mar. 2012. DOI: 10.3904/kjim.2012.27.1.13.

LIMA, A. M. F. *et al.* Discrimination of non-melanoma skin cancer and keratosis from normal skin tissue *in vivo* and *ex vivo* by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, [s. l.], v. 100, p. 131-141, 2019. DOI: 10.1016/j.vibspec.2018.11.009.

LU, P. Staging and classification of lymphoma. In: **Seminars in Nuclear Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 160-164, jul. 2005. DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2005.02.002.

MANAGÒ, S. *et al.* Raman detection and identification of normal and leukemic hematopoietic cells. **Journal of Biophotonics**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e201700265, maio. 2018. DOI: 10.1002/jbio.201700265.

MARTÍNEZ-ESPINOSA, J. C. *et al.* Detection of leukemia with blood samples using Raman spectroscopy and multivariate. **AIP Conference Proceedings**, [s. l.], v. 1142, n. 1, p. 99-103, jun. 2009. DOI: 10.1063/1.3175637.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos de Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MEHTA, K.; HALLER, J. O.; LEGASTO, A. C. Imaging neuroblastoma in children. **Critical Reviews in Computed Tomography**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 47-61, 2003. DOI: 10.3109/10408370390808469.

MESCHER, A. **Junqueira's Basic Histology Text & Atlas**. New York: McGraw-Hill Medical, 2016.

MÍSSIO, L.; SILVA, A. B. Linfoma Não-Hodgkin duodenal em criança de seis anos: relato de caso. **FAG Journal of Health (FJH)**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 112-118, nov. 2019. DOI: 10.35984/fjh.v1i4.129.

MITCHELL, K.; ULRICH, S. Targeting immunophenotypic markers on leukemic stem cells: how lessons from current approaches and advances in the leukemia stem cell (LSC) model can inform better strategies for treating acute myeloid leukemia (AML). **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. a036251, jan. 2020. DOI: 10.1101/cshperspect.a036251.

MOREIRA, W. B. *et al.* Leitura Crítica de Artigos Científicos. Capítulo 5: Artigos sobre Testes Diagnósticos. **Sociedade Brasileira de Oncologia**. 2011. Disponível em: https://www.sboc.org.br/app/webroot/leitura-critica/LEITURA-CRITICA_C5.pdf. Acesso em: 10 jan. 2022.

MOROZOV, A. V.; KARPOV, V.L. Proteasomes and several aspects of their heterogeneity relevant to cancer. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, p. 761, ago. 2019. DOI: 10.3389/fonc.2019.00761.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). **Previous version**: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. Bethesda (MD), 2014.

NAWALE, K. K. *et al.* Metastatic tumors in the jaw bones: A retrospective clinicopathological study of 12 cases at Tertiary Cancer Center. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, [Ss. l.], v. 20, n. 2, p. 252-255, 2016. DOI: 10.4103/0973-029X.185920.

NGUYEN, D. V.; ROCKE, D. M. Multi-class cancer classification via partial least squares with gene expression profiles. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1216-1226, Sset. 2002. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.9.1216

NUSSBAUM, R. L., McINNES, R. R., WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007

NUNES, A. C. *et al.* Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 2003-2010. nov. 2012. DOI: 10.1590/S0103-50532012005000073.

OHTSURU, A. *et al.* Incidence of thyroid cancer among children and young adults in Fukushima, Japan, screened with 2 rounds of ultrasonography within 5 years of the 2011 Fukushima Daiichi Nuclear Power Station accident. **JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 4-11. DOI:10. 1001/jamaoto.2018.3121

OLIVEIRA, L. S. Childhood cancer: the impact of diagnosis for children and families. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação (REASE)**, São Paulo, v. 7, n. 5, p. 1-10, maio 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE / World Health Organization (WHO). **Joint WHO / FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases (2003)**: diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO / FAO Expert Consultation. WHO Technical Report series 916. Geneva, 2003. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;jsessionid=6DCD5B9B3A337ED819B110F854A184D?sequence=1. Acesso em: 4 jan. 2022.

PARACHALIL D. R. *et al.* Raman spectroscopic screening of high and low molecular weight fractions of human serum. **Analyst**, [s. l.], v. 144, p. 4295-4311, Jun. 2019. DOI: 10.1039/c9an00599d.

PLANTE, A. *et al.* Dimensional reduction based on peak fitting of Raman micro spectroscopy data improves detection of prostate cancer in tissue specimens. **Journal of Biomedical Optics**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 116501-1-116501-14, nov. 2021. DOI: 10.1117/1.JBO.26.11.116501.

PÉREZ, I. *et al.* How to interpret diagnostic tests. **Medwave**, [s. l.], v. 21, n. 7, p.e8432, 2021. DOI: 10.5867/medwave.2021.07.8432.

QI, P. *et al.* Associations of miRNA polymorphisms and expression levels with breast cancer risk in the Chinese population. **Genet Mol Res**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 6289-6296, jun. 2015. DOI: 10.4238/2015.

RINGNÉR, M. What is principal component analysis? **Nature Biotechnology** [s. l.], v. 26, n. 3, p. 303-304, mar. 2008. DOI: 10.1038/nbt0308-303.

SABBATINI, R. M. E. Um programa para o cálculo da acurácia, especificidade e sensibilidade de testes médicos. **Revista Informédica**. Campinas - São Paulo, v. 2, n 12, p. 19-21, 1995.

SAHA, A.; YAKOVLEV, V. V. Structural changes of human serum albumin in response to a low concentration of heavy ions. **Journal of Biophotonics**, [s. l.], n. 3, p. 670-677, out. 2010. DOI: 10.1002/jbio.201000044.

SANDRI, M. Protein breakdown in cancer cachexia. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], n. 54, p. 11-19, jun. 2016. DOI: 10.1016/j.sem cdb.2015.11.002.

SCHWAB, M. *et al.* Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 472-480, ago. 2003. DOI: 10.1016/s1470-2045(03)01166-5.

SILVA, A. M. da *et al.* Spectral model for diagnosis of acute leukemias in whole blood and plasma through Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1-11, out. 2018. DOI: 10.1117/1.JBO.23.10. 107002.

SILVEIRA, F. L. *et al.* Discrimination of non-melanoma skin lesions from non-tumor human skin tissues *in vivo* using Raman spectroscopy and multivariate statistics. **Lasers in Surgery and Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 6-16, jan. 2015 DOI: 10.1002/lsm.22318.

SILVEIRA, L. *et al.* Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers in Surgery and Medicine**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 290-297, abr. 2002. DOI: 10.1002/lsm.10053.

SJÖBERG, B. *et al.* An experimental and theoretical study of the amino acid side chain Raman bands in proteins. **Spectrochimica Acta A: Molecular Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], n. 128, p. 128-300, jul. 2014. DOI: 10.1016/j.saa.2014.02.080.

SOUZA, B. A. de O.; SIQUEIRA, C. S. Abordagem das neoplasias malignas com enfoque nos sarcomas de partes moles do tipo rabiomiossarcoma. **Revista Odontológica de Araçatuba**. Araçatuba, v. 35, n. 2, p. 19-25, jul./dez. 2014.

STÄHLE, L.; WOLD, S. Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: a Monte Carlo study. **Journal of Chemometrics**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 185-196, jul. 1987. DOI: 10.1002/cem.1180010306.

STELIAROVA-FOUCHER, E. *et al.* International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 719-731, jun. 2017. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30186-9.

STOCCO, C. *et al.* Presentation and symptom interval in children with central nervous system tumors. A single-center experience. **Child's Nervous System**, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 2109-2116, dez. 2017. DOI: 10.1007/s00381-017-3572-1.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209-249, maio. 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

TANG, H. *et al.* C-reactive protein-to-albumin ratio is an independent poor prognostic factor in newly diagnosed chronic lymphocytic leukaemia: a clinical analysis of 322 cases. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p.101035, abr. 2021. DOI: 10.1016/j.tranon.2021.101035.

VANNA, R. *et al.* Raman spectroscopy for the assessment of acute myeloid leukemia: a proof of concept study. **Progress in Biomedical Optics and Imaging**, [s. l.], v. 8939, mar. 2014. DOI: 10.1117/12.2039186.

UDAKA, Y. T.; PACKER, R. J. Pediatric brain tumors. **Neurologic clinics**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 533-556, ago. 2018. DOI: 10.1016/j.ncl.2018.04.009.

VAN GRONINGEN, T. *et al.* Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 1261-1266, ago. 2017. DOI: 10.1038/ng.3899.

VAN MAELE-FABRY, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; LISON, D. Household exposure to pesticides and risk of leukemia in children and adolescents: Updated systematic review and meta-analysis. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [s. l.], v. 222, n. 1, p. 49-67, jan. 2019. DOI: 10.1016/j.ijheh.2018.08.004.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

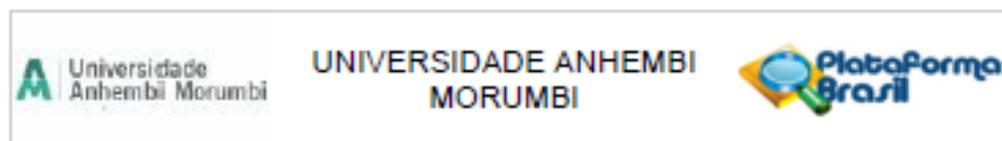
VON WAGNER, C.; VERSTRAETE, W.; STOFFEL, S. Psychological aspects of cancer screening. **Oxford Research Encyclopedia of Psychology**, [s. l.], v. 44, n. 1 nov. 2019. DOI: 10.1093/acrefore/9780190236557.013.130.

WALTON, J. D. *et al.* Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. **Neoplasia**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 838-845, nov. 2004.

WON, J. *et al.* Thyroid nodules and cancer in children and adolescents affected by Hashimoto's thyroiditis. **The British Journal of Radiology**, [s. l.], v. 91, n. 1087, p. 20180014, jul. 2018. DOI: 10.1259/bjr.20180014.

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO COM PACIENTES PEDIÁTRICOS E ONCOLÓGICOS - ALTERAÇÕES SANGUÍNEAS VISUALIZADAS ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN

Pesquisador: Landolfo Silveira Junior

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 23457019.9.0000.5492

Instituição Proponente: Universidade Anhembi Morumbi/ Instituto Superior de Comunicação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.170.213

Apresentação do Projeto:

EXERTO EXTRAÍDO DO PROJETO: ESTUDO COM PACIENTES PEDIÁTRICOS E ONCOLÓGICOS - ALTERAÇÕES SANGUÍNEAS VISUALIZADAS ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN

Pesquisador Responsável: Landolfo Silveira Junior

CAAE: 23457019.9.0000.5492

O diagnóstico das neoplasias na faixa etária pediátrica tem aumentado significativamente nos últimos anos e a possibilidade de cura das mesmas

também. Vários são os desafios que existem no acompanhamento desses pacientes dentre os quais o diagnóstico precoce, a identificação dos

casos de recidiva bem como a individualização do tratamento. Para responder a esses desafios tem se recorrido aos estudos de biologia molecular.

No entanto, tais estudos geralmente demandam a coleta de material dos tumores por vezes através procedimentos cirúrgicos invasivos e arriscados.

A utilização de amostras de sangue para obtenção dessas informações permite uma abordagem menos invasiva, no entanto os marcadores

identificados até o momento ou carecem de especificidade ou não apresentam a sensibilidade que seria desejável, por isso a procura por outros

continua tão atual e relevante. A espectroscopia Raman baseia-se nas características de

Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, 1.134 - 2º andar - sala 207

Bairro: Mooca CEP: 03.164-000

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2790-4658

E-mail: cep@anhembi.br

APÊNDICES

APÊNDICE A: Figura com marcações coloridas para melhor visualização, com as posições dos picos das principais bandas Raman do soro sanguíneo, atribuição de acordo com a literatura publicada e significância estatística (valor de p) das intensidades dos picos entre os grupos normal, leucêmico e outros tipos de câncer.

Posição do pico (cm ⁻¹)	Atribuição	Referências	Significância estatística (valor de p)
622	Fenilalanina [t(C-C)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; MARTÍNEZ-ESPINOSA <i>et al.</i> , 2009)	$p < 0.0001^{**}$
643	Tirosina [δ(anel aromático)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0001^*$
717	Polissacarídeos (C-H); DNA – adenina [δ(anel aromático)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0.0003^*$
758	Triptofano [δ(anel aromático)], [δ(esqueleto)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0212^*$
829	Triptofano/tirosina (anel aromático); glutations [γ(C _n H)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0.00128^*$
852	Prolina (estiramento C-C); proteínas (colágeno)	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	NS*
901	Triptofano/tirosina (anel aromático); glutations (estiramento C-C); DNA [δ(anel aromático)]	(SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	NS*
943	Lipídios (estiramento C-C)	(ANASTASIA; DMITRY; BRATCHENKO, 2017; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	NS*
1004	Fenilalanina (respiração do anel); β-caroteno (estiramento C-C do anel aromático)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; HU; SMITH; SPIRO, 1996)	$p < 0.0001^{**}$
1033	Fenilalanina; Triptofano/tirosina (anel aromático)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	NS*

(Continua)

(Continuação)

1085	Fosfolipídios (vibração C–C), DNA (O–P–O)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0001^*$
1108	Fenilalanina (respiração do anel); triptofano/tirosina (anel aromático)	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	NS*
1128	Proteínas (estiramento C–C); fosfolipídios	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	NS*
1159	β -caroteno [δ (C–C–H)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0001^{**}$
1178	Tirosina (anel aromático); fenilalanina [(respiração do anel, ν (meio do anel de pirrol)) _{normal}]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; HU; SMITH; SPIRO, 1996)	$p < 0.0001^*$
1209	Triptofano/tirosina (anel aromático); fenilalanina (respiração do anel); metionina [t (CH ₂)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0.0001^{**}$
1274	Amida III [δ (NH)]; proteína [ν (C–N)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0.0403^*$
1320	Triptofano (anel aromático); lipídios (fosfolipídio) [t (C–H)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0001^*$
1343	Colágeno; lipídios (CH ₂ /CH ₂)	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018)	$p < 0.0002^{**}$
1452	Proteína [δ (CH ₂)]; fosfolipídios [t (CH ₂ /CH ₃)]; aminoácidos [δ (C–N–H)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0113^*$
1526	β -caroteno [ν (C–N)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0022^{**}$
1555	Triptofano (anel aromático); amida II [ν (C–N)], [β (N–H)]	(GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0001^*$
1659	Proteínas, colágeno, [δ (anel)]; amida I [ν (C–O)]	(BAI <i>et al.</i> , 2020; GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014; SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014)	$p < 0.0001^{**}$

Legenda: Significância estatística: p^* = ANOVA e p^{**} = Kruskal-Wallis

Elipse vermelha: diferença estatística para os 3 grupos (normal, leucêmico e outros tipos de câncer) e mais intensos no grupo normal.

Quadrado amarelo: mais intensos no normal.

Quadrado azul: consegue diferenciar os grupos normal x leucêmico e os grupos normal x outros tipos de câncer.

Quadrado verde: consegue direnciar os grupos leucêmico x outros tipos de câncer.