
UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

DANIELA FRANCO LOPES FREDIANI

**TRIAGEM DE NEOPLASIAS EM SORO CANINO POR MEIO DA
ESPECTROSCOPIA RAMAN ASSOCIADA A ESTATÍSTICA MULTIVARIADA**

TESE DE DOUTORADO

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

São José dos Campos, 28 junho de 2024

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

DANIELA FRANCO LOPES FREDIANI

**TRIAGEM DE NEOPLASIAS EM SORO CANINO POR MEIO DA
ESPECTROSCOPIA RAMAN ASSOCIADA A ESTATÍSTICA MULTIVARIADA**

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 Doutor em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.

São José dos Campos, 28 de junho de 2024.

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

DANIELA FRANCO LOPES FREDIANI

**TRIAGEM DE NEOPLASIAS EM SORO CANINO POR MEIO DA
ESPECTROSCOPIA RAMAN ASSOCIADA A ESTATÍSTICA MULTIVARIADA**

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 Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi – UAM

Profa. Dra. Roberta Carvalho Basile (externo)

Centro Universitário de Jaguariúna – UniFAJ

Profa. Dra. Janaína Duarte (externo)

Universidade Paulista – UNIP

Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti (interno)

Universidade Anhembi Morumbi – UAM

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (Suplente)

Universidade Anhembi Morumbi – UAM

Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro (Suplente)

Universidade Federal da Bahia – UFBA

São José dos Campos, 28 de junho de 2024

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

DANIELA FRANCO LOPES FREDIANI

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Alzira Velano de Alfenas (1997), Pós-Graduada (Lato Sensu) em Homeopatia pelo Instituto François Lamasson (2000), Mestre em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba (2006), Especialista (Lato Sensu) em Saúde e Terapias Quânticas pelo Centro Universitário Internacional (2015). É autora do livro “A Saúde Quântica para os Animais”, Editora Gráfica Caiuá, Maringá, PR (2015) e é Vice-Presidente da Associação Brasileira de Medicina Veterinária Integrativa (2024-2026).

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F929t	Frediani, Daniela Franco Lopes
	Triagem de Neoplasias em Soro Canino por meio da Espectroscopia Raman Associada a Estatística Multivariada / Daniela Franco Lopes Frediani – 2024. 121f.: 30 cm.
	Orientador: Prof. Dr. Landolfo Silveira Junior. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade
Anhembi	Morumbi, São José dos Campos, 2024. Bibliografia: f. 116-119.
	1. Engenharia Biomédica. 2. Neoplasias. 3. Biomarcadores
Tumoriais.	4. Soro Sanguíneo. 5. Análise Discriminantes. I. Título.
	CDD 610.28

Bibliotecária Iara Neves CRB 8/8799

DEDICATÓRIA

À minha família: José Paulo “in memorian”, Iracema, Daniel, Camila, Fernando, Tia Tereza, pelo apoio às minhas escolhas e por compreenderem os momentos de ausência e distanciamento em prol de meus estudos.

Aos meus animais por estarem ao meu lado.

À humanidade que se beneficiará deste estudo e os animais em algum tempo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e razão de todos os êxitos que a ciência pode conquistar.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr., pela generosidade, paciência, confiança e conhecimentos transmitidos com vistas às minhas dificuldades.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro pelo apoio incondicional aos candidatos a Doutorado.

À Analista de Controle de Pós-Graduação, Nidia Lucia de Macedo, pela amizade, confiança e apoio prestado durante toda a realização do programa.

Aos amigos Ana Karina Arima Schmidt, Alessandra Silvério, Jussara Grecchi, Gerson Baptista, Prof. Dr. Aloísio Carvalho, Dr. Marcelo Sibata e Dra. Alice Sibata pelo apoio incondicional e parceria.

Aos tutores pela confiança em ceder as amostras utilizadas neste estudo.

Landulfo Silveira Jr. agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo No. 2009/01788-5) pela aquisição do espectrômetro Raman, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo No. 306344/2017-3) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa e ao Instituto Anima (IA) pela Bolsa de Pesquisa.

Daniela Franco Lopes Frediani agradece ao Instituto Doutor Izao Soares (IDIS) pelo suporte de insumos e recursos de pesquisa e ao amigo Miguel Saavedra Lopes pela ajuda nos gráficos e figuras contidas no artigo e Tese.

“Sonho que se sonha só

É só um sonho que se sonha só.

Mas sonho que se sonha junto é realidade”

Raul Seixas

RESUMO

A oncologia comparativa é um campo emergente interdisciplinar que busca analisar os riscos do desenvolvimento do câncer através da semelhança genômica entre humanos e cães, usando-os como sentinela investigativa de neoplasias em comparação aos modelos em roedores. A finalidade do diagnóstico clínico é determinar com eficiência a presença da doença, para uma intervenção adequada. A espectroscopia Raman pode auxiliar o diagnóstico em tempo real sem a necessidade de preparo do material e uso de reagentes. Este estudo teve como objetivo utilizar a espectroscopia Raman e métodos estatísticos multivariados (análise de componente principal – PCA e regressão por mínimos quadrados parciais – PLS) como uma ferramenta de triagem de pacientes portadores de neoplasias por meio das diferenças espectrais em amostras de soro de 61 cães (31 clinicamente saudáveis e 30 com câncer). Foram relacionadas as diferenças entre as alterações bioquímicas e a análise discriminante dos espectros das amostras com um modelo de discriminação baseado em PLS (PLS-DA), permitindo a separação das amostras em grupo Saudável e grupo neoplásico. As amostras foram submetidas à espectroscopia Raman (espectrômetro dispersivo com 830 nm e 350 mW de excitação acoplado a um cabo de fibras ópticas – sonda Raman), com tempo de coleta cada espectro de 30 s. A análise exploratória das amostras por PCA evidenciou componentes principais com picos específicos atribuídos a aminoácidos, proteínas e lipídeos em 1132, 1342, 1368 e 1453 cm^{-1} (albumina e fenilalanina), com intensidade maior no grupo Neoplásico. Os espectros das amostras de soro dos grupos Saudável e Neoplásico foram modelados por PLS-DA utilizando a validação cruzada “*leave-one-out*”, identificando variáveis latentes com capacidade de classificar os espectros em um dos grupos Saudável ou Neoplásico. Os modelos de classificação dos espectros de soro interpretados “por paciente” (“*patient-wise*”) obtiveram acurácia de 77%, sensibilidade de 77% e especificidade de 77%, que foi superior em comparação à classificação “por espectro” (“*spectrum-wise*”), este último apresentaram acurácia de 78%, sensibilidade de 76% e especificidade de 81%. A espectroscopia Raman pode se tornar uma ferramenta de diagnóstico laboratorial com potencial para a diferenciação de animais saudáveis e com neoplasia através das diferenças espectrais relacionadas às alterações bioquímicas presentes nas amostras.

Palavras-chave: neoplasias, biomarcadores tumorais, soro sanguíneo, análise discriminante, análise de componentes principais, regressão por mínimos quadrados parciais, espectroscopia Raman.

SCREENING OF NEOPLASMS IN DOG SERUM USING RAMAN SPECTROSCOPY ASSOCIATED WITH MULTIVARIATE STATISTICS

ABSTRACT

Comparative oncology is an emerging interdisciplinary field that seeks to analyze the risks of developing cancer through the genomic similarity between humans and dogs, using them as investigative sentinels of cancer compared to rodent models. The purpose of medical diagnostics is to efficiently determine the presence of the disease to intervene appropriately. Raman spectroscopy offers a wealth of possibilities in oncology through real-time diagnosis without the need for material preparation and the use of reagents. This study aimed to use Raman spectroscopy and multivariate statistical methods (principal component analysis – PCA and partial least squares – PLS regression) as a screening tool for neoplasms through spectral differences in serum samples from 61 dogs (31 clinically healthy and 30 with cancer), relating these differences to biochemical alterations and discriminant analysis of the samples' spectra with a PLS-based discrimination model (PLS-DA), discriminating the samples between the Healthy and Cancer groups. The samples were subjected to Raman spectroscopy (dispersive spectrometer with 830 nm and 350 mW excitation coupled to a fiber optic Raman probe), with a collection time of 30 s for each spectrum. Exploratory analysis of the spectra by PCA revealed main components with specific peaks attributed to amino acids, proteins, and lipids at 1132, 1342, 1368 and 1453 cm^{-1} (albumin and phenylalanine), with greater intensity in the Cancer group. The spectra of serum samples from the Healthy and Cancer groups were modelled by PLS-DA using leave-one-out cross-validation, identifying latent variables capable of classifying the spectra into one of the Healthy or Cancer groups. The models for classifying serum spectra interpreted as “patient-wise” had an accuracy of 77%, sensitivity of 77% and specificity of 77%, which was higher than the classification by “spectrum-wise”, which had an accuracy of 78%, sensitivity of 76% and specificity of 81%. Raman spectroscopy is a laboratory diagnostic tool with the potential to differentiate between healthy animals and those with cancer through spectral differences related to the biochemical alterations present in the samples.

Keywords: tumor biomarkers; blood serum; discriminate analysis; principal component analysis; partial least squares regression; Raman spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Diagrama da tumorigênese celular.	21
Figura 2:	Diagnósticos anuais de neoplasias em humanos e cães.	22
Figura 3:	Frequência de mortes relacionadas a neoplasias em humanos e cães.	29
Figura 4:	Diagrama esquemático que descreve a oncologia comparativa em animais de companhia e humanos.	30
Figura 5:	Distribuição do diagnóstico de neoplasias, onde (A) representam sexo e estatus de esterilizado/não esterilizado, castrado/não castrado, (B) a raça, (C) a faixa etária de fêmeas caninas esterilizadas e não esterilizadas, e (D) a faixa etária de machos caninos esterilizados e não esterilizados.	34
Figura 6:	Distribuição de neoplasias benignos e malignos de acordo com os dados recolhidos pela Plataforma myClinical nos anos 2020-2022, (A) por espécie, (B) por tipos celulares, e (C) por localidade anatômica.	35
Figura 7:	(A) Espalhamento elástico (Rayleigh), (B) espalhamento inelástico (Stokes), e (C) espalhamento inelástico (anti-Stokes).	39
Figura 8:	Fluxograma da coleta, processamento e análise dos dados, incluindo a indicação das ferramentas estatísticas empregadas.	51
Figura 9:	(A) Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo. (B) Foto do espectrômetro Raman dispersivo com a sonda “Raman probe” (modelo Dimension P1, Lambda).	55
Figura 10:	Fluxograma da coleta, processamento e análise dos dados, incluindo a indicação das ferramentas estatísticas empregadas.	57
Figura 11:	Espectros Raman médios do soro sanguíneo de cães dos grupos Saudável e Neoplásico e o espectro de diferença (Câncer – Neoplásico). O espectro de diferença foi ampliado (2X). As características positivas no espectro de diferença representam os picos que são mais intensos nos espectros do grupo com câncer do que nos espectros do grupo saudável.	61
Figura 12:	Gráfico das oito primeiras variáveis de componentes principais: Scores e PCs.	66
Figura 13:	Plotagem das variáveis do PC1 e Score 1.	68
Figura 14:	Plotagem das variáveis do PC2 e Score 2.	68
Figura 15:	Plotagem das variáveis do PC3 e Score 3.	70

Figura 16:	Plotagem das variáveis do PC4 e Score 4.	71
Figura 17:	Plotagem das variáveis do PC5 e Score 5.	71
Figura 18:	Plotagem das variáveis do PC6 e Score 6.	72
Figura 19:	Plotagem das variáveis do PC7 e Score 7.	72
Figura 20:	Plotagem das variáveis do PC8 e Score 8.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Comparação entre neoplasias em humanos e caninos.	25
Tabela 2:	Modelo de tabela de contingência para validação de um teste diagnóstico com duas variáveis.	49
Tabela 3:	Número de pacientes incluídos no estudo por sexo, raça e idade.	53
Tabela 4:	Número de pacientes diagnosticados por biópsia histopatológica, imagem e o número de amostras de soro colhidas por paciente.	54
Tabela 5:	Posições dos picos das amostras de soro sanguíneo de cães observados no espectro de diferença entre o grupo Saudável e o grupo Neoplásico (Figura 11), a sua atribuição provisória conforme descrita na literatura e a indicação de presença dos picos nos grupo Saudável e Neoplásico.	62
Tabela 6:	Tabela de contingência com os resultados da discriminação dos espectros Raman de amostras de soro sanguíneo de cães usando o modelo de discriminação baseado em PLS (PLS-DA) utilizando o modelo de classificação “por paciente” e “por espectro” respectivamente.	75
Tabela 7:	Testes diagnósticos usados em Neoplasias comparando metodologia estatística e taxa de sucesso (%)	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVMA – American Veterinary Medical Association

ASA – amilase sérica

BRCA-1 – gene 1 do câncer de mama

BRCA-2 – gene 2 do câncer de mama

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CCOGC – Consórcio de Genômica Oncológica Comparada Canina

DNA – ácido desoxirribonucléico

IARC – Agência Internacional de Investigação do Câncer

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LDL – lipoproteínas de baixa densidade

VL – variável latente

mtDNA – mitocôndria do ácido desoxirribonucléico

NS – estatisticamente não significativo

PFA – proteína de fase aguda

PCA – análise de componente principal

PC – componente principal

PCR – proteína C-reativa

PICS – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PLS – mínimos quadrados parciais

PLS-DA – análise discriminante por mínimos quadrados parciais

RNA – ácido desoxirribonucléico

ROS – espécies reativas de oxigênio

SERS – espectroscopia Raman amplificada por superfície

TP-53 – gene supressor de tumor 53

US – ultrassom

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Objetivo geral	17
1.2. Objetivos específicos	17
1.3. Hipótese	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. As Neoplasias em mamíferos	19
2.1.1. Fisiopatologia das neplasias	19
2.1.2. Oncologia comparativa	22
2.1.3. Epidemiologia das neoplasias em humanos	30
2.1.4. Epidemiologia das neoplasias em animais	31
2.2. Diagnóstico de neoplasias	35
2.2.1. Princípios físicos da espectroscopia Raman	37
2.2.2. Aplicações da espectroscopia Raman em materiais biológicos	39
2.2.3. Aplicações da espectroscopia Raman no diagnóstico de neoplasias	41
2.2.4. Aplicações da espectroscopia Raman na Medicina Veterinária	42
2.3. Identificação de fatores prognósticos em animais	44
2.4. Terapêutica convencional de neoplasias em animais	45
2.5. Análise estatística dos dados	46
2.5.1. Análise de componente principal (PCA)	46
2.5.2. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	47
2.5.3. Tabela de contingência	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1. Parecer ético	50
3.2. Fluxograma da coleta, processamento e análise de dados	50

3.3. Seleção dos pacientes	51
3.4. Espectrômetro Raman	55
3.5. Aquisição dos espectros Raman e pré-processamento	56
3.6. Análise de variância e teste <i>t</i> de Student	57
3.7. Análise estatística e análise exploratória por PCA	58
3.8. Análise discriminante baseada em PLS (PLS-DA)	58
4. RESULTADOS	60
4.1. Espectros Raman no soro de cães	60
4.2. Análise discriminante e modelos de classificação PLS-DA	75
5. DISCUSSÃO	76
5.1. Comparação dos dados dos espectros Raman do soro sanguíneo com outros estudos	76
5.2. Análise discriminante PLS-DA comparada a outros estudos	82
5.3. A espectroscopia Raman e as técnicas convencionais para diagnóstico de neoplasias	85
5.4. Perspectivas futuras	87
6. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO A: Parecer Consubstanciado do CEUA	116
ANEXO B: Comparação da capacidade da espectroscopia Raman dispersiva associada com análise estatística multivariada em modelos de diagnóstico para diferentes doenças na literatura	119

1. INTRODUÇÃO

A oncologia comparativa é um campo emergente interdisciplinar que busca analisar os riscos do desenvolvimento de neoplasias por meio das semelhanças genômicas entre humanos e cães, usando-os como sentinela investigativa do câncer em comparação aos modelos em cobaias. Nos EUA, verificou-se que cerca de 1,66 milhão de humanos e mais de 4,2 milhões de cães são diagnosticados com câncer anualmente (Schiffman; Breen, 2015). A ocorrência de neoplasias em cães os torna modelos adequados para o estudo da gênese tumoral em humanos, pois possuem a particularidade de desenvolverem neoplasias espontâneas (Gardner *et al.*, 2016; Pinello *et al.*, 2022; Reif, 2011), apresentação clínica, fisiopatológica e genômica muito semelhantes principalmente no que diz respeito às linhagens germinativas (Schiffman; Breen, 2015), permitindo que os cães se encontrem em uma posição única para refletir melhor o desenvolvimento e a progressão da neoplasia do que os modelos tradicionais de roedores.

Os desafios na área de pesquisa oncológica não se concentram apenas em terapias efetivas, mas na precocidade de detecção de uma mudança morfológica, molecular ou bioquímica que permita apontar para um diagnóstico precoce e seguro.

O efeito Raman foi verificado experimentalmente em 1928 pelo físico indiano C. V. Raman, e publicado no "*Indian Journal of Physics*". Seu artigo demonstrou resultados que comprovavam a existência do efeito de espalhamento inelástico (mais tarde nomeado espalhamento Raman), propondo que este efeito seria similar ao espalhamento observado por Compton na região de raio-X (Campion, 2001). O efeito ocorre devido à troca de energia entre uma molécula e a luz incidente, onde os fótons podem ser absorvidos ou espalhados. A maior parte da luz espalhada tem o mesmo comprimento de onda da luz incidida, porém uma pequena fração da luz incidente interage com a molécula de formas diferentes a excitação (Hanlon *et al.*, 2000), dependendo do estado vibracional de suas ligações químicas e da polarizabilidade, que após o processamento dos sinais, geram um número de picos conhecidos por espectros Raman, onde linhas espectrais são obtidas em função das frequências vibracionais denominadas deslocamentos Raman ("*Raman shifts*") que são expressas em unidade de metro recíproco (cm^{-1}) (Faria *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2018).

1.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral utilizar a espectroscopia Raman para identificar diferenças na composição bioquímica de soro de cães clinicamente saudáveis e cães com diagnóstico de Neoplasia e desenvolver um modelo de classificação usando as diferenças observadas nos espectros Raman com o intuito de verificar a viabilidade da espectroscopia Raman como método de triagem diagnóstica de neoplasias em cães utilizando amostras de soro.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar os picos Raman que possibilitem a diferenciação entre cães saudáveis de cães com neoplasia diagnosticados por meio da biópsia histopatológica, raio-X, ultrassonografia, tomografia computadorizada e correlacionar estes picos da diferença entre os grupos Saudável e Neoplásico com a composição bioquímica do soro, conforme a literatura;
- Aplicar a análise estatística multivariada utilizando a análise exploratória de componente principal (PCA) para extração de características espectrais relevantes do conjunto de dados e identificar as diferenças por meio dos picos proteínas, aminoácidos e lipídeos nos grupos Saudáveis e Neoplásico, demonstrando a semelhança destes picos com os apresentados no espectro da diferença Saudável e Neoplásico;
- Identificar os marcadores bioquímicos (aminoácidos, proteínas e lipídeos) nos espectros Raman relacionados a neoplasias no soro de cães com diagnóstico de câncer comparativamente aos clinicamente saudáveis;
- Utilizar um modelo de análise discriminante por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) através do método de validação cruzada “deixe um de fora” (*“leave-one-out”*) que identifique as variáveis latentes com capacidade de classificar e discriminar os espectros em cada um dos grupos Saudável ou Neoplásico com a maior acurácia possível, e comparar a classificação dos espectros do soro por meio da interpretação da classificação como “por espectro” (*“spectrum-wise”*) ou “por paciente” (*“patient-wise”*).

1.3. Hipótese

A hipótese do estudo é que alterações na composição bioquímica do soro sanguíneo de cães diagnosticados com neoplasias através do diagnóstico clínico, análise histopatológica e técnicas de imagem (grupo Neoplásico) em comparação com o grupo de cães clinicamente saudáveis (grupo Saudável) podem ser identificadas por meio da espectroscopia Raman associada a estatística multivariada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. As Neoplasias em mamíferos

O câncer (do grego “*karkinos*” – caranguejo) foi um termo utilizado por Hipócrates (460-370 a.C.) relacionadas a lesões ulcerosas e endurecidas que se desenvolve rapidamente se estiverem ligadas a veias calibrosas (Sontang, 1984). Seu sinônimo é o tumor e está relacionado a aumento de volume, usando como sinal cardinal a inflamação que representa um componente fundamental do microambiente tumoral, sendo responsável por mediar a rede de comunicação biológica e o fluxo de sinalização molecular, que caracterizam o tecido neoplásico (Figueiredo, 2019). O câncer já existia na Terra mesmo antes do aparecimento do homem, como comprovam os achados paleontológicos de tumores em animais (Hadju, 2011; Mitrus *et al.*, 2012). A primeira descrição do câncer humano pode ser encontrada no Papiro de Edwin Smith, datado de 3000 a.C. que ilustrava um caso de câncer de mama. Outras provas documentadas incluem o Papiro de Ebers, datado de 1500 a.C. que descreveu vários tipos de tumores relativos à pele, útero, estômago e reto (Hadju, 2011).

O fenômeno biológico que envolve a gênese tumoral onde as células saudáveis se transformam em cancerígenas é objeto de permanente debate e pesquisa na comunidade científica, sendo cercada de paradoxos (Baker; Rayens, 2007; Sonneschein; Soto, 2014), pois não há uma teoria unificadora e que traga com clareza a sua origem, o que em grande parte justifica a dificuldade em se reduzir a taxa de mortalidade do câncer (Seyfried; Shelton, 2010). A partir do século XX, iniciaram-se pesquisas dos fatores que poderiam determinar o predomínio da enfermidade, relacionando-a a um conjunto de mais de 100 doenças que promovem múltiplas alterações na fisiologia celular, sendo que nos tipos benignos é promovido o crescimento desordenado das células, porém sem indiferenciação celular (Seyfried, 2010; Stratton, 2013) e nos tipos malignos o crescimento de células indiferenciadas e agressivas tende a ser maior, podendo se espalhar para outras regiões do corpo e evoluindo para metástases (INCA, 2010).

2.1.1. Fisiopatologia das neoplasias

Em 1887, seguindo os passos de Claude Bernard, o médico Domingos José Freire Jr., professor de química orgânica na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro,

anunciou a descoberta de um micróbio que causaria o câncer. Isto ocorreu a partir de amostras de tumores de humanos que foram inoculadas em animais e posteriormente desenvolveram tumores similares aos das pessoas. As análises dos tecidos dos animais confirmavam suas conclusões, muito similares às que o Dr. Ernest Scheurlen (Alemanha) demonstrou em humanos (Fioravante, 2019).

A teoria genética do câncer originou-se primariamente com Theodor Boveri (1914), sugerindo que o câncer poderia iniciar a partir de defeitos na segregação dos cromossomos durante a divisão celular (Hardy *et al.*, 2005), em conjunto com uma instabilidade cromossômica tipo aneuploidia (cromossomos extras, cromossomos ausentes ou cromossomos quebrados) nos tumores (Duesberg *et al.*, 1999).

Volgelstein *et al.* (2013) e Alexandrov *et al.* (2013) também pertencem à corrente etiológica da genética, afirmando que o ápice biológico dos sintomas decorrentes das mutações no núcleo resultaria em neoplasia.

A partir dos anos 90, surge uma linha de pesquisa que atribui ao câncer ser uma doença de múltiplas alterações que afetam a saúde das células e tecidos, e que pode resultar em tumores malignos (Seyfried; Shelton, 2010; Tarin, 2008), associando-o a uma doença metabólica. Do ponto de vista metabólico, a doença implica em distúrbios na produção de energia por meio da respiração e da fermentação (Seyfried *et al.*, 2014), demonstrando a atenção ao metabolismo. Em associação ao estilo de vida, com exposição crônica às toxinas, pode levar às inflamações crônicas, imunossupressão e desequilíbrios hormonais na membrana citoplasmática (Seyfried; Shelton, 2010), e que secundariamente promovem mutações progressivas e irreversíveis no genoma, acionando oncogenes que controlam as vias de sinalização para diferenciação, apoptose e metástases (Loeb, 2001; Schiffman; Breen, 2015; Seyfried; Shelton, 2010; Szent-Györgyi, 1977).

Seyfried *et al.* (2014), em sua meta-análise, elucidou ambas as posturas, Boveri considerando a aneuploidia na origem do câncer e Von Hanseemann considerando o comportamento cromossômico anormal em tumores como um efeito e não como uma causa da doença (Hardy *et al.*, 2005).

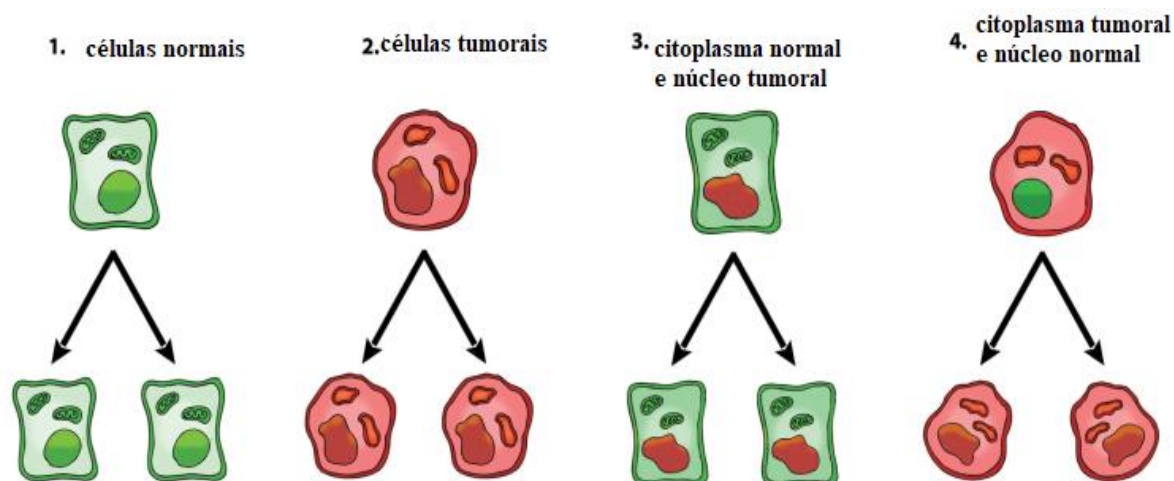


Figura 1: Diagrama da tumorigênese celular, demonstrando o papel fundamental da mitocôndria no processo de origem neoplásica. Fonte: Adaptado de Seyfried (2010).

A tumorigenicidade é aumentada quando os núcleos de células não tumorigênicas são combinados com citoplasma de células tumorais (Israel *et al.*, 1987; Petros *et al.*, 2005), ou seja, as células tumorais surgem de defeitos no citoplasma e não de defeitos no núcleo, devido ao excesso de ácido nucleico de ribose no citoplasma, determinando uma produção mais rápida de proteínas, uma divisão mais rápida de células e núcleos (Darlington, 1948) e as mutações no mtDNA (mitocôndria do ácido desoxirribonucleico) que preenchem todos os critérios esperados para mutações patogênicas envolvidos especialmente na etiologia do câncer de próstata (Petros *et al.*, 2005).

As mutações nos genes mitocondriais codificados pelo DNA nuclear (nDNA) também têm sido associadas ao câncer, consistentes com uma etiologia mitocondrial e epigenética com repercussão dependente de espécies reativas de oxigênio (EROS) e da glicólise aeróbica, característica comum de neoplasias sólidas, o que Warburg observou há mais de 70 anos (Xu *et al.*, 2021).

Seyfried; Shelton (2010) sugeriu que as neoplasias não se originam apenas de defeitos genômicos nucleares; as mitocôndrias normais podem suprimir a tumorigênese conforme demonstrados na Figura 1, onde o diagrama celular demonstra a comparação dos núcleos de células neoplásicas com as células saudáveis. Foi possível observar o papel do núcleo e das mitocôndrias na origem das neoplasias resumindo a evidência experimental do domínio das mitocôndrias na origem da tumorigênese, conforme descrito anteriormente por Seyfried, Shelton (2010). Na Figura 1, a cor verde indica células normais (Figura 1, diagrama 1), com morfologia mitocondrial, nuclear e respiração normais; o vermelho (Figura 1, diagrama

2) indicam células neoplásicas com morfologia mitocondrial e nuclear anormal, respiração anormal e instabilidade genômica. Uma célula com um núcleo neoplásico em um citoplasma normal, pode gerar células normais com anormalidades genômicas associadas à neoplasias (Figura 1, diagrama 3), a origem neoplásica ocorre em células de núcleo normal, mas com citoplasma neoplásico resultando em células tumorais ou células mortas (Figura 1, diagrama 4) em acordo com o estudo de Seyfried; Shelton, (2010).

2.1.2. Oncologia comparativa

A oncologia comparativa é um campo transdisciplinar em crescimento que aproveita os dados de estudos do câncer em animais de companhia, adicionando evidências para apoiar uma patogênese compartilhada entre humanos e cães, determinando sua relevância (Figura 2) já que a incidência de câncer nesses animais é alta e sua população também é três vezes maior que a humana.

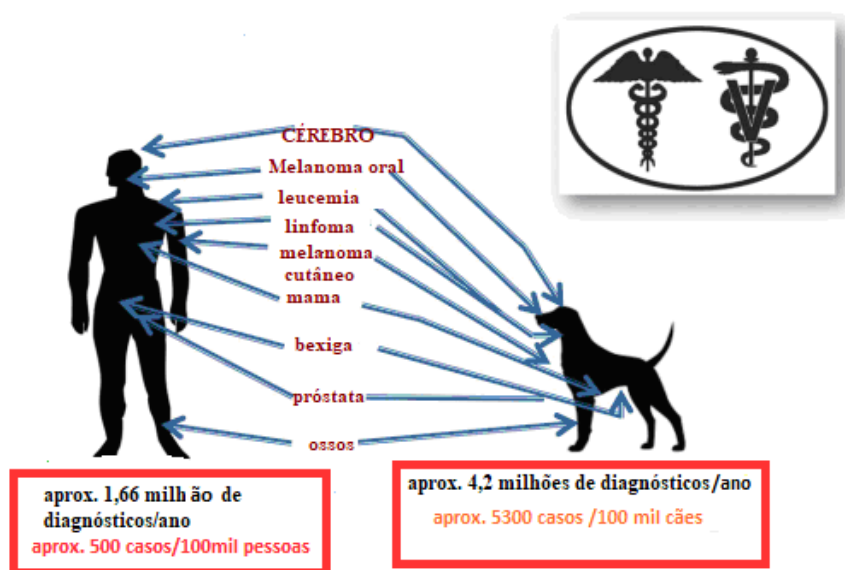


Figura 2: Diagnósticos anuais de neoplasia em humanos e cães, demonstrando a incidência de neoplasias nesses animais é alta e sua população também é três vezes maior que a humana. Fonte: Adaptado de Schiffman; Breen (2015).

A cultura de criatórios caninos estimulada pela sociedade mercantilista propiciou o surgimento de um modelo de alto risco para doenças específicas em cães de raça devido à consanguinidade proveniente da genética restrita (Davis; Ostrander, 2014; Dobson et al., 2002). A variação genética restrita pode levar a uma vida mais

curta e um aumento do risco de desenvolverem câncer, o que segundo Schiffman; Breen (2015), pode ser aproveitado para acelerar o processo de descoberta do gene do câncer com uma perspectiva comparativa, facilitando avaliações e abordagens no diagnóstico, prevenção e tratamento em humanos.

A predisposição genética à neoplasias em humanos também foi encontrada no DNA de cães, como por exemplo, os genes BRCA-1 e BRCA-2 de câncer de mama e ovário relacionados a mutações germinativas para vários tipos de neoplasias (Borges *et al.*, 2015; Engingler *et al.*, 2014; Schiffman; Breen, 2015; Veldohen, 1999). Da mesma forma, o gene supressor TP-53 é responsável pela checagem do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA, diferenciação e desenvolvimento celular (Veldohen *et al.*, 1999), que também ocorrem em humanos com história familiar de neoplasias ou que tiveram mais de uma neoplasia. As mutações de linhagem germinativa são frequentemente identificadas (Vieira, 2010), aumentando o interesse no desenvolvimento de estudo translacional em oncologia comparativa que pode fornecer “*insights*” sobre o risco de neoplasias e a sua prevenção nos mamíferos (Boddy *et al.*, 2020; Schiffman; Breen, 2015).

A valorização científica da pesquisa comparativa e translacional beneficia ambas as espécies uma vez que os animais de companhia, como cães, podem ser usados para avaliar novos biomarcadores correlacionando com estudos pré-clínicos clássicos em roedores ou em testes de neoplasias de humanos (Sultan; Ganaie, 2018) antes do uso clínico. Modelos de pesquisa com cães têm sido empregados em numerosos estudos na Universidade Nacional de Seul, na Coreia do Sul, com o objetivo de analisar semelhanças e diferenças entre muitos tipos de neoplasias que já se sabe que podem ocorrer espontaneamente em caninos e humanos. Isto resulta em um crescimento substancial na investigação comparativa em oncologia, fornecendo aos cães um acesso a tratamentos oncológicos de ponta e ajudando a garantir que os humanos recebam tratamentos com maior probabilidade de sucesso (Gardner *et al.*, 2016).

A capacidade no desenvolvimento do câncer em seu homólogo homem encontra similaridade na sua forma de apresentação clínica, histológica, perfil molecular de resposta e resistência às drogas, bem como desenvolvimento metastático (Pinello *et al.*, 2022; Reif, 2011). A incorporação de cães em estudos pré-clínicos de oncologia influenciou distintamente os resultados obtidos com outros

modelos animais, promovendo uma valiosa interpretação das relações farmacocinéticas/farmacodinâmicas, dose/regime, além das toxicidades clínicas.

Os modelos de neoplasias realizados em ratos têm limitações em imitar neoplasias de humanos, uma vez que alguns tumores surgem espontaneamente em humanos, e os tumores em modelos de ratos devem necessariamente ser induzidos (Oh; Cho, 2023). Os modelos de câncer humano realizados com camundongos geralmente carecem de redes genéticas e interações que sejam responsáveis pelos tumores quando desenvolvidos em humanos.

Provavelmente por estarem tão próximos e por compartilhar o mesmo ambiente dos humanos, os animais podem acidentalmente sofrer exposição aos mesmos fatores de risco classificados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (Tomatis, 1976; De Biase *et al.*, 2023, Oh; Cho, 2023) como exemplo as radiações, intoxicações químicas por metais pesados, agentes biológicos e hormônios (Grosse *et al.*, 2019; Szenti-Györgyl, 1977) e desenvolver naturalmente o câncer, servindo de sentinelas epidemiológicas ou etiológicas para os padrões de mudança de desenvolvimento de câncer observados em humanos (de Biase *et al.*, 2023; Kelsey *et al.*, 1998).

Paoloni; Khanna (2008), em uma revisão de literatura, examinaram assinaturas epigenéticas de neoplasias que são partilhadas em cães e humanos, dado que as regiões reguladoras não codificantes dos genomas caninos são mais semelhantes aos genomas humanos do que os genomas dos ratos. As comparações genômicas e epigenômicas entre tecidos de diferentes espécies também revelaram que o mapa da cromatina se sobrepõe mais entre caninos e humanos (~40–50%) do que entre camundongos e humanos (~10–20%). Assim, as alterações epigenéticas afetadas pelo ambiente podem ser mais semelhantes entre caninos e humanos do que entre ratos e humanos, indicando que os estudos geram dados mais confiáveis quando se comparam aspectos genéticos e epigenéticos em neoplasias de cães e humanos. O desenvolvimento de neoplasias também está ligado à idade, dieta, sexo, às condições domésticas e exposição à poluição. A toxicocinética varia de acordo com a exposição, mecanismos carcinogênicos e a defesa individual do hospedeiro, associados às alterações moleculares irreversíveis como mutação genética, alteração de padrões de metilação do DNA e polimorfismos, e que também dependem dos mecanismos de defesa individuais (Vainio *et al.*, 1992).

Além dos marcadores de genes BRCA-1 e BRCA-2, também o marcador SNP e as vias envolvidas na tumorigênese do câncer de mama humano com caninos da raça Springer Spaniel inglês são demonstrados na Tabela 1 (Oh; Cho, 2023). Foram examinadas assinaturas epigenéticas que são compartilhadas no câncer em cães e humanos e que as regiões reguladoras não codificantes dos genomas caninos são mais semelhantes aos genomas humanos do que os genomas dos ratos (Paoloni; Khanna, 2008).

Tabela 1: Comparação dos marcadores de neoplasias em humanos e caninos.

Tipos de neoplasias	Recursos de alteração	Biomarcadores em humanos	Biomarcadores em caninos
Neoplasia de mama	Via de sinalização	Sinalização PI3K – AKT	Sinalização PI3K – AKT
		Sinalização WNT – β -catenina	Sinalização WNT – β -catenina
		Sinalização ERK	Sinalização ERK
		Via p53 – ATM, CHEK2, TP53, MDM2 e MDM4	Via p53 - ATM, CHEK2, TP53, MDM2 e MDM4
	Nível molecular (mutação e/ou perda/ganho)	Mutações em PIK3CA	Mutação PIK3CA (A3140G)
		ESR1, BRCA2	ESR1 e BRCA2
		CDKN2A, PTEN, CDH1, TP53, CSMD1 e PSD3	CDKN2A, PTEN, CDH1, TP53, CSMD1 e PSD3
		Mucina-1	Mucina-1
		BRCA1, IGF2R, FOXC2, DLG2 e USH2A	BRCA1, IGF2R, FOXC2, DLG2 e USH2A
		POLD1	POLD1
		MDM2, AKT3	
Neoplasia de próstata	Nível molecular (mutação e/ou perda/ganho)	MDM2, PTEN, TP53, CTNNB1, CDH1 e ZBTB4	MDM2, PTEN, TP53, CTNNB1, CDH1 e ZBTB4
		AURCA	ATM, BRCA1 e MEN1

Tipos de neoplasias	Recursos de alteração	Biomarcadores em humanos	Biomarcadores em caninos
		NKX3.1, perda de PTEN	CDKN1B, NKX3.1, PTEN
			AR, TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-ETV5
Neoplasia de pulmão	Nível molecular (mutação e/ou perda/ganho)	EGFR e ALK TP53, PTEN, SMAD4, KRAS, BVS e HRAS	Mutação HER2 ^{V659E} TP53, PTEN, SMAD4, KRAS, BVS e HRAS Receptor de tirosina quinase (TKR)
Neoplasia de bexiga	Nível molecular (mutação e/ou perda/ganho)	Mutação BRAF ^{V600E} EGFR, HER2, CDKN2A, CDKN2B, PIK3CA, BRCA2 e NF-κβ	Mutações em BRAF ^{V595E} , FAM133B, RAB3GAP2 e ANKRD52 EGFR, HER2, CDKN2A, CDKN2B, PIK3CA, BRCA2 e NF-κβ
Glioma	Via de sinalização	Sinalização RTK/RAS/PI3K Sinalização RB Sinalização p53	Sinalização RTK/RAS/PI3K Sinalização RB Sinalização p53
	Nível molecular (mutação e/ou perda/ganho)	Metilação do promotor MGMT IDH1 ou IDH2 Codeleção dos cromossomos 1p e 19q	CDKN2A e CDKN2B PDGFRA
Melanoma	Via de sinalização	Sinalização PI3K – AKT NF1, BRAF e KIT PD-L1	Sinalização PI3K – AKT NF1, BRAF e KIT PD-L1 Membros da família RAS TP53, PTEN, MYC, MDM2 e CDKN2A164–168

Tipos de neoplasias	Recursos de alteração	Biomarcadores em humanos	Biomarcadores em caninos
Linfoma	Via de sinalização	Via NF- κ B	Via NF- κ B
	Nível molecular (mutação e/ou perda/ganho)		CD28, ABCA5, CCDC3 e SMOC2
Leucemia	Nível molecular (mutação e/ou perda/ganho)	Translocação de tirosina quinase	Translocação de tirosina quinase
		RB1	RB1
			c-KIT

Fonte: adaptado de Oh; Cho (2023).

As vias bioquímicas específicas que são determinantes em neoplasia humanos são frequentemente observadas nos caninos, oferecendo a oportunidade de visualizar esses mecanismos nos cães e permitir uma avaliação pré-clínica precisa de novas terapêuticas (Gardner *et al.*, 2016). Grande parte das neoplasias em animais domésticos são assintomáticas e pode passar despercebidas, o que pode dificultar o diagnóstico precoce se considerarmos o padrão-ouro (histopatológico) como única forma de diagnóstico, por isso é necessário integrar a anamnese com uma regularidade de exames anuais em animais predispostos e idosos.

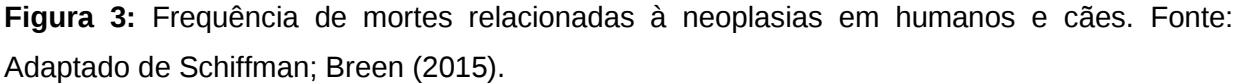
Abegglen *et al.* (2015) fizeram um vasto estudo “*post mortem*” em 36 espécies de mamíferos ($n = 644$), especialmente os grandes e de vida longa, incluindo elefantes. A mortalidade por neoplasia entre espécies foi calculada e comparada por tamanho corporal e expectativa de vida. O genoma do elefante foi investigado quanto às alterações em genes relacionados às neoplasias. O reparo do DNA e a apoptose foram comparados em linfócitos do sangue periférico de elefantes e humanos, os quais demonstraram que os elefantes possuem uma mortalidade associada às neoplasias de 4,81% em comparação a uma taxa de 11-25% em humanos. A conclusão sugere que, em comparação às demais espécies, os elefantes têm uma taxa de neoplasias inferior ao esperado, potencialmente relacionada com o gene TP53, que está em maior quantidade; portanto, em comparação com as células humanas, as células dos elefantes demonstraram uma resposta apoptótica aumentada após danos no DNA.

Outras espécies de animais também poderiam ser utilizadas como sentinelas, oferecendo oportunidades únicas para compreender melhor os processos universais envolvidos na tumorigênese, como o caso de mamíferos marinhos que possuem uma expectativa de vida suficiente para avaliar a saúde dos oceanos do mundo e para permitir a avaliação do desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas, incluindo câncer tendo em vista que o número de animais diagnosticados com câncer tem aumentado nos últimos 30 anos (Browning *et al.*, 2015; Dierauf; Gulland, 2001).

Em lados opostos ao risco de desenvolver neoplasias estão os morcegos, que parecem estar mais vulneráveis às neoplasias e os elefantes, que parecem estar mais protegidos do câncer (Caulin; Maley, 2011; Roche *et al.*, 2012). Ambos fizeram parte de estudos para explicar a base molecular desse fenômeno conhecido como paradoxo de Peto (animais grandes e de vida longa que parecem ser resistentes ao câncer) (Caulin *et al.*, 2015; Dang, 2015; Noble *et al.*, 2015; Peto *et al.*, 1975).

A comparação entre humanos e elefantes demonstrou que os angiossarcomas representam um tipo de subgrupo muito raro de sarcoma de tecidos moles, representando muito menos de 1% de todos os tumores em humanos. Sob a perspectiva epidemiológica, a maior prevalência de neoplasia ocorre em elefantes fêmea, que também com o avanço da idade se tornam mais propensas a desenvolver lesões uterinas (Pessier *et al.*, 2016), sugerindo que os crescimentos benignos ou leiomiomas (miomas) de elefantes fêmeas, são semelhantes aos miomas uterinos benignos que ocorrem em mais de 70% das mulheres ao longo de sua vida (Williams *et al.*; 2017).

Na Figura 3 está representada a frequência de mortes relacionadas à neoplasias em humanos e cães, em que aproximadamente 50% de todas as mortes por neoplasias em humanos nos EUA a cada ano são consequência de quatro tipos de câncer, dois dos quais são comuns a mulheres (Figura 3A) e (Figura 3B) homens em comparação aos cães (Figura 3C), declarados pela American Cancer Society (Schiffman; Breen, 2015; Smith *et al.*, 2015).



Por ser um órgão com inúmeras atividades, o baço se torna alvo de doenças inflamatórias, hiperplásicas e neoplasias benignas, malignas e metástases (Nyland *et al.*, 2002) e tem sido estudado exaustivamente em humanos e cães (Young *et al.*, (2010) apesar de não ser citado no estudo de Schiffmann; Breen (2015).

No estudo elaborado por Boddy *et al.* (2020), após analisar 37 espécies de animais no zoológico de San Diego, CA, EUA, não foi encontrada nenhuma relação entre a prevalência de câncer e longevidade e/ou tamanho, contudo, foi encontrada

uma relação positiva significativa entre o tamanho da ninhada e a prevalência de câncer.

A identificação de novos biomarcadores para neoplasias em humano e a descoberta de novos candidatos às terapêuticas oncológicas são essenciais para superar os principais obstáculos à melhoria das terapias existentes. Para a prevenção do câncer, além da alimentação saudável balanceada proporcionada pela nutrologia, de estilo de vida e exercícios regulares, destaca-se a importância da investigação comparativa relacionada à ocorrência natural do câncer em cães que compartilham do mesmo estilo de vida com humanos, demonstrados pela atuação genética e epigenética observados na Figura 4.

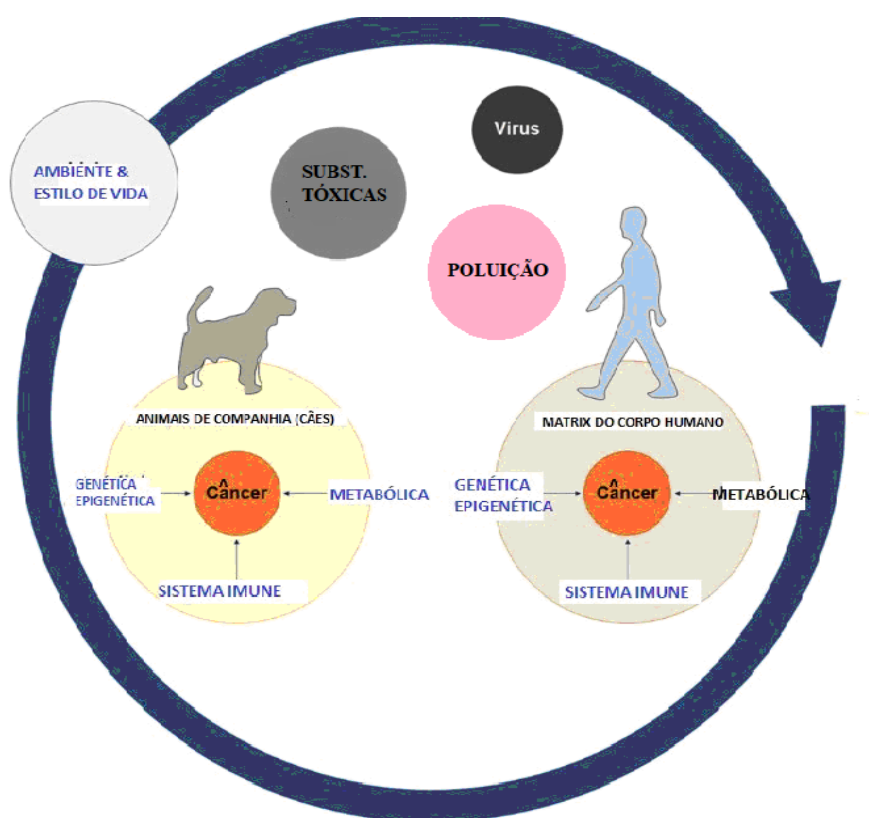


Figura 4: Diagrama esquemático que descreve a oncologia comparativa em animais de companhia e humanos. Fonte: Adaptado de Oh; Cho (2023).

2.1.3. Epidemiologia das neoplasias em humanos

A epidemiologia é uma palavra de origem grega, no qual *epi* significa “sobre”, *demos* refere-se à “população” e *logia* a “estudo”. Esta disciplina estuda a distribuição das várias formas de neoplasias na população, a observação e a análise das

variações de sua ocorrência em diferentes grupos ou comunidades e os fatores de risco associados e aplicando os estudos observacionais de neoplasias, comparações com as diferentes populações, espécies, centros de saúde e registros de câncer (Tedardi *et al.*, 2015).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) é o responsável pelo registro epidemiológico e a classificação dos tipos de neoplasias não hematológicas e hematológicas (leucemia, linfoma e mieloma) em humanos. A taxa ajustada de incidência de neoplasias foi 19% maior em homens (222 por 100 mil habitantes) do que em mulheres (186 por 100 mil habitantes), variando entre as diferentes regiões do Brasil. As neoplasias são uma das principais causas de morte na população humana e é considerado um problema de saúde pública global mais significativo do século XXI (INCA, 2023).

2.1.4. Epidemiologia das neoplasias em animais

Um estudo retrospectivo de necropsia de 2.002 cães relatou que 45% dos cães com 10 anos de idade ou mais e 23% dos cães de todas as idades morreram de câncer, tornando-o uma das principais causas de morte nesta espécie (Bronson, 1982).

Em 2004, foi lançado no Centro Nacional de Câncer (*“National Cancer Center”*) dos Estados Unidos um projeto de pesquisa que recebeu o nome de *“Canine Comparative Oncology Genomics Consortium”* (CCOGC) e que teve como objetivo criar um biorrepositório de tecidos e sangue de cães com câncer para decodificar seus genes e conduzir pesquisas (Oh; Cho, 2023).

A incidência global estimada de neoplasia maligna em animais de companhia varia de aproximadamente 381 a 852 por 100.000 cães (Dorn, 1968; Reid-Smith, 2000; Dobson *et al.*, 2002).

Dados do registro de tumores em animais de Gênova (Itália) estimaram que a incidência de neoplasias em cães possa variar de 99,3 a 272,1 por 100.000 cães (Merlo *et al.*, 2008) e esses dados são compatíveis com a incidência estimada de neoplasias em humanos relatados pelo programa SEER do Instituto Nacional de Câncer.

Davis; Ostrander (2014) demonstraram que 1 milhão em cada 77 milhões de cães nos Estados Unidos desenvolvem neoplasias a cada ano; 50% delas em caninos

ocorrem em animais com 10 ou mais anos de idade e há a chance de um quarto de todos os cães desenvolver a doença durante a sua vida.

Schiffman; Breen (2015) após uma pesquisa extensa, relataram a dificuldade em se obter números precisos de animais acometidos, sugerindo que quase 60% dos estimados 1.500.000 pacientes são diagnosticados com neoplasias malignas tipo sarcoma e carcinoma. Este dado demonstrou que houve um aumento importante, apontando cerca de 1,66 milhão de humanos (taxa de aproximadamente 500/100.000 habitantes) e mais de 4,2 milhões de cães (taxa de aproximadamente 5300/100.000 cães) são diagnosticados com neoplasias anualmente nos EUA. A incidência geral estimada de neoplasia maligna em animais de companhia varia de aproximadamente 381 a 852 por 100.000 cães (Dorn *et al.*, 1968).

As vigilâncias epidemiológicas associadas aos cuidados de prevenção indicam que os cães estão em segundo lugar após os humanos do ponto de vista de incidência mórbida, conforme já relatado acima, pois os cães de companhia partilham o mesmo ambiente de vida que os seus tutores e servem potencialmente de sentinelas epidemiológicas ou etiológicas para os padrões variáveis de desenvolvimento de neoplasias observados nos seres humanos (Kelsey *et al.*, 1998). Nos últimos 15 anos, as investigações científicas em oncologia veterinária estão orientadas para exames genéticos, que promovam melhores diagnósticos orientando para terapias mais eficazes (Schiffman; Breen, 2015). No entanto, quantificar a prevalência de neoplasias e mortes relacionadas a elas em animais têm se concentrado em estudos de casos individuais (American Veterinary Medical Association, 2022; Ostrander; Franklin, 2012), dificultando a capacidade de quantificar a ocorrência em animais (Schiffman; Breen, 2015).

Na Medicina Veterinária, devido a não obrigatoriedade de notificação, os registros de neoplasias têm sido esporádicos, de curta duração pela falta de comunicação e colaboração relacionados à incidência de diferentes tipos de câncer em animais de companhia em qualquer lugar do mundo (Bronden *et al.*, 2007; Nodvedt *et al.*, 2012; Pinello *et al.*, 2022; Rodríguez *et al.*, 2021).

No Brasil, um estudo epidemiológico retrospectivo por meio de laudos de biópsias realizadas no Hospital Veterinário Público do Distrito Federal (HVEP) no período entre julho de 2018 e julho de 2022, demonstrou que 544 animais (80,8%) possuíam formações neoplásicas (684 tipos de neoplasias em 509 animais). Prevalendo 338 (66,4%) fêmeas em comparação aos machos 171 (33,6%), a

idade nos grupos demonstrou que 5 (1%) eram filhotes, 252 (49,5%) eram adultos, 239 (47%) eram idosos e 16 (3,1%) de idade não informada. Sendo que 50% dos cães acometidos por neoplasia possuem entre 8 e 11 anos. Com relação a raça, 261 (51,3%) eram animais de raça definida e 186 (36,5%) sem raça definida. O tipo histológico carcinoma foi identificado em tumor misto mamário (12,3%), mastocitoma (6,6%), lipoma (6,0%), hemangiossarcoma (4,8%), carcinoma de células escamosas (4,4%), carcinoma tubular (4,4%), neoplasia de células redondas (3,9%), carcinoma complexo (3,4%), tumor misto benigno (3,2%) e tricoblastoma (3,1%) foram as mais comuns (Pro, 2022).

Assim como em mulheres, a neoplasia mais frequente nas cadelas foi a mamária (46,3%), sendo o adenocarcinoma o de maior incidência (63,6%) (De Nardi *et al.*, 2002). Uma plataforma “online” (Myclinical) criada na Universidade de Estudos de Nápoles Federico II, Departamento de Medicina Veterinária e Produção Animal (De Biase *et al.*, 2023) coletou dados com base em relato de casos com dados mínimos relacionados a espécie, raça, idade, sexo, castrado/não castrado, topografia e características morfológicas de diagnóstico) onde recolheu cerca de 5740 laudos histológicos e citológicos, dos quais 3318 resultam em neoplasias. Destes 2937 animais (89%) foram diagnosticados por histologia e 381 animais (11%) por citologia. A prevalência da espécie canina e fêmeas (89%) é bem maior em relação à felina (10%) e 1% atribuídas às demais espécies (hamster, cavalo e coelho), em comparação à espécie humana cuja prevalência indica o sexo masculino (90%) e sexo feminino (67%) como não estereotomizados (De Biase *et al.*, 2023). Portanto, há uma falha na vigilância epidemiológica por não existir um sistema de captação de informações de casuística em cães e gatos (Kimura; Teixeira, 2015).

A distribuição do diagnóstico de tumores em cães é apresentada na Figura 5, onde a Figura 5A representa o sexo e a condição de esterilizado/não esterilizado, castrado/não castrado, a Figura 5B representa a raça, e as Figura 5C e 5D representam a distribuição do diagnóstico de neoplasias nas faixas etárias dos pacientes caninos, esterilizados e não esterilizados, dos sexos fêmea e macho, respectivamente (De Biase *et al.*, 2023).

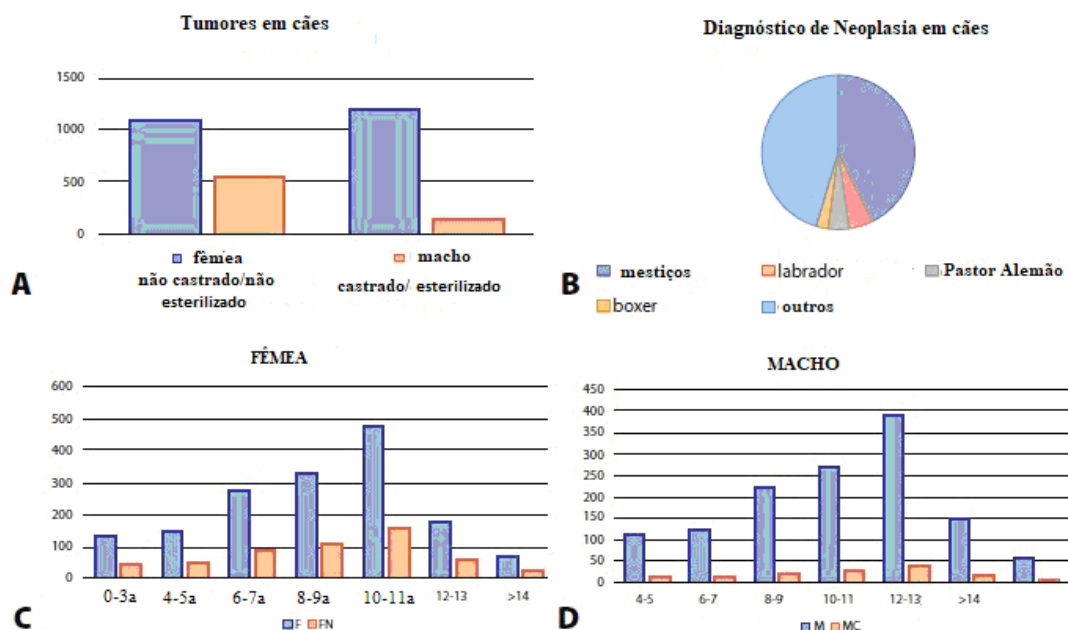


Figura 5: Distribuição do diagnóstico de neoplasias em cães: **(A)** sexo e condição de esterilizado/não esterilizado, **(B)** raça, **(C)** faixa etária de fêmeas caninas esterilizadas e não-esterilizadas e **(D)** faixa etária de machos caninos esterilizados e não-esterilizados. Fonte: Adaptado de De Biase *et al.* (2023).

A Figura 6 apresenta a quantificação e distribuição dos tipos de neoplasias classificadas em malignos e benignos em cães e gatos, a Figura 6A demonstra que o número de diagnósticos de neoplasias em cães é maior do que em gatos, bem como a classificação entre tipos malignos também prevalece em cães. Na Figura 6B, são demonstrados os tipos de neoplasias mais comuns em cães e gatos. Em cães, o tipo epitelial ocorre 56% e mesenquimal 30%, e nos gatos, o tipo epitelial ocorre 65% e os hematopoiéticos 20%. Os cães têm maior probabilidade de desenvolverem neoplasias do tipo mesenquimal em comparação aos gatos, no entanto, os gatos têm maior probabilidade de desenvolverem neoplasias do tipo hematopoiético e epitelial, indicando o avanço de mais de 60% dos tumores de pele e tecidos moles seguido dos localizados em glândulas mamárias (Figura 6C). No que concerne à topografia, a distribuição de neoplasias malignas e benignas em cães, especialmente os tipos localizados em pele, vem aumentando nos últimos anos (Figura 6C).

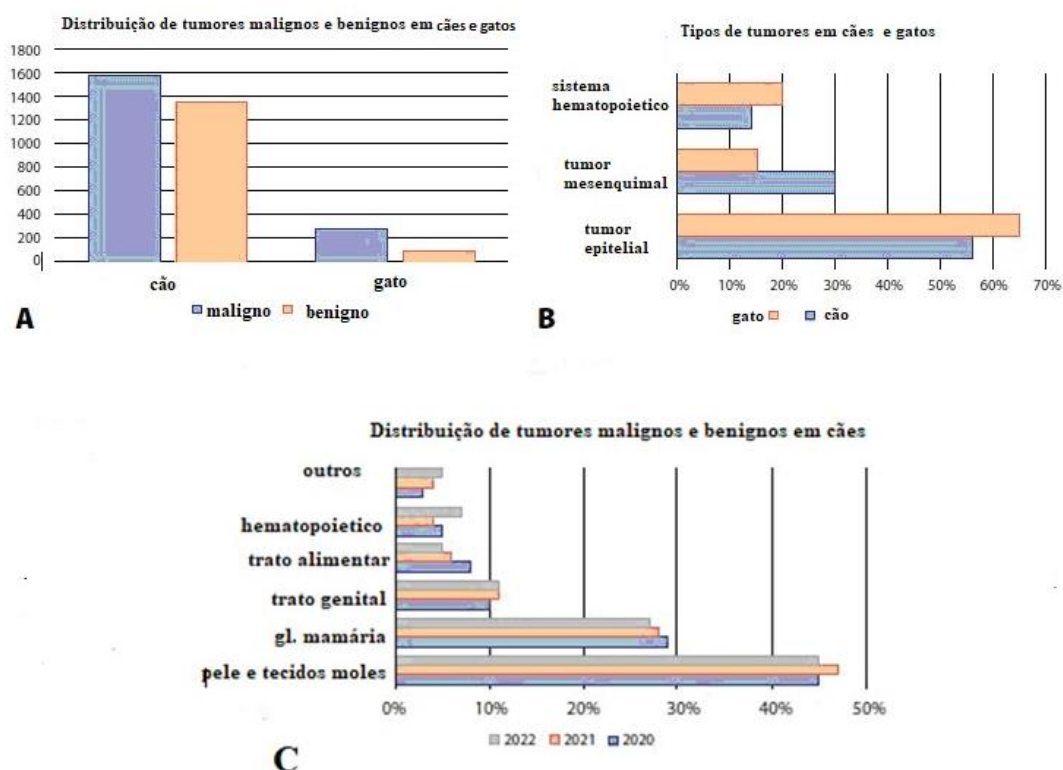


Figura 6: Distribuição de neoplasias benignas e malignas em cães de acordo com os dados recolhidos pela *Piattaforma myClinical* nos anos 2020-2022. (A) por espécie, (B) por tipos de neoplasias celulares, (C) localidade anatômica. Fonte: Adaptado de De Biase *et al.*(2023).

2.2. Diagnóstico de neoplasias

O diagnóstico do câncer no campo da Medicina Veterinária baseia-se na história clínica e na anamnese, associadas aos exames complementares como bioquímicos laboratoriais, imuno-histoquímica que se utiliza de anticorpos monoclonais e tem como objetivo fornecer um diagnóstico e um prognóstico quando a avaliação histopatológica não consegue concluir o caso, podendo auxiliar a determinar a etiologia do processo (Horta *et al.*, 2012).

A citologia aspirativa pode avaliar rapidamente toda a área de superfície, preservando a integridade da amostra se as células tumorais estão à superfície e desprendidas, o que constitui um limite na distinção entre margens próximas e negativas com uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 82,8%. Todavia, as células malignas abaixo da superfície não podem ser detectadas (Cèfaro *et al.*, 2006). O padrão-ouro na maioria dos diagnósticos de neoplasias é através da avaliação microscópica de um tecido corado obtido a partir de uma biópsia de um determinado

órgão (este procedimento é designado por histopatologia) de neoplasias primária ou metástase (Jericó *et al.*, 2015).

O diagnóstico definitivo é obtido por exames histopatológicos de amostras do tumor primário ou metástases (Jericó *et al.*, 2015; Santos; Alessi, 2016). Dentre as desvantagens da biópsia cirúrgica está a necessidade de exames prévios, o fato de este método ser invasivo e requerer anestesia e boa analgesia, a necessidade de preparo da amostra, a demora no tempo de processamento que impede um monitoramento em tempo real, ser mais oneroso, fazendo com que o início da terapia e a resposta sejam comprometidos (Allemani *et al.*, 2015; Melitto *et al.*, 2022; Bertazzolo *et al.*, 2005).

Apesar de existirem inúmeras formas de diagnósticos auxiliares para o câncer, a citologia é utilizada apesar de não ser o padrão-ouro, justificando seu uso por ser minimamente invasiva e seu custo ser relativamente baixo e com boa acurácia (Cowell *et al.*, 2008). Entre as desvantagens do exame citológico está a experiência de interpretação do examinador, que é um fator determinante e limitante, a qualidade de amostras, que devem se apresentar com células viáveis e bem preservadas. A confecção, coloração e armazenamento das lâminas são eventos que podem interferir no resultado e as hemorragias, e disseminação de células neoplásicas e infecções incluem complicações incomuns em decorrência da coleta (Rosseto *et al.*, 2009). A ultrassonografia também tem sido utilizada como exame complementar no diagnóstico padrão-não-ouro, apresentando vantagens por ser minimamente invasiva e seu custo mais acessível que permite um monitoramento mais frequente (Eberle *et al.*, 2012).

De forma complementar são utilizadas as imagens de ultrassonografia (Eberle *et al.*, 2012), a radiografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética (Hage; Masao, 2009; Wisner; Pollard, 2004), pois estes exames também ajudam os médicos veterinários no prognóstico e acompanhamento do paciente.

A necessidade de realizar um diagnóstico precoce e rápido das neoplasias é um dos principais objetivos da medicina moderna e, apesar dos progressos científicos, não é possível alcançar a excelência no diagnóstico precoce do câncer nos animais de companhia, uma vez que muitos tipos de neoplasias são assintomáticos, tal como nos seres humanos. O principal objetivo do diagnóstico é determinar com máxima certeza a presença da doença, para que seja projetada uma intervenção adequada e rápida.

No século V a.C., o médico Hipócrates utilizou a forma mais antiga de diagnóstico médico através da inspeção visual direta da interação da luz com a amostra, relatada em seu trabalho intitulado Epidemias, em que a palidez da pele do paciente e a coloração dos fluidos corporais podem ser indicativas de saúde (Resende, 2006).

Nos últimos cem anos, o diagnóstico médico deixou de depender da inspeção visual e passaram a depender de ferramentas tecnológicas que se baseiam em vários tipos de interação da amostra com diferentes tipos de energia, como a luz, o ultrassom e os raios-X.

Os métodos ópticos têm se concentrado em fornecer essas informações na escala de micrômetro a milímetro, enquanto o ultrassom, o raio-X e as ondas de rádio têm sido fundamentais para auxiliar na escala de milímetro a centímetro. Algumas tecnologias ópticas têm alcançado o estado de instrumentos médicos, mas muitas permanecem na fase de investigação e desenvolvimento, apesar dos esforços persistentes de muitos investigadores na tradução destes métodos para aplicação clínica (Pence; Mahadevan-Jansen, 2016).

2.2.1.Princípios físicos da espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é muito aplicada em Biofotônica para análises biológicas quantitativas utilizando-se da luz (radiação não ionizante), permitindo medir e detalhar a energia vibracional de moléculas (Hanlon *et al.*, 2000). Esta técnica apresenta vantagens dentre todas as técnicas usadas para o diagnóstico, como a sua capacidade de gerar uma “impressão digital” espectral que representa especificamente a composição bioquímica da amostra em análise (Crow *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, técnicas de espectroscopia óptica como fluorescência, espalhamento elástico e espectroscopia Raman foram propostas para diagnósticos médicos rápidos, destrutivos e não invasivos (Hanlon *et al.*, 2000).

As vantagens da espectroscopia Raman em comparação com as demais técnicas de diagnóstico incluem a obtenção de informações sobre a energia vibracional da molécula (Hanlon *et al.*, 2000). As amostras são obtidas sem a necessidade de preparação específica, reduzindo riscos nos procedimentos cirúrgicos por ser minimamente invasiva, utilizam uma quantidade mínima de amostra, portanto, os custos podem ser menos onerosos (Gurgel, 2006; Moreira *et al.*, 2018). Através

desta técnica, é possível determinar as substâncias presentes tanto no tecido biológico normal (Moreira *et al.*, 2008), como em alterações patológicas em tecidos e fluidos (Borges *et al.*, 2015; Hanlon *et al.*, 2000) e se destacam os resultados em tempo real (Hanlon *et al.*, 2000; Lash, 2012).

O efeito Raman ocorre em decorrência da troca de energia entre uma molécula e a luz incidente, os fótons podem ser espalhados ou absorvidos. A maior parte da luz espalhada tem o mesmo comprimento de onda da luz incidida, porém uma pequena fração da luz incidente interage com a molécula de formas diferentes a excitação (Hanlon *et al.*, 2000), dependendo do estado vibracional de suas ligações químicas e da polarizabilidade, que após o processamento dos sinais, geram um número de picos conhecidos por espectros Raman, onde linhas espectrais são obtidas em função das frequências vibracionais denominadas deslocamentos Raman ("*Raman shifts*") que são expressas em unidade de centímetro recíproco (cm^{-1}) (Faria *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2018).

Portanto, o espalhamento Raman estabelece-se como resultado da transição de uma molécula do seu estado fundamental para um estado vibracional excitado (estado virtual), acompanhado pela absorção simultânea de um fóton incidente, e posteriormente a emissão de volta ao ambiente de um fóton de mesma energia, de menor e de maior energia (Hanlon *et al.*, 2000). Tais espalhamentos de luz são demonstrados no diagrama da Figura 7, onde a molécula retorna a forma fundamental de três formas: a primeira em que a energia, $h \cdot \nu_0$, é conservada, ou seja, a radiação apresenta a mesma energia antes e após a sua interação com a molécula (espalhamento elástico ou Rayleigh); nas outras duas formas, quando a molécula retorna de seu estado virtual para o fundamental, o nível energético da mesma pode ser menor, $h \cdot (\nu_0 - \nu_1)$ (espalhamento inelástico, Stokes) ou maior, $h \cdot (\nu_0 + \nu_1)$ (espalhamento inelástico, anti-Stokes) se comparado ao seu estado energético inicial (Figura 7) (Santos *et al.*, 2019).

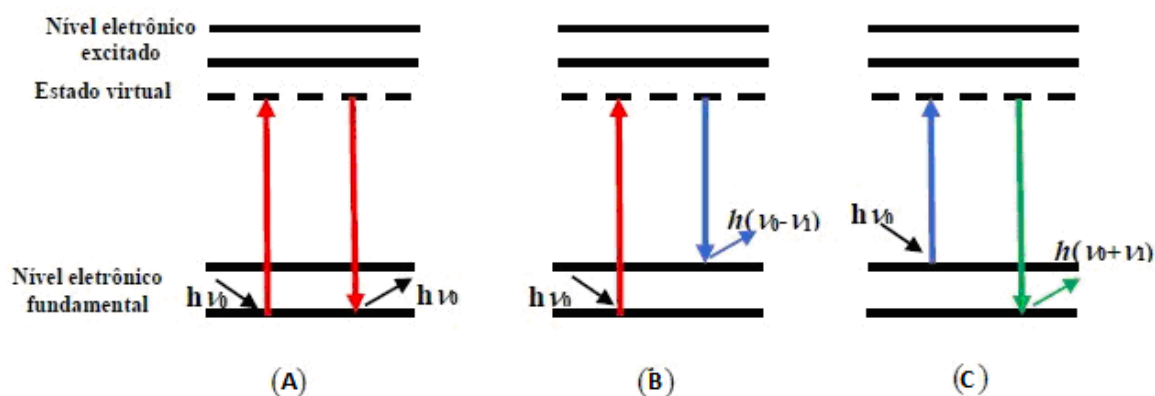


Figura 7: (A) Espalhamento elástico (Rayleigh), (B) espalhamento inelástico (Stokes) e (C) espalhamento inelástico (anti-Stokes). Fonte: Adaptado de Santos *et al.* (2019).

O espectro Raman produzido por esta mensuração tem características únicas daquela substância e a esta medição específica chama-se de espectroscopia Raman, que devido à sua coerência, é chamada de impressão digital da substância (Hanlon *et al.*, 2000). A luz espalhada é coletada por um espectrômetro e o espectro de sua intensidade é plotada em função das frequências vibracionais da amostra. Cada espécie molecular tem seu próprio conjunto de vibrações moleculares.

A espectroscopia Raman baseia-se na dispersão inelástica da luz incidente nas moléculas (Hanlon *et al.*, 2000), permitindo a determinação da composição bioquímica, analisando de forma quantitativa (concentração) e qualitativa (discriminação e classificação) (Hanlon *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2013). Com base no espalhamento Raman, torna-se possível a obtenção de diversas informações relevantes sobre a composição química da amostra na qual houve incidência da luz, fornecendo características em nível molecular, podendo identificar tipos de ligações químicas, conformações moleculares e grupos funcionais de uma estrutura química (Santos *et al.*, 2019; Talari *et al.*, 2015).

2.2.2. Aplicações da espectroscopia Raman em materiais biológicos

Jackson *et al.* (1997) descreveram pesquisas realizadas na região espectral do infravermelho desde o início de 1800, que serviram de inspiração científica de análises das alterações em tecidos e fluidos biológicos, sendo alvo de estudos a partir da interação da luz nos tecidos. Todavia, somente a partir dos anos 1980 é que a espectroscopia Raman passou a ser aplicada em amostras biológicas com a introdução do laser de excitação em comprimentos de onda no infravermelho próximo

(Ozaki;Iriama, 1987) e a técnica Raman começou a ser utilizada com o objetivo de discriminação de tecidos biológicos, componentes bioquímicos, diagnóstico e monitoramento de neoplasias malignas e identificação de grupos de bactérias patogênicas (De Siqueira *et al.*, 2012; Jermyn *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2003).

Na espectroscopia Raman, as informações do material estudado são decodificadas em um conjunto de frequências, e estas revelam os constituintes moleculares das amostras, permitindo detectar modificações bioquímicas existentes na morfologia e arquitetura celular que ocorrem na presença de patologias. Assim, uma análise qualitativa e quantitativa de materiais e substâncias têm sido realizadas pela técnica, cujas aplicações biológicas são relativamente recentes e diversas pesquisas para ampliar esta aplicabilidade (Nunes *et al.*, 2003).

A técnica Raman se transformou em uma ferramenta significativa na análise química da área médica e já permite, na atualidade, o desenvolvimento de pesquisas de patologias humanas “*in vitro*” por meio da detecção de componentes bioquímicos em sangue, urina, tecidos biológicos e fluidos corporais, obtendo diagnósticos em tempos bem mais curtos e não invasivos que revelam o estado atual do indivíduo (Lima, 2022), portanto, a “impressão digital” (“*fingerprint*”) da molécula demonstra suas informações bioquímicas específicas (Silveira *et al.*, 2002).

A maioria dos materiais incluindo tecidos biológicos apresenta redução de emissão de fluorescência quando o comprimento de onda de excitação aumenta para a região do infravermelho próximo. Assim, a interferência da fluorescência no espectro Raman do tecido pode ser reduzida usando a excitação no infravermelho próximo (785, 830 ou 1064 nm, por exemplo, para citar comprimentos de onda de espectrômetros Raman comerciais).

Silveira *et al.* (2002) utilizaram a espectroscopia Raman no infravermelho próximo para avaliação de lesões ateroscleróticas humanas usando um algoritmo baseado em análise discriminante, para o diagnóstico de tecidos não aterosclerótico, não calcificado e calcificado, demonstrando sensibilidade e especificidade máximas de 85% e 89%, respectivamente.

Silveira *et al.* (2013) demonstraram que a técnica Raman é uma ferramenta com potencial para a análise de materiais biológicos utilizando soro sanguíneo, com vantagens em comparação às demais por ser uma análise rápida, necessitando de pouca ou nenhuma preparação nas amostras, volume pequeno de amostra, capacidade para detecção de certa quantidade de compostos bioquímicos em um

único espectro, como por exemplo frações lipídicas e glicose, sem necessidade de reagentes, sendo um manancial de diagnóstico e prognóstico em doenças metabólicas.

2.2.3. Aplicações da espectroscopia Raman no diagnóstico de neoplasias

A espectroscopia Raman pode ser realizada “*in vitro*” e “*in vivo*” como método de avaliação óptica, sendo que os métodos “*in vivo*” são frequentemente mais exatos, mas bastante dispendiosos e demorados, enquanto os métodos “*in vitro*” são mais simples e mais rápidos, com menor custo e precisão (Ye *et al.*, 1999). A análise histopatológica necessita de fases para o preparo da amostra, retardando o diagnóstico e fazendo com que pacientes que necessitam de diagnóstico com rapidez fiquem aguardando determinado tempo para o início do tratamento.

A espectroscopia Raman tem sido usada para caracterizar e diferenciar tecidos normais de tecidos benignos, malignos e pré-malignos do colo do útero (González-Solís *et al.*, 2014b), da mama (Chowdary *et al.*, 2006; Melitto *et al.*, 2022), do cérebro (Banerjee; Zhang, 2007; Aguiar *et al.*, 2020), do trato gastrointestinal (Bohorfoush, 1996), tecidos de neoplasias mamárias em humanos (Moreira *et al.*, 2008) e em animais diferenciar margens cirúrgicas de tecido mamário neoplásico (Munteanu *et al.*, 2017). Além disso, ele pode detectar lesões malignas “*in vivo*” na cavidade oral (Krishna *et al.*, 2014).

Bohorfoush (1996) utilizou a espectroscopia Raman para caracterizar e diferenciar tecidos do trato gastrintestinal. Nunes *et al.* (2003) aplicaram a espectroscopia Raman como técnica diagnóstica em lesões malignas em biópsias de pele humana.

Na esfera de diagnósticos em leucemia humana, a espectroscopia Raman foi utilizada por vários autores. González-Solís *et al.* (2014a) analisaram os espectros Raman do plasma humano de pacientes leucêmicos e saudáveis, e associados à PCA, puderam identificar diferenças na bioquímica sérica relacionadas com a leucemia. Silva *et al.* (2006) analisaram o plasma sanguíneo de pacientes com leucemia mieloide aguda em comparação aos saudáveis e detectaram picos atribuídos às proteínas, aminoácidos e carboidratos em maior intensidade no grupo saudável, enquanto o grupo leucêmico apresentou maior intensidade de fosfolipídios. González-Solís *et al.* (2014b) utilizaram a espectroscopia Raman e a PCA para diferenciar e classificar amostras de soro de doentes normais e leucêmicos,

identificando presença de tirosina e triptofano, que estavam elevadas no grupo saudável, e a presença da fenilalanina no grupo câncer. Gonzáles-Solís *et al.* (2014b) utilizaram a espectroscopia Raman e a PCA no soro humano para monitorizar doentes leucêmicos que estavam recebendo quimioterapia. Martínez-Espinosa *et al.* (2008) utilizaram a espectroscopia Raman com PCA para diferenciar e discriminar amostras de soro de pacientes com leucemia de amostras normais. Silva *et al.* (2018) utilizaram a espectroscopia Raman e um modelo de classificação por análise discriminante empregando PCA e regressão (PLS) e análise de componentes principais (PCA) para a diferenciação espectral de amostras saudáveis e leucêmicas de plasma humano.

Lima *et al.* (2022) utilizaram a espectroscopia Raman em soro de crianças e adolescentes para discriminar amostras normais de amostras de neoplasia leucêmica e não leucêmica utilizando a classificação PLS-DA. Krishna *et al.* (2014) detectaram lesões malignas na cavidade oral “*in vivo*” utilizando a espectroscopia Raman. González-Solís *et al.* (2014b) analisaram espectros de soro sanguíneo humano de pacientes com neoplasias do colo de útero, pré-cancerosos e saudáveis, identificando picos de carotenoides mais intensos em pacientes normais em comparação com os neoplásicos.

Goulart *et al.* (2022) e Goulart *et al.* (2023) utilizaram da espectroscopia Raman como método de diagnóstico do vírus COVID-19 no soro humano e na saliva com alta acurácia.

2.2.4. Aplicações espectroscopia Raman na Medicina Veterinária

Em Medicina Veterinária, estudos que descrevem a utilização da espectroscopia Raman para o diagnóstico e monitoramento do câncer são escassos. Alguns estudos são descritos abaixo.

Munteanu *et al.* (2017) descreveram dois casos clínicos da utilização da espectroscopia Raman SERS (espectroscopia de superfície) para fins diagnósticos em margem cirúrgica de neoplasias mamárias de cães. Os autores sugerem que as características espectrais (picos) de carotenoides e da água interfacial poderiam ser usadas para distinguir entre tecido normal e maligno.

Duarte *et al.* (2010) demonstraram o potencial da espectroscopia Raman associada à regressão PLS para o diagnóstico da toxoplasmose em gatos domésticos, correlacionando as imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo dos

felinos, obtidas com o método de ensaio imuno enzimático (ELISA) padrão-ouro, de acordo com as características espectrais observadas nos espectros Raman, obtendo alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico.

Lopes *et al.* (2009) utilizaram a espectroscopia Raman dispersiva “*in vitro*” com objetivo de caracterizar as diferenças bioquímicas em células de adenocarcinoma de cólon (Caco-2), inoculadas com *Viscum album* homeopático, comparadas com as células Caco-2 controle (sem inoculação), obtendo como resultado a redução de viabilidade de mitocôndria das células tumorais em resposta ao princípio ativo e sugerindo que o homeopático tem potencial antineoplásico.

Os estudos destacam como vantagem da técnica Raman a dispensa de sedação ou anestesia para realizar exames como a biópsia, com potencial para se tornar uma ferramenta de uso clínico na Medicina Veterinária.

A caracterização de alterações bioquímicas em soro sanguíneo de cães e gatos por espectroscopia Raman ainda não foi descrita na Medicina Veterinária, motivo de estímulo para a investigação das alterações bioquímicas em soro sanguíneo de animais domésticos que poderiam ser utilizados em estudo de marcadores biológicos para o câncer.

Os estudos por espectroscopia Raman do sangue e seus componentes bioquímicos serviram de embasamento para autores que aplicaram seus conhecimentos no diagnóstico de leucemias (González-Solíz *et al.*, 2014b; Managó *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2006; Vanna *et al.*, 2014), fornecendo os subsídios necessários para a aplicação desse conhecimento no trabalho aqui descrito.

Lima *et al.* (2022) utilizaram a espectroscopia Raman (830 nm) e a regressão PLS para identificar e diferenciar as características espectrais obtidos de soro sanguíneo com alterações bioquímicas relacionadas à leucemia em crianças e adolescentes, com picos atribuídos a proteínas e/ou aminoácidos, lipídeos e carotenoides. Desta forma corroborou a ideia de que a caracterização das alterações bioquímicas no soro sanguíneo de cães, associada à regressão PLS, pode permitir diferenciar de forma significativa os animais do grupo clinicamente saudável do grupo câncer, através da caracterização de variações ou diferenças espectrais relacionadas a alterações nas bandas de energia vibracional que estão relacionadas a alterações bioquímicas das proteínas, aminoácidos e lipídeos, anteriormente demonstradas em humanos (Bankapur *et al.*, 2010; Bergholt; Hassing, 2009; Dingari *et al.*, 2012; González-Solíz *et al.*, 2014(a,b); Harris *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2013; Lima *et*

al., 2022; Managó *et al.*, 2018; Nguyen; Rocke, 2002; Parachalil *et al.*, 2019; Pichardo-Molina *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2018; Sjöberg *et al.*, 2014; Vargas-Obieta *et al.*, 2016).

Sob esse aspecto, a integração das áreas do conhecimento da Engenharia Biomédica com a Medicina Veterinária, possibilitando a realização de um diagnóstico óptico, possui uma fonte inesgotável de probabilidades científicas que podem delinear leituras de informações biológicas no soro sanguíneo, células sanguíneas e mesmo sangue total, revelando em tempo real, eventos que são interessantes para complementar ou revelar o diagnóstico e como está a evolução e determinar o prognóstico de pacientes oncológicos que fazem quimioterapia (González-Solíz *et al.*, 2014b) ou pacientes que optam por terapias integrativas como a homeopatia.

2.3. Identificação de fatores prognósticos em animais

É de extrema importância o conhecimento dos fatores prognósticos para definição do tratamento e acompanhamento adequados, principalmente relacionados a marcadores de inflamação em humanos e animais, demonstrando que existe uma relação com a mortalidade a longo prazo relacionada a proteínas (Dupré; Malik, 2018; Hsieh *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017). A ausência da albumina foi associada à baixa sobrevida em longo prazo em diversos tipos de neoplasias (Duran *et al.*, 2014; Gupta; Lis, 2010; Lis *et al.*, 2003).

Se estiverem reduzidos, os níveis séricos dessa proteína podem refletir além do aumento do catabolismo proteico, uma desnutrição crônica e a elevação da resposta inflamatória sistêmica (Nakayama *et al.*, 2015). Valores de albumina < 3 g/dL foram associados ao aumento do risco de mortalidade intra-hospitalar em pacientes com câncer independentemente do estado nutricional, estado inflamatório e imunológico (Lima *et al.*, 2021).

Nos cães, as principais proteínas de fase aguda (PFAs) positivas de maior relevância são a proteína C-reativa (PCR) e a amilase sérica (ASA). A principal PFA positiva de relevância moderada é representada pela haptoglobina (Hp). As principais PFAs negativas são as albuminas e a transferrina (Cerón *et al.*, 2005). No estudo realizado por Battisti *et al.* (2013), a albumina apresentou uma redução apenas em pacientes com neoplasia maligna de mama ulcerada e associada ao aumento expressivo da PCR e da Hp, sugerindo um mecanismo de compensação. As citocinas

pró-inflamatórias diminuem a síntese da albumina, uma vez que promovem a síntese de outras PFAs (Calazans *et al.*, 2009).

A eletroforese de proteínas séricas (EPS) é um método simples, que permite separar proteínas do plasma humano em frações. Sua interpretação traz informações úteis ao médico, contribuindo para a investigação e diagnóstico de diversas doenças. No exame citado, a amostra do soro é aplicada em um meio sólido e submetida a um potencial elétrico, separando-as em albumina, α -1-globulina, α -2-globulina, β -globulina e γ -globulina para quantificação. O resultado indica que, se a concentração de albumina estiver reduzida, pode estar ocorrendo baixa ingestão proteica ou elevado catabolismo, bem como as frações de α -globulinas podem se apresentar aumentadas em processos inflamatórios, infecciosos e imunes. No caso da β -globulina, esta proteína está associada às situações de perturbação do metabolismo lipídico ou à anemia ferropriva, em que a ausência ou diminuição da banda γ indica imunodeficiências congênitas ou adquiridas e o seu aumento associado elevação policlonal das imunoglobulinas como, por exemplo, em condições inflamatórias, neoplásicas ou infecciosas (Rajkumar, 2005; Silva *et al.*, 2008).

2.4. Terapêutica convencional de neoplasias em animais

No que concerne à terapêutica, não existe até o momento nenhum tratamento absolutamente efetivo, tornando-se necessária a combinação de multiterapias e oferecer uma melhor qualidade de vida ao paciente, incluindo redução e modulação do estresse emocional, decorrente de procedimentos terapêuticos, como a radioterapia e quimioterapia (Porto, 2004).

As emoções alteram o eixo psico-neuro-imuno-endócrino, havendo uma forte associação com as alterações metabólicas geradas pelos hormônios e citocinas, mediado pelos glicocorticoides que foram observados na angiogênese tumoral (Bauer, 2004; Kiecolt-Glaser *et al.*, 2002).

Os tratamentos para neoplasias na Medicina Veterinária evoluíram em conjunto com o tratamento do câncer em humanos. O primeiro estudo de quimioterapia na Medicina Veterinária foi em 1946, descrevendo o uso de uretano no tratamento de neoplasia hematopoiética em cão (Innes *et al.*, 1946). O primeiro protocolo de quimioterapia combinada utilizando clorambucil e prednisona em cães foi publicado em 1968 (Brick *et al.*, 1968). A partir de 2007, foi aprovada pelo Departamento de Agricultura dos EUA uma vacina contra o melanoma canino (Oncept®, Boehringer

Ingelheim Animal Health do Brasil Ltda, Cuiabá, MT, Brasil) e em 2009, o fosfato de toceranib (Palladia®, Zoetis Comércio e Distribuição Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi o primeiro medicamento aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA para o tratamento de neoplasias caninas.

Outras técnicas utilizadas em Medicina Veterinária incluem a incisão cirúrgica, radioterapia (Haddad *et al.*, 2010), eletroquimioterapia (Silveira *et al.*, 2010), imunoterapia (Schoefelder, *et al.*, 2021).

2.5. Análise estatística dos dados

A análise estatística consiste na aplicação de técnicas e métodos estatísticos para o tratamento de dados amostrais, com o objetivo de extrair o máximo de informações para a melhor análise da diferença entre os grupos. Engloba os testes de significância (testes de hipótese) e os algoritmos de análise multivariada. Os algoritmos de regressão utilizados para a análise multivariada de dados são métodos estatísticos que permitem qualificação e quantificação de dados utilizando diversas variáveis simultaneamente (Brereton *et al.*, 2018; Lehmann *et al.*, 1993).

A análise estatística multivariada permite a redução da dimensionalidade de dados multivariados, através da seleção de informações pela similaridade ou diferença, no qual as variáveis que apresentam grande correlação são organizadas em novas variáveis e resultam em um novo conjunto de dados, composto apenas de informações importantes (Brereton;Lloyd, 2014).

2.5.1. Análise de componente principal (PCA)

A PCA é uma ferramenta multivariada que pode ser utilizada para a análise exploratória de dados espectrais efetuando a compressão de dados em grandes amostras que contêm múltiplas variáveis concomitantemente com a estimativa da variância do conjunto de dados (Jolliffe; Cadima, 2016). Com base nesta variância, a PCA determina novos eixos (os componentes principais) que maximizam esta variância e são ortogonais entre si. O primeiro componente corresponde ao eixo da maior variância espectral; o segundo componente é o eixo da segunda maior variância sem estar correlacionado com o primeiro (ortogonal), e assim sucessivamente (Jolliffe; Cadima, 2016). A intensidade de cada eixo (ou componente principal) nos dados originais também é obtida (carregamento dos componentes principais). Assim, a PCA calcula duas novas variáveis: os Scores dos componentes

principais e os respectivos carregamentos (PCs), de forma que cada eixo do Score representa um componente principal e o carregamento indica a intensidade que cada Score tem ao ser projetado nos dados originais (Bodanese *et al.*, 2012). Os Scores são semelhantes aos espectros Raman e os picos observados podem ser utilizados para revelar diferenças na constituição bioquímica das amostras, enquanto os PCs podem indicar as intensidades dessas diferenças, ou seja, em que grupo (Saudável ou Neoplásico) se encontram essas diferenças (Silva *et al.*, 2018).

Na análise exploratória dos dados busca-se identificar quais variáveis espectrais componentes principais (Scores) apresentam diferenças significativas em suas intensidades (PCs), e associar esses componentes principais às diferenças espectrais entre os grupos. A análise estatística dos PCs foi calculada utilizando o software InStat (versão 3.00, GraphPad, San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com).

2.5.2. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

A regressão PLS é uma técnica estatística multivariada utilizada na análise discriminante (PLS-DA) para classificar amostras com muitas variáveis (Nguyen, Rocke, 2002). Para que a regressão PLS seja utilizada, as variáveis conhecidas devem ter uma relação direta com as variáveis que se deseja treinar, ocorrendo em duas etapas: calibração e validação. No momento da calibração, há uma decomposição entre a matriz **X** (variáveis independentes) e matriz **Y** dependente (amostras) em que a partir da decomposição de matrizes se reduz do conjunto de dados que se obteve das variáveis originais e os componentes principais, sendo determinado o quanto uma variável original contribui para um determinado componente principal, designado variável latente. Na validação, as variáveis latentes, obtidas da decomposição das matrizes durante o processo de calibração, são usados de base para o modelamento das amostras a serem treinadas. O modelo PLS-DA foi utilizado para classificar os espectros nos grupos Saudável e Neoplásico, em que as variáveis preditoras são o conjunto de dados dos espectros Raman e as respostas são os grupos a serem discriminados: Saudável (grupo #1) e Neoplásico (grupo #2). O modelo empregou a validação cruzada (leave-one-out), em que um espectro de amostra é aleatoriamente deixado de fora do conjunto de dados, a covariância do conjunto de dados com espectros $n - 1$ é estimado, e o grupo de o espectro deixado de fora é previsto. Portanto, todos os espectros foram testados um por um. O número

de variáveis latentes (VLs) utilizado no modelo PLS-DA é o número que apresenta a mais alta precisão de discriminação entre os dois grupos.

A PLS-DA cria um modelo no qual qualquer correlação entre as variáveis preditas (grupos: Saudável e Neoplásico) e preditoras (intensidades espectrais Raman) no conjunto de dados espectrais são estimadas e maximizadas e, portanto, usadas para prever a classificação (classes: saudável e neoplásico) 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).

2.5.3. Tabela de contingência

Com o intuito de se desenvolver novos métodos diagnósticos aplicados à Medicina Veterinária, utiliza-se na área biológica a validação da metodologia através da identificação da capacidade discriminativa em relação à doença (presença ou ausência) ou ao estado do indivíduo a qual se deseja discriminar (doente ou saudável). Esta avaliação estatística quantitativa visa determinar se um procedimento ou método é adequado ou não a determinada análise, com a obtenção da margem de erro ou número de acertos (Medeiros *et al.*, 2012). Desta forma, um teste diagnóstico depende da precisão e da ausência de viés para o desempenho adequado, equivalendo à validade e reprodutibilidade do teste (Moreira, 2016). Para tanto, a fim de validar um teste diagnóstico, comparam-se os resultados do teste obtido com os resultados de um teste padrão que sirva de referência a fim de determinar, quantitativa e qualitativamente, se tal metodologia é apropriada para diagnosticar um evento ou para predizê-lo (Moreira, 2016).

A comparação é realizada utilizando-se da tabela de contingência ou matriz de confusão (Tabela 2), que consiste em uma tabela com duas entradas, onde cada entrada é relativa a uma das variáveis, com objetivo de testar a existência de relação entre elas, resultando em melhores testes para diagnósticos os que apresentam poucos resultados falsos positivos e falsos 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 pacientes saudáveis; falso positivo (FP) são os indivíduos onde o teste é positivo em pacientes saudáveis; e falso negativo (FN) são os indivíduos onde o teste é negativo em pacientes doentes

(Moreira, 2016; Vieira, 2011). A tabela de contingência exemplificada com duas variáveis, com a comparação dos dados de classificação de pacientes com resultado positivo (câncer, por exemplo) versus pacientes com resultado negativo (saúdável por exemplo) é demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2: Modelo de tabela de contingência para validação de um teste de diagnóstico com duas variáveis.

Resultado verdadeiro (padrão-ouro)	Resultado esperado (teste de 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)

Os dados obtidos da Tabela 2 fornecem indicadores de Sensibilidade (*S*), que corresponde à probabilidade de o teste ser positivo dado que o paciente examinado é doente, medindo a capacidade de reação do teste em diagnosticar um paciente doente:

$$S = VP / (VP + FN) \quad (1)$$

A Especificidade (*E*) é definida como a probabilidade de o teste ser negativo dado que o paciente examinado não é doente, medindo a capacidade de reação do teste em não diagnosticar paciente não doente ou seja, o teste é específico para a doença em questão.

$$E = VN / (VN + FP) \quad (2)$$

A Acurácia (*A*) ou precisão é definida com a proporção de predições corretas correspondentes ao total de resultados verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos em relação à amostra estudada. Informa se os resultados representam o “verdadeiro diagnóstico” ou o quanto se afasta dele (Martinez; Louzada-Neto, 2003; Vieira, 2011).

$$A = (VP + VN) / N \quad (3)$$

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parecer ético

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi (Protocolo nº. 05001/2021), com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por cada um dos tutores dos cães (Apêndice A).

3.2. Fluxograma da coleta, processamento e análise de dados

O desenho do estudo é apresentado na Figura 8 como um fluxograma de blocos simplificado, no qual se obtém uma macrovisão sobre todo o delineamento do projeto, tendo o seu curso iniciado pelas amostras sanguíneas submetidas à espectroscopia Raman, até o resultado das análises estatísticas, as quais permitiram a identificação das diferenças na composição bioquímica das amostras estudadas e a discriminação dos grupos Saudável e Câncer.

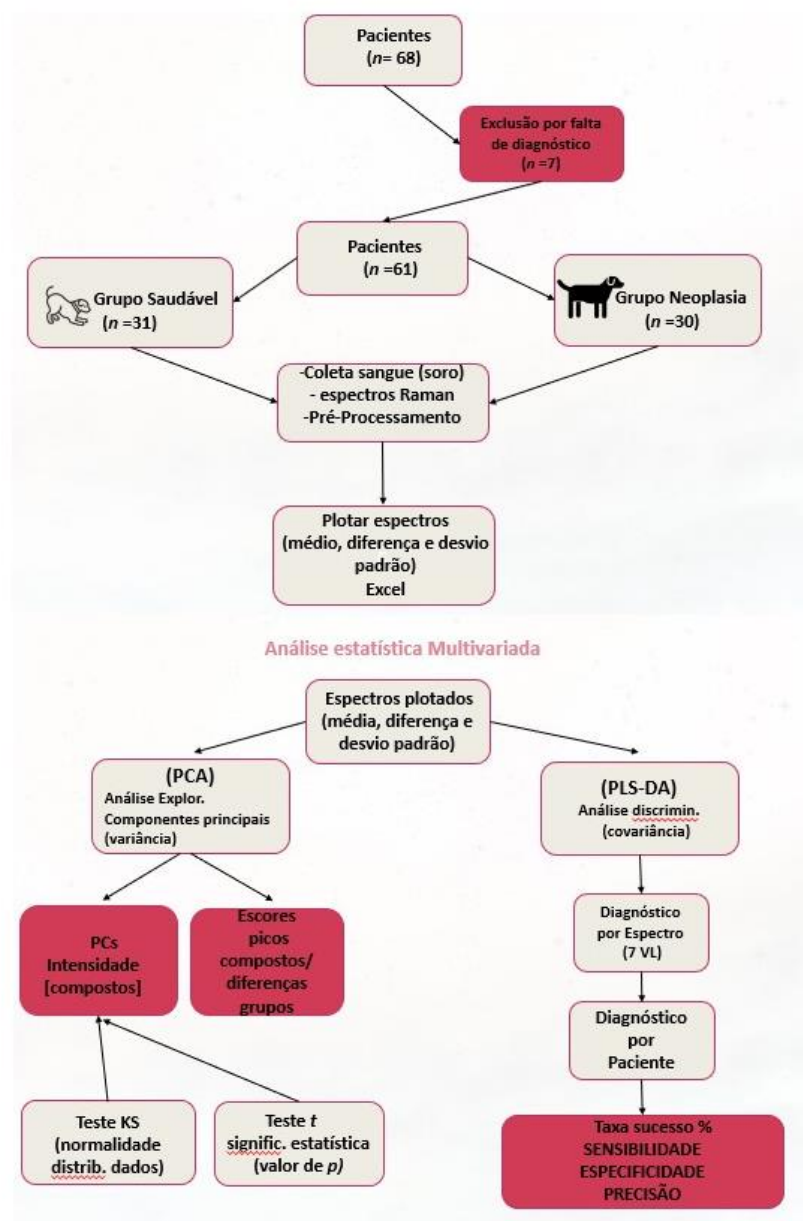


Figura 8: Fluxograma da coleta, processamento e análise dos dados, incluindo a indicação das ferramentas estatísticas empregadas.

3.3. Seleção dos pacientes

Participaram do estudo 61 animais, sendo 31 animais saudáveis (grupo Saudável) e 30 animais com diagnóstico de neoplasia (grupo Neoplasia), onde o diagnóstico foi obtido através de biópsia histopatológica e exames de imagem.

Os critérios de seleção para inclusão das amostras no grupo Saudável foram:

- Amostras de soro de cães provenientes do abrigo particular GAVAA (Campinas, SP);

-
- Amostras de soro provenientes de machos e fêmeas entre 1 a 12 anos, de raça e sem raça definida (SRD), peso entre 2,0 e 45 kg e clinicamente saudáveis;
 - Alimentação industrializada (marca Golden Special, Grandfood Indústria Comércio Ltda., Dourados, SP) contendo 22% proteínas e 9% gorduras, e água potável *ad libitum*.

Os critérios para inclusão das amostras no grupo Neoplasia foram:

- Amostras de soro de cães com câncer, trazidos à clínica pelos tutores e que foram diagnosticados por meio de exame clínico, biópsia histopatológica, ultrassonografia, raios-X, tomografia computadorizada ou ressonância magnética;
- Amostras de soro provenientes de machos e fêmeas indistintamente, com idade variando entre 2 a 12 anos, de raça e sem raça definida (SRD), peso entre 2,0 e 45 kg;
- Amostras de soro de pacientes que nunca receberam nenhuma terapia oncológica;
- Pacientes dispostos a utilizar prescrição dietética de alimentação industrial sem grãos ou prescrição de dieta natural com aproximadamente 30% proteínas e 10% gorduras e água filtrada *ad libitum*;

As amostras de sangue cefálico foram colhidas de cada paciente em jejum, acondicionadas em tubo seco sem anticoagulante (modelo BD Vacutainer®, Interlab Distribuidora de Produtos Científicos Ltda., São Paulo, SP) e enviadas ao Animaltec – Centro de Diagnósticos Veterinários (Campinas, SP), onde foram submetidas à centrifugação (modelo Elektra CE132, Labor Line Ind.com. e Serviços Ltda. – ME, Osasco, SP). Os tubos com as amostras continham 3 mL de sangue e foram centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos para separação do soro sanguíneo e imediatamente armazenados sob refrigeração a 8 °C por 48 h ou congelados a –20 °C por 7 dias para minimizar alterações na constituição bioquímica do soro até a realização do experimento para coleta dos espectros.

As amostras de soro foram separadas em dois grupos: Saudável e Neoplásico. Alguns pacientes do grupo Neoplásico foram submetidos a mais de uma colheita de sangue em datas diferentes e/ou apresentavam mais de um tipo de neoplasia. A Tabela 3 apresenta o número de animais por grupo, sendo que em ambos os grupos predominaram os animais de raça.

Tabela 3: Número de pacientes incluídos no estudo por sexo, raça e idade.

População (n = 61)	Sexo		Raça		Idade		
	Machos	Fêmeas	De raça	SRD*	< 1 ano	2 a 8 anos	> 9 anos
Saudáveis (n = 31)	15	16	22	9	4	17	10
Neoplásico (n = 30)	9	21	23	7	0	6	24

* sem raça definida (SRD)

No grupo Saudável predominaram os cães de ambos os sexos com idades compreendidas entre dois e oito anos de idade, enquanto no grupo Neoplásico predominou as fêmeas com mais de nove anos de idade.

A Tabela 4 apresenta o número de pacientes com neoplásico por tipo de neoplasia, o número de amostras de cada tipo de neoplasia e o método de diagnóstico. Os tumores mais frequentes foram os esplênicos (nove amostras), os de mama (cinco amostras) e os lipomas (quatro amostras). Os pacientes com neoplasias não receberam nenhuma terapêutica oncológica antes da colheita de sangue. Sete doentes com sintomas clínicos sugestivos de tumores foram excluídos da análise dos dados por falta de resultados confirmatórios por biópsia ou imagiologia.

Tabela 4: Número de pacientes diagnosticados por biópsia histopatológica, imagem e o número de amostras de soro colhidas por paciente.

Tipo de neoplasia	Número de pacientes	Número de amostras de soro	Diagnóstico
Melanoma amelanico	1	3	Histopatológico
Carcinoma mama	2	3	Histopatológico
Mesotelioma	1	1	Histopatológico
Adenoma Hepático	1	1	Histopatológico
Histiocitoma	1	1	Histopatológico
Lipoma	1	2	Histopatológico
Mastocitoma	1	1	Histopatológico
Sarcoma tecidos mole grau II	3	3	Histopatológico
Carcinoma células escamosas	2	3	Histopatológico
Sugestivo de hemangiosarcoma esplênico	5	9	US
Sugestivo de tumor cerebral	3	4	Raios-X, US, TC
Sugestivo de cisto renal	2	2	US
Sugestivo de tumor pâncreas	3	3	US
Sugestivo de mieloma	3	3	Raios-X, TC
Sugestivo Feocromocitoma	1	1	US
Sugestivo de tumor bexiga	1	1	US
Sugestivo de neoplasia*	7	7	Exame Clínico
Total	30	41	

TC = tomografia computadorizada; US = ultrassom

3.4. Espectrômetro Raman

Os componentes do sistema de espectroscopia Raman de bancada apresentados na Figura 9 (modelo Dimension P1, Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA) são: o laser, utilizado para a excitação das moléculas, que por meio de um feixe de fótons monocromáticos e colimados, bombardeia o tecido ou fluido biológico, a fim de induzir a polarização das moléculas do material, O espectrômetro Raman possui um laser com excitação de 830 nm, potência máxima de saída de 350 mW, um porta amostras de alumínio, utilizado como receptáculo das amostras de soro, que por meio de uma micropipeta (modelo P200, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) é adicionado 80 μL a cada poço do porta amostras; o cabo de fibras ópticas com a sonda Raman (modelo Vector Probe, Lambda Solutions Inc.), que foi acoplado ao espectrômetro e foi usado para excitação e coleta de sinal retroespalhado pela amostra; e espectrógrafo com grade de difração de 1200 linhas/mm e e câmera CCD de 1340x100 pixels refrigerada por elemento termoeletrônico ($-75\text{ }^{\circ}\text{C}$). A aquisição dos espectros foi realizada no software RamanSoft (versão 1.6, Lambda Solutions Inc.) instalado em um microcomputador notebook Dell Inspiron com Windows 7. O espectrômetro tem uma resolução de 2 cm^{-1} na faixa espectral útil de 400 a 1800 cm^{-1} .

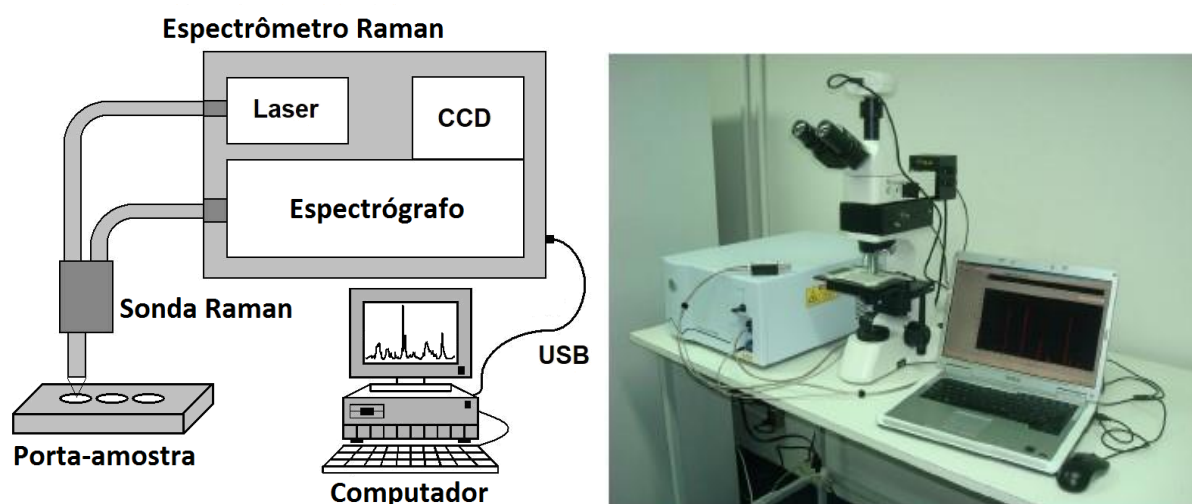


Figura 9: (A) Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo: laser de excitação, sonda Raman, porta-amostra, espectrógrafo com grade de difração, câmera CCD e aquisição de dados pelo computador. (B) Foto do espectrômetro na bancada do laboratório (modelo Dimension P1, Lambda Solutions, Inc.).

3.5. Aquisição dos espectros Raman e pré-processamento

Antes da coleta dos espectros, as amostras de soro foram descongeladas passivamente e uma alíquota de 80 μL de cada amostra foi pipetada em um orifício de um porta amostra de alumínio utilizando uma micropipeta para distribuição do soro. A sonda Raman foi acoplada ao espectrômetro para a excitação e a coleta dos espectros, que foram adquiridos em quintuplicata para fins estatísticos e tempo de exposição definido para 3 s com 10 acumulações (30 s total). Após a coleta, ruídos decorrentes de raios cósmicos foram removidos manualmente e os espectros foram submetidos a um pré-processamento com a finalidade de corrigir a linha de base (devido principalmente à autofluorescência), sendo empregado um polinômio de ordem 7 que foi ajustado e subtraído de cada espectro na faixa espectral entre 400 e 1800 cm^{-1} . Os espectros foram então normalizando pela área sob a curva (norma 1) (Lash, 2012).

O pré-processamento foi realizado utilizando uma rotina desenvolvida no software MATLAB (versão 2007a, The MathWorks Inc., Natick, MA, EUA). A verificação da calibração do deslocamento Raman foi realizada no início do experimento, com a aquisição do espectro do naftaleno e a verificação da posição das bandas, e a correção da resposta espectral do espectrômetro e sonda foi realizada obtendo-se o espectro de uma lâmpada de tungstênio com intensidade calibrada, procedimentos descritos em Silveira *et al.* (2002). A Figura 10 apresenta os espectros de duas amostras de soro de cães (saudável e com câncer) sem o tratamento de remoção do sinal de fundo e com o tratamento de remoção do sinal, evidenciando o pico da vibração de respiração do anel aromático da fenilalanina em 1004 cm^{-1} , onde ficou demonstrado que a calibração do equipamento em termos de deslocamento Raman é preciso, e que a aplicação da correção da linha de base por polinômio de ordem 7 não altera a posição deste pico.

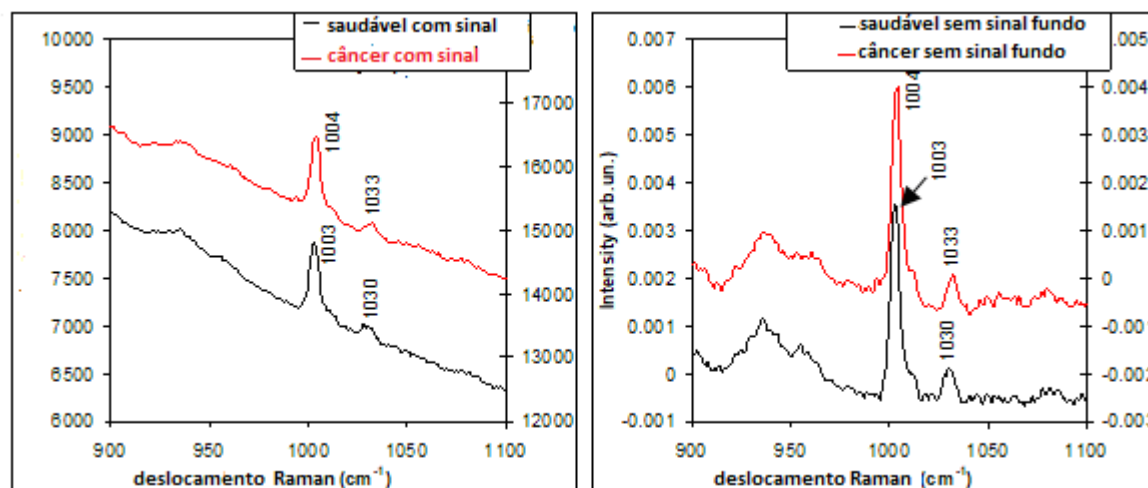


Figura 10: Espectros de duas amostras de soro de cães, uma de cão saudável e outra de cão com neoplasia, antes e após a subtração e remoção da linha de base. Os espectros foram deslocados para melhor visualização.

Os espectros médios de cada grupo (Saudável e Neoplásico) foram calculados e plotados em software Microsoft Excel com abscissas entre 400 e 1800 cm^{-1} , indicando o deslocamento Raman, suas diferenças foram observadas e os seus picos mais evidentes foram marcados para comparação visual e identificação das diferenças nas intensidades dos picos Raman que caracterizam as diferenças de constituição entre os grupos e subsequente análise estatística.

3.6. Análise de variância e teste t de Student

A análise de variância (ANOVA) é adequada para identificar diferenças entre as médias populacionais devido a várias causas atuando simultaneamente sobre os elementos da população (Costa Neto, 2002). Essa análise busca investigar se existem diferenças estatisticamente significativa entre as médias dos grupos estudados e se os fatores analisados exercem influência em alguma variável dependente (Sampaio, 2002).

Para tanto, foi aplicado o teste t de Student que verificou a significância estatística em aceitar ou rejeitar a hipótese nula (hipótese de igualdade na média entre duas populações) quando as amostras seguem distribuição normal, porém com variância desconhecida. Admitindo-se o nível de significância de 5% (valor de $p < 0,05$) e determinando os picos com diferenças significativas e as relações com as diferenças na composição bioquímica entre os grupos, foram identificadas as possíveis diferenças no perfil bioquímico dos dois grupos (Saudável e Neoplásico).

medidos no soro sanguíneo. Quando há diferenças significativas entre os grupos amostrais ($p < 0,05$), rejeita-se a hipótese nula (igualdade) e aceita-se a hipótese alternativa, sugerindo que as médias provêm de populações distintas.

3.7. Análise estatística e análise exploratória por PCA

A análise exploratória foi realizada com a PCA para identificar nos Score 1 a Score 8 os picos de compostos bioquímicos presentes no soro e determinar se há diferenças estatisticamente significativas nas intensidades dos PCs entre os grupos Saudável e Neoplásico, sugerindo uma classificação baseada nas diferenças na constituição bioquímica entre os grupos e na presença de biomarcadores neoplásicos ou ausência de algum biomarcador no grupo Neoplásico. As intensidades dos PCs foram avaliadas estatisticamente para indicar a significância estatística da hipótese de igualdade na média das intensidades dos PCs entre o grupo Saudável e Neoplásico (hipótese nula – H_0), com aceitação ($p > 0,05$) ou rejeição ($p < 0,05$) da hipótese nula (que representa a igualdade na média das intensidades dos PCs nos grupos referidos), sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$ (Vargas-Obietá *et al.*, 2016).

Foi aplicado o teste para verificar a normalidade da distribuição das intensidades dos PCs através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Nos PCs com distribuição gaussiana foi aplicado o teste t de Student, e nos PCs com distribuição não gaussiana foi aplicado o teste de Mann-Whitney a fim de avaliar os picos estatisticamente significativos (picos descritos na Tabela 5). Assim pode-se fazer uso do teste t para a obtenção de conclusões baseadas em cálculos estatísticos, com alto grau de confiança (Neyman, 1937; Raju, 2005). A PCA foi calculada utilizando a rotina “*princomp.m*” no software Matlab (versão 2007a, The MathWorks Inc., Natick, MA, EUA) e a análise estatística aplicada nos PCs foi feita usando o software InStat (versão 3.00, GraphPad, San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com).

3.8. Análise discriminante baseada em PLS

A regressão PLS é uma técnica estatística multivariada usada como análise discriminante (PLS-DA) para classificar amostras com muitas variáveis (Nguyen; Rocke, 2002). O objetivo é classificar amostras com base na covariância calculada entre as variáveis preditoras (os espectros) e as respostas (o grupo ao qual cada amostra pertence) usando um conjunto de dados de treinamento (Barker; Rayens,

2007; Nguyen; Rocke, 2002), o que significa que a PLS-DA encontra a variação nas informações presentes nos espectros Raman, que estão correlacionadas com o grupo, e a variação é usada para classificação. O modelo PLS-DA foi usado para classificar os espectros nos grupos Saudável e Neoplásico, em que as variáveis preditoras variáveis preditoras são o conjunto de dados de espectros Raman e as respostas são os grupos a serem discriminados: Saudável (grupo # 1) e Neoplásico (grupo # 2). O modelo empregou a validação cruzada “*leave-one-out*”, em que um espectro de uma amostra é aleatoriamente retirado do conjunto de dados, a covariância do conjunto de dados com $n - 1$ espectros é estimada, e o grupo no qual o espectro excluído pertence é previsto. Portanto, todos os espectros foram testados um a um em n modelos. O número de variáveis latentes (VLs) usadas no modelo PLS-DA é o número que apresenta a maior acurácia de discriminação entre os dois grupos.

Os resultados da classificação foram apresentados em uma tabela de contingência. Foi calculada a Sensibilidade, a Especificidade e a Acurácia de discriminação analisando os mesmos na forma “por espectro” (“*spectrum-wise*”), ou seja, cada espectro representou um diagnóstico em um dos grupos, e na forma “por paciente” (“*patient-wise*”), onde o resultado da classificação de um paciente é o resultado da classificação da maioria simples dos espectros daquele paciente em um dos grupos. O modelo PLS-DA foi implementado usando a rotina Chemoface (UFLA, MG, Brasil, www.ufla.br/chemoface/) (Nunes *et al.*, 2012).

4. RESULTADOS

4.1. Espectros Raman do soro de cães

Foram coletados espectros Raman do soro sanguíneo de 68 cães (31 clinicamente saudáveis e 37 diagnosticados com câncer). Das 37 amostras de soro sanguíneo de cães com neoplasia obtida para este estudo, foram excluídas sete amostras de pacientes com sintomas clínicos sugestivos de neoplasia, porém suas necropsias indicaram óbito em decorrência de neoplasias, porém não possuíam resultado confirmatório por biópsia ou imagem (Tabela 4), resultando em 154 espectros no grupo Saudável e 200 espectros no grupo Neoplásico. Após o pré-processamento, o espectro médio de cada um dos grupos foi calculado e plotado (Figura 11), apresentando os picos em 455, 506, 621, 642, 757, 853, 939, 1003, 1032, 1130, 1209, 1272, 1315, 1344, 1360, 1453 e 1656 cm^{-1} , atribuídos a proteínas séricas como a albumina e as globulinas (Lin; Koenig, 1976; Martínez-Espinosa *et al.*, 2008; Parachalil *et al.*, 2019). Estes picos podem ser considerados a “impressão digital” Raman dos constituintes do soro, que são semelhante às características Raman do soro humano (González-Solís *et al.*, 2014b; Goulart *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2022; Martínez-Espinosa *et al.*, 2008; Parachalil *et al.*, 2019; Vargas-Obietá *et al.*, 2016) e podem ser utilizados como biomarcadores (González-Solís *et al.*, 2014b; Martínez-Espinosa *et al.*, 2009). Os picos de maior intensidade (1003, 1453 e 1656 cm^{-1}) estão mais intensos no grupo Neoplásia, enquanto o pico em 455 cm^{-1} está mais intenso no grupo Saudável.

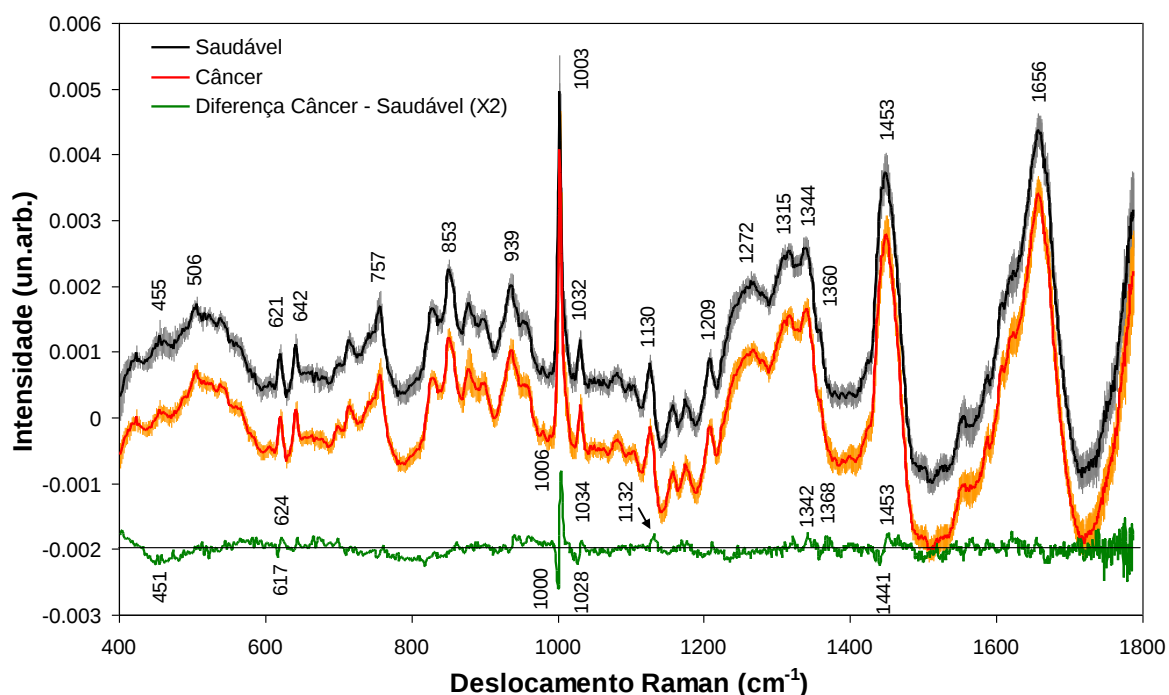


Figura 11: Espectros Raman médios do soro sanguíneo de cães dos grupos Saudável e Neoplásico e o espectro de diferença (Neoplásico – Saudável). O espectro de diferença foi ampliado (X2) para melhor visualização. As características positivas no espectro de diferença representam os picos que são mais intensas nos espectros do grupo Neoplásico do que nos espectros do grupo Saudável. A sombra nos espectros médios representa o desvio padrão em cada número de onda.

O espectro de diferença entre os dois grupos (Neoplásico – Saudável) observados na Figura 11 apresentou picos aos quais se aplicou o teste *t* para a identificação de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), onde as maiores diferenças foram observadas nas bandas com picos positivos em 1132, 1342, 1368 e 1453 cm^{-1} , que podem ser atribuídos a proteínas e/ou aminoácidos, indicando concentrações mais elevadas no grupo neoplásico, os picos negativos em 451 cm^{-1} , atribuídos ao triptofano (KRAFT *et al.*, 2005) e em 1441 cm^{-1} , atribuídos a lipídeos (González-Solís *et al.*, 2014b; Kraft *et al.*, 2005; Vargas-Obieta *et al.*, 2016), sugerem concentrações mais elevadas destes biocomponentes no grupo Saudável. As características espectrais negativas/positivas em 617/624, 1000/1006 e 1028/1034 cm^{-1} sugerem a ocorrência de um desvio à direita ou desvio para o vermelho (“*red shift*” – frequências vibracionais mais elevadas) dos picos em 621, 1003 e 1032 cm^{-1} , atribuídos a fenilalanina/tirosina (De Gelder *et al.*, 2007; Fischer; Hans, 1992; Kuhar *et al.*, 2021), e este desvio para o vermelho está presente nos espectros do grupo

Neoplásico. Uma análise mais pormenorizada deste desvio para a o vermelho é apresentada na análise exploratória na sequência após a Tabela 5, onde estão descritas as atribuições dos picos observados no espectro da diferença entre os grupos (Saudável – Neoplásico).

O espectro da diferença entre os grupos Saudável e Neoplásico também foi calculado e os picos da diferença também foram anotados e as posições dos picos Raman foram atribuídas de acordo com a literatura (González-Solís *et al.*, 2014b; Lima *et al.*, 2022; Martínez-Espinosa *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2018) para determinar a diferença na composição bioquímica do soro de ambos os grupos.

Tabela 5. Posições dos picos das amostras de soro sanguíneo de cães observados no espectro de diferença entre o grupo Saudável e o grupo Neoplásico (Figura 11), as atribuições conforme descrição dos picos e compostos bioquímicos na literatura (De Gelder *et al.*, 2007; González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Lima *et al.*, 2022; Martínez-Espinosa *et al.*, 2009; Munteanu *et al.*, 2017; Parachalil *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2018; Silveira *et al.*, 2013; Talari *et al.*, 2015; Vargas-Obieta *et al.*, 2016) e a indicação de presença dos picos nos grupos Saudável e/ou Neoplásico.

Banda Raman (cm ⁻¹)	Atribuição	Grupo
455 (PC4)	Triptofano	Saudável
485 (PC6)	Proteínas, PCR	Saudável
612 (PC8)	Lipídeos	Saudável
756 (PC5)	Hemoglobina	Saudável
763 (PC4)	Triptofano	Saudável
945 (PC7)	Proteínas, Aminoácidos	Saudável
974 (PC7)	Proteínas, Aminoácidos	Saudável
1028 (PC3)	Fenilalanina	Saudável
1135 (PC6)	Hemoglobina	Saudável
1087 (PC8)	Lipídeos, Fosfolipídeos	Saudável
1227 (PC6)	Amida III, Triptofano	Saudável
1229 (PC5)	Hemoglobina	Saudável
1240 (PC4)	Triptofano	Saudável
1268 (PC8)	Lipídeos	Saudável
1361 (PC4)	Triptofano	Saudável
1441 (PC3/PC8)	Lipídeos – δCH_2 , δCH_3	Saudável
1453 (PC6)	Albumina – δCH_2 , δCH_3	Saudável

Banda Raman (cm ⁻¹)	Atribuição	Grupo
1501 (PC4)	Triptofano	Saudável
1551 (PC5)	Hemoglobina	Saudável
1557 (PC6)	Triptofano	Saudável
1562 (PC5)	Hemoglobina	Saudável
1584 (PC5)	Hemoglobina	Saudável
1623 (PC5)	Tirosina	Saudável
1658 (PC3)	Lipídeos – $\nu\text{C}=\text{C}$	Saudável
1669 (PC4)	Triptofano	Saudável
883 (PC6/PC7)	PCR	Saudável/Neoplásico
959 (PC6)	Hemoglobina – $\delta(\text{CH}_2)$	?
514 (PC4)	Triptofano, Hemoglobina	Neoplásico
517 (PC1)	Serina, Hemoglobina	Neoplásico
569 (PC4)	Proteínas, Hemoglobina	Neoplásico
617 (PC3)	Fenilalanina [t(C–C)], Tirosina, Triptofano	Neoplásico/RS#
621 (PC1)	Fenilalanina, Tirosina, Triptofano	Neoplásico/RS#
624 (PC3)	Fenilalanina, Tirosina, Triptofano	Neoplásico/RS#
639 (PC3)	Fenilalanina, Tirosina, Triptofano	Neoplásico/RS#
642 (PC1)	Tirosina [$\delta(\text{anel aromático})$]	Neoplásico
645 (PC3)	Fenilalanina, Tirosina, Triptofano	Neoplásico/RS#
676 (PC4)	Hemoglobina, Glutathione	Neoplásico
759 (PC1)	Triptofano [$\delta(\text{anel aromático})$], Albumina, Globulina	Neoplásico
760 (PC2/PC3)	Triptofano, Tirosina	Neoplásico
839 (PC1)	Triptofano, Tirosina	Neoplásico
857(PC1)	Albumina	Neoplásico
880 (PC2)	Triptofano	Neoplásico
882 (PC1/PC8)	Lipídeos	Neoplásico
900 (PC8)	Proteínas, Aminoácidos	Neoplásico
901 (PC4)	Proteínas, Hemoglobina	Neoplásico
904 (PC1)	Proteínas, $\delta(\text{C–C})$	Neoplásico
940 (PC1)	Lipídeos, $\delta(\text{C–C})$, α -hélice	Neoplásico
948 (PC4)	Proteínas, Hemoglobina	Neoplásico
950 (PC8)	Lipídeos – $\delta(\text{C–C})$	Neoplásico
1000 (PC3/PC5)	Fenilalanina	Neoplásico
1001 (PC6)	Fenilalanina, Triptofano	Neoplásico/RS#
1003 (PC1)	Fenilalanina, Triptofano	Neoplásico

Banda Raman (cm ⁻¹)	Atribuição	Grupo
1004 (PC2/PC4)	Fenilalanina, Hemoglobina	Neoplásico
1005 (PC6/PC8)	Proteínas, Aminoácidos	Neoplásico/RS#
1006 (PC3/PC5)	Fenilalanina – anel aromático	Neoplásico/RS#
1011 (PC2)	Fenilalanina	Neoplásico
1014 (PC7)	Fenilalanina, Glutathione	Neoplásico
1032 (PC1)	Fenilalanina	Neoplásico
1035 (PC3)	Fenilalanina	Neoplásico
1130 (PC1)	Lipídeos, Leucina	Neoplásico
1132 (PC3)	Triptofano, Tirosina	Neoplásico
1161 (PC1)	Proteínas, Aminoácidos	Neoplásico
1211 (PC8)	Proteínas, Aminoácidos	Neoplásico
1221 (PC1)	Triptofano, Serina	Neoplásico
1234 (PC3)	Triptofano, Tirosina	Neoplásico
1244 (PC2)	Amida III	Neoplásico
1252 (PC7)	Albumina	Neoplásico
1270 (PC1)	Amida III	Neoplásico
1304 (PC3/PC4)	Lipídeos – δCH_2 , βCH_3 , Hemoglobina	Neoplásico
1312 (PC1)	Triptofano	Neoplásico
1343 (PC8)	Proteínas, Aminoácidos	Neoplásico
1403 (PC2)	Glutathione	Neoplásico
1416 (PC8)	Proteínas, Aminoácidos	Neoplásico
1438 (PC4)	Proteínas, Hemoglobina	Neoplásico
1452 (PC1)	Fosfolipídeos, Albumina	Neoplásico
1454 (PC2)	δCH_2 , $\delta\text{C}-\text{N}-\text{H}$	Neoplásico
1466 (PC2)	δCH_2 , δCH_3	Neoplásico
1555 (PC1)	Proteínas	Neoplásico
1566 (PC3)	Triptofano, Tirosina	Neoplásico
1567 (PC4)	Proteínas, Hemoglobina	Neoplásico
1621 (PC4)	Proteínas, Hemoglobina	Neoplásico
1622 (PC3)	Triptofano, Tirosina	Neoplásico
1662 (PC1)	Albumina	Neoplásico
1680 (PC2)	Amida I – α -hélice	Neoplásico

H – grupo Saudável; C – grupo Câncer; DNA – ácido desoxirribonucleico

* Posições dos picos baseadas nos picos observados em espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS)

RS – “red shift”

Símbolos para vibrações: ν – alongamento, β – flexão, t – torção, δ – deformação.

A PCA foi utilizada na análise exploratória com a finalidade de identificar as variáveis espectrais que apresentavam diferenças entre os grupos, através das variáveis Scores e PCs dos componentes principais. A sua interpretação se concentra em identificar se os picos marcados nos componentes principais estão acima ou abaixo do eixo “zero” e compará-los com seus respectivos Scores (grupo Saudável e Neoplásico). Picos positivos com Scores positivos, assim como picos negativos com Scores negativos, revelam que determinado componente bioquímico apresenta alta concentração na amostra estudada, enquanto picos positivos com Scores negativos e vice-versa demonstram que o componente bioquímico, atribuído em tal posição do deslocamento Raman, se apresenta em baixa concentração.

As características espectrais apresentadas nos primeiros oito Scores foram correlacionadas com os compostos bioquímicos séricos de acordo com a literatura. As primeiras oito variáveis da PCA são mostradas na Figura 12 e representaram 98,2% da variância total observada no conjunto de dados espectrais (96,2%, 0,6%, 0,4%, 0,4%, 0,2%, 0,2%, 0,2%, 0,1% e 0,1% para o Score 1 ao Score 8, respectivamente). Foram demonstrados os gráficos das oito primeiras variáveis de componentes principais: Scores e PCs. Para PCs com distribuição gaussiana (PC5, PC6 e PC8), foi aplicado o teste *t* e para os PCs com distribuição não gaussiana (PC1, PC2, PC3, PC4 e PC7), foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Para aceitação da hipótese nula foi considerado o valor de $p > 0,05$, e para rejeitar a hipótese nula (H_0) foi considerado o valor de $p < 0,05$.

As características espectrais que apareceram nos Scores podem ser atribuídas aos constituintes do soro, tais como albumina, globulinas, outras proteínas séricas, aminoácidos e lipídeos. As intensidades dos PCs mostraram diferenças significativas entre os grupos para PC3, PC4, PC5 e PC7 (teste *t*, $p < 0,05$), enquanto PC2 (teste de Mann-Whitney), PC6 e PC8 (teste *t* com correção de Welch) não mostraram diferenças estatisticamente significativa (NS = diferença não significativa, $p > 0,05$). O Score com picos positivos e os componentes principais PCs positivos sugerem que os constituintes bioquímicos estão em concentração elevada no grupo em questão, e o Score com picos positivos e PCs negativos (e vice-versa) sugere que os constituintes bioquímicos estão em concentração reduzida no grupo em questão. A Figura 12 detalha as plotagens dos Scores e PCs 1 a 8.

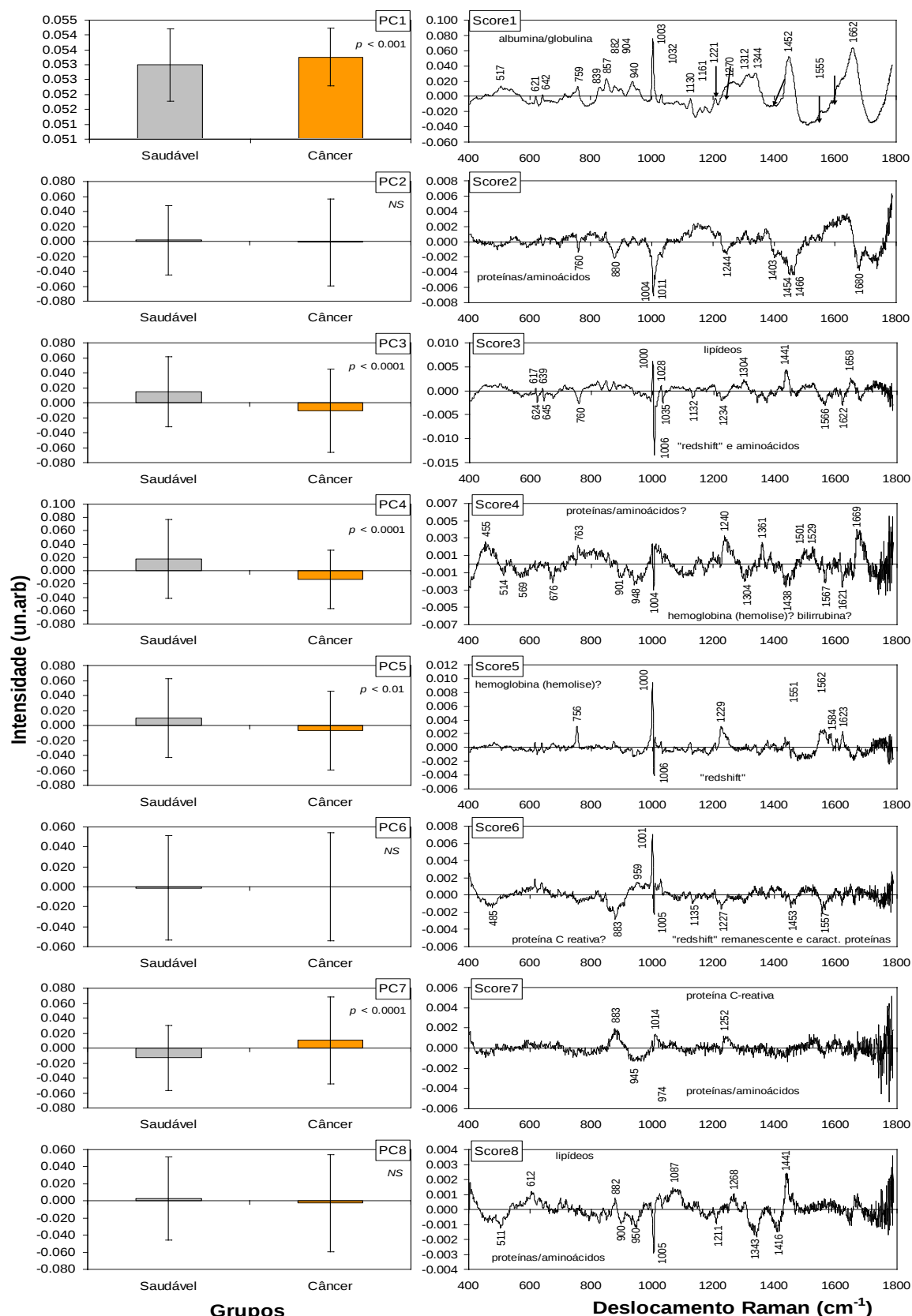


Figura 12: Gráfico das oito primeiras variáveis obtidas da PCA: Scores e PCs. As características em Scores podem ser atribuídas às constituintes do soro: albumina, globulinas, proteínas, aminoácidos e lipídeos. As intensidades dos PCs mostraram diferenças significativas entre os dois grupos para PC3, PC4, PC5 e PC7 (teste t , $p < 0,05$), enquanto

PC2 (teste de Mann-Whitney), PC6 e PC8 (teste *t* com correção de Welch) não mostraram diferenças estatisticamente significativas (NS = diferença não significativa, $p > 0,05$).

O Score 1 (Figura 13 mostrou características espectrais dos constituintes proteicos do soro sanguíneo, principalmente albumina e globulinas, com picos característicos da albumina em 857, 1452 e 1662 cm^{-1} semelhantes aos encontrados nos espectros Raman do soro humano da literatura (Dingari *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2022; Lin; Koenig, 1976; Parachalil *et al.*, 2019). As posições dos picos atribuídos às globulinas são semelhantes às da albumina e podem sobrepor-se aos picos da albumina (Dingari *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2022; Lin; Koenig, 1976; Parachalil *et al.*, 2019). O PC1 (Figura 13) apresentou intensidades elevadas dos picos observados, com concentração significativamente maior de albumina no grupo Câncer em relação ao grupo Saudável (Mann-Whitney, $p < 0,001$). Por isto, a maior concentração de albumina encontrada no grupo Câncer é conflitante com os achados de estudos Raman em soro de pacientes com leucemia (González-Solís *et al.*, 2014b; Lima *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2018) e câncer de colo de útero (González-Solís *et al.*, 2014b).

A albumina é o componente mais abundante encontrado no soro de humanos (Parachalil *et al.*, 2019) e em animais, corresponde a cerca de 35 a 50% do total de proteínas séricas (Rocha *et al.*, 2010). A albumina está diretamente associada ao equilíbrio dos fluidos corporais e à boa saúde (Lima *et al.*, 2021). As concentrações elevadas de albumina e seu espalhamento intenso podem dificultar a identificação de outros componentes espectrais de concentração menos abundante no soro sanguíneo (Parachalil *et al.*, 2019). Níveis séricos de albumina abaixo de 3,0 g/dL poderiam determinar um fator preditivo de morte próxima (Lima *et al.*, 2021). Estudos mostraram que a baixa concentração de albumina estava associada à baixa sobrevida e altas taxas de mortalidade em vários tipos de neoplasia, independentemente do escore corporal e da concentração de proteína C-reativa (PCR) (Duran *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2021).

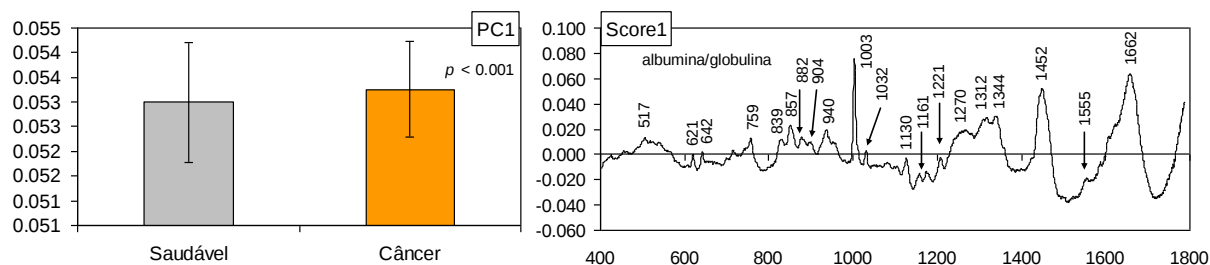


Figura 13: Plotagem das variáveis Score 1 e PC1. A variável Score1/PC1 representa 96,8% da variação espectral presente nos dados e possui diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Mann-Whitney, $p < 0,001$).

O Score 2 (Figura 14) apresentou picos negativos em 760, 880, 1004, 1011, 1244, 1403, 1454, 1466 e 1680 cm^{-1} , que podem ser atribuídos às proteínas e/ou aminoácidos com anéis aromáticos em 760 cm^{-1} (triptofano) (De Gelder *et al.*, 2007; Eckersall; Bell, 2010; González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Lin-Vien *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2018), em 880 cm^{-1} (triptofano) (De Gelder *et al.*, 2007), 1004 e 1011 cm^{-1} (fenilalanina) (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Silva *et al.*, 2018), aminoácidos em 1403 cm^{-1} (glutamina) (González-Solís *et al.*, 2014(a,b)), proteínas em 1244 cm^{-1} (amida III) (González-Solís *et al.*, 2014(a,b)), em 1454 cm^{-1} (δCH_2 e $\delta\text{C-N-H}$) (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Silva *et al.*, 2018), em 1466 cm^{-1} ($\delta\text{CH}_2/\text{CH}_3$) (Dingari *et al.*, 2012; Lin; Koenig, 1976; Lin-Vien *et al.*, 1991; Sandri, 2006) e 1680 cm^{-1} (amida I – α -hélice) (Talari *et al.*, 2015). O PC2 (Figura 14) apresentou intensidade próxima de zero e grande desvio padrão e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p = 0,320$), indicando que essas proteínas/aminoácidos apresentam grande variação entre os grupos, sugerindo, assim, que podem não estar associadas ao processo neoplásico e não seriam relevantes para a diferenciação dos grupos estudados.

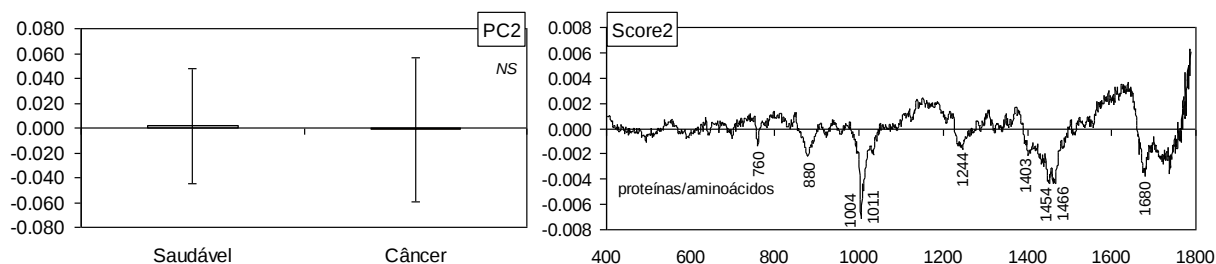


Figura 14: Plotagem das variáveis Score 2 e PC2. A variável Score2/PC2 representa 0,6% da variação espectral presente nos dados e não possui diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Mann-Whitney, $p = 0,320$).

O Score 3 (Figura 15) indicou a existência de um desvio para o vermelho (“*red shift*”) (Fischer; Hans, 1991; Kuhar *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2022; Parachalil *et al.*, 2019) dos picos em 621, 642, 1003 e 1032 cm^{-1} (características positivas/negativas semelhantes a “N” em 617/624, 639/645, 1000/1006, e 1028/1035 cm^{-1}), picos estes atribuídos a aminoácidos que possuem um anel aromático como a fenilalanina, tirosina e triptofano, que ocorreu no grupo câncer. Os picos positivos em 1304, 1441 e 1658 cm^{-1} podem ser atribuídos a lipídeos: em 1304 cm^{-1} ($\delta\text{CH}_3/\text{CH}_2$) (de Gelder *et al.*, 2007), em 1441 cm^{-1} ($\delta\text{CH}_3/\text{CH}_2$) (Banerjee; Zhang, 2007; González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Vargas-Obieta *et al.*, 2016) e em 1658 cm^{-1} ($\delta\text{C}=\text{C}$) (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Kraft *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2018). Os picos negativos em 760, 1132, 1234, 1566 e 1622 cm^{-1} podem ser atribuídos a aminoácidos (triptofano e tirosina) (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Lima *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2018). O PC3 (Figura 15) apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p < 0,001$), sugerindo maior concentração de lipídeos no grupo Saudável, com a presença do “*red shift*” e maior concentração de aminoácidos (triptofano e tirosina) no grupo neoplásicos. No caso da fenilalanina, os picos em 621, 1003 e 1032 cm^{-1} estão relacionados com os movimentos vibracionais das cadeias laterais e apresentam uma constância do número de onda ao passar do monômero para o peptídeo e a proteína (Hernández *et al.*, 2013). As intensidades dos picos da fenilalanina em 621 e 1003 cm^{-1} são sensíveis à hidratação/hidrofilicidade do solvente, devido à interação do solvente com a nuvem de elétrons π do anel benzênico substituído (Kuhar *et al.*, 2021) e os picos em 1032 e 1004 cm^{-1} são sensíveis ao pH devido à protonação (Fischer; Hans, 1991), mas sem alteração da posição do número de onda. O desvio para o vermelho pode sugerir uma alteração conformacional nas proteínas (dobra de estruturas secundárias e terciárias) devido ao pH e à protonação, por exemplo, ou mesmo ligações que ocorrem em locais próximos do anel aromático destes aminoácidos, onde as frequências das bandas dos resíduos da cadeia lateral do aminoácido são deslocadas para o lado direito do espectro (“vermelho”) devido a estas ligações.

Apesar da constância do número de onda da banda na passagem do monômero (fenilalanina) para o peptídeo (somatostatina) e para a proteína (albumina de soro bovino), observada no estudo de Hernández *et al.* (2013), pode-se sugerir-se que as proteínas têm picos com maior energia em comparação com os aminoácidos, embora as diferenças possam ser muito sutis (Figura 15). Estas alterações, mesmo

que sutis na posição destes picos, podem ser prontamente detectadas por um espectrógrafo Raman de alta resolução nesta faixa de números de onda (400 a 1000 cm^{-1}).

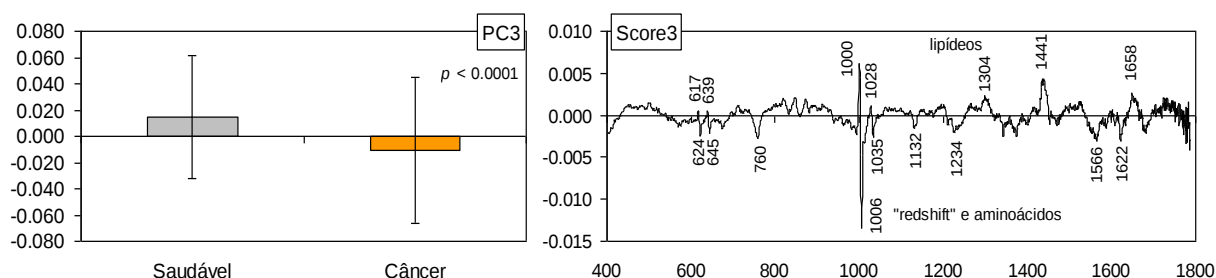


Figura 15: Plotagem das variáveis Score3 e PC3. A variável Score3/PC3 representa 0,4% da variação espectral presente nos dados e possui diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Mann-Whitney, $p < 0,001\%$).

O Score 4 (Figura 16) apresentou picos positivos em 455, 763, 1240, 1361, 1501, 1529 e 1669 cm^{-1} que podem ser atribuídos às proteínas e aminoácidos (De Gelderet *et al.*, 2007; González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Kuhar *et al.*, 2021; Lin; Koenig, 1976; Talari *et al.*, 2015; Vargas-Obieta *et al.*, 2016). Os picos negativos em 514, 569, 676, 901, 948, 1004, 1304, 1438, 1567 e 1621 cm^{-1} podem ser atribuídos às proteínas, particularmente à hemoglobina (Atkins *et al.*, 2017; Bankapur *et al.*, 2010). O PC4 (Figura 16) apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p < 0,001$), sugerindo maior concentração de proteínas e aminoácidos no grupo saudável e maior concentração de hemoglobina no grupo Neoplásico, o que pode sugerir a ocorrência de hemólise nestas amostras. A diminuição da concentração de proteínas/aminoácidos no soro de pacientes com neoplasia pode estar relacionada com alterações no metabolismo das proteínas musculares, que resultam na perda de massa muscular induzida pelo tumor (Sandri, 2006). A anemia hemolítica é devida a duas condições, primeiro por um agente oxidante devido à quebra do metabolismo antioxidativo do eritrócito, formando metemoglobina, responsável pela desnaturação proteica, e ainda de origem microangiopática, onde o eritrócito é fragmentado por alterações na microvasculatura, formando trombo (Fighera, 2008).

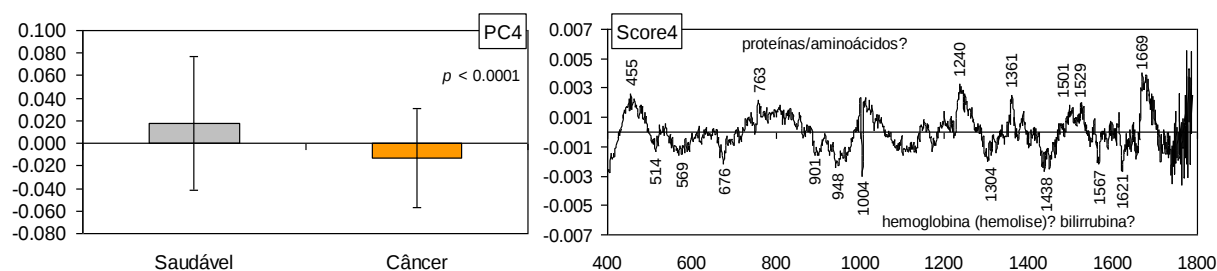


Figura 16: Plotagem das variáveis Score 4 e PC4. A variável Score4/PC4 representa 0,4% da variação espectral presente nos dados e possui diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Mann-Whitney, $p < 0,001\%$).

O Score 5 (Figura 17) mostrou o desvio para o vermelho do pico a 1003 cm^{-1} (característica “N” a $1000/1006 \text{ cm}^{-1}$), que é semelhante ao Score 3. Os picos positivos em 756 , 1229 , 1551 , 1562 , 1584 e 1623 cm^{-1} podem ser atribuídos à hemoglobina (Bankapur *et al.*, 2010). O PC5 (Figura 17) apresentou uma diferença estatisticamente significativa (teste t , $p < 0,01$), confirmando a ocorrência de desvio para o vermelho no grupo Neoplásico e sugerindo que pode ter ocorrido hemólise no grupo saudável em resultado do processamento da amostra, pois uma rotação elevada durante a centrifugação pode promover a hemólise. Também houve maior concentração de hemoglobina e lipídeos no grupo saudável, evidenciada pelo pico em 756 cm^{-1} .

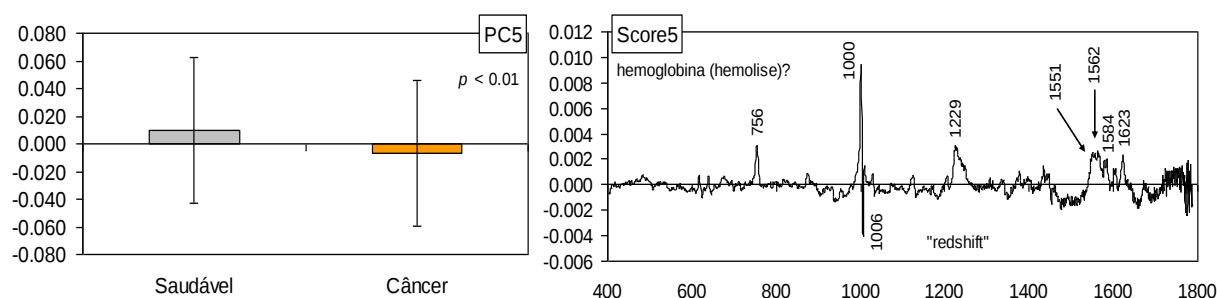


Figura 17: Plotagem das variáveis Score5 e PC5. A variável Score5/PC5 representa 0,2% da variação espectral presente nos dados e possui diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste t , $p < 0,01$).

O Score 6 (Figura 18) mostrou picos remanescentes do “red shift” do pico em 1003 cm^{-1} (característica espectral tipo “N” em $1001/1005 \text{ cm}^{-1}$). Os picos negativos em 485 , 883 , 1135 , 1227 , 1453 e 1557 cm^{-1} podem ser atribuídos às proteínas (Bergholt; Hassing, 2009; Chan *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2005; Dingari *et al.*, 2012; Goheen *et al.*, 1977; Kuhar *et al.*, 2021; Lin-Vien *et al.*, 1991; Lin; Koenig, 1976;

Parachalil *et al.*, 2019). Os picos em 485 e 883 cm^{-1} podem ser atribuídos à PCR (Bergholt; Hassing, 2009; Lin-Vien *et al.*, 1991). O PC6 (Figura 18) não apresentou diferença estatisticamente significativa (teste *t*, $p = 0,8315$), com intensidade próxima de zero e desvio padrão grande, não sendo relevante para a diferenciação dos grupos.

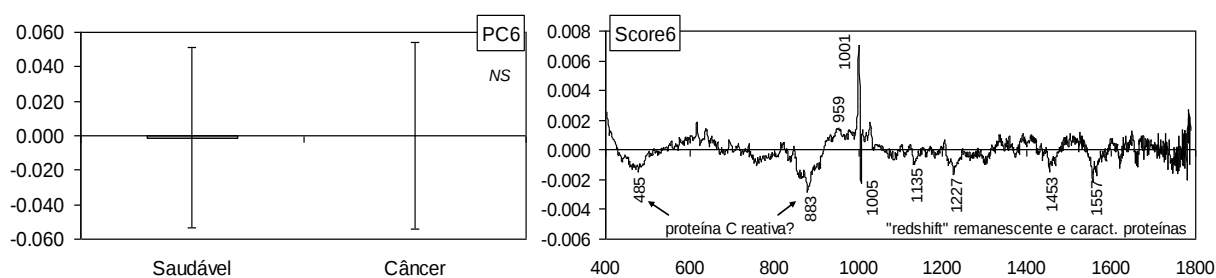


Figura 18: Plotagem das variáveis Score 6 e PC6. A variável Score6/PC6 representa 0,2% da variação espectral presente nos dados e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* com correção de Welch, $p = 0.8315$).

O Score 7 (Figura 19) demonstrou picos positivos em 883, 1014 e 1252 cm^{-1} , que podem ser atribuídos à PCR (Bergholt; Hassing, 2009) e picos negativos em 945 e 974 cm^{-1} , que podem ser atribuídos às proteínas e aminoácidos (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Silva *et al.*, 2018). O PC7 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p < 0,0001$), sugerindo uma maior concentração de PCR no grupo com neoplasia e a já observada maior concentração de proteínas/aminoácidos no grupo saudável.

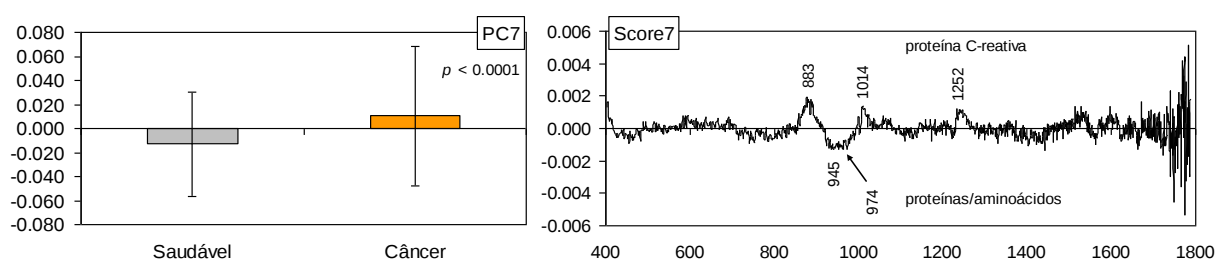


Figura 19: Plotagem das variáveis Score7 e PC7. A variável Score7/PC7 representa 0,2% da variação espectral presente nos dados e possui diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste Mann-Whitney, $p < 0,0001\%$).

O Score 8 (Figura 20) apresentou picos positivos em 612, 882, 1087, 1268 e 1441 cm^{-1} , atribuídos a lipídeos (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Kraft *et al.*, 2005;

Lima *et al.*, 2022; Lin-Vien *et al.*, 1991; Pichardo-Molina *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2018; Talari *et al.*, 2015; Vargas-Obieta *et al.*, 2016) e picos negativos em 511, 900, 950, 1005, 1211, 1343 e 1416 cm^{-1} , atribuídos a proteínas/aminoácidos (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Lin-Vien *et al.*, 1991; Pichardo-Molina *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2018). O PC8 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* com correção de Welch, $p = 0,3522$), com intensidades próximas a zero e grande desvio padrão, sugerindo não haver relevância para a diferenciação dos grupos.

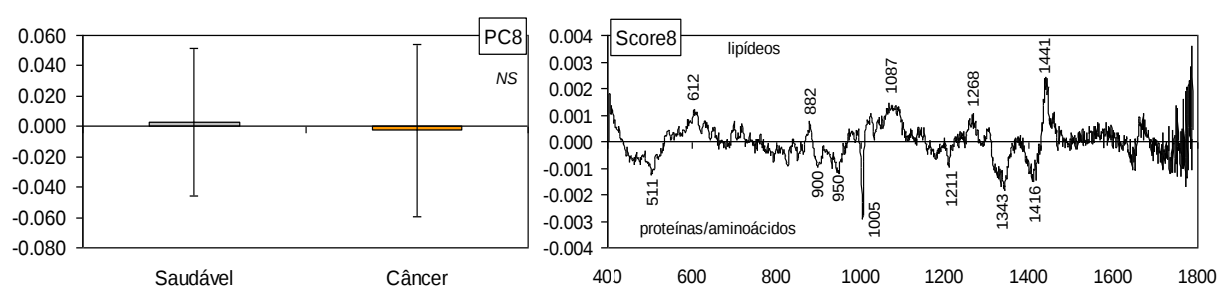


Figura 20: Plotagem das variáveis Score8 e PC8. A variável Score8/PC8 representa 0,1% da variação espectral presente nos dados e não possui diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* com correção de Welch, $p = 0,3522$).

Foi aplicado o teste *t* ($p < 0,05$) nos picos dos espectros médios dos grupos neoplásico e saudável para definição das diferenças estatisticamente significativas entre si, conforme apresentados na Figura 12. As maiores diferenças se encontram nos picos em 455, 506, 621, 642, 757, 853, 939, 1003, 1032, 1130, 1209, 1272, 1315, 1344, 1360, 1453 e 1656 cm^{-1} . Os picos 880, 1004, 1011, 1244, 1403, 1454, 1466 e 1680 cm^{-1} mostram uma intensidade próxima de zero e um grande desvio padrão, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p = 0,320$). Os picos em 485, 883, 1135, 1227, 1453 e 1557 cm^{-1} também não apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste *t*, $p = 0,8315$), com intensidade próxima de zero e grande desvio padrão. Da mesma forma os picos 511, 612, 882, 900, 1005, 1087, 1211, 1268, 1343, 1416 e 1441 cm^{-1} não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* com correção de Welch, $p = 0,3522$), com intensidades próximas a zero e um grande desvio padrão. Esses resultados não significativos sugerem que esses picos, associados principalmente a proteínas/aminoácidos, variaram dentro dos grupos, sugerindo, assim, que podem não estar associadas ao processo neoplásico e não foram relevantes para a diferenciação dos grupos estudados.

As diferenças mais relevantes e que foram observadas nos picos em 1132, 1342, 1368 e 1453 cm^{-1} sugerem concentrações mais elevadas de proteínas e/ou aminoácidos no grupo Neoplásico (albumina e globulinas) e nos picos em 451 cm^{-1} (triptofano) no grupo Saudável (De Gelder *et al.*, 2007; González-Solís *et al.*, 2014(a,b) e 1441 cm^{-1} (lipídeos) (Kraft *et al.*, 2005; González-Solís *et al.*, 2014a; Vargas-Obieta *et al.*, 2016), que sugerem concentrações mais elevadas de triptofano e lipídeos no grupo Saudável, e a ocorrência de desvio para o vermelho nos picos em 621, 1003 e 1032 cm^{-1} (fenilalanina) (González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Hernández *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2022; Martínez-Espinosa *et al.*, 2008; Parachalil, *et al.*, 2019) (características “N” em 617/624, 1000/1006 e 1028/1034 cm^{-1}) no grupo Neoplásico, sugerindo uma alteração na conformação da proteína e/ou ligação perto do anel aromático em resíduos de aminoácidos no grupo Neoplásico.

Lima *et al.* (2022) observaram nos espectros Raman do soro de crianças e adolescentes que um deslocamento para o vermelho (“*red shift*”) dos picos dos aminoácidos contendo anéis aromáticos apareceu no grupo de câncer, sugerindo que esse deslocamento para números de onda mais altos caracteriza alterações neoplásicas. Observaram também que as proteínas (principalmente a albumina), os aminoácidos e os carotenoides apresentavam-se em maior intensidade no grupo normal em relação aos grupos leucêmicos e outros cânceres, discordando dos resultados obtidos neste estudo relativamente à albumina. A obtenção do proteoma sérico com a identificação das proteínas de fase aguda na inflamação é uma ferramenta importante nos testes de diagnóstico veterinário (Atherthon *et al.*, 2013) uma vez que podem ocorrer alterações na composição e concentrações das proteínas plasmáticas no linfoma canino em comparação com indivíduos saudáveis, e valores aumentados de proteínas séricas que são comumente observados na inflamação devido ao câncer (Eckersal; Bell, 2010).

Não foram observados picos de carotenoides na análise PCA, o que sugere que estes não desempenham um papel importante no diagnóstico de neoplasias em cães, provavelmente porque estes compostos não estão normalmente presentes na dieta destes animais.

Em um estudo de espectroscopia Raman com soro e plasma humanos visando diagnóstico, Silva *et al.* (2018), González-Solís *et al.* (2014a) e González-Solís *et al.* (2014b) analisaram espectros Raman de plasma humano de doentes leucêmicos e saudáveis para identificar diferenças na bioquímica sérica relacionadas com a

leucemia. González-Solís *et al.* (2014b) analisaram espectros de soro sanguíneo humano de pacientes com câncer do colo do útero, pré-cancerosos e saudáveis, e identificaram picos de carotenoides com intensidade significativamente mais elevada em indivíduos normais em comparação com os neoplásicos.

Munteanu *et al.* (2017) analisaram os espectros Raman (SERS) de dois fragmentos de tecidos mamários benignos e malignos em cães e demonstraram a presença de características espectrais de carotenoides nos tecidos benignos.

4.2. Análise discriminante e modelos de classificação PLS-DA

Os resultados da PLS-DA utilizando 7 VLS são apresentados na tabela de contingência (Tabela 6) e foram calculadas a sensibilidade, especificidade e acurácia para cada modelo construído que classificam os grupos Saudável X Neoplásico. Os melhores resultados foram obtidos com os modelos de classificação dos espectros de soro interpretados “por paciente” (*“patient-wise”*), com sensibilidade de 77%, especificidade de 77% e acurácia de 77%, que foi superior em comparação à classificação “por espectro” (*“spectrum-wise”*), que apresentou sensibilidade de 76%, especificidade de 81% e acurácia de 78%.

Tabela 6: Tabela de contingência com os resultados da discriminação dos espectros Raman das amostras de soro de sangue de cães usando o modelo de discriminação baseado em PLS (PLS-DA) utilizando o modelo de classificação por paciente e por espectro, respectivamente.

Diagnóstico clínico	Diagnóstico por Raman / PLS-DA (7 LVs)			
	Por paciente		Por espectro	
	Saudável	Neoplásico	Saudável	Neoplásico
Saudável ($n = 31$ amostras de 31 pacientes, $n = 154$ espectros)	25	6	119	35
Neoplásico ($n = 41$ amostras de 30 pacientes, $n = 200$ espectros)	10	31	46	154
Sensibilidade %	77%		76%	
Especificidade %	77%		81%	
Acurácia (classificação correta) %	77%		78%	

5. DISCUSSÃO

5.1. Comparação dos dados dos espectros Raman do soro sanguíneo com outros estudos

A fisiologia do soro sanguíneo dos mamíferos é complexa e semelhante entre as espécies, sendo constituída basicamente por água, sais inorgânicos e biomoléculas, incluindo proteínas, aminoácidos, lipoproteínas, vitaminas e glicose (Martínez-Espinosa *et al.*, 2008; Parachalil *et al.*, 2019) e que, está em consonância as pesquisas de oncologia comparativa entre cão e humano (Gardner *et al.*, 2016; Reif, 2011; Pinello *et al.*, 2022).

Várias biomoléculas presentes nos tecidos e fluidos biológicos são sensíveis às alterações homeostáticas pré-cancerígenas e cancerígenas, o que pode facilitar o uso da espectroscopia Raman para o diagnóstico e monitoramento do câncer (González-Solís *et al.*, 2014a), uma vez que neoplasias aumentam as concentrações de proteínas (albumina e globulinas) (Martínez-Espinosa *et al.*, 2008; Parachalil *et al.*, 2019). Este fato foi observado nos espectros Raman no soro dos cães obtidos no presente trabalho e apresentados na Figura 12.

Em humanos, 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-específico para biomoléculas para diagnóstico e monitoramento (Martínez-Espinosa *et al.*, 2009).

Barker; Rayens (2007) verificaram que as globulinas séricas apresentam perfil espectral semelhante ao da α -albumina sugerindo, portanto, que o aumento das características espectrais semelhantes à albumina no Score 1 pode ser devido ao aumento dessas proteínas, algumas delas associadas ao sistema de defesa do corpo, particularmente as imunoglobulinas.

As posições dos picos Raman das globulinas são semelhantes às da albumina e estão descritas nas seguintes posições: em 857 cm^{-1} (tirosina), em 948 cm^{-1} (lipídeo – estiramento C–C), em 1002 cm^{-1} (fenilalanina – deformação $=\text{CbH}_2$) em 1452 cm^{-1} – deformação CH_2 , em 1343 cm^{-1} (lipídeos e proteínas – deformação CH_2); em 1453 cm^{-1} proteínas – deformação CH_2 e em 1658 cm^{-1} (proteínas – amida I, conformação α -hélice), semelhantes às posições encontradas nos espectros Raman do soro humano (Lima *et al.*, 2022; Parachalil *et al.*, 2019; Lin; Koenig, 1976; Dingari *et al.*,

2012). Tais picos apresentam correspondência similar aos encontrados no presente estudo, sendo indicados os seguintes picos relacionados à albumina e globulina nos espectros médios: 853, 939, 1003, 1344, 1453 e 1656 cm^{-1} . Todavia, as posições dos picos não estão em consonância com os achados obtidos no soro de pacientes com leucemia (González-Solís *et al.*, 2014a; Lima *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2018) e câncer de útero (González-Solís *et al.*, 2014b). Em humanos, se os níveis séricos de albumina estiverem abaixo de 3,0 g/dL podem determinar um fator preditivo de morte próxima (Lima *et al.*, 2021).

Nas amostras de soro de cães obtidas no presente estudo, foi observado que a albumina e globulina estavam em maior intensidade no grupo Neoplásico, sugerindo maior concentração. De acordo com Oliveira *et al.*, (2013) a síndrome Paraneoplásica compreende alterações hematológicas mistas, como por exemplo, anemia, eritrocitose, leucopenia, leucocitose, trombocitopenia e principalmente a hipergamaglobulinemia. Ela é caracterizada pelo excesso na produção de imunoglobulinas por linfócitos ou plasmócitos, de maneira que o excesso de proteínas circulantes promove a hiperviscosidade sanguínea, hipóxia, entre outras, decorrente de linfomas, plasmocitomas ou leucemia linfocítica (Bergman, 2007; Mangieri, 2016). Os picos de fenilalanina estavam presentes em maior concentração nos Scores 2 e 3 localizado no grupo Neoplásico em concordância com Silva *et al.* (2018), que verificaram em seus resultados concentrações maiores de fenilalanina no grupo leucêmico, em que sua presença está relacionada à ativação do gene BCR-ABL oriundo do cromossomo Philadelphia, presente em uma classe de leucemias mieloides crônicas, mas que também tem sido identificada em leucemias agudas mieloides e linfoides (Colleoni *et al.*, 1998; Levine; Gilliland, 2008; Schaffel; Simões, 2008). González-Solís (2019) verificou a presença da fenilalanina nos espectros de soro de pacientes com leucemia e com câncer de útero (cervix). Contudo, as concentrações de tirosina e triptofano se encontravam maiores no grupo saudável, diferindo dos resultados obtidos neste estudo.

González-Solís *et al.* (2014a) demonstraram em seu estudo utilizando amostras de soro sanguíneo de indivíduos saudáveis e leucêmicos que os picos Raman em 1338 cm^{-1} (triptofano, proteínas – α -hélice, fosfolipídeos), 1447 cm^{-1} (lipídeos), 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, fosfolipídeos) e foram menos intensos nos leucêmicos em comparação aos indivíduos saudáveis.

Apesar de serem encontrados em humanos com leucemia, esses achados corroboram com o encontrado neste estudo, uma vez que visto que os picos na faixa de 1343, 1453 e 1656 cm^{-1} do presente estudo foram menos intensos no grupo Saudável em comparação ao grupo Neoplásico e maior concentração de albumina se encontram no grupo Câncer. González-Solís *et al.* (2014b) também analisaram espectros de soro sanguíneo humano de pacientes com câncer de útero, pré-câncer e saudáveis e identificaram picos de carotenoides com intensidade significativamente maior em indivíduos normais em comparação com os neoplásicos.

Munteanu *et al.* (2017) analisaram os espectros Raman (SERS) de dois fragmentos de tecidos mamários benignos e malignos em cães e demonstraram a presença de características de carotenoides em tecidos benignos. No entanto, no presente estudo não foram observados picos de carotenoides na análise por PCA, sugerindo que eles não desempenham papel no diagnóstico de neoplasias em cães, provavelmente porque esses compostos não estão presentes na dieta desses animais.

Lima *et al.* (2022) utilizaram a espectroscopia Raman em soro de crianças e adolescentes para discriminar amostras normais de amostras de neoplasia leucêmica e não leucêmica, demonstrando picos de albumina sérica (852, 1452 e 1659 cm^{-1}) contidas no soro de amostras do grupo normal estão em maior quantidade de albumina do que o soro de amostras leucêmicas e dos outros tipos de câncer, diferindo dos encontrados no presente estudo. Ocorreu um “deslocamento para o azul” (“*blue shift*” ou deslocamento para alta energia vibracional) em 1004 cm^{-1} (picos invertidos em 1002 e 1006 cm^{-1}) e em 619 e 640 cm^{-1} (picos invertidos 619/625 e 640/646 cm^{-1}) das amostras do grupo leucêmico e outros tipos de neoplasias em relação ao grupo normal.

No presente estudo, o Score 3 e o Score 5 apresentaram picos em 621, 642, 1003 e 1032 cm^{-1} (características positivas/negativas semelhantes a “N” em 617/624, 639/645, 1000/1006 e 1028/1035 cm^{-1}) atribuídos a aminoácidos que contém anel aromático: fenilalanina, tirosina e triptofano. Estas moléculas estariam em maior concentração no grupo Neoplásico, que corrobora com os achados neste estudo pois ocorreu este desvio ou deslocamento da intensidade do pico para a região do vermelho, que sugere uma maior concentração de lipídeos no grupo Saudável e uma maior concentração de aminoácidos (triptofano e tirosina) no grupo Neoplásico.

Para a fenilalanina, os picos em 621, 1003 e 1032 cm^{-1} estão relacionados aos movimentos vibracionais da cadeia lateral e apresentam constância do número de onda ao passar do monômero para o peptídeo e para a proteína (Hernández *et al.*, 2013). As intensidades dos picos de fenilalanina em 621 e 1003 cm^{-1} são sensíveis à hidratação/hidrofilicidade do solvente, devido à interação do solvente com a nuvem de elétrons π do anel de benzeno substituído (Kuhar; Umapati, 2021). Os picos em 1032 e 1004 cm^{-1} são sensíveis ao pH (devido à protonação) (Fischer; Hans, 1992), sem alteração na posição do número de onda. O desvio para o vermelho pode sugerir uma mudança conformacional nas proteínas (dobramento de estruturas secundárias e terciárias) devido ao pH e à protonação, por exemplo, ou mesmo ligações que ocorrem em locais próximos ao anel aromático desses aminoácidos, onde as frequências de banda do aminoácido os resíduos da cadeia lateral são deslocados para o lado direito (vermelho), por exemplo, ou mesmo ligações que ocorrem em locais próximos ao anel aromático desses aminoácidos, onde as frequências de banda do aminoácido os resíduos da cadeia lateral são deslocados para o lado direito (vermelho) do espectro devido a essas ligações. Embora o número de onda da banda permaneça constante ao passar do monômero (fenilalanina) para o peptídeo (somatostatina) e a proteína (albumina sérica bovina), como visto no estudo de Hernández *et al.* (2013).

González-Solís *et al.* (2014a) verificaram que os picos Raman em 1338 cm^{-1} (triptofano, proteínas – α -hélice, fosfolípidos), 1447 cm^{-1} (lípidos), 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, fosfolípidos) foram menos intensos nos leucêmicos em comparação aos indivíduos saudáveis. Esses achados corroboram com os achados deste estudo, visto que os picos em 1304 cm^{-1} ($\delta\text{CH}_3/\text{CH}_2$), em 1441 cm^{-1} ($\delta\text{CH}_3/\text{CH}_2$), e em 1658 cm^{-1} ($\delta\text{C}=\text{C}$) foram mais intensos no grupo Saudável e a presença de “*red shift*” com uma maior concentração de aminoácidos (triptofano e tirosina) no grupo Neoplásico.

Sandri (2006) relatou a ocorrência da diminuição da concentração de proteínas/aminoácidos no soro de pacientes com neoplasia pode estar relacionada a alterações no catabolismo proteico muscular, resultando em perda de massa muscular induzida por tumor. Bankapur *et al.* (2010) verificaram picos em 473, 490, 517, 545, 589, 620, 635, 860, 898, 936, 962 e 1138 cm^{-1} , atribuídos em sua maioria à hemoglobina, componente molecular das hemácias. Esses achados corroboram com

os achados deste estudo, nos picos em 514, 569, 676, 901, 948, 1004, 1304, 1438, 1567 e 1621 cm^{-1} e podem ser atribuídos a proteínas, onde a maior concentração de hemoglobina pode sugerir a ocorrência de hemólise em amostras dos grupos.

Freitas (2018) relataram a ocorrência da ruptura das hemácias por erros técnicos de coleta, processamento, transporte e armazenamento, apontando a proporção de amostras veterinárias com presença significativa de hemólise como principal interferência nos resultados de análises bioquímicas de caninos. No presente estudo, foi citado no parágrafo anterior que a hemólise fora encontrada no grupo neoplásico, o que sugere que os picos em 756, 1229, 1551, 1562, 1584 e 1623 cm^{-1} podem ser atribuídos à hemoglobina, indicando que a hemólise pode ter ocorrido no grupo Saudável devido ao processamento das amostras presentes no grupo Neoplásico.

Bergholt; Hassing (2009) utilizaram a espectroscopia Raman de forma quantitativa para avaliar a presença da PCR plasmática humana, cuja presença pode ser atribuída a um biomarcador clínico de infecção bacteriana e dano tecidual. Quando presente no sangue, esta proteína tem sua concentração aumentada à medida que a inflamação está ocorrendo. As previsões quantitativas da PCR foram feitas por meio da PLS. Esses achados corroboram com os achados deste estudo nos picos em 1014 e 1252 cm^{-1} , que foram atribuídos à PCR e que demonstraram uma maior concentração no grupo Neoplásico, sugerindo que devido à complexidade da doença, fatores inflamatórios estejam latentes. No grupo Saudável ocorreram picos em 945 e 974 cm^{-1} atribuídos a proteínas e aminoácidos.

A obtenção do proteoma sérico (Atherthon *et al.*, 2013) com a identificação de proteínas de fase aguda na inflamação é uma ferramenta importante nos testes de diagnóstico veterinário que ainda não são usualmente aplicados na rotina de exames que demonstrem alterações na composição e nas concentrações das proteínas plasmáticas, por exemplo, em cães com linfoma canino em comparação a cães saudáveis, concluindo que os valores aumentados de proteína são comumente observados na inflamação decorrente de neoplasias (Eckersall; Bell, 2010). Neste sentido, a espectroscopia Raman poderia verificar de forma complementar essas alterações bioquímicas em quantidade e qualidade e discriminar de acordo com essas alterações em que grupo se encontra o paciente, conforme obtido neste estudo em consonância aos achados espectroscópicos observados nos Scores 1 e 7.

Gonzáles-Solís *et al.* (2014b) utilizaram a espectroscopia Raman e a PCA em soro humano para monitorizar doentes leucêmicos que estavam recebendo quimioterapia. Os autores identificaram diferenças em relação a componentes proteicos, aminoácidos e carotenoides que estavam presentes no grupo leucêmico, obtendo 100% de sensibilidade e especificidade através de validação cruzada “*leave-one-out*”. Neste estudo, não foi verificado a presença de carotenoides em nenhum dos grupos estudados, o que poderia sugerir que o tipo de alimentação ou suplemento pudesse modificar esse componente bioquímico.

Gonzáles-Solís *et al.* (2019) utilizaram a espectroscopia Raman e a PCA para determinar a composição bioquímica das amostras de soro através do método de aglomeração super paramagnética (ASP), discriminando as amostras de pacientes com diferentes tipos de neoplasia. Concluíram através do método ASP que, embora os tipos de neoplasias estudadas pareçam diferentes uns dos outros, os aspectos bioquímicos têm relações entre elas, uma vez que os espectros de leucemia possuem maiores semelhanças com o câncer do colo do útero, mantendo uma relação entre os três outros tipos de neoplasias de mama e de pulmão.

Bronson (1982) demonstrou que a ocorrência de neoplasia em cães idosos é alta, sendo uma das principais causas de morte em cães. Cerca de 45% dos cães com mais de 10 anos, e 23% dos cães de todas as idades, morreram de câncer. Dos 74% das amostras do presente estudo, verificou-se que no grupo Neoplásico havia mais fêmeas acima de 9anos de idade provenientes de cães de raça. As diferenças observadas entre os grupos analisados (Neoplásico x Saudável) não estavam atribuídas apenas à idade ou alterações relacionadas a ela, mas propriamente a presença de doença neoplásica, dado ao fato que esta doença pode afetar animais de diversas raças e idades, independente dos fatores etiológicos causais, sugerindo que não somente a idade ou o gênero podem modificar a presença de aminoácidos no soro. As observações de Oh; Cho (2023) relativos à oncologia comparativa, que objetivou analisar semelhanças e diferenças entre muitos tipos de cânceres que ocorrem espontaneamente em caninos e humana, uma vez que, o envelhecimento propicia a ocorrência de câncer serviram de embasamento para análise dos resultados.

Chan *et al.* (2006) demonstraram que a bioquímica dos compostos plasmáticos humanos, como a lactato desidrogenase, é diferente em termos de gênero e idade dos participantes, demonstrando que a quantidade de proteína total e albumina não

diferiu significativamente entre os dois gêneros. Todavia, dependeu da idade, contrastando com Cheng *et al.* (2005) que demonstraram que a concentração de albumina no soro humano muda dependendo da idade e do gênero.

De acordo com Felix (2019), de 48,39% das pacientes avaliadas com carcinoma de mama, 20% apresentaram hiperproteinemia e 20% hiperalbuminemia, sendo sugestivo de desidratação na síndrome paraneoplásica. Os linfomas podem causar hiperglobulinemia monoclonal ou policlonal, sendo a hiperalbuminemia resultante da hemoconcentração em decorrência da perda de água e da desidratação (Calazans, 2006; Eckersall; Bell, 2008; Semolin, 2016), as proteínas totais foram maiores em cães com linfoma, que relataram maior produção de globulinas em doenças inflamatórias e neoplásicas.

Couto (2001) relatou a hiperproteinemia como uma anormalidade paraneoplásica que ocorre raramente e é secundária à produção de proteína monoclonal pelas células do linfoma, o que pode resultar em síndromes de hiperviscosidade. Vieira (2010) relatou que o linfoma em cães apresentava concentrações séricas de albumina mais baixas e concentrações de globulina mais altas quando comparado a cães saudáveis. Silva *et al.* (2023) relataram alterações como linfopenia, toxicidade de neutrófilos e hiperalbuminemia em um paciente com sarcoma histiocítico.

Estes dados que relacionam a presença de albumina e proteínas em alta concentração sérica em pacientes oncológicos, como em carcinomas (Felix, 2019), linfomas (Calazans, 2006; Couto, 2001; Eckersall; Bell, 2008; Semolin *et al.*, 2016) e em sarcoma histiocítico (Silva *et al.*, 2023) corroboram com os achados clínicos e dados obtidos nos picos apresentados nos Scores 1, 3, 4, 5 e 7 com alta concentração de albumina e proteínas, o Score 4 e 5 em particular com presença de hemoglobinas e hemólise na configuração desses componentes no grupo Câncer.

5.2. Análise discriminante por PLS-DA comparada a outros estudos

De acordo com Oliveira (2016), o soro sanguíneo humano é um fluido corporal complexo, constituído por biomoléculas, em maior proporção a água, seguido proteínas (principalmente albumina e α - e β -globulinas), aminoácidos, lipoproteínas, hormônios, vitaminas, glicose e sais inorgânicos (Lima *et al.*, 2022; Martínez-Espinosa *et al.*, 2009) similarmente ao dos animais mamíferos.

Sabe-se que a análise molecular do soro 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 (Rocha *et al.*, 2010). Na literatura publicada, os modelos de discriminação baseados em PLS (PLS-DA) aplicados no soro de pacientes têm sido usados para a discriminação entre sujeitos saudáveis e pacientes neoplásicos (Barker; Rayens, 2003), em soro de pacientes adultos com leucemia (Harris *et al.*, 2000; Nguyen; Rocke, 2002; Parachalil *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2018) e de crianças e adolescentes (Lima *et al.*, 2022) e serviram de embasamento para este estudo.

Para executar os cálculos de Sensibilidade, Especificidade e Acurácia, foram aplicados modelos de discriminação baseados em estatística multivariada, os modelos foram utilizados a fim de discriminar as amostras de soro sanguíneo dos grupos analisados. A Sensibilidade é a probabilidade de o teste classificar de forma correta os pacientes com câncer (resultados positivos) e a Especificidade é a probabilidade de o teste classificar corretamente pacientes clinicamente saudáveis (resultados negativos). Existe o risco em aplicar um teste diagnóstico e a classificação ser incorreta dos pacientes, onde pacientes supostamente diagnosticados como doentes que são saudáveis (falsos positivos) e pacientes supostamente diagnosticados como saudáveis que estão doentes (falsos negativos). A necessidade iminente de que os exames diagnósticos devem estar sempre associados à avaliação da história clínica do paciente, a semiologia como os sinais e sintomas identificados no exame físico, e aos resultados de exames complementares (laboratoriais, imagem, histopatologia) para constatar a presença ou ausência da doença (Pérez *et al.*, 2021).

Foram apresentados os resultados dos modelos PLS-DA aplicados aos espectros de soro sanguíneo dos cães quando se discriminam duas categorias (Saudável e Neoplásico). De acordo com os modelos PLS-DA que foi utilizado para classificar os espectros nos grupos Saudáveis e Neoplásico, onde as variáveis preditoras representam o conjunto de dados dos espectros Raman, e as respostas são os grupos a serem discriminados: Saudável (grupo #1) e Neoplásico (grupo #2). O modelo empregou validação cruzada “deixa um de fora” (“*leave-one-out*”), onde um espectro de amostra é aleatoriamente deixado de fora do conjunto de dados, a covariância do conjunto de dados com $n - 1$ espectros é estimada e o grupo do espectro deixado de fora é previsto. Portanto, todos os espectros foram testados um

por um. O número de VLS utilizado no modelo PLS-DA é o número que apresenta maior precisão de discriminação entre os dois grupos.

Os resultados do PLS-DA usando 7 VLS e apresentados na Tabela 6 classificaram os espectros nos grupos Saudável x Neoplásico. Os melhores resultados foram obtidos para a classificação dos espectros de soro interpretados como classificação “por paciente” (“*patient-wise*”), com sensibilidade de 77%, especificidade de 77% e acurácia de 77%, em comparação à classificação “por espectro” (“*spectrum-wise*”) que apresentou sensibilidade de 76%, especificidade de 81% e acurácia de 78%.

A literatura disponível até o momento ainda é escassa em publicações que comparam pacientes saudáveis e pacientes com neoplasias em humanos e animais por meio da espectroscopia Raman e da análise discriminante aplicada no soro sanguíneo, portanto, são poucas as publicações em que as neoplasias se diferenciam entre si pela análise no sangue, plasma ou amostras de soro. Gonzáles-Solís *et al.* (2014b) usaram espectroscopia Raman e PCA em soro humano para monitorar pacientes leucêmicos que estavam recebendo quimioterapia; os autores identificaram diferenças nos componentes proteicos, aminoácidos e carotenoides que estavam presentes no grupo leucêmico, alcançando 100% de sensibilidade e especificidade por meio da validação cruzada “*leave-one-out*”.

Silva *et al.* (2018) utilizaram a espectroscopia Raman com um modelo de classificação por análise discriminante (DA) empregando PLS e PCA para a diferenciação espectral de amostras saudáveis e leucêmicas de plasma humano, que resultou em uma sensibilidade de 95,7%, especificidade de 98,0% e acurácia de 97,1%, para a classificação PLS-DA. Os resultados obtidos no presente estudo são um pouco inferiores aos obtidos por Gonzáles-Solís *et al.* (2014a), Gonzáles-Solís *et al.* (2014b) e Silva *et al.* (2018), porém no caso deste trabalho a amostragem foi menor, foram colhidas amostras de variados tipos histopatológicos devido a um tempo menor para seleção de pacientes.

Lima *et al.* (2022) utilizaram a espectroscopia Raman em soro de crianças e adolescentes para discriminar amostras normais de amostras de câncer leucêmico e não leucêmico, utilizando o modelo de classificação PLS-DA o que resultou em sensibilidade de 99%, especificidade de 57% e acurácia de 66%. Os resultados obtidos são inferiores ao presente estudo, demonstrando que apesar da amostragem ter limitações relacionadas à raça, idade, sexo e tipos tumorais, o modelo de

classificação apresenta boa acurácia na discriminação do grupo a qual pertence o soro do paciente.

Alguns estudos com sangue ou fragmentos de tecidos utilizaram PCA-DA (Atkins *et al.*, 2017; Gonzáles-Solís *et al.* 2014a; Gonzáles-Solís *et al.* 2014b; Managó *et al.*, 2018; Martínez-Espinosa *et al.*, 2009; Sjöberg *et al.*, 2014) em vez de PLS-DA para a análise discriminante dos espectros Raman. No entanto, a PLS-DA se destaca por permitir 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).

Duarte *et al.* (2010) demonstraram o potencial da espectroscopia Raman associada à regressão PLS para o diagnóstico da toxoplasmose em gatos domésticos, correlacionando as imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo dos felinos, medidas com o método padrão-ouro de ensaio imuno enzimático (ELISA), com as características dos espectros Raman observada por PLS, obtendo parâmetros de diagnóstico como sensibilidade, especificidade, precisão, previsão de valores positivos, e previsão de valores negativos de 100, 80, 90, 83,3 e 100%, respectivamente, obtendo a discriminação e diagnóstico das amostras positivas de negativas, indicando que a técnica tem potencial para se tornar uma ferramenta de uso na área veterinária.

5.3. A espectroscopia Raman e as técnicas convencionais para diagnóstico de neoplasias

Ao comparar algumas metodologias para o diagnóstico de neoplasias em humanos e cães, os resultados de Sensibilidade (76%), Especificidade (81%) e Acurácia (78%) do presente estudo usando soro e espectroscopia Raman estão alinhados com os resultados da citologia aspirativa em comparação com a histopatologia (precisão de 69,7%) (Braz *et al.*, 2016), espectroscopia Raman do soro comparada à histopatologia (Sensibilidade de 99%, Especificidade de 57% e Acurácia de 66%) (Goheen *et al.*, 1977) e imagem hiperespectral das margens do tumor comparada à histopatologia (sensibilidade de 71% e especificidade de 76%) (Semolin *et al.*, 2016). A eletroforese de proteínas é uma metodologia para quantificar proteínas e suas frações de forma simples e rápida, no entanto ainda está em desvantagem em comparação à espectroscopia Raman que em uma única coleta fornece a

concentração de proteínas, aminoácidos e PCR. Com base na literatura Raman existente em Oncologia, sugere-se que pacientes oncológicos humanos apresentam maior concentração de aminoácidos fenilalanina e tirosina e com ausência ou redução de lipídeos e carotenoides.

Tabela 7: Testes diagnósticos usados em Neoplasias comparando metodologia estatística e taxa de sucesso (%)

Teste de Diagnostico	Metodologia	Se (%)	Esp (%)	Ac (%)
Leucemia juvenil humanos (A)	espectrosc. Raman	99,0	57,0	66,0
Margem cirúrgica mama cadelas (B)	PCA/PLS			
	SERS	73,08	98,32	Não declarado
Neoplasia mama cadelas (C)	SERS/PCA-LDA	95,0	87,0	Não declarado
Neoplasias geral cães (D)	Espec. Raman	76,0	81,0	78,0
	PCA/PLS			
Neoplasias geral cães(E)	Citologia aspirativa	75,0	82,8	69,7
Neoplasias geral cães(F)	-			90,0
Margem cirúrgica mama humanos(G)	Histopatologia			
	Imagem	71,0	76,0	Não declarado
	Hiperespectral			
Leucemias humanos (H)	Imunofenotipagem por citometria de fluxo			98,0
Neoplasias geral humanos (I)	Histopatológico por congelamento	97,6	100,0	98,2

A (LIMA *et al.*, 2022); B (MUNTEANU *et al.*, 2017); C (VARGAS-OBIETA, 2016); D (Frediani *et al.*, 2023); E (CEFARO *et al.*, 2006); F (BRAZ *et al.*, 2016); G (SAHU *et al.*, 2014); H (PIER, 2008); I (SANTOS *et al.*, 2014).

O presente estudo demonstrou que a espectroscopia Raman aplicada ao soro de cães tem o potencial de ser usada para o diagnóstico de neoplasias em triagem e rastreamento, precedendo a confirmação por exame histopatológico após o diagnóstico clínico, ou como acompanhamento para detecção de uma recidiva, pois essa técnica óptica poderia oferecer precocidade no diagnóstico e, assim, otimizar os protocolos terapêuticos. Esse método óptico poderia fornecer uma análise complementar na triagem precoce de alterações bioquímicas para auxiliar o

diagnóstico nos grupos estudados. Este estudo observou que há uma similaridade bioquímica nos cânceres dos animais, o que sugere que proteínas e aminoácidos estarão alterados por ser a neoplasia uma doença que se caracteriza por possuir processos inflamatórios associados. Por ser um exame que poderia ser empregado em triagem, é necessário o acompanhamento e posteriormente realizado exame padrão-ouro caso confirme a doença.

Os testes diagnósticos devem ser realizados concomitantemente com a anamnese e a semiologia, maximizando as chances de assertividade no diagnóstico e sucesso no tratamento. A espectroscopia Raman se destaca por ser minimamente invasiva, não necessitando de marcadores, sem preparação específica da amostra e usando apenas uma pequena quantidade de material biológico (Hanlon *et al.*, 2000) facilitando seu uso potencial na medicina veterinária (Birtoiu *et al.*, 2016; Duarte, *et al.*, 2010; Munteanu *et al.*, 2017) especialmente na análise de soro.

Uma vantagem da espectroscopia Raman aplicada ao diagnóstico de doenças neoplásicas é que ela pode detectar alterações precoces no tecido neoplásico relacionadas às alterações bioquímicas (Birtoiu *et al.*, 2016; Dukor, 2006; González-Solís *et al.*, 2014b, b; Melitto *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2012), discriminando o grupo ao qual o paciente pertence por meio de alterações biomoleculares pré-cancerosas (Martínez-Espinosa *et al.*, 2008) e auxiliando no acompanhamento terapêutico. No entanto, ainda não pode substituir a biópsia histopatológica (padrão-ouro), que confere uma precisão superior a 90% (Braz *et al.*, 2016).

5.4. Perspectivas futuras

O presente estudo demonstrou potencial para demonstrar potencial para fornecer uma análise complementar no rastreio precoce de alterações bioquímicas e auxiliar o diagnóstico nos grupos estudados, identificando biomarcadores em fluidos biológicos relacionados a neoplasias, como proteínas, aminoácidos, lipídeos e PCR, com significância estatística. O modelo sentinela canino poderia ser utilizado para guiar estudos de oncologia comparativa.

Este método óptico poderia fornecer uma análise complementar no rastreio precoce de alterações bioquímicas e auxiliar o diagnóstico nos grupos estudados, identificando biomarcadores em fluidos biológicos relacionados a neoplasias, como proteínas, aminoácidos, lipídeos e PCR, com significância estatística. O modelo sentinela canino poderia ser utilizado para guiar estudos de oncologia comparativa.

Recomenda-se que os exames diagnósticos sejam realizados concomitantemente com a anamnese e exames clínicos, maximizando as chances de sucesso no diagnóstico e tratamento, uma vez que apenas a citologia aspirativa (Braz *et al.*, 2016) que possui 69,7% de acurácia em relação à histopatologia, é um método que poderia competir com a espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman destaca-se pelo fato de ser realizada de forma mais simplificada e minimamente invasiva de análise amostras de material biológico de tamanho pequeno (Hanlon *et al.*, 2000). É um potencial exame analítico para ser utilizada em medicina veterinária (Birtoiu *et al.*, 2016; Duarte *et al.*, 2010; Munteanu *et al.*, 2017). Uma vantagem da técnica é a detecção precoce de alterações na bioquímica de tecidos e fluidos relacionadas com as alterações neoplásicas (Birtoiu *et al.*, 2016; González-Solís *et al.*, 2014(a,b); Melitto *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2012); discriminando o grupo a que pertence o paciente através de alterações biomoleculares pré-cancerígenas (Martínez-Espinosa *et al.*, 2008) e auxiliando no acompanhamento terapêutico (Harrys *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2022; Martínez-Espinosa *et al.*, 2008). No entanto, ainda não pode substituir a biópsia histopatológica (padrão-ouro), que fornece uma precisão superior a 90% (Braz *et al.*, 2016), permitindo explorar em um futuro estudo com situações de manejo alimentar em situação controlada para melhor compreender as alterações espectrais no soro devido à doença neoplásica. Isso pode levar à redução de erros na classificação dos pacientes e que permitam obter melhores resultados de acurácia do modelo de discriminação.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, a espectroscopia Raman, combinada com técnicas de análise estatística multivariada PCA e regressão PLS, permitiram classificar os espectros da diferença entre as amostras de soro canino revelando a presença de proteínas e aminoácidos, especialmente albumina e fenilalanina, hemoglobina, PCR e glucosamina que foram mais intensas no grupo Neoplásico. Foi utilizada como um exame de triagem diagnóstica identificando alterações bioquímicas em amostras de soro de cães com neoplasia em comparação com cães clinicamente saudáveis, que permitiram classificar os espectros das amostras de soro nos grupos Saudáveis e Neoplásico. O espectro de diferenças revelou a presença de proteínas e aminoácidos, especialmente albumina e fenilalanina, e que foi mais intensa no grupo Câncer, enquanto os lipídeos e triptofano foram mais intensos no grupo Saudável. Estes achados bioquímicos foram confirmados através da PCA, que identificou picos sugestivos de aumento das concentrações de proteínas e aminoácidos (Score1/PC1 e Score3/PC3), redução dos lipídeos (Score3/PC3 e Score7/PC7), aumento das características referentes à hemoglobina (Score4/PC4), e aumento da PCR e da glucosamina (Score 7/PC7) no grupo Câncer.

Mudanças vibracionais ocorreram nas cadeias laterais de proteínas, promovendo um desvio para o vermelho (*“red shift”*) dos picos dos aminoácidos com anel aromático em 621, 1003 e 1032 cm^{-1} (fenilalanina, triptofano e tirosina) no grupo Neoplásico, o que pode estar relacionado com alterações conformacionais nas proteínas e/ou ligações em locais próximos do anel aromático. Enquanto os lipídeos e o triptofano foram mais intensos no grupo Saudável.

Como modelo de classificação desenvolvido, foi obtido por regressão multivariada PLS (PLS-DA) aplicado aos espectros Raman utilizando a validação cruzada “deixe um de fora” (*“leave-one-out”*) e a interpretação do diagnóstico fornecido pelo modelo de classificação dos espectros nos grupos Saudável e Neoplásico, alcançando uma taxa de sucesso obtido por meio do espectro (*“spectrum wise”*) com sensibilidade de 76%, especificidade de 81% e acurácia de 78%.

A espectroscopia Raman é uma ferramenta sem necessidade de marcadores, minimamente invasiva, capaz de fornecer análises específicas e sensíveis sem a necessidade de preparo de amostras, podendo ser utilizada como uma triagem de diagnóstico prévio à biópsia histopatológica, tendo o potencial de classificar animais

saudáveis e com câncer, através das diferenças espectrais que estão relacionadas às alterações bioquímicas presentes no soro. Assim, a espectroscopia Raman tem potencial para classificar animais saudáveis daqueles com neoplasia, através das diferenças espectrais que estão relacionadas às alterações bioquímicas presentes no soro sanguíneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEGGLEN, L.M.; CAULIN, A.F.; CHAN, A.; LEE, K.; ROBINSON, R.; CAMPBELL, M.S.; KISO, W.K.; SCHMITT, D.L.; WADDELL, P.J.; BHASKARA, S.; JENSEN, S.T.; MALEY, C.C.; SCHIFFMAN, J.D. Potential mechanisms for cancer resistance in elephants and comparative cellular response to DNA damage in humans. **The Journal of the American Medical Association**, v.314, n.7, p.1850-1860, 2015. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.13134>.
- AGUIAR, R.P.; FALCÃO, E.T, PASQUALUCCI, C.A, SILVEIRA, L. Use of Raman spectroscopy to evaluate the biochemical composition of normal and tumoral human brain tissues for diagnosis. **Lasers in Medical Science**, v.37, n.1, p.121-133, 2022. DOI:10.1007/s10103-020-03173-1.
- ALEXANDROV, L.B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D.C.; APARICIO, S.A.; BEHJATI, S.; BIANKIN, A.V.; BIGNELL, G.R.; BOLLI, N.; BORG, A.; BØRRESEN-DALE, A.L.; ET AL. STRATTON, M.R. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v.500, n.7463, p.415-21, 2013. DOI:10.1038/nature12477.
- ALLEMANI, C.; WEIR, H.K.; CARREIRA, H.; HAREWOOD, R.; SPIKA, D.; WANG, X.S.; BANNON, F.; AHN, J.V.; JOHNSON, C.J.; BONAVENTURE, A.; MARCOS-GRAGERA, R.; STILLER, C.; AZEVEDO E SILVA, G.; CHEN, W. Q.; OGUNBIYI, O.J.; RACHET, B.; SOEBERG, M.J.; YOU, H.; MATSUDA, T.; BIELSKA-LASOTA, M.B.; TEMPESTADE, H.; TUCKER, T.C.; COLEMAN, M.P. Concord Working Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **Lancet**, v.385, n.9972, p.977-1010, 2015. DOI:/10.1016/S0140-6736.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). **Cancer in Pets**. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2022. <https://www.avma.org/resources/pet-owners/petcare/cancer-pets#:~:text=Almost%20half%20of%20dogs%20over,in%20cats%20than%20in%20dogs.>Acesso em ?21/02/22>.
- ANDRIES, J.P.M.; HEYDEN, Y.V. Improved multi-class discrimination by common subset-of-independent-variables partial-least-squares discriminant analysis. **Talanta**, v.234, p.1-7, 2021. DOI:10.1016/j.talanta. 2021.122595.
- ATHERTON, M.J.; BRACELAND, M.; FONTAINE, S.; WATERSTON, M.M.; BURCHMORE, R.J.; EADIE, S.; ECKERSALL, P.D.; MORRIS, J.S. Changes in

-
- the serum proteome of canine lymphoma identified by electrophoresis and mass spectrometry. **Veterinary Journal**, v.196, n.3, p.320-324, 2013. DOI:10.1016/j.tvjl.2012.12.010.
- ATKINS, C.G.; BUCKLEY, K.; BLADES, M.W.; TURNER, R.F.B. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. **Applied Spectroscopy**, v.71, n.5, p.767-793, 2017. DOI:10.1177/0003702816686593.
- BANERJEE, H.N.; ZHANG, L. Deciphering the fingerprints of Brain Cancer Astrocytoma in comparison to Astrocytes by using near infrared Raman Spectroscopy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.295, n.1-2, p.237-240, 2007. DOI:10.1007/s11010-006-9278-4.
- BANKAPUR, A.; ZACHARIAH, E.; CHIDANGIL, S.; VALIATHAN, M.; MATHUR, D. Raman tweezers spectroscopy of live, single red and white blood cells. **PloS ONE**, v.5, n.4, p.1-11, 2010. DOI:10.1371/journal.pone.0010427.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least square for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v.17, p.166, 2007. DOI:10.1002/cem.785.
- BATTISTI, M.K.B.; SILVA, D.M.; REUSING, M.S.O.; BELTRAME, O.C.; SCHMIDT, E.M.S.; FAGLIARI, J.J.; DITTRICH, R.L.; GUÉRIOS, S.D. Acute phase proteins in female dogs with mammary tumors. **Ciência Rural**, v.43, n.5, p.902-907, 2013.
- BAUER, M.E. How do the psychologic factors have influence on the arise and cancer progression? **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v.1, n.1, p.33-40, 2004.
- BERGHOLT, M.S.; HASSING, S. Quantification of C-Reactive protein in human blood plasma using near-infrared Raman spectroscopy, **Analyst**, v.134, n.10, p.2123, 2009. DOI:10.1039/b903089a.
- BERGMAN, P.J.; BREEN, M. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 4^a. ed. WB Saunders Company, 2007. cap. 5, p.77-94.
- BERSELLI, M. **Estudo da incidência, identificação e parâmetros prognósticos dos hemangiomas e hemangiossarcomas em animais de companhia**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências – Patologia Animal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2011.
- BERTAZZOLO, W.; DELL'ORCO, M.; BONFANTI, U.; GHISLENI, G.; CANIATTI, M.; MASSERDOTTI, C.; ANTONIAZZI, E.; CRIPPA, L.; ROCCABIANCA, P. Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations.
-

-
- Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n. 1, p.28-34, 2005. DOI:10.1111/j.1939-165x.2005.tb00005.x
- BEVILACQUA, M.; MARINI, F. Local classification: locally weighted-partial least squares-discriminant analysis (LW-PLS-DA). **Analytica Chimica Acta**, n.838, p.20-30, 2014. DOI:10.1016/j.aca.2014.05.057.
- BIRTOIU, I.A.; RIZEA, C.; TOGOE, D.; MUNTEANU, R.M.; MICSĂ, C.; RUSU, M.I.; TAUTAN, M.; BRAIC, L.; SCOICARU, L.O.; PARAU, A.; BECHERESCU-BARBU, N.D.; UDREA, M.V.; TONETTO, A.; NOTONIER, R.; GRIGORESCU, C.E. Diagnosing clean margins through Raman spectroscopy in human and animal mammary tumour surgery: a short review. **Interface Focus**, v.6, n.6, p 1-11, 2016. DOI:10.1098/rsfs.2016.0067.
- BODANESE, B.; SILVEIRA, F.L.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T.; PASQUALUCCI, C. A.; SILVEIRA, L. Discrimination of basal cell carcinoma and melanoma from normal skin biopsies in vitro through Raman spectroscopy and principal component analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.30, n.7, p.381-387, 2012. DOI:10.1089/pho.2011.3191.
- BODDY, A.M.; ABEGGLEN, L.M.; PESSIER, A.P.; AKTIPIS, A.; SCHIFFMAN, J.D.; MALEY, C.C.; WITTE, C. Lifetime cancer prevalence and life history traits in mammals. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v.1, p.187-195, 2020. DOI:10.1093/emph/eoaa015.
- BOHORFOUSH, A.G. Tissue spectroscopy for gastrointestinal diseases. **Endoscopy**, v.28, n.4, p.372-80, 1996. DOI:10.1055/s-2007-1005484.
- BORGES, R.C.F.; NAVARRO, R.S; GIANA, H.E.; TAVARES, F.G.; FERNANDES, A.B.; SILVEIRA, L. Detecting alterations of glucose and lipid components in human serum by near-infrared Raman spectroscopy, **Research on Biomedical Engineering**, v.31, n.2, p.160-168, 2015. DOI:10.1590/2446-4740.0593.
- BRAZ, P.H.; BRUM, K.B.; ALDA, I.; SOUZA, A.I.; ABDO, M. A.G.S. Comparação entre a citopatologia por biópsia com agulha fina e a histopatologia no diagnóstico das neoplasias cutâneas e subcutâneas de cães, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.3, p.197, 2016. DOI:10.1590/S0100-736X2016000300008.
- BRERETON, R.G.; LLOYD, G.R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. **Journal of Chemometrics**, v.28, p.213-225, 2014. DOI:10.1002/cem.2609.
-

-
- BRERETON, R.G.; JANSEN, J.; LOPES, J.; MARINI, F.; POMERANTSEV, A.; RODIONOVA, O.; ROGER, J.M.; WALCZAK, B.; TAULER, R. Chemometrics in analytical chemistry – part II: modeling, validation, and applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.410, n.46, p.6691-6704, 2018. DOI:10.1007/s00216-018-1283-4.
- BRICK, J.O.; ROENIGK, W.J.; WILSON, G.P. Chemotherapy of malignant lymphoma in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.153, n.1, p.47-52, 1968.
- BRONDEN, L.B.; FLAGSTAD, A.; KRISTENSEN, A.T. Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.5, n.3, p.133-44, 2007. DOI:10.1111/j.1476-5829.2007.00126.x.
- BRONSON, R.T. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.2057-2059, 1982.
- BROWN, N.O.; PATNAIK, A.K.; MACEWEN, G.E. Canine hemangiosarcoma: Retrospective analysis of 104 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, n.1, p.56-58, 1985.
- BROWNING, H.M.; GULLAND, F.M.; HAMMOND, J.A.; COLEGROVE, K.M.; HALL, A.J. Common cancer in a wild animal: the California sea lion (*Zalophus californianus*) as an emerging model for carcinogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.370, p.1673, 2015. DOI:10.1098/rstb.2014.0228.
- CALAZANS, S.G. DALECK, R.; FAGLIARI, J.J.; REPETTI, C.F.; DE NARDI, A.B.; CASTRO, J.H.T.; FERNANDES, S.C.; CÉSAR, J.R.F.; RODIGHERI, S.M. Serum protein concentrations in healthy dogs and dogs with lymphoma by means of sodium dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1044-1048, 2009. DOI:10.1590/S0102-09352009000500005.
- CAMPION, A. Infrared and Raman spectroscopy of biological materials. Practical Spectroscopy Series. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, n.42, p.10427-10427, 2001. DOI:10.1021/ja004845m.
- CAULIN, A.F.; GRAHAM, T.A.; WANG, LI-SAN.; MALEY, C.C. Solutions to Peto's paradox revealed by mathematical modelling and cross-species cancer gene analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.370, p.20140222, 2015. DOI:10.1098/rstb.2014.0222.
-

-
- CAULIN, A.F.; MALEY, C.C. Peto's Paradox: evolution's prescription for cancer prevention. **Trends in Ecology and Evolution**, v.26, n.4, p.175-182, 2011. DOI:10.1016/j.tree.2011.01.002.
- CÈFARO, G.A.; GENOVESI, D.; MARCHESE, R.; URSINI, L.A.; CIANCHETTI, E.; BALLONE, E.; DI NICOLA, M. Predictors of local recurrence after conservative surgery and whole-breast irradiation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.98, n.3, p.329-335, 2006. DOI:10.1007/s10549-006-9169-0.
- CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.85-99, 2005. DOI:10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x>.
- CHAN, J.W.; TAYLOR, D.S.; ZWERDLING, T.; LANE, S.M.; IHARA, K.; HUSER, T. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. **Biophysical Journal**, v.90, n.2, p.648, 2006. DOI:10.1529/biophysj.105.066761.
- CHENG, W.T.; LIU, M.T.; LIU, H.N.; LIN, S.Y. Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. **Microscopy Research Technique**, v.68, n.2, p.75-79, 2005. DOI:10.1002/jemt.20229.
- CHOWDARY, M.V.P.; KUMAR, K.K.; KURIEN, J.; MATHEW, S.; KRISHNA, C.M. Diagnosing molecular subtypes of breast cancer by means of Raman spectroscopy. **Biopolymers**, v.83, n.5, p.556-569, 2006. DOI:10.1002/bip.20586.
- COLLEONI, G.W.B.; SATAKE, M.; BOROVIK, C.L.; KERBAUY, J.; YAMAMOTO, J. Leucemia mieloide aguda Ph1-positivo de novo ou crise blástica de leucemia mielóide crônica? Análise molecular e evolução clínica de um caso. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.44, n.3, p.253-255, 1998. DOI:10.1590/s0104-42301998000300015.
- COSTA-NETO, P.L.O. **Estatística**, 2ª. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2002.
- COUTO, C.G. Oncologia. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 3ª. ed. Oxford: Elsevier, 2008.
- CROW, O.; UFF, J.S.; FARMER, J.A.; WRIGHT, M.P.; STONE, N. The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro, **BJU International**, v.93, n.9, p.1232-1236, 2004. DOI:10.1111/j.1464-410X.2004.04852.x.
-

-
- DANG, C.V. A metabolic perspective of Peto's paradox and cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.370, n.1673, p.20140223, 2015. DOI:10.1098/rstb.2014.0223.
- DARLINGTON, C.D. The plasmagene theory of the origin of cancer. **British Journal of Cancer**, v.2, n.2, p.118-126, 1948. DOI: 10.1038/bjc.1948.17.
- DAVIS, B.W.; OSTRANDER, E.A. Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. **ILAR Journal**, v.55, n.1, p.59-68, 2014. DOI:10.1093/ilar/ilu017.
- DAY, M.J.; LUCKE, V.M.; PEARSON, H. A review of pathological diagnoses made from 87 canine splenic biopsies. **Journal of Small Animal Practice**, v.36, n.10, p.426-433, 1995.
- DE BIASE, D.; BALDASSARRE, V.; PIEGARI, G.; ROSATO, G.; CAPUTO, V.; POMPAMEO, M.; SARNELLI, P.; RUSSO, V.; D'ANGELO, D.; PAPPARELLA, S.; PACIELLO, O. Animal sentinels and cancer registries: State of the art and new perspectives. **Annals of Research in Oncology**, v.3, n.1, p.14-23, 2023. DOI:10.48286/aro.2023.61.
- DE GELDER, J.; DE GUSSEM, K.; VANDENABEELE, P.; MOENS, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.38, n.9, p.1133-1147, 2007. DOI:10.1002/jrs.1734.
- DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, CH. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Sciences**, v.7, p.15-26, 2002. DOI:10.5380/avs.v7i2.3977.
- DE SIQUEIRA E OLIVEIRA, F.S.; GIANA, H.E.; SILVEIRA, L. Discrimination of selected species of pathogenic bacteria using near-infrared Raman spectroscopy and principal components analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v.17, n.10, p.107004, 2012. DOI:10.1117/1.JBO.17.10.107004.
- DIERAUF, L.A.; GULLAND, F.M.D. Marine mammals as sentinels of ocean health. In: REDDY, M.L.; DIERAUF, L.A.; GULLAND, F.M.D. **CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation**. Chapter 1, 2^a. ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. p.1. 1166p.
- DINGARI, N.C.; HOROWITZ, G.L.; KANG, J.W.; DASARI, R.R.; BARMAN, I. Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of
-

-
- albumin glycation. **PloS ONE**, v.7, n.2, p.e32406, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0032406.
- DOBSON, J.M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J.L. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **The Journal of Small Animal Practice**, v.43, n.6, p.240-246, 2002. DOI:10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x.
- DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.; SCHNEIDER, R.; HIBBARD, H.H.; KLAUBER, M.R. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. **Journal of National Cancer Institute**, v.40, n.2, p.307-318, 1968.
- DUARTE, J.; PACHECO, M. T.; VILLAYERDE, A.B.; MACHADO, R.Z.; ZANGARO, R.A.; SILVEIRA, L. Near-infrared Raman spectroscopy to detect anti-*Toxoplasma gondii* antibody in blood sera of domestic cats: quantitative analysis based on partial least-squares multivariate statistics. **Journal of Biomedical Optics**, v.15, n.4, p.047002, 2010. DOI:10.1117/1.3463006.
- DUESBERG, P.; RASNICK, D.; LI, R.; WINTERS, L.; RAUSCH, C.; HEHLMANN, R. How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. **Anticancer Research Journal**, v.19, p.4887-4906, 1999.
- DUKOR, R.K. Vibrational spectroscopy in the detection of cancer. In: CHALMERS, J.M.; GRIFFITHS, P.R. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**. v.5, Chapter 3. Downers Grove: Wiley, 2006. DOI:10.1002/0470027320.s8107.
- DUPRÉ, A.; MALIK, H.Z. Inflammation and cancer: What a surgical oncologist should know. **European Journal of Surgical Oncology**, v.44, n.5, p.566-570, 2018. DOI:10.1016/j.ejso.2018.02.209.
- DURAN, A.O.; INANC, M.; KARACA, H.; DOGAN, I.; BERK, V.; BOZKURT, O.; OZASLAN, E.; UCAR, M.; EROGLU, C.; OZKAN, M. Albumin-globulin ratio for prediction of long-term mortality in lung adenocarcinoma patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, n.15, p.6449-6453, 2014. DOI:10.7314/apjcp.2014.15.15.6449.
- EBERLE, N.; VON BABO, V.; NOLTE, I.; BAUMGÄRTNER, W.; BETZ, D. Splenic masses in dogs. Part 1: Epidemiologic, clinical characteristics as well as histopathologic diagnosis in 249 cases (2000-2011). **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere**, v.40, n.4, p.250-260, 2012.
-

-
- ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, n.1, p.23-27, 2010. DOI:10.1016/j.tvjl.2010.04.009.
- FARIA, D.L.A.; SANTOS, L.G.C.; GONÇALVES, N.S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**, v.20, n.3, p.319-323, 1997. DOI:10.1590/S0100-40421997000300014.
- FELIX, T.F. **Estudo retrospectivo: alterações hematológicas e bioquímicas em cães com neoplasias malignas**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2019.
- FERRAZ, J.R.S.; ROZA, M.R.; CAETANO JÚNIOR, J.; COSTA, A.C; Hemangiossarcoma canino: revisão de literatura. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.1, n.1, p.35-48, 2008.
- FIGHERA, R.A. Hemolytic anemia in dogs and cats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.2, p.264-266, 2008.
- FIGUEIREDO, C.R.L.V. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização, **Jornal Brasileiro de Patologia de Medicina Laboratorial**, v.55, n.3, p.321-332, 2019.
- FIORAVANTE, C.H. Pimenta Bueno e uma visão ampla sobre a origem do câncer no início do século XX. **Khronos, Revista de História da Ciência**, n.7, p.184-191, 2019. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/khronos/article/view/159251/155705>. Acesso em 06/10/23.
- FISHER, W.B.; HANS, E.H. Polarized Raman spectra and intensities of aromatic amino acids phenylalanine, tyrosine and tryptophane. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.48, p.725-732, 1992. DOI:10.1016/0584-8539(92)80216-J.
- FLORES, M.M.; PANZIERA, W.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L.; FIGHERA, R.A. Aspectos epidemiológicos e anatomopatológicos do hemangiossarcoma em cães: 40 casos (1965-2012). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.12, p.1319-1328, 2012. DOI:10.1590/S0100-736X2012001200017.
- FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. 4ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara: Elsevier editora, 2015. 5008p.
-

- FREITAS, V. Interferência da hemólise nas análises bioquímicas. **Anais do 10º SIEPE – Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Santana do Livramento: Universidade Federal do Pampa, 2018. Disponível em: https://guri.unipampa.edu.br/uploads/evt/arq_trabalhos/18228/seer_18228.pdf. Acesso em 06/10/23.
- GARDNER, H.L.; FENGER, J.F.; LONDON, C.A. Dogs as a model for cancer. **Annual Review of Animal Biosciences**, v.4, p.199-222, 2016. DOI:10.1146/annurev-animal-022114-110911.
- GOGONE, I.C.V.P.; FERREIRA, G.H.; GAVA, D.; SCHAEFER, R.; DE PAULA-LOPES, F.F.; ROCHA, R.A.; DE BARROS, F.R.O. Applicability of Raman spectroscopy on porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 detection. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.249, p.119336, 2021. DOI:10.1016/j.saa.2020.119336.
- GOHEEN, S.C.; GILMAN, T.H.; KAUFFMAN, J.; W.; GARVIN, J.E. The effect on Raman spectra of extraction of peripheral proteins from human erythrocyte membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.79, n.3, p.805-814, 1977. DOI:10.1016/0006-291X(77)91183-4.
- GONZÁLEZ-SOLÍS, J.L. Discrimination of different cancer types clustering Raman spectra by a super paramagnetic stochastic network approach, **PLoS ONE**, v.4, n.3, p.e0213621, 2019. DOI:10.1371/journal.pone.0213621.
- GONZÁLEZ-SOLÍS, J.L.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, J.C.; SALGADO-ROMÁN, J.M.; PALOMARES-ANDA, P; Monitoring of chemotherapy leukemia treatment using Raman spectroscopy and principal component analysis. **Lasers in Medical Science**, v.29, n.3, p.1241-1249, 2014a. DOI:10.1007/s10103-013-1515-y.
- GONZÁLEZ-SOLÍS, J.L.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, J.C.; TORRES-GONZÁLEZ, L.A.; AGUILAR-LEMARROY, A.; JAVE-SUÁREZ, L.F.; PALOMARES-ANDA, P. Cervical cancer detection based on serum sample Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v.29, n.3, p.979-985, 2014b. DOI:10.1007/s10103-013-1447-6.
- GOULART, A.C.C.; SILVEIRA, L.; CARVALHO, H.C.; DORTA, C.B.; PACHECO, M.T.; ZÂNGARO, R.A. **Lasers in Medical Science**, v.37, n.4, p.2217, 2022. DOI:10.1007/s10103-021-03488-7.

-
- GOULART, A.C.C.; ZÂNGARO, R.A.; CARVALHO, H.C.; LEDNEV, I.K.; SILVEIRA, L. **Lasers in Medical Science**, v.38, n.1, p.210, 2023. DOI: 10.1007/s10103-023-03871-6.
- GROSSE, Y.; LAJOIE, P.; BILLARD, M.; KREWSKI, D.; RICE, J.; BAAN, R.A.; COGLIANO, V.; BIRD, M.; ZIELINSKI, J.M. Development of a database on tumors and tumor sites in humans and in experimental animals for 'Group 1 agents identified through volume 109 of the IARC Monographs, **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v.22, n.7-8, p.237-243, 2019. DOI:10.1080/10937404.2019.1642601.
- GUPTA, D.; LIS, C.G. Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: a systematic review of the epidemiological literature. **Nutricional Journal**, v.9, n.69, p.1-16, 2010. DOI:10.1186/1475-2891-9-69.
- GURGEL, S.M.L. **O uso da espectroscopia Raman para diferenciar soja convencional e soja transgênica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca, SP, 2006.
- HADDAD, J.L.; GOLDSCHMIDT, M.H.; PATEL, R.T. Fibrosarcoma arising at the site of a retained surgical sponge in a cat. **Veterinary Clinical Pathology**, v.39, n.2, p.241-246, 2010. DOI:10.1111/j.1939-165X.2009.00209.x.
- HAGE, M.C.F.N.S.; MASAO, I. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1287-1295, 2009. DOI:10.1590/S0103-84782009005000041.
- HAJDU, S.I. A note from history: landmarks in history of cancer, Part 1. **Cancer**, v.117, n.5, p.1097-1102, 2011. DOI:10.1002/cncr.25553.
- HANLON, E.B.; MANOHARAN, R.; KOO, T.W.; SHAFER, K.E.; MOTZ, J.T.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J.R.; ITZKAN, I.; DASARI, R.R.; FELD, M.S. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, v.45, n.2, p.R1-R59, 2000. DOI:10.1088/0031-9155/45/2/201.
- HARDY, P. A.; ZACHARIAS, H. Reappraisal of the Hanseman-Boveri hypothesis on the origin of tumors. **Cell Biology International**, v.29, n.12, p. 983-992, 2005. DOI:10.1016/j.cellbi.2005.10.001.
- HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H.K.; VARDIMAN, J. Lymphoma classification: from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms. **Annals of Oncology**, v.1, n.11, p.3-10, 2000. DOI:10.1093/annonc/11.Suppl 1.S3.
-

-
- HERNÁNDEZ, B.; PFLÜGER, F.; KRUGLIK, S.G.; GHOMI, M. Characteristic Raman lines of phenylalanine analyzed by a multiconformational approach. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.44, n.6, p.827-833, 2013. DOI:10.1002/jrs.4290.
- HORTA, R.S.; COSTA, M.P.; LAVALLE, G.E.; ARAÚJO, R.B.; CASSALI, G.D. Prognostic and predictive factors of canine tumours defined with immunohistochemistry's assistance. **Ciência Rural Santa Maria**, v.42, n.6, p.1033-1039, 2012. DOI:10.1590/S0103-84782012000600013.
- HSIEH, M.C.; WANG, S.H.; CHUAH, S.K.; LIN, Y.H.; LAN, J.; RAU, K.M. A prognostic model using inflammation- and nutrition-based scores in patients with metastatic gastric adenocarcinoma treated with chemotherapy. **Medicine**, v.95, n.17, p.e3504, 2016. DOI:10.1097/MD.0000000000003504.
- HU, Y.-J.; LIU, Y.; SHEN, X.S.; FANG, X.Y.; QU, S.S. Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v.738, n.1-3, p.143-147, 2005. DOI:10.1016/j.molstruc.2004.11.062.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional**. Volume IV. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2010. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//registro_de_base_populacional_completo.pdf. Acesso em 23/01/22.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em 23/01/22.
- INNES, J.R.; PARRY, H.B.; BERGER J. Record of lymphadenosis (lymphatic leukaemia) in a dog treated with urethane. **British Veterinary Journal**, v.102, n.12, p.389-393, 1946.
- ISRAEL, B.A.; SCHAEFFER, W.I. Cytoplasmic suppression of malignancy. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.23, p.627-632, 1987. DOI:10.1007/BF02621071.
- JACKSON, M.; SOWA, M.G.; MANTSCH, H.H. Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine. **Biophysical Chemistry**, v.68, n.1-3, p.109-125, 1997. DOI:10.1016/s0301-4622(97)80555-8.
- JERICÓ, M.M.; KOGIKA, M.M.; NETO, J.P.A. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2015. 7047p.
-

-
- JERMYN, M.; MOK, K.; MERCIER, J.; DESROCHES, J.; PICHETTE, J.; SAINT-ARNAUD, K.; BERNSTEIN, L.; GUIOT, M.C.; PETRECCA, K.; LEBLOND, F. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. **Science Translacional Medicine**, v.7, v.274, p.274ra19, 2015. DOI:10.1126/scitranslmed.aaa2384.
- JOLLIFFE, I.T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v.374, n.2065, p.1471-2962, 2016. DOI:10.1098/rsta.2015.0202.
- KHANNA, C.; LINDBLAD-TOH, K.; VAIL, D.; LONDON, C. The dog as a cancer model. **Nature Biotechnology**, v.24, n.9, p.1065-1066, 2006. DOI:10.1038/nbt0906-1065b.
- KELSEY, J.L.; MOORE, A.S.; GLICKMAN, L.T. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. **Epidemiology Review**, v.20, n.2, p.204-217, 1998. DOI:10.1093/oxfordjournals.epirev.a017981.
- KIECOLT-GLASER, J.K.; MCGUIRE, L.; ROBLES, T.F.; GLASER, R. Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v.70, n.3, p.537-547, 2002. DOI:10.1037//0022-006x.70.3.537.
- KIMURA, K.C.; TEIXEIRA, T.F. Epidemiologia dos tumores. In: JERICÓ, M.M.; KOGIKA, M.M.; DE ANDRADE NETO, J.P. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2015. 7047p.
- KRAFFT, C.; NEUDERT, L.; SIMAT, T.; SALZER, R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.61, n.7, p.1529-1535, 2005. DOI:10.1016/j.saa.2004.11.017.
- KRISHNA, H.; MAJUMDER, S.K.; CHATURVEDI, P.; SIDRAMESH, M.; GUPTA, P.K. In vivo Raman spectroscopy for detection of oral neoplasia: a pilot clinica QQWI study. **Journal of Biophotonics**, v.7, n.9, p.690-702, 2014. DOI:10.1002/jbio.201300030.
- KUHAR, N.; SIL, S.; UMAPAHY, S. Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.258, p.119712, 2021. DOI:10.1016/j.saa.2021.119712.
-

-
- LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.117, p.100-114, 2012. DOI:10.1016/j.chemolab.2012. 03.
- LEHMANN, E.L. The Fisher, Neyman-Pearson theories of testing hypotheses: one theory or two? **Journal of the American Statistical Association**, v.88, n.424, p.1242-1249, 1993. DOI:10.2307/2291263.
- LEVINE, R.L.; GILLILAND, D.G. Myeloproliferative disorders. **Blood**, v.112, n.6, p.2190-2198, 2008. DOI:10.1182/blood-2008-03-077966.
- LIMA, A.M.F.; DANIEL, C.R.; NAVARRO, R.S.; BODANESE, B.; PASQUALUCCI, C.A.; PACHECO, M.T.T.; ZANGARO, R.A.; SILVEIRA, L. Discrimination of non-melanoma skin cancer and keratosis from normal skin tissue in vivo and ex vivo by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v.15, p.773-787, 2019. DOI:10. 1016/j. vibsp ec. 2019. 11. 009.
- LIMA, A.M.F.; DANIEL, C.R.; PACHECO, M.T.T.; DE BRITO, P.L.; SILVEIRA, L. Discrimination of leukemias and non-leukemic cancers in blood serum samples of children and adolescents using a Raman spectral model. **Lasers in Medical Science**, v.38, n.1, p.1-22, 2022. DOI:10.1007/s10103-022-03681-2.
- LIMA, E.N.S.; FERREIRA, I.B.; SILVA, N.C.DA.; PRESTES, I.V.; PENA, G.G. Albumina sérica é preditor independente de mortalidade hospitalar em pacientes com câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.67, n.4, p.e-071209, 2021. DOI:10.32635/2176-9745.RBC.2021v67n4.1209.
- LIN-VIEN, D.; COLTHUP, N.B; FATELEY, W.G.; GRASSELLI, J.G. A summary of characteristic Raman and infrared frequencies. In: **The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules**. Appendix 3. 1ª. ed. San Diego: Academic Press, 1991. DOI:10.1016/ B978-0-08-057116-4.50027-4.
- LIN, V.J.C.; KOENIG, J.L. Raman studies of bovine serum albumin. **Biopolymers**, v.15, n.1, p.203-218, 1976. DOI:10.1002/bip.1976.360150114.
- LIS, C.G.; GRUTSCH, J.F.; VASHI, P.G, LAMMERSFELD, C.A. Is serum albumin an independent predictor of survival in patients with breast cancer? **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.27, n.1, p.10-15, 2003. DOI:10.1177/014860710302700110.
- LOEB, LA. A mutator phenotype in cancer. **Cancer Research**, v.61, n.8, p.3230-3239, 2001.
-

-
- LOPES, D.F.; SILVEIRA, L.; SIBATA, M.N.; CARVALHO, A.C.; PACHECO-SOARES, C.; SAADE, J.; PACHECO, M.T.T. Use of dispersive Raman spectroscopy to detect the cytotoxic action of viscum album in adenocarcinoma of colon. **Journal of Laser Applications**, v.21, n.4, p.162-168, 2009. DOI:10.2351/1.3263117.
- MANAGÒ S.; VALENTE, C.; MIRABELLI, P.; CIRCOLO, D.; BASILE, F.; CORDA, D.; DE LUCA, A.C. A reliable Raman-spectroscopy-based approach for diagnosis, classification and follow-up of B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Scientific Reports**, v.6, p.24821, 2016. DOI:10.1038/srep24821.
- MARTÍNEZ-ESPINOSA, J.C.; GONZÁLEZ-SOLÍS, J.L.; FRAUSTO-REYES, C.; MIRANDA-BELTRÁN, M.L.; SORIA-FREGOSO, C.; MEDINA-VALTIERRA, J. Detection of leukemia with blood samples using Raman spectroscopy and multivariate analysis. **AIP Conference Proceedings**, v.1142, p.99-103, 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**, v.11, n.1, p.7-31, 2003.
- MEDEIROS, L.R.; SIMÕES, P.W.A.; MADEIRA, K.; SILVA, N.C.; LUMERTZ, S.; ROSA, M.I.D.A. Revisão sistemática e metanálise com enfoque na acurácia de testes diagnósticos. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.41, n.3, p.81-88, 2012.
- MELITTO, A.S.; ARIAS, V.E.A.; SHIDA, J.Y.; GEBRIM, L.H.; SILVEIRA, L.; Diagnosing molecular subtypes of breast cancer by means of Raman spectroscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.54, n.8, p.1143-1156, 2022. DOI:10.1002/lsm.23580.
- MERLO, D.F.; ROSSI, L.; PELEGRINO, C.; CEPPI, M.; CARDELLINO, M.; CAPURRO, C.; RATTO, A.; SAMBUCCO, L.; SESTITO, V.; TANARA, G.; BOCCHINI, V. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **Journal of Veterinary International Medicine**, v.22, n.4, p.976-984, 2008. DOI:10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x.
- MITRUS, I.; BRYNDZA, E.; SOCHANIK, A.; SZALA, S. Evolving models of tumor origin and progression. **Tumor Biology**, v.33, n.4, p.911-917, 2012. DOI:10.1007/s13277-012-0389-0.
- MOREIRA, L.M.; SILVEIRA, L., SANTOS, F.V.; LYON, J.P.; ROCHA, R.; ZÂNGARO, R.A.; VILLAVERDE, A.B.; PACHECO, M.T.T. Raman spectroscopy: A powerful
-

-
- technique for biochemical analysis and diagnosis. **Spectroscopy**, v.22, n.1, p.1-19, 2008. DOI:10.3233/SPE-2008-0326.
- MOREIRA, L.P.; SILVEIRA, L.; PACHECO, M.T.T.; DA SILVA, A.G.; ROCCO, D.D.F.M. Detecting urine metabolites related to training performance in swimming athletes by means of Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.185, p.223-234, 2018. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2018.06.013.
- MOREIRA, W.B. Artigos sobre testes diagnósticos. In: **Leitura Crítica de Artigos Científicos**. Capítulo 5. 1ª. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Oncologia, 2016.
- MOROZ, L.R.; SCHWEIGERT, A. Hemangiossarcoma em cães. **Campo Digital, Campo Mourão**, v.2, n.1, p.50-55, 2007.
- MUNTEANU, R.M.; SCOICARU, L.O.; MILITARU, M.; GAGNIUC, E.; MICSA, C.; TOGOE, D.; VITALARU, A.B.; RUSU, M.I.; TAUTAN, M.; CHIRICUTA, B.; UDREA, M.V.; SONEA, A.; GRIGORESCU, C.E.A.; BIRTOIU, A.I. Comparison of benign and malignant mammary tumors in dogs through Raman spectroscopy: two clinical cases. **Scientific Works Series C. Veterinary Medicine**, v.LXIII, n.2, p.85-90, 2017.
- NAKAYAMA, M.; TABUCHI, K.; HARA, A. Clinical utility of the modified Glasgow prognostic score in patients with advanced head and neck cancer. **Head and Neck**, v.37, n.12, p.1745-1749, 2015. DOI:10.1002/hed.23823.
- NETO, B.A.D.; LAPIS, A.A.M. Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. **Molecules**, v.14, p.1725, 2009. DOI:10.3390/molecules14051725.
- NEYMAN, J. Outline of a theory of statistical estimation based on the classical theory of probability. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical and Physical Sciences**, v.236, n.767, p.333-380, 1937. DOI: 10.1098/rsta.1937.0005.
- NGUYEN, D.V.; ROCKE, D.M. Multi-class cancer classification via partial least squares with gene expression. **Bioinformatics**, v.18, p.1216, 2002. DOI:10.1093/bioinformatics/18.9.1216.
-

-
- NOBLE, R.; KALTZ, O.; HOCHBERG, M.E. Peto's paradox and human cancers. **Philosophical Transactions Royal Society B: Biological Sciences**, v.19, n.370, p.1673, 2015. DOI:10.1098/rstb.2015.0104.
- NØDTVEDT, A.; BERKE, O.; BONNETT, B.N.; BRØNDEN, L. Current status of canine cancer registration report from an international workshop. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.10, n.2, p.95-101, 2012. DOI:10.1111/j.1476-5829.2011.00279.x.
- NUNES, C.A.; FREITAS, M.P.; PINHEIRO, A.C.M.; BASTOS, S.C. Chemoface: a novelfree user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, n.11, 2012. DOI:6610.1590/S0103-50532012005000073.
- NUNES, L.O.; MARTIN, A.A.; SILVEIRA, L. Biochemical changes between normal and BCC tissue: a FT-Raman study. **Journal of Spectroscopy**, v.17, n.11, p.104696, 2003. DOI:10.1155/2003/104696.
- NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S.; HERRGESELL, E.J. Urinary tract. In: NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. **Small Animal Diagnostic Ultrasound**. 2^a. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2002.
- OH, J.H.; CHO, J.Y. Comparative oncology: overcoming human cancer through companion animal studies. **Experimental and Molecular Medicine**, v.55, n.4, p.725-734, 2023. DOI:10.1038/s12276-023-00977-3.
- OLIVEIRA, G.C. **Plasma humano: componentes e derivados conservação e utilização terapêutica em ambiente hospitalar**. 2016. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal, 2016.
- OLIVEIRA, K.M.; HORTA, R.S.; SILVA, C.M.O.; LAVOR, M.S.L. **Principais síndromes paraneoplásicas em cães e gatos**. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.9, n.17, p.2073, 2013.
- OSTRANDER, E.A.; FRANKLIN, H. Both ends of the leash – the human links to good dogs with bad genes. **The New England Journal Medicine**, v.367, n.7, p.636-646, 2012. DOI:10.1056/NEJMra1204453.
- OZAKI, I.; IRIAMA, K. Potential of Raman spectroscopy in medical science. In: STEPANEK, J., ANZENBACHER, P., AND SEDLACEK, B. **Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objetcts**. Amsterdam: Elsevier, 1987.
-

-
- PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v.8, n.2, p.147-156, 2008. DOI:10.1038/nrc2273.
- PARACHALIL, D.R.; BRUNO, C.; BONNIER, F.; BLASCO, H.; CHOURPA, I.; MCINTYRE, J.; BYRNE, H.J. Raman spectroscopic screening of high and low molecular weight fractions of human serum. **Analyst**, v.14, n.144, p.4295-4311, 2019. DOI:10.1039/c9an00599d.
- PENCE, I.; MAHADEVAN-JANSEN, A. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v.7, n.45, p.1958-1579, 2016. DOI:10.1039/c5cs00581g.
- PÉREZ, I.; TAITO-VICENTIB, I.Y.; GONZÁLEZ-XURIGUERAA, C.G.; CARVAJALA, C.; FRANCOB, J.V.A.; LOÉZARC, C. How to interpret diagnostic tests. **Medwave**, v.21, n.7, p.e8432, 2021. DOI:10.5867/medwave.2021.07.8432
- PESSIER, A.P.; STERN, J.K.; WITTE, C.L. TP53 gene and cancer resistance in elephants. **The Journal of the American Medical Association**, v.315, n.16, p.1789-1791, 2016. DOI:10.1001/jama.2016.0449.
- PETO, R.; ROE, F.J.C.; LEE, P.N.; LEVY, L.; CLACK, J. Cancer and ageing in mice and men. **British Journal of Cancer**, v.32, n.4, p.411-426, 1975. DOI:10.1038/bjc.1975.242.
- PETROS, J.A.; BAUMANN, A.K.; PESINI, E.R.; AMIN, M.B.; SUN, C.Q.; SALÃO, J.; LIM, S.D.; ISSA, M.M.; FLANDRES, W.D.; HOSSEINI, S.H.; MARSHALL, F.F.; WALLACE, D.C. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.102, n.3, p.719-724, 2005. DOI:10.1073/pnas.0408894102.
- PICHARDO-MOLINA, J.L.; FRAUSTO-REYES, C.; BARBOSA-GARCÍA, O.; HUERTA-FRANCO, R.; GONZÁLEZ-TRUJILLO, J.L.; RAMÍREZ-ALVARADO, C.A.; GUTIÉRREZ-JUÁREZ, G.; MEDINA-GUTIÉRREZ, C. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. **Lasers in Medical Science**, v.22, p.229-236, 2007. DOI:10.1007/s10103-006-0432-8.
- PIER, M.G. Imunofenotipagem das Leucemias. Anais da Academia de Ciências e Tecnologia de São Jose Do Rio Preto, p.1-15, 2008.
- PINELLO, K.; BALDASSARRE, V.; STEIGER, K.; PACIELLO, O.; PIRES, I.; LAUFER-AMORIM, R.; OEVERMANN, A.; NIZA-RIBEIRO, J.; ARESU, L.; ROUS, B.; ZNAOR, A.; CREE, I. A.; GUSCETTI, F.; PALMIERI, C.; DAGLI, M.L.Z. Vet-ICD-
-

- O-Canine-1, a system for coding canine neoplasms based on the human ICD-O-3.2. **Cancers (Basel)**, v.14, n.6, p.1529, 2022. DOI:10.3390/cancers14061529.
- PORTO, A.O. **Pacientes oncológicos: respostas emocionais frente à doença**. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Psicologia) – Centro Universitário de João Pessoa, João Pessoa, PB, 2004.
- PRO, T.S. **Estudo retrospectivo de neoplasias caninas diagnosticadas no Hospital Veterinário Público do Distrito Federal**. 2022. Dissertação (Conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária). - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac, Gama, DF, 2022. Disponível em:<
<https://dspace.uniceplac.edu.br/bitstream/123456789/2597/1/Thaissa%20Dos%20Santos%20Pro.pdf>>. Acesso em 05/07/24.
- RAJKUMAR S.V. MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management. **Hematology American Society Hematological Education Program**, v.2005, p.340-345, 2005. DOI:10.1182/asheducation-2005.1.340.
- RAJU, T.N.K. William Sealy Gosset and William A. Silverman: Two “students” of science. **Pediatrics**, v.116, n.3, p.732-735, 2005. DOI:10.1542/peds.2005-1134.
- REID-SMITH, R.J. **The incidence of neoplasia in the canine and feline patient populations of private veterinary practices in southern Ontario**. 2000. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculty of Graduate Studies, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá, 2000.
- REIF, J.S. Animal sentinels for environmental and public health. **Public Health Report**, v.126, p.50-57, 2011. DOI:10.1177/003335491111260S108.
- RESENDE, J.M. O uso da tecnologia no diagnóstico médico e suas consequências. **Ética Revista**, v.4, n.4, p.18-21, 2006. Disponível em:
<http://www.imagiologia.com.br/dow/exames/uso-da-tecnologia-no-diagnostico-medico.pdf>. Acesso em 22/11/2023.
- ROCHA, T.C.; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R.P.; NOGUEIRA, C.A.S. FAGLIARI, J.J. Hemogram and serum proteins of Canchim-Nelore and Holstein calves in the first 30 days of life. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1250-1254, 2010. DOI: 10.1590/S0102-09352010000500030

- ROCHE, B.; HOCHBERG, M.E.; CAULIN, A.F.; MALEY, C.C.; GATENBY, R.A.; MISSE, D.; THOMAS, F. Resistência natural ao câncer: uma hipótese darwiniana para explicar o paradoxo de Peto. Natural resistance to cancers: a Darwinian hypothesis to explain Peto's paradox, **BMC Cancer**, v.12, n.387, p.1-4, 2012. DOI:10.1186/1471-2407-12-387.
- RODRIGUEZ, B.J.; ORTIZ, L.C.; GARZÓN, A.; GÓMEZ, L.F.; VASQUEZ, Y. Assessment of cytology for diagnosis of canine tumors. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.22, n.1, p.42-53, 2009. Disponível em: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/324349/207881522>. Acesso em 21/02/22.
- ROSSETTO, V.J.V.; MORENO, K.; GROTTI, C.B; FARIA DOS REIS, A.C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Frequência de neoplasmas diagnosticados por exame citológico: estudo retrospectivo em um hospital-escola. Semina: **Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.189-200, 2009. DOI:10.5433/1679-0359.2009v30n1p189.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ª. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SANDRI, M. Protein breakdown in cancer cachexia. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.54, p.11-19, 2006. DOI:10.1016/j.semcdb.2015.11.002.
- SANTOS, A.M.; SOUSA, R.C.; FERNANDES, E.S. Sarcoma de tecido muscular esquelético (hemangiossarcoma muscular) em região sacro-ílica de cão – Relato de caso. **Revista NIP – UNIDESC**, v.1, n.1, 2016. Disponível em: https://docplayer.com.br/75130827-Curso-de-medicina-veterinaria-sarcoma-de-tecido-muscular-esqueletico-hemangiossarcoma-muscular-em-regiao-sacro-iliaca-de-caos-relato-de-caso.html#google_vignette. Acesso em 23/07/2023.
- SANTOS, A.R.; MENEZES, D.B.; ELLENA, J.; ANDRADE, M.B. Aplicação da espectroscopia Raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. **Química Nova**, v.42, n.5, p.489-796, 2019. DOI:10.21577/0100-4042.20170358.
- SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. **Patologia veterinária**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.
- SANTOS, R.L.C.; LASMAR, R.B.; FONTES, T.M.P.; FONSECA, R.C.S.P.; SALDANHA, P.A.B.; SANTOS, R.F.C. Avaliação da acurácia do exame

- histopatológico por congelação em fragmentos de tecido obtidos por biópsia percutânea com agulha grossa no diagnóstico do câncer de mama em tumores palpáveis, **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.41, n.1, p.7-10, 2014. DOI: 10.1590/S0100-6991201400100003.
- SCHAFFEL, R.; SIMÕES, B.P. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.30, n.1, p.52-58, 2008. DOI:10.1590/S1516-84842008000700013.
- SCHIFFMAN, J.D; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.370, n.1673, p.20140231, 2015. DOI:10.1098/rstb.2014.0231.
- SCHOEFELDER, A.T.; BELARMINO, L.A.; BATISTA, K.Z.S. Imunoterapia antitumoral em Medicina Veterinária. **Multidisciplinary Reviews**, v.4, p.1-9, 2021. DOI:10.29327/multi.2021010.
- SEDIGHIPOOR, M.; KIANFAR, A.H.; MAHMOOD, W.A.; AZARIAN, M.H Synthesis and electronic structure of novel Schiff bases Ni/Cu (II) complexes: Evaluation of DNA/serum protein binding by spectroscopic studies. **Polyhedron**, v.129, p.1-8, 2017. DOI:10.1016/J.POLY.2017.03.027.
- SEER, Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer Stat Facts**. Bethesda: National Cancer Institute, 2022. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts>. Acesso em 22/02/2022.
- SEMOLIN, L.M.; HERNÁNDEZ-VARGAS, G.; NARDI, A.B.D.E. Mesotelioma. In: DALECK, C.R.; NARDI, A.B. **Oncologia em Cães e Gatos**. Capítulo 53. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.
- SEYFRIED, T.N.; FLORES, R.E.; POFF, A.M, D'AGOSTINO, D.P. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. **Carcinogenesis**, v.35, n.3, p.515-527, 2014. DOI:10.1093/carcin/bgt480.
- SEYFRIED, T.N.; SHELTON, L.M. Cancer as a metabolic disease. **Nutrition and Metabolism**, v.7, n.7, p.1-22, 2010. DOI:10.1186/1743-7075-7-7.
- SILVA, A.M. **Identificação do espectro proteico plasmático de pacientes com leucemia mieloide aguda através da espectroscopia Raman: Uma nova metodologia para o monitoramento**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 2006.

-
- SILVA, A.M.; DE SIQUEIRA E OLIVEIRA, F.S.A.; DE BRITO, P.L.; SILVEIRA, L. Spectral model for diagnosis of acute leukemias in whole blood and plasma through Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v.23, n.10, p.1-11, 2018. DOI:10.1117/1.JBO.23.10. 107002.
- SILVA, A.P. **Estudo comparativo da avaliação citopatológica e histopatológica das neoplasias caninas**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Instituto Federal da Paraíba, Sousa, PB, 2019.
- SILVA, F.B.; CASTRO, A.C.; ZENTENO, I.M.A.G.; RODRIGUES, T.; FABRETTI, A.K. Sarcoma histiocítico em cães: RELATO DE DOIS CASOS, **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v.5, n.3, p.572-582, 2023. DOI:10.36557/2674-8169.2023v5n4p572-582.
- SILVA, R.O.P.; LOPES, A. F.; FARIA, R.M.D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica: revisão. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.18, n.2, p.116-122, 2008.
- SILVEIRA, L.; BORGES, R.C.F.; NAVARRO, R.S.; GIANA, H.E.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T.T.; FERNANDES, A.B. Quantifying glucose and lipid components in human serum by Raman spectroscopy and multivariate statistics. **Lasers in Medical Science**, v.32, n.4. p.787-795, 2013. DOI:10.1007/s10103-017-2173-2.
- SILVEIRA, L.; SATHAIAH, S.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T.; CHAVANTES, M.C.; PASQUALUCCI, C.A. Correlation between near-infrared Raman spectroscopy and the histopathological analysis of atherosclerosis in human coronary arteries. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.30, n.4, p.290-297, 2002. DOI:10.1002/lsm.10053.
- SILVEIRA, L.; SILVEIRA, F.L.; BODANESE, B.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals. **Journal of Biomedical Optics**, v.18, n.3, p.039801, 2013. DOI:10.1117/1.JBO.17.7.077003.
- SILVEIRA, L.M.G.; BRUNNER, C.C.H.M.; CUNHA, F.M.; FUTEMA, F.; CALDERARO, F.F.; KOZLOWSKY, D. Utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizadas em pele ou mucosas de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.1, p.55-66, 2010.
-

-
- SILVEIRA, M.F.; BONEL, J.; PEREIRA, S.M.; FERNANDES, C.G. Características epidemiológicas de sarcomas de tecidos moles caninos e felinos: levantamento de 30 anos. **Ciências Agrárias e Ambientais**, v.10, n.4, p.361-365, 2012. DOI:10.7213/acadêmica.7742
- SJÖBERG, B.; FOLEY, S.; CARDEY, B.; ENESCU, M. An experimental and theoretical study of the amino acid side chain Raman bands in proteins. **Spectrochimica Acta A: Molecular Biomolecular Spectroscopy**, v.128, p.300-311, 2014. DOI:10.1016/j.saa.2014.02.080.
- SMITH, R.A.; ANDREWS, K.S.; BROOKS, D.; FEDEWA, S.A.; MANASSARAM-BAPTISTE, D.; SASLOW, D.; WENDER, R.C. Cancer screening in the United States: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. **Cancer Journal Clinics**, v.65, p.30-54, 2015. DOI:10.3322/caac.21261.
- SOARES, N.P.; MEDEIROS, A.P.; SZABÓ, M.P.J.; GUIMARÃES, E.C.; FERNANDES, L.G.; SANTOS, T.R. Hemangiomas and Hemangiosarcomas in dogs: retrospective study of 192 cases (2002-2014). **Ciência Animal Brasileira**, v.18, p.1-10, 2017. DOI: 10.1590/1089-6891v18e-30889.
- SONNENSCHN, C.; SONNENSCHN, C.; SOTO, A. M.; RANGARAJAN, A.; KULKARNI, P. Competing views on cancer. **Journal of Biosciences**, v.39, n.2, p.281-302, 2014. DOI:10.1007/s12038-013-9403-y.
- SONTANG, S. **A doença como metáfora**. Coleção Tendências, Volume 6. Tradução: Márcio Ramalho. Rio de Janeiro: Edições Graal, 1984. Título original: Illness as Metaphor.
- SOUZA, F.B.; PACHECO, M.T.T.; VILAVERDE, A.B.; SILVEIRA, L.; MARCOS, R.L.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte. **Revista Brasileira Medicina e Esporte**, v.9, n.6, p.388-395, 2003. DOI:10.1590/S1517-86922003000600004.
- STONE, N.; KENDALL, C.; SMITH, J.; CROW, P.; BARR, H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discussion**, v.126, p.141-157, 2004. DOI:10.1039/b304992b.
- STRATTON, S.R. Journeys into the genome of cancer cells. **EMBO Molecular Medicine**, v.5, n.2, p.169-172, 2013. DOI:10.1002/emmm.201202388.
-

-
- SULTAN, F.; GANAIE, B.A. Comparative oncology: Integrating human and veterinary medicine. **Open Veterinary Journal**, v.8, n.1, p.25-34, 2018. DOI:10.4314/ovj.v8i1.5.
- SZENT-GYORGYI, A. The living state and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v.74, p.2844, 1977. DOI: 10.1073/pnas.74.7.2844.
- TALARI, A.C.S.; MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.50, n.46, p.46-111, 2015. DOI:10.1080/05704928.2014.923902.
- TARIN, D. Comparisons of metastases in different organs: biological and clinical implications. **Clinical Cancer Research**, v.14, n.7, p.1923-1925, 2008. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-5259.
- TEDARDI, M.V.; VENEZIANO, D.B.; KIMURA, K.C.; PEDRA-MENDONÇA, P.; BIONDI, L.R.; GRANDI, F.; LATORRE, M.R.D.O.; DAGLI, M.L.Z. Sao Paulo Animal Cancer Registry, the first in Latin America. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.13, n.2, p.154-155, 2015. DOI:10.1111/vco.12133.
- TOMATIS, L. IARC programme on evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.271, p.396-409, 1976.
- VAIL, D.M.; THAMM, D.H.; LIPTAK, J.M. Miscellaneous tumors. In: VAIL, D.M, THAMM, D.H.; LIPTAK, J.M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Capítulo 34. 6ª. ed. Saint Louis: Elsevier, 2020. Disponível em: <https://www.animalcancersurgeon.com/publications-textbooks>. Acesso em 21/05/24.
- VAINIO, H.; MAGEE, P.N.; MCGREGOR, D.B.; MCMICHAEL, A.J. Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. In: **IARC Scientific Publication No. 116 – Consensus Report Scientific Publications**. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press, 1992.
- VANNA, R.; TRESOLDI, C.; RONCHI, P.; LENFERINK, A.T.M.; MORASSO, C.; MEHN, D.; BEDONI, M.; TERSTAPPEN, L.W.M.M.; CICERI, F.; OTTO, C.; GRAMATICA, F. Raman spectroscopy for the assessment of acute myeloid leukemia: a proof-of-concept study. **Proceedings of SPIE Biomedical Vibrational Spectroscopy VI: Advances in Research and Industry**, San Francisco: SPIE, v.8939, p.89390F, 2014. DOI:10.1117/12.2039186.
- VARGAS-OBIETA, E.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, J.C.; MARTÍNEZ-ZEREGA, B.E.; JAVE-SUÁREZ, L.F.; AGUILAR-LEMARROY, A.; GONZÁLEZ-SOLÍS, J.L. Breast
-

-
- cancer detection based on serum sample surface enhanced Raman spectroscopy. **Lasers in Medical Science**, v.31, n.7, p.1317-1324, 2016. DOI:10.1007/s10103-016-1976-x.
- VELDHOEN, N.; WATTERSON, J.; BRASH, M.; MILNER, J. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. **British Journal of Cancer**, v.81, n.3, p.409-415, 1999. DOI:10.1038/sj.bjc.6690709.
- VIEIRA, M.C.; COLETA, F.E.D.; GODOY, A.V.; SOBREIRA, M.F.R.; GALVÃO, A.L.B.; BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; ANAI, L.A.; NOGUEIRA, A.F.S.; SANTANA, A.E. Acute phase proteins in canine lymphoma during antineoplastic chemotherapy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.3, n.2, p.86-92, 2010.
- VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 4^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 357p.
- VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V.E.; ZHOU, S.; DIAZ, L.A.; KINZLER, K.W. Cancer genome landscapes. **Science**, v.29, n.339, p.1546-1558, 2013. DOI:10.1126/science.1235122.
- XU, J.; YU, T.; ZOIS, C.E.; CHENG, J.X.; TANG, Y.; HARRIS, A.L.; HUANG, W.E. Unveiling cancer metabolism through spontaneous and coherent Raman spectroscopy and stable isotope probing. **Cancers (Basel)**, v.5, n.13, p.1-24, 2021. DOI:10.3390/cancers13071718.
- YE, Y.; J, HU.; L, HE.; Y.E, ZENG. Surface-enhanced Raman spectroscopy of some Schiff base complexes and their interaction with DNA, **Vibrational Spectroscopy**, v.20, n.1, p.1-4, 1999. DOI:10.1016/S0924-2031(98)00077-0.
- YOUNG, R.J.; BROWN, N.J.; REED, M.W.; HUGHES, D.; WOLL, P.J. Angiosarcoma. **Lancet Oncology**, v.11, n.10, p.983-991, 2010. DOI:10.1016/S1470-2045(10)70023-1.
- WANG, W.G.; WYCKOFF, J.B.; FROHLICH, V.C.; OLEYNIKOV, Y.; HÜTTELMAIER, S.; ZAVADIL, J.; CERMAK, L.; BOTTINGER, E.P.; SINGER, R.H.; WHITE, J.G.; SEGALL, J.E.; CONDEELIS, J.S. Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. **Cancer Research**, v.62, n.21, p.6278-6288, 2002.
- WILLIAMS, S.B.; HUO, J.; CHU, Y.; BAILLARGEON, J.G.; DASKIVICH, T.; KUO, Y.F.; KOSAREK, C.D.; KIM, S.P.; ORIHUELA, E.; TYLER, D.S.; FREEDLAND, S.J.; KAMAT, A.M. Cancer and all-cause mortality in bladder cancer patients undergoing radical cystectomy: Development and validation of a nomogram for
-

-
- treatment decision-making. **Urology**, v.110, p.76-83, 2017. DOI:10.1016/j.urology.2017.08.024.
- WISNER, E.R.; POLLARD, R.E. Trends in veterinary cancer imaging. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.2, n.49, p.49-74, 2004. DOI:/10.1111/j.1476-5810.2004.00043.x.
- ZHU, Y.; LI, J.H.; YANG, J.; GAO, X.M.; JIA, H.L.; YANG, X. Inflammation-nutrition scope predicts prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma after curative resection. **Medicine**, v.96, n.39, p.1-7, 2017. DOI:10.1097/MD.00000000000008056.
-

ANEXO A

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
PARECER CONSUBSTANCIADO

Processo: 05001 / 2021

Projeto recebido em: 17/05/2021

Resposta da última pendência recebida em: 22/09/2021

IDENTIFICAÇÃO:

Nome do(a) pesquisador(a): Daniela Franco Lopes Frediani

Nome do(s) orientador(es): Nidia Macedo

Projeto: Caracterização molecular de soro sanguíneo de *canis familiaris* com Neoplasias Glandulares analisados pela espectroscopia Raman no infravermelho próximo

Instituição(es) envolvidas na realização do projeto:

Espécie animal utilizada: Cães

Número de animais utilizados: 60

PROJETO DE PESQUISA:

- 1- As referências são atualizadas e contém informações suficientes para dar continuidade aos experimentos no futuro.
- 2- Os benefícios a serem alcançados justificam a utilização dos animais.

- 3- Estudo com grande relevância do tema na atualidade, na área de prevenção e promoção de saúde.
- 4- Os objetivos do projeto estão apresentados de forma clara.
- 5- Metodologia está clara e bem descrita, porém com questionamentos, ver abaixo.
- 6- TCLE compõe documentação do projeto, porém precisa de pequena alteração.
- 7- Fonte de financiamento não descrito no projeto.
- 8- Cronograma consta no projeto, porém sem precisar o ano.

PENDÊNCIAS Esclarecidas:

- 1- O trabalho está escrito em diferentes tempos verbais (passado, presente e futuro). Definir CORRIGIDO
- 2 – Ajustar a formatação geral do trabalho. CORRIGIDO
- 3- Definir um “n” mínimo estatístico entre os grupos controle e de tratamento. Valores de “50 a 70 animais incluindo ambos os grupos” não ficou claro. VALOR ESTIMADO, DESEJO 30 DE CADA GRUPO
- 4- Quais proteínas serão avaliadas? (Proteínas Totais, Albumina, Globulinas ou algum outro tipo proteico?) JÁ ESTAVA NO ITEM OBJETIVO POREM ESPECIFIQUEI MAIS
- 5 – Os ácidos graxos foram citados nos objetivos mas não desenvolvidos no projeto SIM ESPECIFIQUEI MAIS, ESTE LITEM FAZ PARTE DA ANALISE QUE OUTROS AUTORES JA EFETUARAM, PORTANTO ESTA SIM NO QUE SERA AVALIADO POIS DEFINE O ESTATUS DO PACIENTE A SER ANALISADO
- 6 – Definir raça, idade e sexo e estado reprodutivo do grupo tratamento. Se for aleatório deve ser informado no projeto, assim como foi referido no grupo controle. Estas informações podem ser melhor esclarecidas no item 3.1 do projeto. CORRIGIDO
- 7 – Como haverá a identificação do paciente que entrará no grupo oncológico? Imagem, Citologia, Histopatológico, etc? CORRIGIDO
- 8 - Haverá diferença entre tratamento para malignos e benignos? CORRIGIDO
- 9 – Sugere-se estipular apenas um tipo de neoplasia, por exemplo, tumores de origem mamária para compor o projeto de forma a chegar num grupo mínimo de estudo estatístico e minimizar as variáveis e vieses de resultado. ESTIMATIVA PARA TUMOR SOLIDO EM BAÇO, FOI CORRIGIDO

Pendências: respondidas em 04 de agosto

1- Objetivo geral: Alertar a terminologia de paciente normais por hígidos. Essas proteínas já estão estabelecidas em pacientes vivos? Se não, um primeiro objetivo é estabelecer o padrão normal. E um segundo objetivo, avaliar o padrão alterado, comparando-os. Separar em 2 objetivos: verificar e comparar. CORRIGIDO

2-Fundamentação científica: ER detecta alterações em ácido graxo, mas irá dosar expressão proteica?

3-Materiais e métodos descrever como é feito o diagnóstico tumoral; perfil de idade e raça dos animais.

Os animais que compõem os diferentes grupos são necessariamente os mesmos? Ou seja, serão acompanhados ao longo da doença, sendo controles de si mesmos?

Qual o n de cada grupo? Como vai ser o tratamento clínico com viscum álbum? Isso é o objetivo específico do trabalho. Mas não está descrito na metodologia.

Qual será a análise estatística. CORRIGIDO

AValiação FINAL sobre todos os itens:

- ☒ APROVADO
- ☐ Bom com pendências – deve ser revisto.
- ☐ Inadequado – indeferido.

Senhor pesquisador, caso haja qualquer evento adverso, favor informar esta comissão em até 24h.

LOCAL e DATA: São Paulo, 08 de novembro de 2021

ASSINATURA:



Prof. Dra. Tatiana Helenstein
Coordenadora CEUA_UAM

ANEXO B

Comparação da capacidade da espectroscopia Raman dispersiva associada com análise estatística multivariada em modelos de diagnóstico para diferentes doenças na literatura (Atkins, 2017; Bankapur *et al.*, 2010; Barker; Rayens, 2003; Bergholt-Hassing, 2009; Dai *et al.*, 2020; Dingari *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2010; Gogone *et al.*, 2021; González-Solís *et al.*, 2014a; González-Solís *et al.*, 2014b; Harris *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2013; Jöberg *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2022; Lin; Koenig, 1976; Lopes *et al.*, 2009; Managó *et al.*, 2018; Martínez-Espinosa *et al.*, 2008; Munteanu *et al.*, 2017; Nguyen; Rocke, 2002; Parachalil *et al.*, 2019; Pichardo-Molina *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2018; Vargas-Obieta *et al.*, 2016). Foi demonstrado nos resultados da caracterização de biomarcadores, que estes estão em consonância com os obtidos para outras doenças utilizando a mesma técnica espectroscópica.

Autor e ano	Amostra (soro/sangue/tecido)	Espécie	Análise exploratória ou classificação	Descrição da composição ou diagnóstico	Tipo de diagnóstico	Principais resultados em termos de análise bioquímica (compostos e posição dos picos)	Sensibilidade, especificidade e acurácia
LIN; KOENIG, 1976	Soro	Bovina		Albumina		1658 cm ⁻¹	
NGUYEN; ROCKE, 2002	Soro	Humana	PLS				
BARKER; RAYENS, 2003	Tecidos	Humana	PLS				
SILVA <i>et al.</i> , 2006	Plasma	Humana			Leucemia mieloide		
PICHARDODO-MOLINA <i>et al.</i> , 2007	Soro	Humana	Discriminação PCA/LDA	Proteínas amida, α-hélice, fosfolipídeos, C-H, CH ₂	Câncer mama	1439, 1453, 1663 cm ⁻¹	97% SE 78% ESP
MARTÍNEZ-ESPINOSA <i>et al.</i> , 2008	Soro	Humana	PCA		Diferenciar e discriminar amostras de soro de pacientes com leucemia de amostras normais		

BERGHOLT-HASSING, 2009			PLS	PCR			
MARTÍNEZ-ESPINOSA <i>et al.</i> , 2009		Humana	PCA				
LOPES <i>et al.</i> , 2009	Cultura	Humana	PCA		Redução de viabilidade de mitocôndria das células tumorais em resposta ao princípio ativo Viscum album		
HARRIS <i>et al.</i> , 2000	Soro	Humana	PLS	Fenilalanina, amida III, amida I, CH ₂ e CH ₃	Diagnóstico de carcinoma de cabeça e pescoço		75% SE 75% ESP
BANKAPUR <i>et al.</i> , 2010		Humana		Hemoglobina		473, 490, 517, 545, 589, 620, 635, 860, 898, 936, 962, 1138, cm ⁻¹	
DUARTE <i>et al.</i> , 2010	Soro	Felina	PLS		Diagnóstico da toxoplasmose em gatos domésticos, correlacionando as imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo		100% SE 80% ESP
DINGARI <i>et al.</i> , 2012		Humana		Albumina			
HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2013		Humana		Fenilalanina		621, 1003, 1032 cm ⁻¹	
GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014 ^a	Soro	Humana	PCA	Triptofano e fosfolipídeos; lipídeos; caroteno; triptofano; Tirosina; fenilalanina; fosfolipídeos e amida I; picos de carotenoides mais intensos em pacientes normais em comparação com os neoplásicos	Câncer do colo de útero, pré-cancerosos e saudáveis	1338; 1447; 1523; 1556; 1587; 1603; 1654 cm ⁻¹	87% SE 100% ESP 93% AC

GONZÁLEZ-SOLÍS <i>et al.</i> , 2014b	Soro	Humana	Classificação PCA		Controle x leucemia e tipos de leucemia		100% SE 100% ESP
SJÖBERG <i>et al.</i> , 2014		Humana	PCA				
VARGAS-OBIETÁ <i>et al.</i> , 2016	Soro	Humana	Discriminação PCA-LDA		Discriminação SERS, PCA-LDS		96%SE 87% ESP
MUNTEANU <i>et al.</i> , 2017	Tecido	Canina	PCA	Carotenóides em tecido benigno	Diagnósticos em margem cirúrgica de tumores mamários de cães		
ATKINS, 2017			PCA				
DA SILVA <i>et al.</i> , 2018	Soro	Humana	Análise exploratória via PCA e classificação via PLS		Diferenciação espectral de amostras saudáveis e leucêmicas de plasma humano		97,1% SE 95,7% ESP
MANAGÓ <i>et al.</i> , 2018		Humana	PCA				
PARACHALIL <i>et al.</i> , 2019		Humana					
DAI <i>et al.</i> , 2020		Humana					
Gogone <i>et al.</i> , 2021	Tecido de testículo	Suína	Discriminação PCA-LDA	Ácidos nucleicos, proteínas e arginina	Identificar biomarcadores moleculares de infecção de PPV ou PCV2 através da microespectroscopia Raman	1064, 1098, 1126, 1171, 1306, 1447, 1605, 1655 cm ⁻¹	95,55 SE 97,7% ESP 99,97% ACU
LIMA <i>et al.</i> , 2022		Humana		Fenilalanina, tirosina e triptofano	Discriminar amostras normais de amostras de câncer leucêmico e não leucêmico	619, 640, 1004, 852, 1452, 1659 cm ⁻¹	99% SE 57% ESP 66% ACU