

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

MARIANE FONTANA MEZONI

**BREVE RELATO: A ANÁLISE SALIVAR ANTIOXIDANTE REVELA
PERFIS DISTINTOS DE ACORDO COM OS SUBTIPOS
MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA**

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2024)

MARIANE FONTANA MEZONI

**BREVE RELATO: A ANÁLISE SALIVAR ANTIOXIDANTE REVELA PERFIS
DISTINTOS DE ACORDO COM OS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER
DE MAMA**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Carolina Panis

Co-orientadora: Dra. Aedra Carla Bufalo Kawassaki

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2024)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Mezoni, Mariane Fontana

Breve relato: a análise salivar antioxidante revela perfis distintos de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama / Mariane Fontana Mezoni; orientadora Carolina Panis; coorientadora Aedra Carla Bufalo Kawassaki . -- Francisco Beltrão, 2024.

88 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Francisco Beltrão) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2024.

1. Câncer de mama. 2. Perfil antioxidante . 3. Saliva . I. Panis, Carolina , orient. II. Kawassaki , Aedra Carla Bufalo, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANE FONTANA MEZONI

**BREVE RELATO: A ANÁLISE SALIVAR ANTIOXIDANTE REVELA PERFIS
DISTINTOS DE ACORDO COM OS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER
DE MAMA**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Panis
UNIOESTE

Membro da banca: Prof. Dr. Geraldo Emilio Vicentini
UNIOESTE

Membro da banca: Profa. Dra. Marta Aparecida Alberton
Nuernberg

UNISEP

FRANCISCO BELTRÃO-PR
(MARÇO/2024)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, antes de todas as coisas, pela vida, pelas oportunidades e por todos os caminhos que me trouxeram até o presente momento. À minha família, pela força e encorajamento, por me apoiarem e serem o alicerce na minha vida. Sobretudo, minha mãe, Marines, que até mesmo nos momentos mais difíceis, nunca perdeu a fé e a esperança, e sempre esteve ao meu lado, obrigada mãe. Ao meu amado pai, Marcelino (in memoriam), que gosto de acreditar que de alguma forma, me acompanhou e acompanha em toda essa caminhada, é por ele e para ele que dedico todo meu esforço. Seu amor me acompanha sempre. À minha irmã, Maressa, por ser fonte de inspiração e determinação para mim, aos meus sobrinhos Marjorie e Murilo, que são a alegria na minha vida. Ao meu namorado Marcos, por sempre me apoiar em minhas decisões, por ser meu companheiro e por me ajudar tanto nesse processo. Agradeço em especial à minha orientadora Doutora Carolina Panis, entre tantas coisas, pela paciência, e por ser minha maior fonte de inspiração e admiração, por toda sua contribuição para a ciência, seu conhecimento me inspira. À minha co-orientadora, Doutora Aedra Bufalo Kawassaki, e a todos os professores do programa de mestrado da UNIOESTE, Francisco Beltrão, por todo conhecimento transmitido. Às amigadas que o mestrado me proporcionou. E por último e não menos importante, agradeço as pacientes do Hospital do Câncer de Francisco Beltrão, CEONC, que acreditaram e confiaram na ciência e no nosso papel de pesquisadores na busca por respostas contra o câncer de mama, a todas essas mulheres guerreiras, vocês são incríveis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Cânceres com maior incidência no ano de 2020.....	15
Figura 2- Perfil da curva de decomposição térmica do ABAP avaliado por quimioluminescência.....	31
Figura 3- Desenho esquemático da técnica da TRAP para análise das amostras.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP – 2,2'azobis

ATP – Adenosina trifosfato

BRCA 1/2 – Breast Cancer type 1 and 2

CA 15-3 – Antígeno CA 15-3

CA-125 – Antígeno ca-125

CDI – Carcinoma Ductal Infiltrante

CDIS – Carcinoma ductal in situ

CLIS – Carcinoma lobular in situ

CEONC – Hospital do Câncer de Francisco Beltrão

C-erbB-2 –Antígeno c-erb-2

CLI – Carcinoma lobular invasivo

Coenzima Q-10 – Ubiquinona

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ERO – Espécie reativa de oxigênio

ERN – Espécie reativa de nitrogênio

HER 2 – Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2

IARC – International Agency for Research on Cancer

IDH – Índice de desenvolvimento humano

IMC – Índice de massa corporal

Ki-67 – Índice de Proliferação Celular

mi-RNA – Micro-RNA

NFR-2 – Fator 2 Relacionado ao Fator Nuclear Eritroide

NF Kappa B – Fator Nuclear Kappa B

RE – Receptor de estrógeno

RP – Receptor de progesterona

RNA – Ácido ribonucleico

TRAP – Avaliação da capacidade antioxidante total

TNM – Tumor node metastasis classification

Breve relato: a análise salivar antioxidante revela perfis distintos de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama

Resumo

O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa, com subtipos biológicos distintos e diversos fatores de risco envolvidos. Dessa forma, a busca por métodos para a investigação de biomarcadores do câncer de mama é constante. Neste contexto, a saliva constitui um promissor indicador de saúde não somente oral, mas também sistêmico, fornecendo um *status* da doença de forma rápida e não invasiva. Considerando-se o papel dos antioxidantes na gênese e progressão do câncer de mama, a utilização da saliva para avaliação da capacidade antioxidante da paciente pode representar uma estratégia relevante. Assim, este estudo teve como objetivo investigar a capacidade antioxidante de amostras de saliva de pacientes portadoras de câncer de mama e sua correlação com os aspectos clínicos determinantes de prognóstico da doença. Trata-se de um estudo observacional analítico, misto (prospectivo e retrospectivo), do tipo coorte, que incluiu mulheres portadoras de câncer de mama atendidas pelo Hospital do Câncer de Francisco Beltrão-PR (CEONC) de 2017 a 2022 e aprovado no Comitê de Ética Institucional sob o número CAAE 35524814.4.0000.0107. Foram selecionadas amostras de saliva 134 pacientes voluntárias com diagnóstico de câncer de mama. Foram coletados dados clinicopatológicos dos prontuários médicos de todas as participantes. A avaliação da capacidade antioxidante total (TRAP) foi feita através da técnica de quimioluminescência de alta sensibilidade e as análises estatísticas foram conduzidas no software Graphpad Prism versão 9.0. Observamos níveis de TRAP salivares significativamente reduzidos nas portadoras de tumores positivos para receptores de estrógeno e de progesterona ($p < 0,05$). Observou-se ainda aumento da TRAP salivar nas portadoras de tumores triplo-negativos ($p = 0,041$). Não foram observadas alterações significantes nas demais comparações clínicas. Correlações moderadas foram observadas entre redução dos níveis de TRAP salivar e a presença de receptores de estrógeno ($R = -0,1881$) e presença de receptores de progesterona ($R = -0,1837$). Correlações positivas foram observadas entre os níveis de TRAP e a expressão do índice de proliferação

ki67 acima de 14%(R= 0,1697) e com a presença do subtipo molecular tumoral triplo-negativo (R= 0,2078). A análise de correlação dos níveis de TRAP na saliva e no sangue demonstrou que não existe correspondência entre eles, e que os níveis de TRAP no sangue são frequentemente maiores do que os detectados na saliva. Estes achados sugerem os níveis salivares de TRAP como possível marcador sistêmico associado à ocorrência de câncer de mama com características clínicas de pior prognóstico como tumores triplo-negativos e de alto índice de proliferação.

Palavras-chave: Câncer de mama, perfil antioxidante, saliva

Brief report: antioxidant salivary analysis reveals distinct profiles according to breast cancer molecular subtypes

Abstract

Breast cancer is a heterogeneous and complex disease, with distinct biological subtypes and several risk factors involved. Therefore, the search for methods to investigate breast cancer biomarkers is constant. In this context, saliva constitutes a promising indicator of health not only oral, but also systemic, providing a quick and non-invasive disease status. Considering the role of antioxidants in the genesis and progression of breast cancer, the use of saliva to assess the patient's antioxidant capacity may represent a relevant strategy. Therefore, this study aimed to investigate the antioxidant capacity of saliva samples from patients with breast cancer and its correlation with the clinical aspects that determine the prognosis of the disease. This is an analytical observational, mixed (prospective and retrospective) cohort study, which included women with breast cancer treated at the Hospital do Câncer de Francisco Beltrão-PR (CEONC) from 2017 to 2022 and approved by the Institutional Ethics Committee under number CAAE 35524814.4.0000.0107. Saliva samples were selected from 134 volunteer patients diagnosed with breast cancer. Clinicopathological data were collected from the medical records of all participants. The assessment of total antioxidant capacity (TRAP) was carried out using the high-sensitivity chemiluminescence technique and statistical analyzes were conducted using Graphpad Prism version 9.0 software. We observed significantly reduced salivary TRAP levels in women with tumors positive for estrogen and progesterone receptors ($p < 0.05$). An increase in salivary TRAP was also observed in patients with triple-negative tumors ($p = 0,041$). No significant changes were observed in other clinical comparisons. Moderate correlations were observed between reduced salivary TRAP levels and the presence of estrogen receptors ($R = -0.1881$) and the presence of progesterone receptors ($R = -0.1837$). Positive correlations were observed between TRAP levels and the expression of the ki67 proliferation index above 14% ($R = 0.1697$) and with the presence of the triple-negative tumor molecular subtype ($R = 0.2078$). Correlation analysis of TRAP levels in saliva and blood demonstrated that there is no correspondence between them,

and that TRAP levels in blood are often higher than those detected in saliva. These findings suggest salivary levels of TRAP as a possible systemic marker associated with the occurrence of breast cancer with clinical characteristics of worse prognosis such as triple-negative tumors and a high proliferation index.

Keywords: Breast cancer, antioxidant profile, saliva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Câncer de mama: visão geral	14
1.2 Mecanismos moleculares do câncer de mama: papel do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes	19
1.2.1 Estresse oxidativo: definições	19
1.2.2 Defesas antioxidantes	22
1.3 A saliva como potencial fonte de biomarcadores de estresse oxidativo no câncer	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Geral	28
2.2 Específicos	28
3. METODOLOGIA	29
3.1 Desenho do estudo	29
3.2 Obtenção das amostras de sangue e saliva	30
3.3 Avaliação da capacidade antioxidante total pela técnica de quimioluminescência de alta sensibilidade (TRAP)	30
3.4 Análises estatísticas	32
4. REFERÊNCIAS	34
5. ARTIGO CIENTÍFICO	42
6. ANEXO I- Termo de consentimento livre e esclarecido	64
ANEXO II- Submissão do artigo	65
ANEXO III - Draft proof	67

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, em 2020 se tornou a neoplasia maligna feminina mais diagnosticada globalmente, além de uma das principais causas de óbito (IARC, 2023). São previstos 34 milhões de novos casos até 2070 (Soerjomataram, 2021). No Brasil, são esperados 704 mil novos casos de câncer no triênio 2023-2025, cerca de 10% desse número é relativo ao câncer de mama feminino, que ocupa a segunda posição entre os tumores malignos mais incidentes no país (Inca, 2023).

O câncer de mama é uma doença complexa que possui grande amplitude genética e diversos subtipos moleculares, que cursam com características clinicopatológicas distintas (Yeo; Guan, 2017; Kashyap *et al.*, 2022). As últimas décadas foram marcadas por intensas investigações e buscas sobre os mecanismos e fatores envolvidos na carcinogênese mamária (Hanahan, 2000). O estudo dos fatores envolvidos na doença permitiu entender, dentre os mecanismos envolvidos na carcinogênese, a participação do estresse oxidativo como um determinante de mutações do material genético e de manutenção da instabilidade genômica (Hecht *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desbalanço entre a produção de espécies reativas e sua neutralização pelas defesas antioxidantes (Halliwell, 2022). Os danos causados às células e a cronicidade deste processo sem o reparo adequado pelos antioxidantes, podem ter implicações relevantes na homeostase redox e na etiologia do câncer de mama (Barbosa *et al.*, 2008). Neste sentido, diversos estudos vêm demonstrando a importância da caracterização dos níveis sistêmicos de antioxidantes como possível biomarcador no câncer de mama e seu significado clínico, como o aumento na capacidade antioxidante tumoral (Panis *et al.*, 2015), redução da capacidade antioxidante sistêmica (Herrera *et al.*, 2014) e alteração dos níveis plasmáticos antioxidantes após quimioterapia (Panis *et al.*, 2012).

A busca por biomarcadores no câncer de mama ainda apresenta algumas limitações, especialmente por conta da dificuldade de obtenção de amostras devido ao pequeno tamanho da massa tumoral mamária ou ainda da coleta de sangue e fluidos corporais de maneira invasiva. Neste contexto, a saliva tem sido apontada

como uma fonte promissora para a descoberta de possíveis biomarcadores no câncer (Wang *et al.*, 2017). A sialoquímica demonstra que a saliva apresenta biomoléculas que também estão presentes no sangue, sugerindo uma nova fonte de obtenção de dados bioquímicos de doenças sistêmicas e uma nova possibilidade de exame complementar não-invasivo (Nový, 2014).

Considerando-se a importância dos antioxidantes no câncer de mama, e que não há estudos utilizando a saliva como fonte desta análise, este estudo investigou os níveis antioxidantes na saliva de mulheres portadoras de câncer de mama e avaliou sua correlação com os aspectos clínicos determinantes de prognóstico na doença.

1.1 Câncer de mama: visão geral

O câncer de mama é uma doença heterogênea que se desenvolve a partir do acúmulo de mutações nas células do tecido mamário ao longo da vida. A heterogeneidade dos tumores mamários resulta nas várias formas de manifestações clínicas decorrentes de suas diferentes assinaturas genéticas, que resultam em diferentes respostas terapêuticas (INCA, 2023).

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais incidente em mulheres em todo o mundo. Sung *et al.*, (2021) demonstrou que, de 185 países, 159 tiveram esse câncer como o mais diagnosticado em 2020 (Figura 1). É também a causa mais frequente de óbitos na população feminina (IARC, 2020). No triênio 2023-2025, no Brasil, são estimados cerca de 704 mil novos casos de câncer de mama por ano (INCA, 2023).

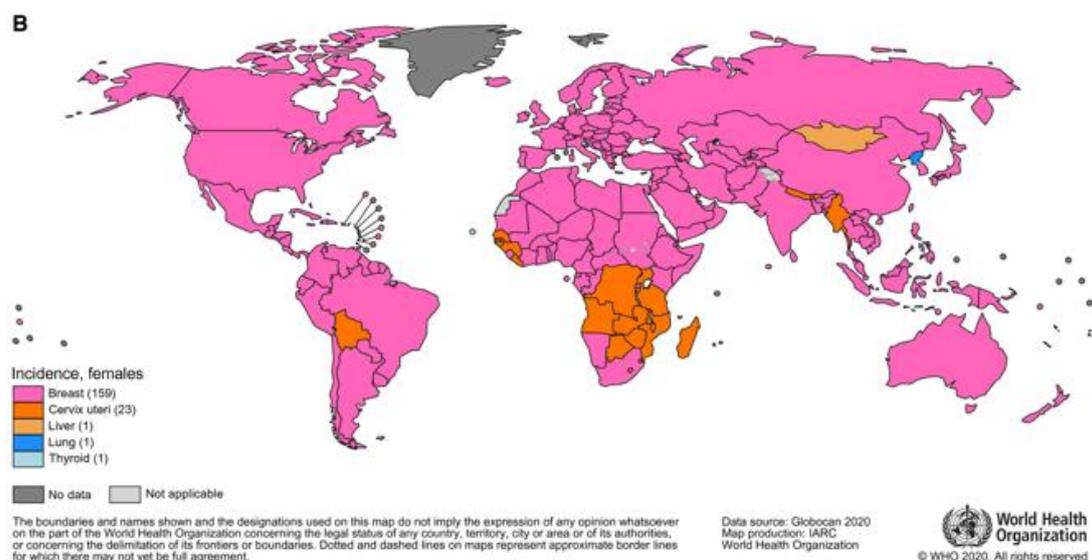


Figura 1: Cânceres com maior incidência no ano de 2020.
Fonte: Adaptado de Sung *et al.*, 2021.

Existem variações nas taxas de ocorrência de câncer de mama em diferentes populações, o que pode refletir diferenças na prevalência de fatores de risco e variações na implementação ou adoção de rastreamento (Sopik, 2020). A incidência de câncer de mama é maior em países com um índice de desenvolvimento humano (IDH) maior, em contrapartida, as taxas de mortalidade são maiores em países com IDH mais baixos. Pode-se associar o aumento da incidência em países mais desenvolvidos ao melhor acesso aos serviços de saúde, enquanto que em países subdesenvolvidos os diagnósticos ocorrem mais tardiamente (Huang *et al.*, 2021).

Embora a incidência do câncer de mama seja mais elevada nos países mais industrializados, um grande número de pessoas que se encontra em regiões menos desenvolvidas totalizam mais de metade de todos os casos de câncer de mama do mundo que não são diagnosticados, criando um fardo significativo da doença (Wilkinson, 2021). Nos países em desenvolvimento, as principais razões para a elevada incidência e mortalidade por câncer de mama são a falta de conhecimento adequado da doença, precariedade de programas de rastreio, diagnóstico tardio e um sistema de saúde ineficiente (Kashyap *et al.*, 2022).

O rastreamento e a detecção precoce do câncer de mama levam a melhores resultados terapêuticos, diminuindo complicações psicológicas, sociais e

financeiras. Contudo, em muitos países ainda há inúmeros desafios para a detecção precoce do câncer de mama (Koopae, 2022).

O câncer de mama não possui uma etiologia única e isolada, sendo uma doença multifatorial que sofre influência de fatores modificáveis e não modificáveis. Dentre os principais fatores não modificáveis estão o sexo feminino, o avanço da idade, fatores genéticos relacionados a história familiar, etnia, menarca e menopausa precoce (Youn; Han, 2020).

O sexo feminino é mais acometido, sendo que a incidência de câncer de mama no sexo masculino representa apenas 1% de todos os casos. Além do sexo, o envelhecimento também é um dos fatores de risco mais importantes para o câncer de mama. Se torna mais expressivo a partir dos 40 anos, com pico de ocorrência a partir dos 50 anos (Inca; 2019; Sun *et al.*, 2017).

A curva de incidência de câncer de mama aumenta consideravelmente com a idade, atingindo um pico logo após a menopausa, podendo evoluir com oscilações a partir de então (Kim; Yoo; Goodman, 2015). Os fatores reprodutivos também estão relacionados ao câncer de mama. Essa correlação pode ser explicada pela hiperexposição aos hormônios ovarianos nos casos de menarca precoce e menopausa tardia (Fioretti *et al.*, 1999).

O câncer de mama em mulheres jovens costuma ser mais raro, afetando apenas 6% das mulheres com menos de 40 anos. Contudo, mulheres jovens são mais propensas a terem tumores com características clinicopatológicas mais agressivas. Além disso, tendem a ser diagnosticadas em estágios mais avançados, o que por sua vez contribui para um prognóstico desfavorável (Radecka; Litwiniuk, 2016; Johnson *et al.*, 2018).

A história familiar da paciente também representa um fator de risco não modificável que deve ser levado em consideração, especialmente se já houver histórico de câncer de mama com um parentesco próximo de primeiro grau, pois pode haver uma herança genética associada. Porém, apenas 5 a 10% dos casos de câncer de mama têm causa genética ou hereditária, com mutações nos genes de reparo, especialmente nos genes BRCA1 ou BRCA2 (Streckfus, Bigler, 2016). Entretanto, o Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001) concluiu que oito em cada nove mulheres que desenvolvem câncer de mama não têm parente de primeiro grau afetado, reforçando seu caráter esporádico. Embora as mulheres que possuem tal parentesco com histórico de câncer de mama tenham

maior risco de desenvolver a doença, a maioria nunca o desenvolverá (Kashyap *et al.*, 2022).

Além dos fatores citados acima, outros como menarca precoce (antes dos 12 anos), menopausa tardia (acima dos 55 anos e idade avançada na primeira gestação) aumentam drasticamente o risco de câncer de mama, sendo fatores de risco não modificáveis (Kashyap *et al.*, 2022). Por exemplo, quanto maior o número de gestações, menor o risco de câncer de mama entre mulheres, sendo a gestação a termo um fator protetor contra o câncer de mama (Ma *et al.*, 2010).

Heer *et al.*, (2020), em seu estudo relatou que foram registrados cerca de 645.000 casos de câncer de mama na pré-menopausa e 1,4 milhões de casos de câncer de mama na pós-menopausa, diagnosticados em todo o mundo em 2018, com mais de 130.000 e 490.000 mortes ocorrendo em cada grupo respectivamente, reforçando sua ocorrência mais frequente na pós menopausa.

Já os fatores de risco modificáveis são aqueles relacionados principalmente ao estilo de vida, e excesso de peso, sedentarismo, paridade, uso de contraceptivos orais, consumo de álcool e exposições ambientais (Youn; Han, 2020).

O excesso de peso ou a obesidade estão relacionados a um risco aumentado de câncer de mama, principalmente no período pós menopausa. Além disso, a obesidade aumenta o risco de morte em pacientes com câncer da mama tanto na pré-menopausa como na pós-menopausa (Picon-Ruiz *et al.*, 2017).

Friedenreich *et al.*, 2021 sugere que há fortes evidências de que a atividade física reduz o risco de câncer de bexiga, mama, cólon, endométrio, esôfago e câncer gástrico e que a inatividade física e o sedentarismo estão associados ao maior risco destas doenças.

Por ser uma doença hormônio dependente, a exposição prolongada ao estrogênio endógeno ou exógeno é considerado um fator de risco relevante ao desenvolvimento de câncer de mama, por propiciar o aumento do tempo de multiplicação das células do tecido mamário e a exacerbação da atividade hormonal durante os ciclos ovulatórios (Breyer, 2016). O estrogênio, tanto endógeno como exógeno, está associado ao risco de câncer de mama, as principais fontes de estrogênio exógeno são os anticoncepcionais ou terapias hormonais (Sun *et al.*, 2017). O papel das pílulas contraceptivas hormonais na incidência do câncer de mama é bastante debatido com dados distintos (Fioretti *et al.*, 1999). Do mesmo

modo, a associação da terapia hormonal na pós-menopausa com câncer de mama ainda permanece como um tema controverso (Beral, 2003).

Estudos também relacionam o consumo de álcool com o aumento do risco de tumores da glândula mamária e no desenvolvimento do câncer de mama, por induzir reações oxidativas no organismo (Strarek-Świechowicz *et al.*, 2023). A exposição a poluentes e a agrotóxicos também são fatores que oferecem risco para câncer de mama, de forma ocupacional ou ocasional, por ingestão, inalação ou contato com a pele e se dando de formas agudas ou crônicas (Panis *et al.*, 2021; Panis *et al.*, 2022).

Em relação à apresentação clínica e morfológica da doença, o câncer de mama apresenta diferentes formas de classificação, podendo ser dividido em diferentes subtipos clínicos e histológicos a fim de tornar o diagnóstico mais preciso, tentar prever o comportamento do tumor e facilitar as tomadas de decisões (Kashyap *et al.*, 2022).

De acordo com a histologia, os tumores mamários são classificados como carcinoma ductal in situ (CDIS), carcinoma ductal invasivo (CDI), carcinoma lobular in situ (CLIS), carcinoma lobular invasivo (CLI), câncer de mama inflamatório, doença de Paget e alguns tipos menos comuns, que incluem linfomas, angiosarcomas, dentre outros (WHO, 2012).

O tipo histológico mais comum, que corresponde a cerca de 75% dos casos, é o CDI. Diferente do CDIS, em que as células anormais do ducto mamário não atingiram outros sítios além do seu lugar de origem, o CDI, trata de uma variante infiltrativa em que as células neoplásicas do ducto mamário rompem as paredes dos ductos e se proliferam além da camada basal. É caracterizado pela disseminação e invasão de tecidos adjacentes e pela tendência à formação de metástases (Kameo *et al.*, 2021). Estima-se que 8 em cada 10 cânceres de mama invasivos são CDI, seguidos pelo CLI, com cerca de 15% dos casos, sendo o restante distribuído entre os outros tipos menos frequentes (Sun *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2019).

Além dos subtipos histológicos, os carcinomas mamários também são classificados através do perfil imunofenotípico de expressão de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Esses marcadores são importantes preditivos de prognósticos e manejo clínico (Kashyap *et al.*, 2022).

O índice de proliferação Ki67 também é um marcador imunoistoquímico utilizado na prática, sendo que valores acima de 14% são significativamente associados à ocorrência de metástases e invasões linfonodais, comumente observadas em tumores de mama mais agressivos (Aman *et al.*, 2019). A combinação entre a expressão de RE, RP, HER2 e do índice Ki67 confere a classificação molecular do câncer de mama nos subtipos moleculares Luminal A (RE e/ou PR positivos, HER2 negativo e ki67 igual ou abaixo de 14%), Luminal B (RE e/ou PR positivos, HER2 negativo e ki67 superior a 14%), HER2-amplificado (qualquer expressão de RE/PR, HER2 positivo e qualquer valor de ki67) e triplo-negativo (RE e/ou PR negativos, HER2 negativo e qualquer valor de ki67). Estes subtipos são determinantes do tratamento e prognóstico da doença, sendo o foco dos principais estudos de câncer de mama da atualidade (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

1.2 Mecanismos moleculares do câncer de mama: papel do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes

1.2.1 Estresse oxidativo: definições

Diversos mecanismos moleculares têm sido apontados como fatores cruciais para a ocorrência e progressão do câncer de mama, dentre os quais o estresse oxidativo ocupa um papel central devido à sua participação em todas as etapas da carcinogênese mamária como fonte de acúmulo de mutações, instabilidade genômica e perpetuação da inflamação crônica (Suman *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo é definido como o desbalanço entre a produção de radicais livres e sua neutralização pelas defesas antioxidantes em favor da formação excessiva de radicais livres ou na diminuição da velocidade de sua remoção, que podem resultar em danos aos sistemas biológicos (Halliwell, 2007; Reuther, 2010).

Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, e que por isso, se tornam instáveis e quimicamente reativos. Sua presença está ligada à manutenção de muitas funções fisiológicas normais e sua formação pelo organismo é inevitável e contínua, principalmente através da respiração mitocondrial (Vasconcelos *et al.*, 2014). Em

equilíbrio no sistema, controlam a força e duração da sinalização celular, por meio de processos cíclicos de oxirredução em proteínas como cinases, fosfatases e fatores de transcrição. Atuam ainda como mediadores na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, e fazem parte no processo de respiração celular e na geração de energia (ATP) (Cotinguiba *et al.*, 2013). Os radicais livres também exercem papel no sistema imunológico, agindo como barreira de defesa do organismo devido à sua ação bactericida, fungicida e virótica. Além disso, estão envolvidos nos processos de fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas diversas (Vasconcelos *et al.*, 2014).

Por outro lado, quando a produção dos radicais livres acontece de maneira desequilibrada, sem controle, este processo se torna potencialmente perigoso às células e tecidos (Gutteridge, Halliwell, 2018). Seu excesso no organismo acarreta efeitos deletérios como a lipoperoxidação e oxidação de proteínas, carboidratos e DNA (Antunes Neto *et al.*, 2008). Os radicais livres, cujo elétron desemparelhado liga-se nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente (Barbosa *et al.*, 2010).

Assim, as EROs abrangem moléculas derivadas de oxigênio, incluindo radicais de superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais de hidroxila, ozônio e oxigênio singleto. Dentre as principais ERNs estão o óxido nítrico, óxido nitroso, ácido nitroso, nitrito, nitratos e peroxinitrito (Tan *et al.*, 2018).

A oxidação de biomoléculas, especialmente, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, está fortemente ligada a indução de efeitos deletérios e consequente perda de suas funções biológicas e da homeostase. Há fortes evidências de que processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, a indução do câncer, têm como precursor o estresse oxidativo (Forman; Zhang, 2021).

O estresse oxidativo está associado à fisiopatologia de diversas doenças crônicas como artrite, diabetes, demência, câncer, aterosclerose, doenças vasculares, obesidade, osteoporose, síndromes metabólicas, doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, dentre outras. O aumento do estresse oxidativo no organismo tem sido associado ao início e à progressão do

envelhecimento, e conseqüentemente, das demais doenças que vêm acompanhadas por ele (Tan *et al.*, 2015).

O ataque intenso e frequente dos radicais livres ao DNA, podem causar erros de replicação, instabilidade genômica e ativação de oncogenes. O estresse oxidativo está relacionado às fases de iniciação, promoção, progressão e transformação maligna das neoplasias (Forman; Zhang, 2021). A cronicidade deste processo tem relevantes implicações sobre o prognóstico das pacientes (Lee *et al.*, 2017).

Os mecanismos de estresse oxidativo também estão envolvidos na ativação de vias de sinalização celular, incluindo a proliferação de células tumorais, aumento da migração e o aumento de fatores pró-angiogênicos de células tumorais. Estudos têm demonstrado que um alto nível de estresse oxidativo são características chave dos tumores malignos (Lee *et al.*, 2017; Heyes, 2020).

Fatores de risco de câncer de mama, como os citados anteriormente, também podem induzir danos oxidativos, como o envelhecimento, a menopausa, presença de mutações nos genes de reparo ou o estrogênio em excesso, que apoiam o desenvolvimento e progressão da doença (Gurer-Orhan *et al.*, 2018). A inflamação crônica também é um importante fator de relevância no microambiente tumoral, impactando nos processos de progressão e metástase (Suman *et al.*, 2016).

As células cancerosas são geralmente submetidas a níveis mais elevados de EROs que as células normais, o que estimula ainda mais um fenótipo maligno, promovendo proliferação celular sustentada, sobrevivência celular, angiogênese e metástase (Griñan-Lison *et al.*, 2021). O aumento das EROs, gera ainda um aumento das taxas de mutações, o que contribui para danos no DNA nos estágios iniciais da carcinogênese (Tan *et al.*, 2018). Assim, a formação excessiva de espécies reativas, associada a uma redução nas defesas antioxidantes no organismo, desencadeia alterações genéticas que predispõem a formação de tumores na mama (Zhang *et al.*, 2021).

O aumento dos marcadores oxidativos tem sido observado em vários tipos de câncer, indicando produção de estresse oxidativo de forma contínua nesta patologia (Matsui *et al.*, 2000). Em pacientes com câncer, o estresse oxidativo altera a expressão de genes que inibem a progressão do ciclo celular e genes supressores tumorais, o que aumenta a proliferação das células cancerosas

(Marteli; Nunes, 2014). Visto que o desequilíbrio redox representa um fator importante para a carcinogênese e prognóstico do câncer de mama e está frequentemente associado a condições pró-inflamatórias, manter a homeostase é importante para as funções celulares normais (Ursini *et al.*, 2016).

Assim, para neutralizar ou evitar os danos causados nas células pela produção excessiva de radicais livres, o organismo humano apresenta mecanismos de defesa, denominados antioxidantes (Griñan-Lison *et al.*, 2021), que estão discutidos no tópico a seguir

1.2.2 Defesas Antioxidantes

Por definição, os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação, agindo diretamente na neutralização dos radicais livres ou participando indiretamente em sistemas enzimáticos com esta função. Moléculas antioxidantes podem ter origens enzimáticas ou não enzimáticas (Vasconcelos *et al.*, 2014).

As principais defesas antioxidantes de via enzimática são a superóxido dismutase, a catalase e as glutatona peroxidase e redutase. A primeira via de defesa é composta pela enzima superóxido dismutase, atuando na remoção do radical superóxido e convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Forman; Zhang, 2021).

A seguir, a enzima catalase atua na dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A terceira via, composta pelas glutatona peroxidase e redutase, também catalisa peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutatona opera em ciclos entre a sua forma oxidada e a sua forma reduzida (Reuter *et al.*, 2010).

Além das vias enzimáticas citadas acima, a outra origem dos antioxidantes é por via não enzimática. Os principais antioxidantes desta classe são os carotenoides, a bilirrubina, a ubiquinona, o ácido úrico, o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) (Miyazawa *et al.*, 2019). O ácido ascórbico é um dos principais antioxidantes no organismo, e atua como protetor das células contra os danos causados pelo estresse oxidativo através da doação de elétrons, reduzindo as EROs, protegendo da oxidação moléculas importantes como lipídios e ácidos nucleicos (Carr; Maggini, 2017; Cimmino; Aifantis, 2018). Por este motivo, o ácido

ascórbico possui efeito protetor para muitas doenças, com potencial para proteger contra o câncer. Estudos demonstraram que o ascorbato inibiu sinergicamente o câncer de ovário em modelos de camundongos e reduziu a toxicidade associada à quimioterapia em pacientes com câncer de ovário (Ma et al., 2014).

Dentre os tocoferóis conhecidos, o α -tocoferol é considerado o mais eficaz e o principal antioxidante lipossolúvel presente nas membranas celulares, interrompendo o processo de peroxidação dos lipídios e mantendo a estabilidade das membranas (Miyazawa *et al.*, 2019). Outro grupo de antioxidantes importante são os carotenoides, que agem no sequestro dos radicais de peroxila e na desativação do oxigênio singleto. O β - caroteno é uma das principais fontes de vitamina A. São moléculas altamente lipofílicas que residem intracelularmente para proteger a membrana do estresse oxidativo (Tan *et al.*, 2018). Um outro carotenoide, a luteína, é capaz de inibir a proliferação do câncer de mama, pela ativação da via do fator de transcrição NRF2 e bloqueio da via de sinalização inflamatória do NF- κ B (Chang *et al.*, 2018).

Outro antioxidante não-enzimático de baixo peso molecular, o ácido úrico, encontra-se presente na maioria dos tecidos, na forma de ânion urato, que é um antioxidante efetivo nos sistemas biológicos, capaz de proteger o DNA e lipídios dos danos oxidativos, recuperar estruturas já atacadas e estabilizar o ascorbato no plasma sanguíneo (Barreiros *et al.*, 2006). A ubiquinona, também conhecida como coenzima Q10, é sintetizada nas células do corpo e também pode ser obtida através dieta, é um potente antioxidante para neutralizar EROs e proteger o revestimento interno da linfa, vasos sanguíneos e endotélio (Tan *et al.*, 2018).

Tanto as defesas enzimáticas como as não-enzimáticas são passíveis de avaliação laboratorial através de métodos tradicionais, como os ensaios enzimáticos, ou métodos de alta sensibilidade como a fluorescência e a quimioluminescência (Colado-Simão et al., 2006).

A medida do TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter) é utilizada para determinação da capacidade antioxidante de misturas. A avaliação da TRAP de uma amostra pode ser considerada um marcador para a determinação do estresse oxidativo, da capacidade do sistema em resistir aos seus desequilíbrios, e ainda fornecer informações sobre a biodisponibilidade de compostos antioxidantes (Evelson *et al.*, 2001).

Essa determinação é realizada pela medida da intensidade de quimioluminescência emitida por radicais peroxila formados pela decomposição térmica do composto ABAP (2,2'azobis - 2-amidinopropano) na presença de luminol. A adição de misturas complexas de antioxidantes, como as amostras biológicas, a uma solução contendo radicais de peroxila produzidos pelo ABAP, leva a uma diminuição da quimioluminescência, por determinado período, chamado tempo de indução, que é proporcional a concentração de antioxidantes na amostra (Lissi *et al.*, 1992).

A determinação da capacidade antioxidante pela TRAP tem sido amplamente utilizada para investigação do perfil antioxidante no câncer de mama, bem como para entendimento do seu significado clínico no sangue periférico e tecido mamário. Panis *et al.*, (2015) em sua investigação sobre o perfil oxidativo dos tumores de mama em comparação com o tecido mamário adjacente normal, observou que tumores na mama apresentam aumento da capacidade antioxidante quando comparados aos tecidos mamários adjacentes, sugerindo que os antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular são acumulados pelo tecido mamário tumoral.

Pires *et al.*, (2019) em sua avaliação do estresse oxidativo e inflamação como fatores que aumentam a quimiorresistência no câncer de mama Luminal, identificaram que pacientes quimiorresistentes exibiram níveis mais baixos de TRAP do que os pacientes responsivos, sugerindo seu consumo durante o processo de resposta ao tratamento.

A avaliação da TRAP em um estudo de caracterização das alterações inflamatórias no tecido mamário de mulheres sem câncer expostas ocupacionalmente a agrotóxicos feita por da Silva *et al.*, (2023) demonstrou que a capacidade antioxidante sistêmica foi significativamente menor no grupo exposto, sugerindo que exposições ambientais afetam de forma significativa este parâmetro.

1.3 A saliva como potencial fonte de biomarcadores de estresse oxidativo no câncer

Como descrito anteriormente, os estudos que investigaram a correlação entre o perfil clínico do câncer de mama e o status antioxidante se basearam em

dados obtidos através de análises de sangue e tecido mamário. Existem poucas informações referentes ao uso da saliva como fonte de biomarcadores no câncer de mama, apesar do seu potencial como fonte de tais substâncias.

Por definição, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), marcadores biológicos ou biomarcadores referem-se a uma ampla categoria de fatores dentre eles, substâncias, estruturas ou processos que podem ser medidos de forma reprodutível no corpo, ou mesmo em produtos do seu metabólito, podendo influenciar ou prever um agravo ou desfecho específico. Ainda, compreende não apenas a incidência e os desfechos dos agravos, mas também os efeitos de tratamentos, intervenções e até mesmo exposição ambiental não intencional, como a produtos químicos ou nutrientes. Biomarcadores de câncer são biomoléculas produzidas pelas células tumorais ou por outras células do corpo em resposta ao tumor. Cada tipo de célula tem sua assinatura molecular única, com características identificáveis (Inchem, [s.d.]).

A saliva é um fluido biológico complexo, formado pelos produtos de três pares de glândulas salivares maiores, sendo elas, as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais, bem como de 300 a 400 glândulas salivares menores presentes na cavidade oral (Wang *et al.*, 2017).

Em sua composição, 99% é água e 1% representa um amplo espectro de moléculas, como íons inorgânicos, DNA, RNA mensageiro, microRNA, proteínas (citocinas, enzimas, quimiocinas, imunoglobulinas) e metabólitos. As secreções salivares são misturadas com as secreções do trato respiratório superior, fluido gengival, exsudatos plasmáticos, restos celulares e componentes de microrganismos (Zhou; Liu, 2023).

A composição da saliva pode ser muito variável, tanto de indivíduo para indivíduo, quanto na secreção de cada glândula, do período do dia, da estimulação ou não. A saliva não estimulada corresponde a quantidade total sem nenhum estímulo exógeno e a saliva estimulada é aquela que responde a um estímulo gustativo, olfativo e mastigatório (Lamy *et al.*, 2018).

Sua função está fundamentalmente ligada a um papel protetor nos tecidos moles e duros dentais, assim como proteção do trato gastrointestinal, proteção contra irritações mecânicas e térmicas, ação sobre o paladar e digestão, ação antimicrobiana, e crucial como biomarcadores correlacionados a agentes

patogênicos responsáveis pela doença periodontal e cárie, entre outros (Wang *et al.*, 2017).

Devido às suas características e fácil obtenção, a saliva tem se tornado um fluido altamente atrativo e desejável, na busca da categorização do estado saúde-doença de um indivíduo, por ser um método simples e minimamente invasivo, com baixo custo. A sialoquímica demonstra que a saliva apresenta biomoléculas que também estão presentes no sangue, como DNAs, RNAs, proteínas, metabólitos sugerindo uma nova fonte de obtenção de dados bioquímicos de doenças sistêmicas e uma nova possibilidade de exame complementar (Kaczor-Urbanowicz *et al.*, 2019).

Diversas revisões foram publicadas delineando a possibilidade de utilização da saliva como fluido diagnóstico. Assim, as ciências ômicas estão contribuindo na identificação e caracterização de componentes salivares que possam descrever em tempo real a condição fisiológica geral de um indivíduo (Castagnola *et al.*, 2017).

Estudos sugerem que alterações de sua concentração podem ser usadas como parâmetros do estresse oxidativo na avaliação de biomarcadores para detectar câncer em estágio inicial ou para monitorar a resposta a um manejo terapêutico (Wang *et al.*, 2017). Dessa forma, os biomarcadores salivares podem auxiliar nas intervenções precoces, evitando que as patologias evoluam para quadros graves. E assim, tem levado muitos estudiosos a considerar a saliva, o “espelho do corpo”, por ser uma porção ultrafiltrada do sangue e por sua composição mudar sob diferentes condições patológicas, considerando que a saliva seja igualmente informativa ao sangue, devido a troca entre eles (Nemeir *et al.*, 2019).

Os biomarcadores salivares correlacionados com características do câncer de mama podem levar a informações mensuráveis que, a partir de sua expressão, podem ajudar a descobrir o estágio da doença, o prognóstico ou até mesmo a resposta a um determinado tratamento (Amiri-Farahani *et al.*, 2020). A capacidade de monitorar a saúde e o bem-estar dos pacientes, bem como detectar patologias sistêmicas precocemente através de meios não invasivos, são objetivos desejáveis na promoção e prestação de cuidados à saúde (Lee; Wong., 2010).

A saliva representa um método promissor frente a abordagens diagnósticas tradicionais (Aps *et al.*, 2002). Assim, a determinação do estresse oxidativo no fluido

salivar pode se apresentar como uma ferramenta promissora para o diagnóstico, monitorização e tratamento do câncer de mama (Williamson *et al.*, 2012).

Por exemplo, o marcador tumoral c-erbB-2, que pertence a uma família de receptores de membrana com atividade de tirosina quinase que reconhecem peptídeos relacionados ao fator de crescimento epitelial foi encontrado em níveis elevados na saliva de mulheres com câncer de mama, em comparação com mulheres saudáveis (Matos *et al.*, 2005; Martí-álamo *et al.*, 2012). Outro marcador encontrado em amostras de saliva é o CA-125, utilizado para monitorar o câncer de ovários, endométrio e que pode também ser preditivo de tumores nas mamas (Malathi *et al.*, 2014).

Esforços têm sido realizados no sentido de identificar marcadores para a avaliação do estresse oxidativo, com o objetivo de sistematizar sua utilização no diagnóstico e controle de seus efeitos adversos. Os marcadores oxidativos são importantes ferramentas na compreensão dos mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo, com o objetivo de possibilitar o controle e prevenção de tal processo (Lee *et al.*, 2017). Apesar disso, pouco se sabe sobre o perfil de marcadores de estresse oxidativo na saliva, e até onde se sabe, não existe nenhum trabalho avaliando o perfil antioxidante da saliva e seu significado clínico no câncer de mama. Por conta disso, este trabalho teve como foco caracterizar os níveis da TRAP, um importante marcador de estresse oxidativo, em amostras de saliva de mulheres portadoras de câncer de mama, e determinar seu significado no contexto clínico da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os níveis antioxidantes na saliva de mulheres portadoras de câncer de mama e avaliar sua correlação com os aspectos clínicos determinantes de prognóstico da doença.

2.2 Específicos

- Medir os níveis de antioxidantes em amostras de saliva de mulheres portadoras de câncer de mama;
- Verificar se as variações nos níveis antioxidantes da saliva estão correlacionadas com algum parâmetro clínico patológico indicativo de pior prognóstico;
- Comparar se há correspondência entre os níveis de antioxidantes na saliva e no sangue da população estudada.

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

A presente proposta corresponde um estudo de delineamento misto, retrospectivo e prospectivo, qualitativo e quantitativo, com pacientes atendidas pelo Hospital de Câncer de Francisco Beltrão-PR (CEONC) entre 2017 e 2022 para investigação de lesões sugestivas de carcinoma mamário. Este estudo encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética Institucional, sob o CAAE 35524814.4.0000.0107 e sob o parecer de ética número 6.129.064.

Foram utilizados como critérios de inclusão: diagnóstico de câncer de mama confirmado por biópsia, tipo histológico CDI (carcinoma ductal infiltrante), com coleta pareada de sangue e saliva. Critérios de exclusão: amostras sem pareamento sangue ou saliva, amostras com quantidades insuficientes para o processamento das mesmas, pacientes em quimioterapia. Compuseram esse estudo 134 mulheres, com participação voluntária, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foi aplicado um questionário para coleta de dados clinicopatológicos das pacientes, que conjuntamente com a consulta aos dados de prontuários objetivou obter as seguintes informações:

a) Caracterização histopatológica e diagnóstico da biópsia: O resultado da análise microscópica das biópsias, fornecida pelo Patologista que atende o Ceonc, foi categorizado como: ausência de lesões, lesão mamária benigna, CDI ou outras alterações malignas da mama. Para categorização histopatológica foram adotados os critérios de avaliação relacionados ao grau histológico (1- bem diferenciado, 2- moderadamente diferenciado ou 3- pouco diferenciado), envolvimento de bordos e presença de êmbolos angiolinfáticos. Também foram utilizados dados referentes à caracterização macroscópica da biópsia no que se refere ao tamanho do tumor, número de linfonodos positivos para células tumorais à análise em microscopia e presença de linfonodo sentinela. Nas biópsias positivas para CDI, foram realizadas análises imuno-histoquímicas para avaliação de expressão dos receptores de estrógeno, progesterona, superexpressão de HER2 e índice de proliferação ki67. A combinação destes resultados foi utilizada para categorizar as biópsias nos subtipos moleculares do câncer de mama: Luminal A (ER e/ou PR positivos e $ki67 < 14\%$), Luminal B (ER e/ou PR positivos, $ki67 \geq 14\%$, HER2 amplificado: qualquer valor de ER, PR e ki67, com amplificação de HER2 ou triplo-negativo: sem expressão de ER, PR e HER2 e qualquer valor de ki67).

b) Determinação do perfil clínico das pacientes: determinado a partir dos dados clínicos obtidos durante a consulta médica e em registro de prontuário, e se refere aos seguintes itens: idade ao diagnóstico (categorizada abaixo ou acima de 50 anos), índice de massa corporal- IMC (categorização em IMC normal: IMC até 26 kg/m², sobrepeso: IMC entre 26,1 e 30 kg/m² ou obesidade: IMC acima de 30,1 kg/m²) e status menopausal ao diagnóstico (presença ou ausência).

3.2 Obtenção das amostras de sangue e saliva

Amostras de sangue heparinizado periférico foram coletadas, em média 10 mL por paciente, no pré-operatório, e centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos para separação do plasma. As amostras de saliva foram coletadas através de salivação espontânea, sem nenhuma estimulação, em tubos plásticos individuais. Todas as pacientes estavam em jejum de pelo menos 8 horas. Ambas as amostras foram coletadas no mesmo momento e em seguida armazenadas em freezer -20°C até a análise.

3.3 Avaliação da capacidade antioxidante total pela técnica de quimioluminescência de alta sensibilidade (TRAP)

O composto 2,2'azobis (ABAP) reage com lipídeos presentes no plasma formando lipoperóxidos. Esta reação emite fótons em baixas quantidades, não detectáveis por espectrofotometria. Para amplificar esta reação, adiciona-se luminol, um composto mais instável que os lipoperóxidos, capaz de captar os elétrons desemparelhados destes, amplificando a emissão de luz e emissão de sinal ao luminômetro. Quanto maior a quantidade de antioxidantes presentes na amostra, maior será o retardo na subida da curva do ABAP, que corresponde ao impedimento na formação de lipoperóxidos devido ao nível de antioxidantes de baixo peso molecular (Figura 2).

A mistura da reação iniciou com a diluição de 4uL de saliva em 1196uL de tampão glicina com pH 8,6. Após, retirou-se 70uL dessa solução que foi colocada em outro eppendorf com 830uL de tampão de glicina e acrescentado 50 uL de solução de luminol (0,0398 mg/mL) e 50 uL de solução de ABAP (54,24 mg/mL) para início da reação, em temperatura ambiente acima de 25°C, um esquema da

TRAP pode ser visto na figura 3. A medida de quimioluminescência foi realizada durante o período necessário para um regresso a aproximadamente 20% do valor basal (aproximadamente 10 minutos). Os resultados foram analisados no software OriginLab 7.5 e expressos em nM de trolox, com base no perfil de inibição da curva do ABAP em comparação ao perfil da solução padrão de Trolox (REPPETO et al., 1996).

A curva do Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um análogo hidrossolúvel de α -tocoferol, foi utilizado como substância antioxidante padrão de referência, importante na padronização dos resultados. Foi diluído 10uL de trolox em 1000uL de tampão de glicina. Dessa solução foi retirado 70uL e acrescentado em 830 uL de tampão de glicina, 50uL de luminol e 50uL de ABAP.

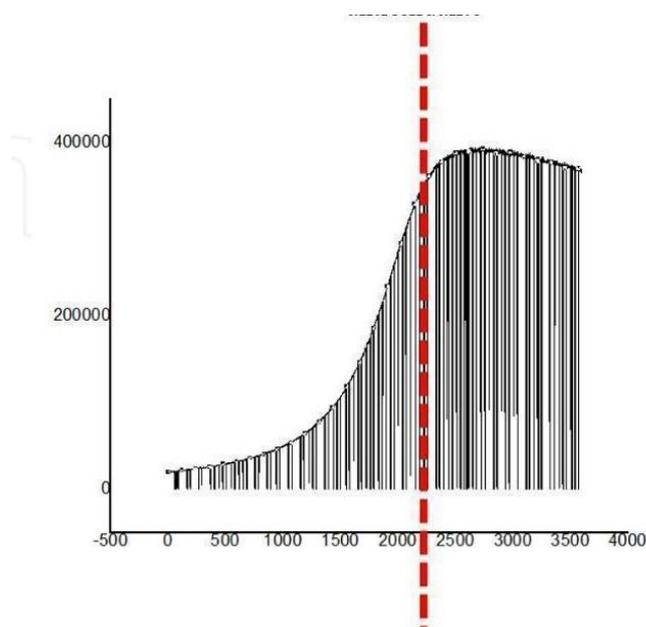


Figura 2: Perfil da curva de decomposição térmica do ABAP avaliado por quimioluminescência. A seta Vermelha indica o tempo de indução (Tind), valor máximo de emissão utilizado para cálculo da TRAP de cada amostra.
Fonte: autor, 2024.

Estimativa da TRAP

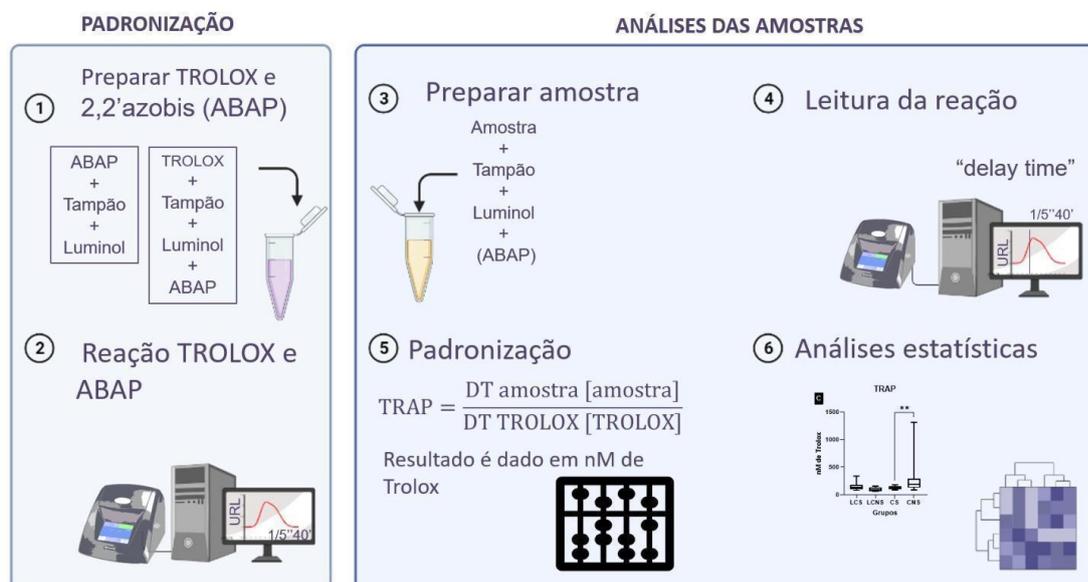


Figura 3: Desenho esquemático da técnica da TRAP para análise das amostras.
Fonte: autor, 2024.

3.4 Análises estatísticas

Para cada variável foi realizado o Teste de Fisher para independência para analisar a associação entre as categorias e os grupos. Em situações de ferimento do pressuposto de frequência mínima esperada igual a 5, foi utilizado como teste de associação o método de Monte Carlo, com 5% de significância. O objetivo desse teste é o mesmo que o do Qui-quadrado para independência, entretanto é estatisticamente mais robusto quando os pressupostos não são verificados. Os dados foram apresentados como médias ± erro padrão da média. A distribuição dos dados foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk. Assim, as variáveis com distribuição normal foram analisadas com testes paramétricos. Quando a suposição de normalidade não foi atendida, testes não paramétricos foram usados. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por teste t de Student para dados paramétricos ou pelo teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos. No caso de mais de 2 grupos de comparação, utilizou-se o teste de One Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni ou Tukey como pos-hoc. Para a análise de correlação foi utilizado o teste de Spearman. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$. Todas as

análises estatísticas foram conduzidas no software Graphpad Prism versão 9.0 (Graphpad software, San Diego-CA,USA), utilizando a ferramenta on-line quickcalcs (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1.cfm>) para detecção de indivíduos outliers. Nenhum outlier foi identificado neste estudo.

4. REFERÊNCIAS

1. IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Breast Cancer Awareness Month 2023. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/news-events/breast-cancer-awareness-month-2023/> Acesso em: 20 nov 2023
2. SOERJOMATARAM, I; BRAY, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. **Nat Rev Clin Oncol**. 2021 Oct;18(10):663-672. doi: 10.1038/s41571-021-00514-z. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34079102.
3. INCA- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Disponível: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 11 nov. 2023.
4. YEO, S.K; GUAN, J. L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? **Trends Cancer**. 2017 Nov;3(11):753-760. doi: 10.1016/j.trecan.2017.09.001. Epub 2017 Oct 24. PMID: 29120751; PMCID: PMC5802368.
5. KASHYAP, D. *et al*. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. **Biomed Res Int**. 2022 Apr 18;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439. PMID: 35480139; PMCID: PMC9038417.
6. HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.
7. HECHT, A.L. *et al*. Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. **EMBO Rep**. 2016 Sep;17(9):1281-91. doi: 10.15252/embr.201642282. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27432285; PMCID: PMC5007561.
8. HALLIWELL, B. Reactive oxygen species (ROS), oxygen radicals and antioxidants: Where are we now, where is the field going and where should we go? **Biochem Biophys Res Commun**. 2022 Dec 10;633:17-19. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.08.098. PMID: 36344150.
9. BARBOSA, K. B. F. Costa N M B, Alfenas R C G, Paula S O, Minim V P R, Bressani J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr** ; 33(2): 111-128, ago. 2008
10. PANIS, C. *et al*. Can Breast Tumors Affect the Oxidative Status of the Surrounding Environment? A Comparative Analysis among Cancerous Breast, Mammary Adjacent Tissue, and Plasma. **Oxid Med Cell Longev**. 2015;2015:6429812. doi: 10.1155/2016/6429812. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26697139; PMCID: PMC4677231.
11. HERRERA, A. C. *et al*. Impact of tumor removal on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation at diagnosis

- as a putative marker of disease recurrence. **Clin Breast Cancer**. 2014 Dec;14(6):451-9. doi: 10.1016/j.clbc.2014.05.002. Epub 2014 Jun 25. PMID: 25077997.
12. PANIS, C. et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 3, p. 881–888, jun. 2012.
 13. WANG, X; KACZOR-URBANOWICZ, K. E; WONG, D. T. Salivary biomarkers in cancer detection. **Med Oncol**. 2017 Jan;34(1):7. doi: 10.1007/s12032-016-0863-4. Epub 2016 Dec 10. PMID: 27943101; PMCID: PMC5534214.
 14. NOVÝ, B. B. Saliva and biofilm-based diagnostics: a critical review of the literature concerning sialochemistry. **J Evid Based Dent Pract**. 2014 Jun;14 Suppl:27-32. doi: 10.1016/j.jebdp.2014.04.004. Epub 2014 Apr 5. PMID: 24929586.
 15. SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
 16. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível <<https://www.who.int/pt/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20de%20mama%20ultrapassou,IAR C%20em%20dezembro%20de%202020>>. Acesso em: 15 nov 2023.
 17. SOPIK, V. International variation in breast cancer incidence and mortality in young women. **Breast Cancer Res Treat**. 2021 Apr;186(2):497-507. doi: 10.1007/s10549-020-06003-8. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33145697.
 18. HUANG, J. et al. Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**. 2021 Feb;160(3):744-754. doi: 10.1053/j.gastro.2020.10.007. Epub 2020 Oct 13. PMID: 33058868.
 19. WILKINSON, L; GATHANI, T. Understanding breast cancer as a global health concern. **Br J Radiol**. 2022 Feb 1;95(1130):20211033. doi: 10.1259/bjr.20211033. Epub 2021 Dec 14. PMID: 34905391; PMCID: PMC8822551.
 20. KOOPAIE, M. et al. Salivary biomarkers in breast cancer diagnosis: A systematic review and diagnostic meta-analysis. **Cancer Med**. 2022 Jul;11(13):2644-2661. doi: 10.1002/cam4.4640. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35315584; PMCID: PMC9249990.
 21. YOUN, H. J; HAN, W. A Review of the Epidemiology of Breast Cancer in Asia: Focus on Risk Factors. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2020 Apr 1;21(4):867-880. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.4.867. PMID: 32334446; PMCID: PMC7445974.

22. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). A situação do câncer de mama no brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Disponível: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_do_cancer_de_mama_no_brasil.pdf. Acesso em: 12 mar 2023.
23. SUN, J. *et al.* Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in a Large Series of Unselected Breast Cancer Patients. **Clin Cancer Res.** 2017 Oct 15;23(20):6113-6119. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3227. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28724667.
24. KIM, Y; YOO, K. Y; GOODMAN, M. T. Differences in incidence, mortality and survival of breast cancer by regions and countries in Asia and contributing factors. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 2857-2870, 2015.
25. FIORETTI, F. *et al.* Risk factors for breast cancer in nulliparous women. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 79, n. 11–12, p. 1923–1928, 1999. Disponível em: . Acesso em: 13 de abr. 2019.
26. RADECKA, B. LITWINIUK, M. Breast cancer in young women. **Ginekol Pol.** 2016;87(9):659-663. doi: 10.5603/GP.2016.0062. PMID: 27723074.
27. STRECKFUS, C. F; BIGLER, L. A Catalogue of Altered Salivary Proteins Secondary to Invasive Ductal Carcinoma: A Novel In Vivo Paradigm to Assess Breast Cancer Progression. *Sci Rep.* 2016 Aug 1;6:30800. doi: 10.1038/srep30800. PMID: 27477923; PMCID: PMC4967869.
28. COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet.** 2001 Oct 27;358(9291):1389-99. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06524-2. PMID: 11705483.
29. MA, Y. *et al.* High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. **Sci Transl Med.** 2014 Feb 5;6(222):222ra18. doi: 10.1126/scitranslmed.3007154. PMID: 24500406.
30. HEER, E. *et al.* Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. **Lancet Glob Health.** 2020 Aug;8(8):e1027-e1037. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30215-1. PMID: 32710860.
31. PICON-RUIZ, M. *et al.* Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **CA Cancer J Clin.** 2017 Sep;67(5):378-397. doi: 10.3322/caac.21405. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28763097; PMCID: PMC5591063.
32. FRIEDENREICH, C. M; RYDER-BURBIDGE, C; MCNEIL, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. **Mol Oncol.** 2021 Mar;15(3):790-800.

- doi: 10.1002/1878-0261.12772. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32741068; PMCID: PMC7931121.
33. BREYER, J. Z. *et al.* Assessment of potential risk factors for breast cancer in a population in Southern Brazil. **Breast Cancer Res. Treat.** 169 (1) (2018) 125-131, doi: 10.1007/s10549-017-4655-0.
 34. BERAL, V; MILLION WOMEN STUDY COLLABORATORS. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet** (London, 121 England), [s. l.], v. 362, n. 9382, p. 419-427, 2003. Disponível em: . 23 de jun. 2020.
 35. STAREK-ŚWIECHOWICZ, B; BUDZISZEWSKA, B; STAREK, A. Alcohol and breast cancer. **Pharmacol Rep.** 2023 Feb;75(1):69-84. doi: 10.1007/s43440-022-00426-4. Epub 2022 Oct 30. PMID: 36310188; PMCID: PMC9889462.
 36. PANIS, C. *et al.* Characterization of occupational exposure to pesticides and its impact on the health of rural women. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 43, p. 1–14, 21 jan. 2022b.
 37. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Classification of tumors of the breast. Lyon: IARC Press; 2012. Acesso em: 15 nov 2023.
 38. KAMEO S.Y. *et al.* Clinical-epidemiological profile of women undergoing oncological treatment for invasive ductal breast carcinoma. **Res Soc Dev.** 2021;10(1):e39110111836. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11836>
 39. CABRAL *et al.* Vulnerabilidade social e câncer de mama: diferenciais no intervalo entre o diagnóstico e o tratamento em mulheres de diferentes perfis sociodemográficos. **Ciências e saúde coletiva** 24 (2) • Fev 2019 <https://doi.org/10.1590/1413-81232018242.31672016>
 40. AMAN, N. A. *et al.* Immunohistochemical Evaluation of Ki-67 and Comparison with Clinicopathologic Factors in Breast Carcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2019 Jan 25;20(1):73-79. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.1.73. PMID: 30678383; PMCID: PMC6485584
 41. CANCER GENOME ATLAS NETWORK. COMPREHENSIVE MOLECULAR PORTRAITS OF HUMAN BREAST TUMOURS. **Nature.** 2012 Oct 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412. Epub 2012 Sep 23. PMID: 23000897; PMCID: PMC3465532.
 42. SUMAN, R. K. *et al.* Development of an Experimental Model of Diabetes Co-Existing with Metabolic Syndrome in Rats. **Adv Pharmacol Sci.** 2016;2016:9463476. doi: 10.1155/2016/9463476. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26880906; PMCID: PMC4736803.
 43. REUTHER, T; BAYRHAMMER, J; KERSCHER, M. Effects of a three-session skin rejuvenation treatment using stabilized hyaluronic acid-based gel of non-animal origin on skin elasticity: a pilot study. **Arch Dermatol Res.** 2010 Jan;302(1):37-45. doi: 10.1007/s00403-009-0988-9. PMID: 19730872.

44. VASCONCELOS, T. B. *et al.* Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **J. Health Sci.** [Internet]. 2º de julho de 2015 [citado 31º de outubro de 2023];16(3). Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/449>
45. COTINGUIBA, G. G; SILVA, J. R; AZEVEDO, R. R; ROCHA, T. J. M; DOS SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **J. Health Sci.** Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/684>
46. GUTTERIDGE, J. M. C; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochem Biophys Res Commun.** 2018 Jul 12;502(2):183-186. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.045. Epub 2018 May 24. PMID: 29752940.
47. BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** 2010 <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
48. TAN, B.L; NORHAIZAN, M. E; LIEW, W. P; SULAIMAN RAHMAN, H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. **Front Pharmacol.** 2018 Oct 16;9:1162. doi: 10.3389/fphar.2018.01162. PMID: 30405405; PMCID: PMC6204759.
49. FORMAN, H. J; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nat Rev Drug Discov.** 2021 Sep;20(9):689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1. Epub 2021 Jun 30. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Aug;20(8):652. PMID: 34194012; PMCID: PMC8243062.
50. LEE, J. D; CAI, Q; SHU, X. O; NECHUTA, S J. The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *J Womens Health (Larchmt).* 2017 May;26(5):467-482. doi: 10.1089/jwh.2016.5973. Epub 2017 Feb 2. PMID: 28151039; PMCID: PMC5446608.
51. HAYES, J. D, DINKOVA-KOSTOVA, A. T, TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell.** (2020) doi:10.1016/j.ccell.2020.06.001
52. GURER-ORHAN, H. *et al.* The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. **Curr Med Chem.** 2018;25(33):4084-4101. doi: 10.2174/0929867324666170711114336. PMID: 28699501.
53. GRIÑAN-LISON, C. *et al.* Antioxidants for the Treatment of Breast Cancer: Are We There Yet? *Antioxidants (Basel).* 2021 Jan 31;10(2):205. doi: 10.3390/antiox10020205. PMID: 33572626; PMCID: PMC7911462.
54. ZHANG, Y. *et al.* Single-cell analyses reveal key immune cell subsets associated with response to PD-L1 blockade in triple-negative breast cancer. **Cancer Cell.** 2021 Dec 13;39(12):1578-1593.e8. doi: 10.1016/j.ccell.2021.09.010. Epub 2021 Oct 14. PMID: 34653365.

55. MATSUI, K; NISHIKAWA, A; SUTO, H; TSUBOI, R; OGAWA, H. Comparative study of *Staphylococcus aureus* isolated from lesional and non-lesional skin of atopic dermatitis patients. **Microbiol Immunol.** 2000;44(11):945-7. doi: 10.1111/j.1348-0421.2000.tb02587.x. PMID: 11145276.
56. MARTELLI, F; NUNES, F. M. F. Radicais Livres: Em Busca do Equilíbrio. *Ciência e Cultura*, 66, 54-57. (2014) <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000300017>
57. URSINI, F; MAIORINO, M; F. H. J. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. **Redox Biol.** 2016 Aug;8:205-15. doi: 10.1016/j.redox.2016.01.010. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26820564; PMCID: PMC4732014
58. MIYAZAWA, T. *et al.* Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. **IUBMB Life.** 2019 Apr;71(4):430-441. doi: 10.1002/iub.2008. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30681767.
59. CARR, A. C; MAGGINI, S. Vitamin C and Immune Function. **Nutrients.** 2017 Nov 3;9(11):1211. doi: 10.3390/nu9111211. PMID: 29099763; PMCID: PMC5707683.
60. CIMMINO, L; NEEL, B. G; AIFANTIS, I. Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer. **Trends Cell Biol.** 2018 Sep;28(9):698-708. doi: 10.1016/j.tcb.2018.04.001. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29724526; PMCID: PMC6102081.
61. CHANG, J. *et al.* Nrf2/ARE and NF- κ B pathway regulation may be the mechanism for lutein inhibition of human breast cancer cell. **Future Oncol.** 2018 Apr;14(8):719-726. doi: 10.2217/fon-2017-0584. Epub 2018 Jan 16. PMID: 29336610.
62. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
63. COLADO SIMÃO, A. N *et al.* Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). **Life Sci.** 2006 Feb 9;78(11):1202-10. doi: 10.1016/j.lfs.2005.06.047. Epub 2005 Oct 19. PMID: 16242158.
64. EVELSON, P. *et al.* Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch Biochem Biophys.** 2001 Apr 15;388(2):261-6. doi: 10.1006/abbi.2001.2292. PMID: 11368163
65. LISSI, E. *et al.* Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radic Res Commun.** 1992;17(5):299-311. doi: 10.3109/10715769209079523. PMID: 1483581.
66. PIRES, B. R. B. *et al.* Label-Free Proteomics Revealed Oxidative Stress and Inflammation as Factors That Enhance Chemoresistance in Luminal Breast Cancer. **Oxid Med Cell Longev.** 2019 Aug

- 8;2019:5357649. doi: 10.1155/2019/5357649. PMID: 31485295; PMCID: PMC6702830.
67. da Silva, R. G. S *et al.* Brief research report pesticide occupational exposure leads to significant inflammatory changes in normal mammary breast tissue. **Front Public Health.** 2023 Sep 14;11:1229422. doi: 10.3389/fpubh.2023.1229422. PMID: 37780419; PMCID: PMC10538633.
68. BIOMARKERS IN RISK ASSESSMENT: VALIDITY AND VALIDATION (EHC 222, 2001). [S. I.], [s. d.]. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>. Acesso em: 25 jan. 2024. BIRKBAK, Nicolai J. *et al.* Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Discovery*, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 366- 375, 2012.
69. LAMY, E. Research on Saliva Secretion and Composition. **Biomed Res Int.** 2018 Jun 26;2018:7406312. doi: 10.1155/2018/7406312. PMID: 30046604; PMCID: PMC6038691.
70. KACZOR-URBANOWICZ, K. E. *et al.* Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer.** 2019 Aug;1872(1):49-59. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.05.007. Epub 2019 May 30. PMID: 31152821; PMCID: PMC6692231.
71. CASTAGNOLA, M. *et al.* Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. **Acta Otorhinolaryngol Ital.** 2017 Apr;37(2):94-101. doi: 10.14639/0392-100X-1598. PMID: 28516971; PMCID: PMC5463528
72. ABRAO NEMEIR, I. *et al.* The Advent of Salivary Breast Cancer Biomarker Detection Using Affinity Sensors. **Sensors (Basel).** 2019 May 23;19(10):2373. doi: 10.3390/s19102373. PMID: 31126047; PMCID: PMC6566681.
73. AMIRI-FARAHANI, L; SHARIFI-HERIS, Z; MOJAB, F. The Anti-Inflammatory Properties of the Topical Application of Human Milk in Dermal and Optical Diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020 Jul 23;2020:4578153. doi: 10.1155/2020/4578153. PMID: 32774417; PMCID: PMC7396075.
74. APS, J. K; DELANGHE, J; MARTENS, L. C. Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes. **Clin Chem Lab Med.** 2002 Apr;40(4):345-50. doi: 10.1515/CCLM.2002.055. PMID: 12059073.
75. MATOS, I. *et al.* p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005 Oct;447(4):688-94. Epub 2005 Oct 19. PubMed PMID: 16012853.
76. MARTÍ-ÁLAMO, S; MANCHEÑO-FRANCH, A; MARZAL-GAMARRA, C; CARLOS-FABUEL, L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. **J Clin Exp Dent.** 2012 Oct 1;4(4):e237-43. doi: 10.4317/jced.50865. PMID: 24558562; PMCID: PMC3917631.

77. MALATHI, N; MYTHILI, S; VASANTHI, H. R. Salivary diagnostics: a brief review. *ISRN Dent.* 2014 Jan 29;2014:158786. doi: 10.1155/2014/158786. PMID: 24616813; PMCID: PMC3926256

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Brief report: antioxidant salivary analysis reveals distinct profiles according to breast cancer molecular subtypes

Mariane Fontana Mezoni, Aline Graciele Henriques Campos, Ana Carolina Aredes Goulart, Ana Carolina Lopes Federige, Ana Gabriela de Oliveira Silva, Bruna Yukie Koizumi, Rafaela Oliveira Matos, Felipe da Silva Bender, Gustavo Bendlin Padilha, Victor Pereira da Silva, Rafaella Frederico Almeida, Maria Paula de Andrade Berny, Daniel Rech, Aedra Carla Bufalo and Carolina Panis*.

Laboratory of Tumor Biology, State University of Western Paraná, UNIOESTE, Francisco Beltrão-Paraná, Brazil.

*Corresponding author: carolpanis@hotmail.com

Abstract

Breast cancer is a heterogeneous and complex disease with distinct biological subtypes and several risk factors involved. Therefore, the search for methods to investigate breast cancer biomarkers is constant. In this context, saliva constitutes a promising indicator of health, both oral and systemic, providing a quick and non-invasive disease status. Considering the role of antioxidants in the genesis and progression of breast cancer, using saliva to assess the patient's antioxidant capacity may represent a relevant strategy. Therefore, this study aimed to investigate the antioxidant capacity of saliva samples from patients with breast cancer and its correlation with the clinical aspects that determine the prognosis of the disease in 134 women with breast cancer. Total antioxidant capacity (TRAP) was assessed using the high-sensitivity chemiluminescence technique. We observed significantly reduced salivary TRAP levels in women with tumors positive for estrogen and progesterone receptors ($p < 0.05$). An increase in salivary TRAP was also observed in patients with triple-negative tumors. No significant changes were observed in other clinical comparisons. Correlations were observed between reduced salivary TRAP levels, estrogen receptors ($R = -0.1881$), and progesterone receptors ($R = -0.1837$). Positive correlations were observed between TRAP levels and the expression of the ki67 proliferation index above 14% ($R = 0.1697$) and with the presence of the triple-negative tumor molecular subtype ($R = 0.2078$). Correlation analysis of TRAP levels in saliva and blood demonstrated no correspondence between them, and TRAP levels in blood are often higher than those detected in saliva. These findings suggest salivary levels of TRAP as a possible systemic marker associated with the occurrence of breast cancer with clinical characteristics of worse prognosis, such as triple-negative tumors and a high proliferation index.

Keywords: saliva; oxidative stress; antioxidant capacity; breast cancer.

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the biggest public health problems in the world, in 2020 it has become the most diagnosed female malignancy globally, as well as one of the leading causes of death (IARC, 2023). Thirty-four million new cases are predicted by 2070 (Soerjomataram, 2021). In Brazil, 704 thousand new cancer cases are expected in 2023-2025. Around 10% of this number is related to female breast cancer, which ranks second among the most common malignant tumors in the country (Inca, 2023).

Breast cancer is a complex disease that has a significant genetic range and several molecular subtypes, which have distinct clinicopathological characteristics (Yeo; Guan, 2017; Kashyap et al., 2022). The last decades have been marked by intense investigations and searches on the mechanisms and factors involved in breast carcinogenesis (Hanahan, 2000). The study of the factors involved in the disease allowed us to understand, among the mechanisms involved in carcinogenesis, the participation of oxidative stress as a determinant of mutations in genetic material and the maintenance of genomic instability (Hecht et al., 2016).

Oxidative stress is characterized by the imbalance between the production of reactive species and their neutralization by antioxidant defenses (Halliwell, 2022). The damage caused to cells and the chronicity of this process without adequate repair by antioxidants may have relevant implications for redox homeostasis and the etiology of breast cancer (Barbosa et al., 2008). In this sense, several studies have demonstrated the importance of characterizing systemic levels of antioxidants as a possible biomarker in breast cancer and its clinical significance, such as increased tumor antioxidant capacity (Panis et al., 2015), reduced systemic antioxidant capacity (Herrera et al., 2014) and changes in plasma antioxidant levels after chemotherapy (Panis et al., 2012).

The search for biomarkers in breast cancer still has some limitations, mainly due to the difficulty in obtaining samples due to the small size of the breast tumor mass or in collecting blood and body fluids invasively. In this context, saliva has been identified as a promising source for discovering possible biomarkers in cancer (Wang et al., 2017). The sialochemistry demonstrates that saliva contains biomolecules that are also present in the blood, suggesting a new source for

obtaining biochemical data on systemic diseases and a new possibility for complementary non-invasive testing (Nový, 2014).

Considering the importance of antioxidants in breast cancer and that there are no studies using saliva as a source for this analysis, this study investigated antioxidant levels in the saliva of women with breast cancer and evaluated their correlation with the clinical aspects determining prognosis in the disease.

METHODS

Study design

The present proposal corresponds to a study with a mixed design, retrospective and prospective, qualitative and quantitative, with patients treated at the Francisco Beltrão-PR Cancer Hospital (Ceonc) between 2017 and 2022 to investigate lesions suggestive of breast carcinoma. This study is approved by the Institutional Ethics Committee under CAAE 35524814.4.0000.0107 and under ethics opinion number 6.129.064.

The inclusion criteria were used: diagnosis of breast cancer confirmed by biopsy, CDI histological type (infiltrating ductal carcinoma), with paired collection of blood and saliva. Exclusion criteria: samples without blood or saliva pairing, samples with insufficient quantities for processing, and patients undergoing chemotherapy. This study consisted of 134 women who participated voluntarily and signed the free and informed consent form (ICF).

A questionnaire was applied to collect clinicopathological data from patients, which, together with the consultation of medical records data, aimed to obtain the following information:

a) Histopathological characterization and diagnosis of the biopsy: The result of the microscopic analysis of the biopsies provided by the Pathologist at Ceonc was categorized as the absence of lesions, benign breast lesions, CDI, or other malignant changes in the breast. For histopathological categorization, evaluation criteria related to histological grade were adopted (1- well differentiated, 2- moderately differentiated, or 3- poorly differentiated), edge involvement, and presence of angiolymphatic emboli. Data relating to the macroscopic characterization of the biopsy were also used regarding tumor size, the number of lymph nodes positive for tumor cells upon microscopy analysis, and the presence

of a sentinel lymph node. Immunohistochemical analyses were performed in biopsies positive for CDI to evaluate the expression of estrogen and progesterone receptors, HER2 overexpression, and ki67 proliferation index. The combination of these results was used to categorize biopsies into the molecular subtypes of breast cancer: Luminal A (ER and/or PR positive and ki67<14%), Luminal B (ER and/or PR positive, ki67 \geq 14%, HER2 amplified: any value of ER, PR and ki67, with amplification of HER2 or triple-negative: without expression of ER, PR and HER2 and any value of ki67);

b) Determination of the patient's clinical profile: determined from clinical data obtained during the medical consultation and from medical records, and refers to the following items: age at diagnosis (categorized under or over 50 years), body mass index - BMI (categorization into normal BMI: BMI up to 26 kg/m², overweight: BMI between 26.1 and 30 kg/m² or obesity: BMI above 30.1 kg/m²), menopausal status at diagnosis (presence or absence), risk stratification, treatment responsiveness and distant metastasis.

Sample obtention

Peripheral heparinized blood samples were collected, on average 10 mL per patient, preoperatively, and centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes to separate the plasma. Saliva samples were collected in individual plastic tubes through spontaneous salivation without stimulation. All patients were fasting for at least 8 hours. The both samples were collected simultaneously and stored in a freezer at -20°C until analysis.

Assessment of total antioxidant capacity by high sensitivity chemiluminescence (TRAP)

The compound 2,2'azobis (ABAP) reacts with lipids present in the sample to form lipoperoxides. This reaction emits photons in low quantities, not detectable by spectrophotometry. Luminol, a compound more unstable than lipoperoxides and capable of capturing their unpaired electrons, is added to amplify the luminometer's light and signal emission. The greater the amount of antioxidants present in the sample, the greater the delay in the rise of the ABAP curve, which corresponds to

the impediment in the formation of lipoperoxides due to the level of low molecular weight antioxidants.

The reaction mixture began with diluting 4uL of saliva in 1196uL of glycine at pH 8.6. Afterwards, 70uL of this solution was removed and placed in another eppendorf with 830uL of glycine solution and 50 uL of luminol solution (0.0398 mg/mL) and 50 uL of ABAP solution (54.24 mg/mL) were added, to start the occurrence, at ambient temperatures above 25°C. The chemiluminescence measurement was performed during the period necessary for a return to approximately 20% of the baseline value (approximately 10 minutes). The results were analyzed in the OriginLab 7.5 software and expressed in nM of Trolox, based on the inhibition profile of the ABAP curve compared to the profile of the Trolox standard solution (REPPETO et al., 1996).

The Trolox curve (6-hydroxy-2,5,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a water-soluble analogue of α -tocopherol, was used as a reference standard antioxidant substance, important in standardizing results 10uL of trolox was diluted in 1000uL of glycine regularly. This solution was taken from 70uL and added to 830 uL of glycine, 50uL of luminol and 50uL of ABAP.

Data analysis

For each variable, Fisher's test for independence was performed to analyze the association between categories and groups. In injury situations assuming a minimum expected frequency of 5, the Monte Carlo method was used as an association test, with 5% significance. The objective of this test is the same as that of the Chi-square test for independence. However, it is statistically more robust when the assumptions are not verified. Data were presented as means \pm standard error of the mean. Data distribution was done using the Shapiro-Wilk test. Therefore, variables with normal distribution were analyzed with parametric tests. When the assumption of normality was not met, non-parametric tests were used. Differences between groups were assessed using the Student's t-test for parametric data or the Mann-Whitney test for non-parametric data. In the case of more than two comparison groups, the One Way ANOVA test was used, followed by the Bonferroni or Tukey test as post-hoc. For correlation analysis, the Spearman test was used. A value of $p < 0.05$ was considered significant. All statistical analyses were conducted

in Graphpad Prism software version 9.0 (Graphpad software, San Diego-CA, USA), using the quickcalcs online tool (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1.cfm>) for the detection of outlier individuals. No outliers were identified in this study.

RESULTS

Table 1 presents the clinicopathological profile of the patients included in the study. It can be observed that 67.1% were positive for estrogen receptors, 55,6 % were positive for progesterone receptor, with a prevalence of 57.6% of the Ki67 tumor proliferation index in tumors greater than or equal to 2 cm and a predominance of the Luminal A molecular subtype (41.5%). There is also a predominance of non-menopausal patients (55.8%) aged over 50 years (67.6%), (78.7%) low histological grade and overweight (67.3%).

Table 1 – Clinicopathological characteristics of patients with breast cancer.

	%
Estrogen receptor	Negative: 32.9% Positive: 67.1%
Progesterone receptor	Negative: 55.6% Positive: 44.4%
ki67 proliferation index	<14%: 42.4% ≥14%:57.6%
Molecular subtype	Luminal A:41.5% Luminal B:24.6% HER-2 amplified:6.2% Triple-negative:27.7%
Tumor size (cm)	>2 cm: 90% ≤ 2 cm :10%
	Low: 78.7%

Histological grade	High : 21.3%
Body mass index (kg/m²)	Normal: 32.7% Excess: 67.3%
Age at diagnosis	> 50 years: 67.6% ≤ 50 years: 32.4%
Menopause at diagnosis	No: 55.8% Yes:44.2%

Source: Author, 2024

In Table 2, we observe the TRAP values according to the clinicopathological parameters of the patients evaluated. In the categorization of tumors for the ki67 index below 14%, the values varied between 10,328 and 251,478 nM of trolox, and in the group with ki67 equal to or above 14%, the values varied from 1,500 to 273,128 nM of trolox. The values for the group of tumors below 2 cm ranged from 16767 to 209811 nM of trolox, and for the tumors equal to or above 2 cm, the values were from 1500 to 273128 nM of trolox.

For patients with histological grade 1 and 2 tumors, TRAP levels ranged from 1500 to 251478 nM, and those with grade 3 tumors ranged from 25531-273128 nM trolox. The TRAP values considering the presence of lymph node metastasis were 35756- 191522 nM of trolox, and for the group without lymph node metastasis, the values ranged from 72889 to 251478 nM of trolox. Patients with distant metastasis presented values between 19214 and 209811 nM of trolox. The values for the group without distant metastasis were 1500 to 251478 nM of trolox. Patients with a low-risk stratification of death and recurrence had values ranging from 3305 to 248098 nM of trolox. Intermediate-risk patients presented values of 1500 to 251478 nM of trolox, and high-risk patients values between 19214 and 273128 nM of trolox. Finally, patients responsive to treatment presented values between 31634 and 273128 nM of trolox, while chemoresistant patients presented values between 1500 and 251478 nM of trolox. No comparison showed statistical significance between the variables in this table ($p > 0.05$, Fisher's test).

Table 2 – TRAP levels according to clinicopathological characteristics of patients.

	Min-max (nM trolox)	P-value
Ki67 proiliferation index	<14%: 10328- 251478 ≥14%: 1500-273128	0.1873
Tumor size	<2cm:16767- 209811 >2cm: 1500-273128	0.4632
Histological grade	Low: 1500- 251478 High: 25531- 273128	0.7080
Lymphnode metastasis	Presence: 35756-191522 Absence: 72889-251478	0.8549
Distanto metastasis	Yes: 19214-209811 No: 1500- 251478	0.5046
Risk stratification for recurrence and death	Low: 3305-248098 Intermediate: 1500-251478 High: 19214-273128	0.7866
Chemoresistance	Yes: 31634-273128 No: 1500- 251478	0.7633

Source: Author, 2024

Figure 1A shows the comparison between the salivary TRAP levels of patients with breast cancer according to the tumor estrogen receptor expression. It was observed that samples with positive expression for the estrogen receptor had a lower TRAP compared to samples with negative status. The ranges varied between 1 and 480 nM of Trolox for ER+ and from 50 to 500 nM for ER- ($p = 0.049$).

In Figure 1B, a salivary TRAP profile for patients is observed according to the expression of progesterone receptors in the tumor tissue, where those with breast tumors with positive PR expression showed lower TRAP than those with negative tumor expression. ER+'s minimum and maximum ranges for ER+ were 1 to 480 nM and 50 to 500 nM trolox for ER-, ($p = 0.044$).

In Figure 1C, salivary TRAP increases in patients with tumors of the triple-negative molecular subtype compared to those with the Luminal A, Luminal B, and HER2 subtypes. The minimum and maximum values found for triple-negative ranged from 30 to 480 nM; for Luminal B, they ranged from 50 to 420, and Luminal A values ranged from 1 to 500 nM ($p = 0.041$).

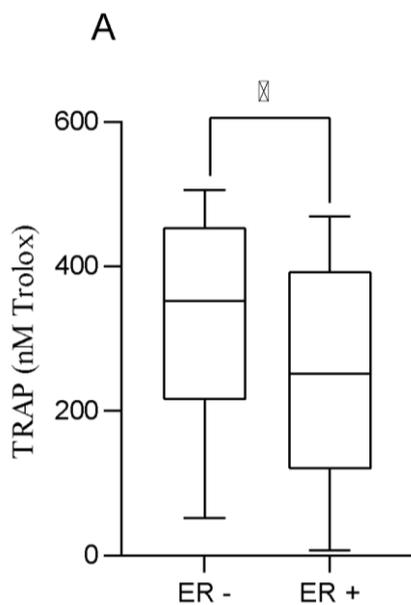


Figure 1A

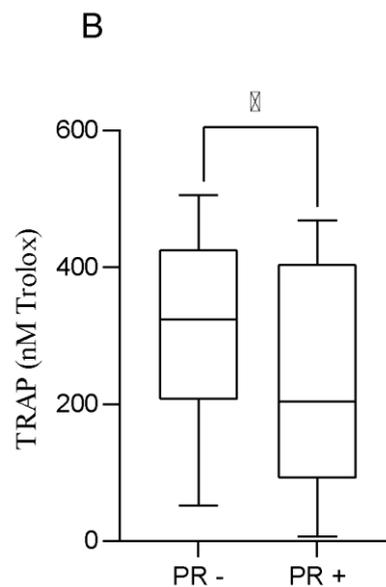


Figure 1B

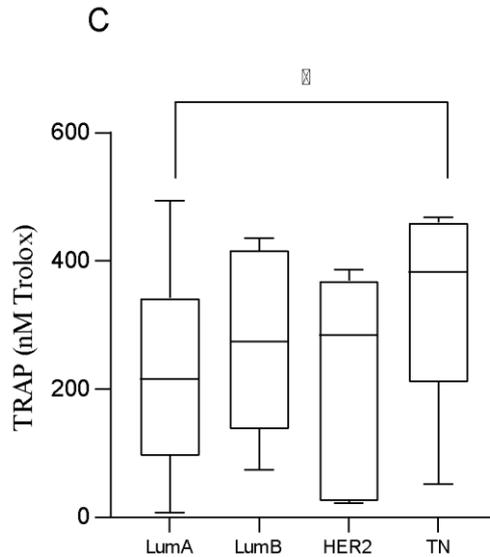


Figure 1C

Source: Author, 2024

Figure 1 – TRAP levels according to hormonal receptors status and molecular subtyping of breast tumors. A: estrogen receptor status, B: progesterone receptor status, C: molecular subtypes of breast cancer. ER = estrogen receptors, PR = progesterone receptors, - = negative, + = positive, LumA = Luminal A, LumB = Luminal B, HER2 = HER2-amplified, and TN = triple-negative. The data are represented in box plots (min-max). * indicates $p < 0.05$.

Correlations were identified between salivary TRAP values and some parameters associated with a worse prognosis of breast cancer (Table 3), such as the absence of estrogen receptors ($R = -0.1881$), absence of progesterone receptors ($R = -0.1837$), increased ki67 proliferation index ($R = 0.1697$), occurrence of the triple negative molecular subtype ($R=0.2078$) and occurrence of distant metastasis ($R = 0.1080$). The p-values of all correlations were > 0.05 .

Table 3 – Spearman’s correlations.

	TRAP vs. ER	TRAP vs. PR	TRAP vs. KI67	TRAP vs. Molecular subtype	TRAP vs. Tumor size	TRAP vs. Grade	TRAP vs. Lymph node metastasis	TRAP vs. distant metastasis	TRAP vs. risk stratification	TRAP vs. chemoresistance
Spearman R	-0.1881	-0.1837	0.1697	0.2078	0.01705	0.04187	-0.00165	0.1080	0.02520	0.07179
IC 95%	-0.4341 to 0.08401	-0.4304 to 0.08858	-0.1055 to 0.4207	-0.06883 to 0.4548	-0.2837 to 0.2520	-0.2310 to 0.3087	-0.2967 to 0.2936	-0.2155 to 0.4101	-0.2443 to 0.2911	-0.3564 to 0.2250
p-value	0.1611	0.1714	0.2112	0.1279	0.8998	0.7593	0.9912	0.5015	0.8524	0.6278

Source:

Author, 2024

Regarding the correlation analysis between TRAP levels in saliva and blood, we observed in Figure 2A that there is no significant correlation ($R = 0.0013$). In figure 2B, we also observed that the numerical values of TRAP in blood are higher than those found in saliva, but this difference was not significant. The minimum and maximum values of the saliva samples maintained an average of 400 nM trolox, while the values of the blood samples varied from 10 to 1200 nM trolox. Furthermore, analyzing paired samples between blood and saliva individually, the values do not have any correspondence (Figure 2C).

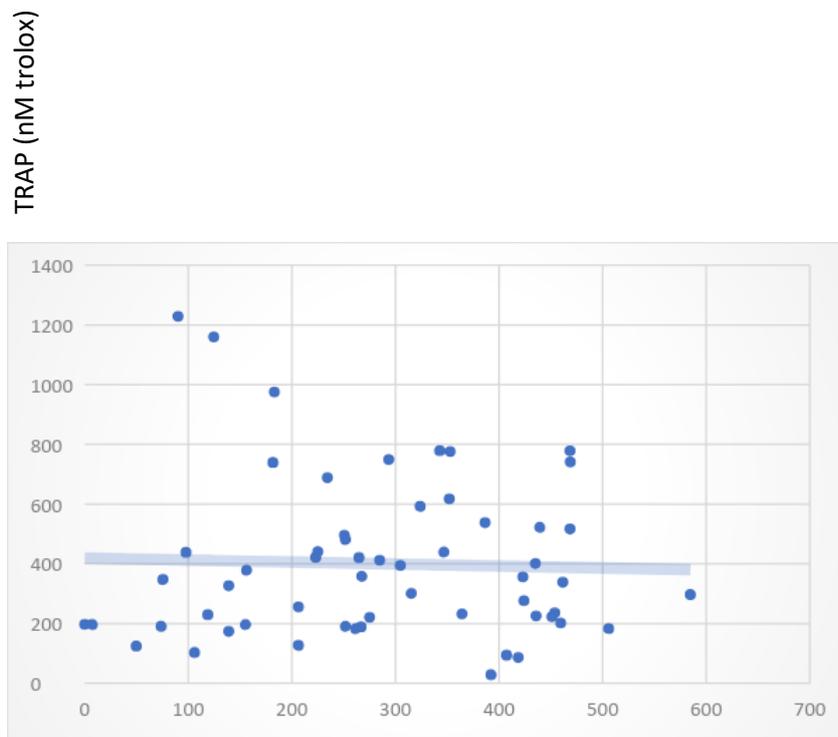


Figure 2A
Source: Author, 2024

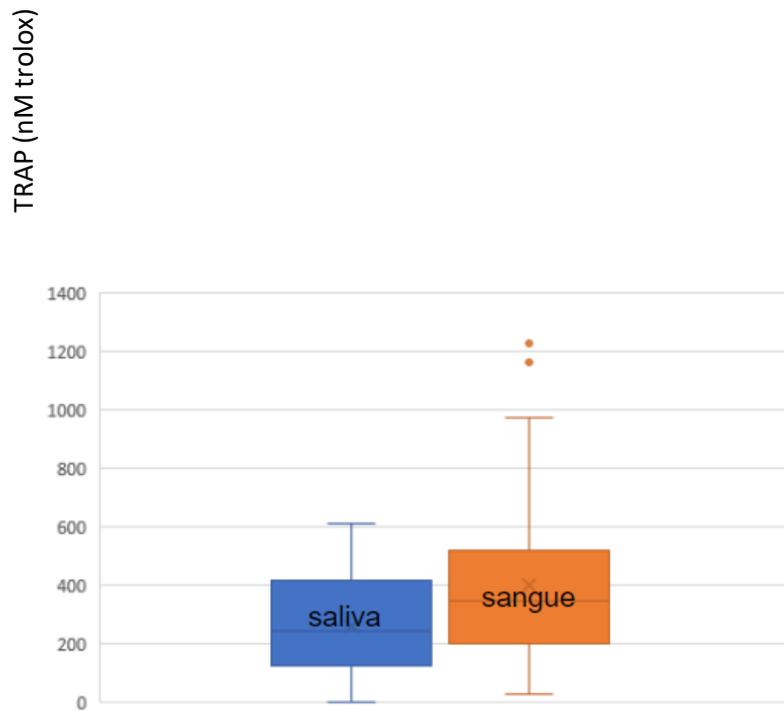


Figure 2B
Source:

Author, 2024

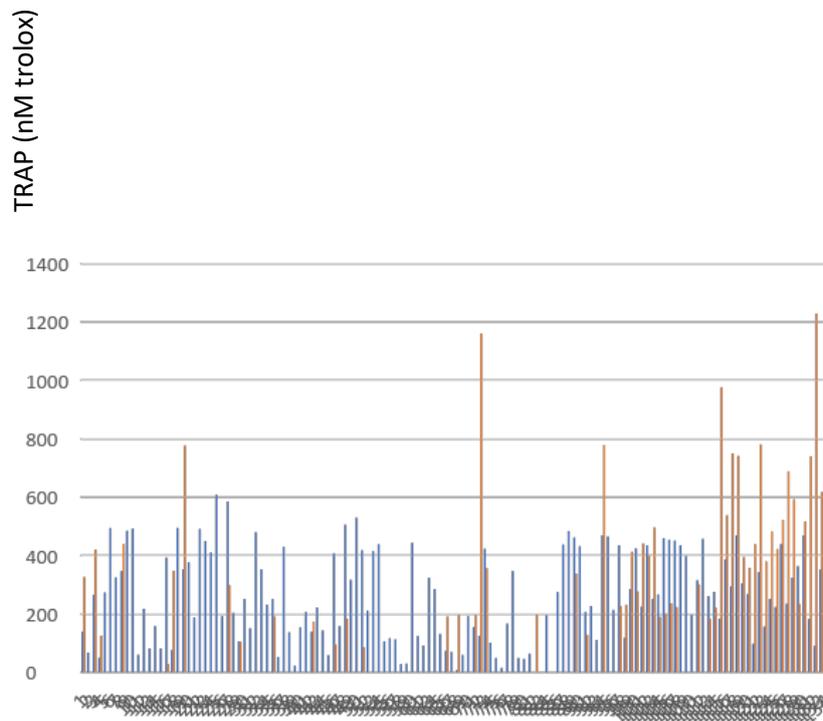


Figure 2C

Source: Author, 2024

Figure 2 – Correlation between TRAP levels in saliva and blood. In A, regression analysis shows no correlation between TRAP levels in blood and saliva ($R = 0.0013$). In B, mean saliva and blood range. In C, individual levels of TRAP in saliva (blue lines) and blood (orange lines).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that the antioxidant profile of saliva presents significant variations depending on the clinical profile of breast cancer. Using the TRAP technique, we detected changes in salivary antioxidant levels that correlated with essential parameters for determining breast cancer prognosis, especially the hormone receptor profile and tumor molecular subtyping. As far as we know, this information is new and adds a lot to the discovery of breast cancer biomarkers with clinical applications.

The assessment of antioxidant capacity using the TRAP technique consists of a high-sensitive tool capable of detecting minimal variations in the low molecular weight antioxidants present in the sample. Despite not being specific to a type of antioxidant, the TRAP profile provides a general overview of the balance of oxidative stress, as it can assess the consumption of low molecular weight non-enzymatic antioxidant defenses, such as uric acid, carotenoids, glutathione and tocopherols, by lipoperoxides produced as a result of the generation of oxidative stress (Barreiros et al., 2006; Evelson et al., 2001).

Although there is no data on the consumption of TRAP in saliva, studies have shown systemic variations in this parameter in patients with breast cancer. Herrera and colleagues (2012) demonstrated that breast cancer patients have high levels of systemic oxidative stress, with significant depletion of TRAP levels. The impairment of plasma antioxidant capacity was accompanied by increased lipid peroxidation in patients with advanced-stage breast cancer and correlated with episodes of disease recurrence. The study of tumor TRAP reveals that its levels are higher in tumor tissue compared to adjacent non-tumorous breast tissue, suggesting that breast cancer cells need to maintain high antioxidant levels, possibly as a way of adapting

to the inflammatory changes generated by the immune response against the tumor (Panis et al., 2015).

Breast cancer is not a single disease, as it has distinct classifications subdivided into four molecular subtypes whose clinical prognoses are different. We demonstrated that breast cancer patients with tumors with positive estrogen and progesterone receptors had lower salivary TRAP levels compared to samples with negative receptor status. An increase in salivary TRAP was observed in patients with tumors of the triple-negative molecular subtype when compared to those with hormone-positive subtypes (Luminal A and B) and amplified HER-2.

Changes in immune response signaling capable of generating systemic inflammation are described as a process expected for all molecular subtypes of breast cancer (Panis et al., 2014). It is known that the inflammatory state is the primary source of generation of systemic oxidative stress in cancer. Regarding molecular subtypes, a distinct pattern of stress markers is produced depending on the hormone receptor profile, as described by Herrera et al., 2012. Luminal tumors present high levels of oxidative stress and inflammatory cytokines, while a distinct profile was observed in triple-negative samples, with reduced levels of tumor necrosis factor-alpha and increased both oxidative and nitrosative stress. These findings suggest that the presence of hormone receptors affects the profile of systemic inflammation generated in breast cancer and help us understand why we observed different levels of antioxidants in the saliva of patients with triple-negative tumors. In this sense, Victorino and collaborators (2014) demonstrated that postmenopausal women produce higher systemic levels of TRAP as an adaptive process to hormonal loss, suggesting that estrogen represents an important systemic antioxidant defense against oxidative processes. These findings suggest that, without hormone receptors, cells could increase their antioxidant capacity to defend themselves from oxidative damage. It could help to understand the increase in salivary TRAP observed in the triple-negative patients in our study.

Most studies on saliva focus on searching for specific biomarkers in cancer. Greabu and collaborators (2009) discuss that saliva has a significant role in controlling and modulating oxidative damage in the oral cavity. The antioxidant action of saliva has the function of reducing lipid peroxidation generated by ingested food, inhibiting the mutagenic potential of reactive species inducers. Exposure to factors that cause oxidative stress is capable of generating changes directly in the

salivary glands, affecting the profile of the saliva produced (Ungureanu et al., 2023). For patients with oral cancer, salivary antioxidants such as glutathione consumption have been identified as an important biomarker of oral squamous cell carcinoma (Zhou et al., 2023). In breast cancer, increased salivary antioxidant capacity has been related to the occurrence of aggressive breast cancer, especially the presence of a mutation in the BRCA1 repair gene (Sawczuk et al., 2019), which reinforces the importance of our findings in patients with triple-negative tumors.

Our study did not demonstrate any significant correspondence between antioxidant levels in the saliva and blood of breast cancer patients, demonstrating that the composition of saliva does not necessarily mirror that of blood. TRAP levels were higher in blood than in saliva, probably because blood oxidative challenges are more significant than those in the oral cavity. A study carried out in healthy individuals for 27 salivary inflammatory markers had similar findings to ours, concluding that there is a low correlation between the levels of blood and salivary markers (Williamson et al., 2012).

This study has limitations, including the modest sample size, which limited the pairing of saliva and blood samples for analyses in clinicopathological subgroups. Saliva volume resulted in the evaluation of only TRAP, without the possibility of measuring other important molecules in the redox balance, such as hydroperoxides or nitric oxide metabolites. Furthermore, other possible confounding factors, such as food consumption profile and oral microbiota assessment, were not subject to analysis. Despite this, our data demonstrated for the first time that there is a correlation between the clinical presentation of breast cancer and saliva antioxidant levels, especially in the molecular subtypes with the worst prognosis, such as triple negative. More studies must be carried out to validate these findings in a larger patient population through the search for additional markers of oxidative stress.

CONCLUSION

Although saliva is one of the least recognized fluids in the human body, it plays a fundamental role in oral health and maintenance, and is directly linked to quality of life. Due to its vast network of information, saliva is a good source of biochemical data on the general health/illness status of an individual in many already established diseases.

The results of this study demonstrated that although no correlations were found in the pairing between antioxidant levels in blood and saliva samples, it was demonstrated that the levels of total antioxidants in saliva samples from women with triple-negative breast cancer were higher compared to patients with estrogen and progesterone hormone receptors. These results showed significant variations in clinical pathological parameters indicative of worse prognosis such as triple negative molecular subtype, high Ki67 tumors and occurrence of distant metastasis, suggesting salivary TRAP as a possible marker for hormone negative breast cancer.

Acknowledgment

Funding: Fundação Araucária, Programa de Pesquisa Para o SUS – PPSUS, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflicts of interest: The authors have no conflicts to declare.

Availability of data and material: All data will be available under a reasonable request.

Authors' contribution: All authors contributed to the study conception and design, material preparation, data collection and analysis. The first draft of the manuscript was written by Mariane Fontana Mezoni and Carolina Panis, and all authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate: All ethical issues were considered in the study and are reported accordingly in the methods section.

Acknowledgements: The authors would like to thank all patients who agreed to participate in this work and Francisco Beltrão Cancer Hospital (CEONC) for collaborating with the study.

REFERENCES

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Breast Cancer Awareness Month 2023. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/news-events/breast-cancer-awareness-month-2023/> Acesso em: 20 nov 2023

SOERJOMATARAM, I; BRAY, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. **Nat Rev Clin Oncol**. 2021 Oct;18(10):663-672. doi: 10.1038/s41571-021-00514-z. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34079102.

INCA- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Disponível: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 11 nov. 2023.

YEO, S.K; GUAN, J. L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? **Trends Cancer**. 2017 Nov;3(11):753-760. doi: 10.1016/j.trecan.2017.09.001. Epub 2017 Oct 24. PMID: 29120751; PMCID: PMC5802368.

KASHYAP, D. *et al*. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. **Biomed Res Int**. 2022 Apr 18;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439. PMID: 35480139; PMCID: PMC9038417.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.

HECHT, A.L. *et al*. Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. **EMBO Rep**. 2016 Sep;17(9):1281-91. doi: 10.15252/embr.201642282. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27432285; PMCID: PMC5007561.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species (ROS), oxygen radicals and antioxidants: Where are we now, where is the field going and where should we go? **Biochem Biophys Res Commun**. 2022 Dec 10;633:17-19. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.08.098. PMID: 36344150.

14. BARBOSA, K. B. F. Costa N M B, Alfenas R C G, Paula S O, Minim V P R, Bressani J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr** ; 33(2): 111-128, ago. 2008

PANIS, C. *et al*. Can Breast Tumors Affect the Oxidative Status of the Surrounding Environment? A Comparative Analysis among Cancerous Breast, Mammary Adjacent Tissue, and Plasma. **Oxid Med Cell Longev**. 2015;2015:6429812. doi: 10.1155/2016/6429812. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26697139; PMCID: PMC4677231.

HERRERA, A. C. *et al*. Impact of tumor removal on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation at diagnosis as a putative marker of disease recurrence. **Clin Breast Cancer**. 2014 Dec;14(6):451-9. doi: 10.1016/j.clbc.2014.05.002. Epub 2014 Jun 25. PMID: 25077997.

PANIS, C. et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 3, p. 881–888, jun. 2012.

WANG, X; KACZOR-URBANOWICZ, K. E; WONG, D. T. Salivary biomarkers in cancer detection. **Med Oncol**. 2017 Jan;34(1):7. doi: 10.1007/s12032-016-0863-4. Epub 2016 Dec 10. PMID: 27943101; PMCID: PMC5534214.

NOVÝ, B. B. Saliva and biofilm-based diagnostics: a critical review of the literature concerning sialochemistry. **J Evid Based Dent Pract**. 2014 Jun;14 Suppl:27-32. doi: 10.1016/j.jebdp.2014.04.004. Epub 2014 Apr 5. PMID: 24929586.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta*. 1996 Nov 29;255(2):107-17. doi: 10.1016/0009-8981(96)06394-2. PMID: 8937754.

BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

EVELSON, P. et al. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Apr 15;388(2):261-6. doi: 10.1006/abbi.2001.2292. PMID: 11368163

HERRERA, A. C. et al. Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients. **Cancer Immunol Immunother**. 2012 Nov;61(11):2193-201. doi: 10.1007/s00262-012-1283-8. Epub 2012 May 22. PMID: 22618884.

PANIS, C. et al. Label-free proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes. **J Proteome Res**. 2014 Nov 7;13(11):4752-72. doi: 10.1021/pr500676x. Epub 2014 Sep 24. PMID: 25221861.

VICTORINO, V. J. et al. Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer. **Tumour Biol**. 2014 Apr;35(4):3025-34. doi: 10.1007/s13277-013-1391-x. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24248545.

GREABU, M. et al. Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease. **J Med Life**. 2009 Apr-Jun;2(2):124-32. PMID: 20108531; PMCID: PMC3018981.

UNGUREANU, L. B. et al. Atrophy and Inflammatory Changes in Salivary Glands Induced by Oxidative Stress after Exposure to Drugs and Other Chemical Substances: A Systematic Review. **Medicina (Kaunas)**. 2023 Sep 21;59(9):1692. doi: 10.3390/medicina59091692. PMID: 37763811; PMCID: PMC10535338

ZHOU, Q. et al. Oxidative stress-related biomarkers in oral squamous cell carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis. **Biomark Med**. 2023 Mar;17(6):337-347. doi: 10.2217/bmm-2022-0846. Epub 2023 Jun 7. PMID: 37284735.

SAWCZUK, B. et al. Salivary Gland Function, Antioxidant Defence and Oxidative Damage in the Saliva of Patients with Breast Cancer: Does the BRCA1 Mutation

Disturb the Salivary Redox Profile? **Cancers (Basel)**. 2019 Oct 8;11(10):1501. doi: 10.3390/cancers11101501. PMID: 31597313; PMCID: PMC6826655.

WILLIAMSON, S. *et al.* Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. **Nurs Res Pract**. 2012;2012:246178. doi: 10.1155/2012/246178. Epub 2012 Apr 30. PMID: 22619709; PMCID: PMC3350846.

6. ANEXO I

Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE

Título do Projeto: Mapeamento do câncer de mama familiar no Sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Pesquisador responsável: Profa Dra CAROLINA PANIS – Telefones (43)99165316 e (46) 30571079

Convidamos você a participar de nossa pesquisa que tem o objetivo de identificar os casos de câncer de mama em mulheres que tem história da doença na família, que moram na região Sudoeste do Paraná. Para isso será realizada a coleta de um tubo de sangue (10 mL) e um tubo de saliva (1 mL) para fazer os exames necessários para identificar porque alguns tumores de mama levam à doenças tão agressivas. Durante a execução do projeto também vamos precisar de uma parte do tecido tumoral que o médico irá remover durante a sua cirurgia ou que foi coletado para o diagnóstico da doença (na biópsia). Também precisaremos consultar o prontuário médico, para saber informações sobre sua saúde e sua ocupação de trabalho. Para algum questionamento, dúvida ou relato de algum acontecimento os pesquisadores poderão ser contatados a qualquer momento, pelos telefones (43)99165316 e (46) 30553026. Estamos disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas, a qualquer momento. Desta forma, você está contribuindo para a identificação de fatores que levam à alta incidência de cânceres agressivos na nossa região. Este termo será entregue em duas vias, sendo que uma ficará com você. Você não pagará nem receberá para participar do estudo. Seus dados serão mantidos em sigilo, ou seja, ninguém além dos pesquisadores terá acesso ao material ou informações coletadas. Estes dados serão utilizados somente para fins científicos. Você poderá cancelar sua participação a qualquer momento. Se necessitar de maiores informações, o telefone do comitê de ética é 3220-3272 e da pesquisadora responsável é 46 30553026. A coleta de material será feita dentro do Ceonc, portanto qualquer imprevisto será resolvido imediatamente no local. Ao término do projeto, se a pesquisa identificar que a sua doença se classifica como câncer familiar, você será chamado ao Ceonc para receber esclarecimentos sobre como proceder no acompanhamento da doença nos próximos anos.

Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto. Nome do sujeito de pesquisa ou responsável:

Assinatura:

CPF:

Eu, _____, declaro que forneci todas as informações do projeto ao participante e/ou responsável.

ANEXOII

Submissão do artigo

15/02/2024, 17:11 ScholarOne Manuscripts

ScholarOne Manuscripts™ Carolina Panis Switch to a different account Instructions & Forms Help Log Out

Brazilian Oral Research

[Home](#) | [Author](#)

[Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Brazilian Oral Research

Manuscript ID BOR-2024-0095

Title ANTIOXIDANT SALIVARY ANALYSIS REVEALS DISTINCT PROFILES ACCORDING TO BREAST CANCER MOLECULAR SUBTYPES

Authors Mezoni, Mariane
Campos, Aline
Goulart, Ana Carolina
Federige, Ana Carolina
de Oliveira Silva, Ana Gabriela



<https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>

1/3

15/02/2024, 17:11

ScholarOne Manuscripts

Koizumi, Bruna
Matos, Rafaela
Bender, Felipe
Padiha, Gustavo
da Silva, Victor
Almeida, Rafaella
Bery, Maria Paula
Rech, Daniel
Carla Bufalo Kawassaki, Aedra
Panis, Carolina

Date Submitted 15-Feb-2024

[Author Dashboard >](#)

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>

2/3



© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2024. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@Clarivate for Academia & Government](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#) | [Definições de cookies](#)

ANEXOIII

Draft proof

Brazilian Oral Research



ANTIOXIDANT SALIVARY ANALYSIS REVEALS DISTINCT PROFILES ACCORDING TO BREAST CANCER MOLECULAR SUBTYPES

Journal:	<i>Brazilian Oral Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Report
Specialties:	Biochemistry
Category--Select your categories from the MeSH or DeCS lists.:	breast cancer, saliva, antioxidants

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **ANTIOXIDANT SALIVARY ANALYSIS REVEALS DISTINCT PROFILES**
2 **ACCORDING TO BREAST CANCER MOLECULAR SUBTYPES**

3 Mariane Fontana Mezon, Aline Graciele Henriques Campos, Ana Carolina Aredes
4 Goulart, Ana Carolina Lopes Federige, Ana Gabriela de Oliveira Silva, Bruna Yukie
5 Koizumi, Rafaela Oliveira Matos, Felipe da Silva Bender, Gustavo Bendlin Padilha,
6 Victor Pereira da Silva, Rafaela Frederico Almeida, Maria Paula de Andrade Berny,
7 Daniel Rech, Aedra Carla Bufalo and Carolina Panis*.

8 Laboratory of Tumor Biology, State University of Western Paraná, UNIOESTE, Francisco
9 Beltrão-Paraná, Brazil.

10 *Corresponding author: carolpanis@hotmail.com

11

12 **Conflicts of interest:** the authors have no conflicts to declare.

13 **Availability of data and material:** All data are available in the manuscript.

14 **Authors' contribution:** All authors equally contributed to the study conception and
15 design, material preparation, data collection and analysis, and manuscript writing and
16 revision.

17 **Funding:** Carolina Panis is supported by Fundação Araucária (Call number 048/2021-
18 PRPPG/Unioeste and 02/2022), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
19 Superior (CAPES, Call number 01/2019), Conselho Nacional de Desenvolvimento
20 Científico e Tecnológico (CNPq grants number 402364/2021-0, 441017/2023-1, and
21 305335/2021-9).

22

24 ABSTRACT

25 Breast cancer (BC) is a heterogeneous and complex disease with distinct
26 biological subtypes and several risk factors. The investigated BC biomarkers in saliva
27 constitute a promising indicator of health, both oral and systemic disease status.
28 Considering the role of antioxidants in the genesis and progression of BC, using saliva
29 to assess the patient's antioxidant capacity may represent a relevant strategy. Therefore,
30 this study aimed to investigate the antioxidant capacity of saliva samples from patients
31 with BC and its correlation with aspects that determine the prognosis of the disease in
32 134 women with BC. Total antioxidant capacity (TRAP) was assessed using the high-
33 sensitivity chemiluminescence technique. We observed significantly reduced salivary
34 TRAP levels in women with tumors positive for estrogen and progesterone receptors
35 ($p < 0.05$). An increase in salivary TRAP was also observed in patients with triple-negative
36 tumors. No significant changes were observed in other clinical comparisons. Correlations
37 between reduced salivary TRAP levels, estrogen receptors ($R = -0.1881$), and
38 progesterone receptors ($R = -0.1837$). Positive correlations between TRAP levels and the
39 expression of the ki67 proliferation index above 14% ($R = 0.1697$) and with the presence
40 of the triple-negative tumor molecular subtype ($R = 0.2078$). Correlation analysis of TRAP
41 levels in saliva and blood demonstrated no correspondence between them, and TRAP
42 levels in blood are higher than in saliva. These findings suggest salivary levels of TRAP
43 as a possible systemic marker associated with the occurrence of BC with clinical
44 characteristics of worse prognosis, such as triple-negative tumors and a high proliferation
45 index.

46 **Keywords:** saliva; oxidative stress; antioxidant capacity; breast cancer.

48 INTRODUCTION

49 BC is one of the biggest public health problems in the world in 2020, and it has
50 become the most diagnosed female malignancy globally, as well as one of the leading
51 causes of death (IARC, 2023). Thirty-four million new cases are predicted by 2070
52 (Soerjomataram, 2021). In Brazil, 704 thousand new cancer cases are expected in 2023-
53 2025. Around 10% of this number is related to female BC, which ranks second among
54 the most common malignant tumors in the country (Inca, 2023).

55 BC is a complex disease that has a significant genetic range and several
56 molecular subtypes, which have distinct clinicopathological characteristics (Yeo; Guan,
57 2017; Kashyap et al., 2022). The last decades have been marked by intense
58 investigations and searches on the mechanisms and factors involved in breast

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

59 carcinogenic disease
60 allowed us to understand, among the mechanisms involved in carcinogenesis, the
61 participation of oxidative stress as a determinant of mutations in genetic material and the
62 maintenance of genomic instability (Hecht et al., 2016).

63 Oxidative stress is characterized by the imbalance between the production of
64 reactive species and their neutralization by antioxidant defenses (Halliwell, 2022). The
65 damage caused to cells and the chronicity of this process without adequate repair by
66 antioxidants may have relevant implications for redox homeostasis and the etiology of
67 BC (Barbosa et al., 2008). In this sense, several studies have demonstrated the
68 importance of characterizing systemic levels of antioxidants as a possible biomarker in
69 BC and its clinical significance, such as increased tumor antioxidant capacity (Panis et
70 al., 2015), reduced systemic antioxidant capacity (Herrera et al., 2014) and changes in
71 plasma antioxidant levels after chemotherapy (Panis et al., 2012; Lemos et al., 2015).

72 The search for biomarkers in BC still has some limitations, mainly due to the
73 difficulty in obtaining samples due to the small size of the breast tumor mass or in
74 collecting blood and body fluids invasively. In this context, saliva has been identified as
75 a promising source for discovering possible biomarkers in cancer (Wang et al., 2017).
76 The sialochemistry demonstrates that saliva contains biomolecules that are also present
77 in the blood, suggesting a new source for obtaining biochemical data on systemic
78 diseases and a new possibility for complementary non-invasive testing (Nový, 2014).

79 Considering the importance of antioxidants in BC and that there are no studies
80 using saliva as a source for this analysis, this study investigated antioxidant levels in the
81 saliva of women with BC and evaluated their correlation with the clinical aspects
82 determining prognosis in the disease.

83 84 **METHODS**

85 **Study design**

86 The present proposal corresponds to a study with a mixed design, retrospective
87 and prospective, qualitative and quantitative, with patients treated at the Francisco
88 Beltrão-PR Cancer Hospital (Ceonc) between 2015 and 2022 to investigate lesions
89 suggestive of BC. This study is approved by the Institutional Ethics Committee under
90 CAAE 35524814.4.0000.0107, under ethics opinion number 6.129.064.

91 The inclusion criteria were used: diagnosis of BC confirmed by biopsy, CDI
92 histological type (infiltrating ductal carcinoma), with paired collection of blood and saliva.
93 Exclusion criteria: samples without blood or saliva pairing, samples with insufficient
94 quantities for processing, and patients undergoing chemotherapy. This study consisted

1
2
3 of 134 women who participated voluntarily and signed the free and informed consent
4 form (ICF).

5
6 97 A questionnaire was applied to collect clinicopathological data from patients,
7
8 98 which, together with the consultation of medical records data, aimed to obtain the
9
10 99 following information:

11
12 100 a) Histopathological characterization and diagnosis of the biopsy: The result of the
13
14 101 microscopic analysis of the biopsies provided by the Pathologist at Ceonc was
15
16 102 categorized as the absence of lesions, benign breast lesions, CDI, or other malignant
17
18 103 changes in the breast. For histopathological categorization, evaluation criteria related to
19
20
21 104 histological grade were adopted (1- well differentiated, 2- moderately differentiated, or 3-
22
23 105 poorly differentiated), edge involvement, and presence of angiolymphatic emboli. Data
24
25 106 relating to the macroscopic characterization of the biopsy were also used regarding
26
27
28 107 tumor size, the number of lymph nodes positive for tumor cells upon microscopy analysis,
29
30 108 and the presence of a sentinel lymph node. Immunohistochemical analyses were
31
32 109 performed in biopsies positive for CDI to evaluate the expression of estrogen and
33
34 110 progesterone receptors, HER2 overexpression, and ki67 proliferation index. The
35
36 111 combination of these results was used to categorize biopsies into the molecular subtypes
37
38 112 of BC: Luminal A (ER and/or PR positive and ki67<14%), Luminal B (ER and/or PR
39
40 113 positive, ki67 ≥14%, HER2 amplified: any value of ER, PR and ki67, with amplification
41
42 114 of HER2 or triple-negative: without expression of ER, PR and HER2 and any value of
43
44
45 115 ki67);

46
47
48 116 b) Determination of the patient's clinical profile: determined from clinical data obtained
49
50 117 during the medical consultation and from medical records, and refers to the following
51
52 118 items: age at diagnosis (categorized under or over 50 years), body mass index - BMI
53
54 119 (categorization into normal BMI: BMI up to 26 kg/m², overweight: BMI between 26.1 and
55
56 120 30 kg/m² or obesity: BMI above 30.1 kg/m²) and menopausal status at diagnosis
57
58 121 (presence or absence).

59 122 **Sample obtention**
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

123 Peripheral heparinized blood samples were collected, on average 10 mL per
124 patient, preoperatively, and centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes to separate the
125 plasma. Saliva samples were collected in individual plastic tubes through spontaneous
126 salivation without stimulation. All patients were fasting for at least 8 hours. The samples
127 were collected simultaneously and stored in a freezer at -20°C until analysis.

128 **Assessment of total antioxidant capacity by high sensitivity chemiluminescence** 129 **(TRAP)**

130 The compound 2,2'azobis (ABAP) reacts with lipids present in the sample to form
131 lipoperoxides. This reaction emits photons in low quantities, not detectable by
132 spectrophotometry. Luminol, a compound more unstable than lipoperoxides and capable
133 of capturing their unpaired electrons, is added to amplify the luminometer's light and
134 signal emission. The greater the amount of antioxidants present in the sample, the
135 greater the delay in the rise of the ABAP curve, which corresponds to the impediment in
136 the formation of lipoperoxides due to the level of low molecular weight antioxidants. The
137 reaction mixture consists of 50 uL of saliva or plasma diluted 1:50, 850 uL of glycine
138 buffer pH 8.6, 50 uL of luminol solution (0.0398 mg/mL) and 50 uL of ABAP solution
139 (54.24 mg/mL). Trolox (6-hydroxy-2,5,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a water-
140 soluble analog of α -tocopherol, was used as a reference standard antioxidant substance.
141 The results were analyzed using the OriginLab 7.5 software and expressed in nM of
142 Trolox, based on the ABAP curve's inhibition profile compared to the standard Trolox
143 solution (REPPETO et al., 1996).

144 **Data analysis**

145 For each variable, Fisher's test for independence was performed to analyze the
146 association between categories and groups. In injury situations assuming a minimum
147 expected frequency of 5, the Monte Carlo method was used as an association test, with
148 5% significance. The objective of this test is the same as that of the Chi-square test for
149 independence. However, it is statistically more robust when the assumptions are not
150 verified. Data were presented as means \pm standard error of the mean. Data distribution
151 was done using the Shapiro-Wilk test. Therefore, variables with normal distribution were
152 analyzed with parametric tests. When the assumption of normality was not met, non-
153 parametric tests were used. Differences between groups were assessed using the
154 Student's t-test for parametric data or the Mann-Whitney test for non-parametric data. In
155 the case of more than two comparison groups, the One Way ANOVA test was used,
156 followed by the Bonferroni or Tukey test as post-hoc. For correlation analysis, the
157 Spearman test was used. A value of $p < 0.05$ was considered significant. All statistical
158 analyses were conducted in Graphpad Prism software version 9.0 (Graphpad software,

1
2
3 159 San Diego-CA, USA), using the quickcalcs online tool
4
5 160 (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1.cfm>) for the detection of outlier
6
7 161 individuals. No outliers were identified in this study.

162 RESULTS

163 Table 1 presents the clinicopathological profile of the patients included in the
164 study. It can be observed that 67.1% were positive for estrogen receptors, with a
165 prevalence of 57.6% of the Ki67 tumor proliferation index in tumors greater than or equal
166 to 2 cm and a predominance of the Luminal A molecular subtype (41.5%). There is also
167 a predominance of non-menopausal patients (55.8%) aged over 50 years (67.6%) and
168 overweight (67.3%).

169 In Table 2, we observe the TRAP values according to the clinicopathological
170 parameters of the patients evaluated. In the categorization of tumors for the ki67 index
171 below 14%, the values varied between 10,328 and 251,478 nM of trolox, and in the group
172 with ki67 equal to or above 14%, the values varied from 1,500 to 273,128 nM of trolox.
173 The values for the group of tumors below 2 cm ranged from 16767 to 209811 nM of
174 trolox, and for the tumors equal to or above 2 cm, the values were from 1500 to 273128
175 nM of trolox.

176 For patients with histological grade 1 and 2 tumors, TRAP levels ranged from
177 1500 to 251478 nM, and those with grade 3 tumors ranged from 25531-273128 nM
178 trolox. The TRAP values considering the presence of lymph node metastasis were
179 35756- 191522 nM of trolox, and for the group without lymph node metastasis, the values
180 ranged from 72889 to 251478 nM of trolox. Patients with distant metastasis presented
181 values between 19214 and 209811 nM of trolox. The values for the group without distant
182 metastasis were 1500 to 251478 nM of trolox. Patients with a low-risk stratification of
183 death and recurrence had values ranging from 3305 to 248098 nM of trolox.
184 Intermediate-risk patients presented values of 1500 to 251478 nM of trolox, and high-
185 risk patients values between 19214 and 273128 nM of trolox. Finally, patients responsive
186 to treatment presented values between 31634 and 273128 nM of trolox, while
187 chemoresistant patients presented values between 1500 and 251478 nM of trolox. No
188 comparison showed statistical significance between the variables in this table ($p > 0.05$,
189 Fisher's test).

190 Figure 1A shows the comparison between the salivary TRAP levels of patients
191 with BC according to the tumor estrogen receptor expression. It was observed that
192 samples with positive expression for the estrogen receptor had a lower TRAP compared
193 to samples with negative status. The ranges varied between 1 and 480 nM of Trolox for
194 ER+ and from 50 to 500 nM for ER- ($p = 0.049$).

1
2
3 195 In Figure 1B, a salivary TRAP profile for patients is observed according to the
4 196 expression of progesterone receptors in the tumor tissue, where those with breast tumors
5 197 with positive PR expression showed lower TRAP than those with negative tumor
6 198 expression. ER+'s minimum and maximum ranges for ER+ were 1 to 480 nM and 50 to
7 199 500 nM trolox for ER-, ($p = 0.044$).

10 200 In Figure 1C, salivary TRAP increases in patients with tumors of the triple-
11 201 negative molecular subtype compared to those with the Luminal A, Luminal B, and HER2
12 202 subtypes. The minimum and maximum values found for triple-negative ranged from 30
13 203 to 480 nM; for Luminal B, they ranged from 50 to 420, and Luminal A values ranged from
14 204 1 to 500 nM ($p = 0.041$).

15 205 Correlations were identified between salivary TRAP values and some parameters
16 206 associated with a worse prognosis of BC (Table 3), such as the absence of estrogen
17 207 receptors ($R = -0.1881$), absence of progesterone receptors ($R = -0.1837$), increased
18 208 ki67 proliferation index ($R = 0.1697$), occurrence of the triple negative molecular subtype
19 209 ($R=0.2078$) and occurrence of distant metastasis ($R = 0.1080$). The p-values of all
20 210 correlations were > 0.05 .

21 211 Regarding the correlation analysis between TRAP levels in saliva and blood, we
22 212 observed in Figure 2A that there is no significant correlation ($R = 0.0013$). In figure 2B,
23 213 we also observed that the numerical values of TRAP in blood are higher than those found
24 214 in saliva, but this difference was not significant. The minimum and maximum values of
25 215 the saliva samples maintained an average of 400 nM trolox, while the values of the blood
26 216 samples varied from 10 to 1200 nM trolox. Furthermore, analyzing paired samples
27 217 between blood and saliva individually, the values do not have any correspondence
28 218 (Figure 2C).

29 219 **DISCUSSION**

30 220 In this study, we demonstrated that the antioxidant profile of saliva presents
31 221 significant variations depending on the clinical profile of BC. Using the TRAP technique,
32 222 we detected changes in salivary antioxidant levels that correlated with essential
33 223 parameters for determining BC prognosis, especially the hormone receptor profile and
34 224 tumor molecular subtyping. As far as we know, this information is new and adds a lot to
35 225 the discovery of BC biomarkers with clinical applications.

36 226 The assessment of antioxidant capacity using the TRAP technique consists of a
37 227 high-sensitive tool capable of detecting minimal variations in the low molecular weight
38 228 antioxidants present in the sample. Despite not being specific to a type of antioxidant,
39 229 the TRAP profile provides a general overview of the balance of oxidative stress, as it can
40 230 assess the consumption of low molecular weight non-enzymatic antioxidant defenses,
41 231 such as uric acid, carotenoids, glutathione and tocopherols, by lipoperoxides produced

1
2
3 232 as a result of the generation of oxidative stress (Barreiros et al., 2006; Evelson et al.,
4 233 2001).

5
6 234 Although there is no data on the consumption of TRAP in saliva, studies have
7
8 235 shown systemic variations in this parameter in patients with BC. Herrera and colleagues
9 236 (2012) demonstrated that BC patients have high levels of systemic oxidative stress, with
10 237 significant depletion of TRAP levels. The impairment of plasma antioxidant capacity was
11 238 accompanied by increased lipid peroxidation in patients with advanced-stage BC and
12 239 correlated with episodes of disease recurrence. The study of tumor TRAP reveals that
13 240 its levels are higher in tumor tissue compared to adjacent non-tumorous breast tissue,
14 241 suggesting that BC cells need to maintain high antioxidant levels, possibly as a way of
15 242 adapting to the inflammatory changes generated by the immune response against the
16 243 tumor (Panis et al., 2015).

17
18
19 244 BC is not a single disease, as it has distinct classifications subdivided into four
20 245 molecular subtypes whose clinical prognoses are different. We demonstrated that BC
21 246 patients with tumors with positive estrogen and progesterone receptors had lower
22 247 salivary TRAP levels compared to samples with negative receptor status. An increase in
23 248 salivary TRAP was observed in patients with tumors of the triple-negative molecular
24 249 subtype when compared to those with hormone-positive subtypes (Luminal A and B) and
25 250 amplified HER-2.

26
27
28 251 Changes in immune response signaling capable of generating systemic
29 252 inflammation are described as a process expected for all molecular subtypes of BC
30 253 (Panis et al., 2014). It is known that the inflammatory state is the primary source of
31 254 generation of systemic oxidative stress in cancer. Regarding molecular subtypes, a
32 255 distinct pattern of stress markers is produced depending on the hormone receptor profile,
33 256 as described by Herrera et al., 2012. Luminal tumors present high levels of oxidative
34 257 stress and inflammatory cytokines, while a distinct profile was observed in triple-negative
35 258 samples, with reduced levels of tumor necrosis factor-alpha and increased both oxidative
36 259 and nitrosative stress. These findings suggest that the presence of hormone receptors
37 260 affects the profile of systemic inflammation generated in BC and help us understand why
38 261 we observed different levels of antioxidants in the saliva of patients with triple-negative
39 262 tumors. In this sense, Victorino and collaborators (2013) demonstrated that
40 263 postmenopausal women produce higher systemic levels of TRAP as an adaptive process
41 264 to hormonal loss, suggesting that estrogen represents an important systemic antioxidant
42 265 defense against oxidative processes. These findings suggest that, without hormone
43 266 receptors, cells could increase their antioxidant capacity to defend themselves from
44 267 oxidative damage. It could help to understand the increase in salivary TRAP observed in
45 268 the triple-negative patients in our study.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

269 Most studies on saliva focus on searching for specific biomarkers in cancer.
270 Greabu and collaborators (2009) discuss that saliva has a significant role in controlling
271 and modulating oxidative damage in the oral cavity. The antioxidant action of saliva has
272 the function of reducing lipid peroxidation generated by ingested food, inhibiting the
273 mutagenic potential of reactive species inducers. Exposure to factors that cause
274 oxidative stress is capable of generating changes directly in the salivary glands, affecting
275 the profile of the saliva produced (Ungureanu et al., 2023). For patients with oral cancer,
276 salivary antioxidants such as glutathione consumption have been identified as an
277 important biomarker of oral squamous cell carcinoma (Zhou et al., 2023). In BC,
278 increased salivary antioxidant capacity has been related to the occurrence of aggressive
279 BC, especially the presence of a mutation in the BRCA1 repair gene (Sawczuk et al.,
280 2019), which reinforces the importance of our findings in patients with triple-negative
281 tumors.

282 Our study did not demonstrate any significant correspondence between
283 antioxidant levels in the saliva and blood of BC patients, demonstrating that the
284 composition of saliva does not necessarily mirror that of blood. TRAP levels were higher
285 in blood than in saliva, probably because blood oxidative challenges are more significant
286 than those in the oral cavity. A study carried out in healthy individuals for 27 salivary
287 inflammatory markers had similar findings to ours, concluding that there is a low
288 correlation between the levels of blood and salivary markers (Williamson et al., 2012).

289 This study has limitations, including the modest sample size, which limited the
290 pairing of saliva and blood samples for analyses in clinicopathological subgroups. Saliva
291 volume resulted in the evaluation of only TRAP, without the possibility of measuring other
292 important molecules in the redox balance, such as hydroperoxides or nitric oxide
293 metabolites. Furthermore, other possible confounding factors, such as food consumption
294 profile and oral microbiota assessment, were not subject to analysis. Despite this, our
295 data demonstrated for the first time that there is a correlation between the clinical
296 presentation of BC and saliva antioxidant levels, especially in the molecular subtypes
297 with the worst prognosis, such as triple negative. More studies must be carried out to
298 validate these findings in a larger patient population through the search for additional
299 markers of oxidative stress.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

300 CONCLUSION

301 Although saliva is one of the least recognized fluids in the human body, it plays
302 a fundamental role in health. The results of this study demonstrated that although no
303 correlations were found in the pairing between antioxidant levels in blood and saliva
304 samples, it was demonstrated that TRAP in saliva samples from women with triple-
305 negative BC were higher compared to patients with estrogen and progesterone hormone
306 receptors. These results showed significant variations in clinical pathological parameters
307 indicative of worse prognosis such as triple negative molecular subtype, high Ki67
308 tumors and occurrence of distant metastasis, suggesting salivary TRAP as a possible
309 marker for hormone negative BC.

310 Acknowledgment

311 **Funding:** Fundação Araucária, Programa de Pesquisa Para o SUS – PPSUS,
312 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho
313 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

314 **Conflicts of interest:** the authors have no conflicts to declare.

315 **Availability of data and material:** All data will be available under a reasonable request.

316 **Authors' contribution:** All authors contributed to the study conception and design,
317 material preparation, data collection and analysis. The first draft of the manuscript was
318 written by Mariane Fontana Mezoni and Carolina Panis, and all authors read and
319 approved the final manuscript.

320 **Ethics approval and consent to participate:** All ethical issues were considered in the
321 study and are reported accordingly in the methods section.

322 **Acknowledgements:** The authors would like to thank all patients who agreed to
323 participate in this work and Francisco Beltrão Cancer Hospital (CEONC) for collaborating
324 with the study.

325 REFERENCES

- 326 1. Iarc- international agency for research on cancer. Breast Cancer Awareness [homepage
327 on the Internet]. Month 2023. Available [https://www.iarc.who.int/news-events/breast-](https://www.iarc.who.int/news-events/breast-cancer-awareness-month-2023/)
328 [cancer-awareness-month-2023/](https://www.iarc.who.int/news-events/breast-cancer-awareness-month-2023/)Accessed :nov/20/2023
- 329 2. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of
330 prevention 2020-2070. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Oct;18(10):663-672. doi:
331 10.1038/s41571-021-00514-z. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34079102.
- 332 3. Inca- Instituto Nacional Do Câncer (Brasil). [homepage on the Internet]. Estimate 2023:
333 incidence of cancer in Brazil. Available:
334 [https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-](https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil)
335 [brasil](https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil). Accessed on: Nov/11/ 2023.
- 336 4. Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer*.
337 2017 Nov;3(11):753-760. doi: 10.1016/j.trecan.2017.09.001. Epub 2017 Oct 24. PMID:
338 29120751; PMCID: PMC5802368.

- 1
2
3 339 5. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garq VK, Goel N, Koundal D, Zaquia A, Koundal S, Belay
4 340 A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures.
5 341 Biomed Res Int. 2022 Apr 18;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439. Retraction in:
6 342 Biomed Res Int. 2023 Dec 29;2023:9872034. PMID: 35480139; PMCID: PMC9038417.
- 7
8 343 6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi:
9 344 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.
- 10 345 7. Hecht F, Pessoa CF, Gentile LB, Rosenthal D, Carvalho DP, Fortunato RS. The role of
11 346 oxidative stress on breast cancer development and therapy. Tumour Biol. 2016
12 347 Apr;37(4):4281-91. doi: 10.1007/s13277-016-4873-9. Epub 2016 Jan 27. PMID:
13 348 26815507.
- 14
15 349 8. Halliwell B. Reactive oxygen species (ROS), oxygen radicals and antioxidants: Where
16 350 are we now, where is the field going and where should we go? Biochem Biophys Res
17 351 Commun. 2022 Dec 10;633:17-19. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.08.098. PMID: 36344150.
- 18
19 352 9. Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; Paula, S. O.; Minin, V. P. R.;
20 353 Bressan, J. Oxidative Stress: Assessment Of Biomarkers. Nutrire Rev. Soc. Bras.
21 354 Aliment. Nutr ; 33(2): 111-128, ago. 2008.
- 22 355 10. Panis C, Victorino VJ, Herrera AC, Cecchini AL, Simão AN, Tomita LY, Cecchini R. Can
23 356 Breast Tumors Affect the Oxidative Status of the Surrounding Environment? A
24 357 Comparative Analysis among Cancerous Breast, Mammary Adjacent Tissue, and
25 358 Plasma. Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:6429812. doi: 10.1155/2016/6429812. Epub
26 359 2015 Nov 30. PMID: 26697139; PMCID: PMC4677231.
- 27
28 360 11. Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Verenitach BD, Lemos LT, Aranome AM, Oliveira
29 361 SR, Cecchini AL, Simão AN, Abdelhay E, Panis C, Cecchini R. Impact of tumor removal
30 362 on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation
31 363 at diagnosis as a putative marker of disease recurrence. Clin Breast Cancer. 2014
32 364 Dec;14(6):451-9. doi: 10.1016/j.clbc.2014.05.002. Epub 2014 Jun 25. PMID: 25077997.
- 33
34 365 12. Panis C, Victorino VJ, Herrera AC, Freitas LF, De Rossi T, Campos FC, Simão AN,
35 366 Barbosa DS, Pinge-Filho P, Cecchini R, Cecchini AL. Differential oxidative status and
36 367 immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer.
37 368 Breast Cancer Res Treat. 2012 Jun;133(3):881-8. doi: 10.1007/s10549-011-1851-1.
38 369 Epub 2011 Nov 3. PMID: 22048816.
- 39 370 13. Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. Med
40 371 Oncol. 2017 Jan;34(1):7. doi: 10.1007/s12032-016-0863-4. Epub 2016 Dec 10. PMID:
41 372 27943101; PMCID: PMC5534214.
- 42
43 373 14. Nový BB. Saliva and biofilm-based diagnostics: a critical review of the literature
44 374 concerning sialochemistry. J Evid Based Dent Pract. 2014 Jun;14 Suppl:27-32. doi:
45 375 10.1016/j.jebdp.2014.04.004. Epub 2014 Apr 5. PMID: 24929586.
- 46
47 376 15. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Liesuy S. Oxidative
48 377 stress in blood of HIV infected patients. Clin Chim Acta. 1996 Nov 29;255(2):107-17. doi:
49 378 10.1016/0009-8981(96)06394-2. PMID: 8937754.
- 50 379 16. Barreiros ALBS, David JM, DAVID JP. Oxidative stress: Relationship between generation
51 380 of reactive species and organism defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- 52 381 17. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Liesuy S, Lissi EA. Evaluation of total
53 382 reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. Arch
54 383 Biochem Biophys. 2001 Apr 15;388(2):261-6. doi: 10.1006/abbi.2001.2292. PMID:
55 384 11368163.
- 56
57 385 18. Herrera AC, Panis C, Victorino VJ, Campos FC, Colado-Simão AN, Cecchini AL, Cecchini
58 386 R. Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile
59 387 from invasive breast cancer patients. Cancer Immunol Immunother. 2012
60

- 1
2
3 388 Nov:61(11):2193-201. doi: 10.1007/s00262-012-1283-8. Epub 2012 May 22. PMID:
4 389 22618884.
- 5
6 390 19. Panis C, Pizzatti L, Herrera AC, Corrêa S, Binato R, Abdelhay E. Label-free proteomic
7 391 analysis of breast cancer molecular subtypes. *J Proteome Res.* 2014 Nov 7;13(11):4752-
8 392 72. doi: 10.1021/pr500676x. Epub 2014 Sep 24. PMID: 25221861.
- 9
10 393 20. Victorino VJ, Campos FC, Herrera AC, Colado Simão AN, Cecchini AL, Panis C, Cecchini
11 394 R. Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in
12 395 women diagnosed with breast cancer. *Tumour Biol.* 2014 Apr;35(4):3025-34. doi:
13 396 10.1007/s13277-013-1391-x. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24248545.
- 14 397 21. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, Totan C, Miricescu D,
15 398 Radulescu R. Saliva—a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J*
16 399 *Med Life.* 2009 Apr-Jun;2(2):124-32. PMID: 20108531; PMCID: PMC3018981.
- 17
18 400 22. Ungureanu LB, Grădinaru I, Ghiciuc CM, Amălinei C, Gelețu GL, Petrovici CG, Stănescu
19 401 RȘ. Atrophy and Inflammatory Changes in Salivary Glands Induced by Oxidative Stress
20 402 after Exposure to Drugs and Other Chemical Substances: A Systematic Review.
21 403 *Medicina (Kaunas).* 2023 Sep 21;59(9):1692. doi: 10.3390/medicina59091692. PMID:
22 404 37763811; PMCID: PMC10535338.
- 23
24 405 23. Zhou Q, Ye F, Zhou Y. Oxidative stress-related biomarkers in oral squamous cell
25 406 carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis. *Biomark Med.* 2023
26 407 Mar;17(6):337-347. doi: 10.2217/bmm-2022-0846. Epub 2023 Jun 7. PMID: 37284735.
- 27
28 408 24. Sawczuk B, Maciejczyk M, Sawczuk-Siemieniuk M, Posmyk R, Zalewska A, Car H.
29 409 Salivary Gland Function, Antioxidant Defence and Oxidative Damage in the Saliva of
30 410 Patients with Breast Cancer: Does the *BRCA1* Mutation Disturb the Salivary Redox
31 411 Profile? *Cancers (Basel).* 2019 Oct 8;11(10):1501. doi: 10.3390/cancers11101501.
32 412 PMID: 31597313; PMCID: PMC6826655.
- 33
34 413 25. Williamson S, Munro C, Pickler R, Grap MJ, Elswick RK Jr. Comparison of biomarkers in
35 414 blood and saliva in healthy adults. *Nurs Res Pract.* 2012;2012:246178. doi:
36 415 10.1155/2012/246178. Epub 2012 Apr 30. PMID: 22619709; PMCID: PMC3350846.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

418 **FIGURES**

419 **Figure 1 – TRAP levels according to hormonal receptors status and molecular**
420 **subtyping of breast tumors.** A: estrogen receptor status, B: progesterone receptor
421 status, C: molecular subtypes of BC. ER = estrigen receptors, PR = progesterone
422 receptors, - = negative, + = positive, LumA = Luminal A, LumB = Luminal B, HER2 =
423 HER2-amplified, and TN = triple-negative. The data are represented in box plots (min-
424 max). * indicates $p < 0.05$.

425 **Figure 2 – Correlation between TRAP levels in saliva and blood.** In A, regression
426 analysis shows no correlation between TRAP levels in blood and saliva ($R = 0.0013$). In
427 B, mean saliva and blood range. In C, individual levels of TRAP in saliva (blue lines) and
428 blood (orange lines).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

430 **TABLES**

431 **Table 1 – Clinicopathological characteristics of patients included in the study.**

432 **Table 2 – TRAP levels according to clinicopathological characteristics of patients.**

433 **Table 3 – Spearman's correlations.**

434

For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1

	%
Estrogen receptor	Negative: 32.9% Positive: 67.1%
Progesterone receptor	Negative: 55.6% Positive: 44.4%
ki67 proliferation index	<14%: 42.4% ≥14%:57.6%
Molecular subtype	Luminal A:41.5% Luminal B:24.6% HER-2 amplified:6.2% Triple-negative:27.7%
Tumor size (cm)	>2 cm: 90% ≤ 2 cm :10%
Histological grade	Low: 78.7% High : 21.3%
Body mass index (kg/m²)	Normal: 32.7% Excess: 67.3%
Age at diagnosis	> 50 years: 67.6% ≤ 50 years: 32.4%
Menopause at diagnosis	No: 55.8% Yes:44.2%

Table 2

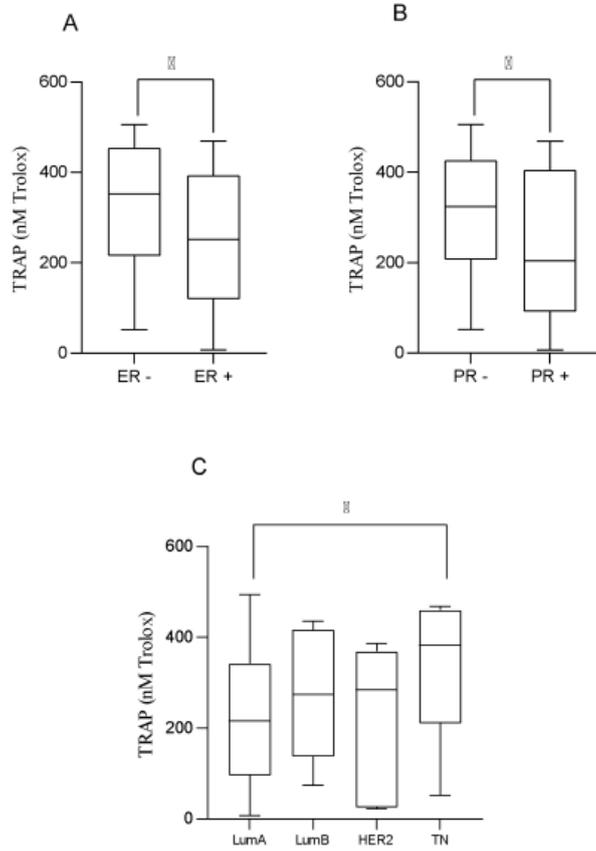
	Min-max (nM trolox)	P-value
Ki67 proliferation index	<14%: 10328- 251478 ≥14%: 1500-273128	0.1873
Tumor size	<2cm:16767- 209811 >2cm: 1500-273128	0.4632
Histological grade	Low: 1500- 251478 High: 25531- 273128	0.7080
Lymphnode metastasis	Presence: 35756- 191522 Absence: 72889-251478	0.8549
Distanto metastasis	Yes: 19214-209811 No: 1500- 251478	0.5046
Risk stratification for recurrence and death	Low: 3305-248098 Intermediate: 1500- 251478 High: 19214-273128	0.7866
Chemoresistance	Yes: 31634-273128 No: 1500- 251478	0.7633

Table 3

	TRAP vs. ER	TRAP vs. PR	TRAP vs. KI67	TRAP vs. Molecular subtype	TRAP vs. Tumor size	TRAP vs. Grade	TRAP vs. Lymphnode metastasis	TRAP vs. distant metastasis	TRAP vs. risk stratification	TRAP vs. chemoresistance
Spearman R	-0.1881	-0.1837	0.1697	0.2078	-0.01705	0.04187	-0.001655	0.1080	0.02520	-0.07179
IC 95%	-0.4341 to 0.08401	-0.4304 to 0.08858	-0.1055 to 0.4207	-0.06883 to 0.4548	-0.2837 to 0.2520	-0.2310 to 0.3087	-0.2967 to 0.2936	-0.2155 to 0.4101	-0.2443 to 0.2911	-0.3564 to 0.2250
p-value	0.1611	0.1714	0.2112	0.1279	0.8998	0.7593	0.9912	0.5015	0.8524	0.6278

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Figure 1 (1A; 1B;1C)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2 (2A; 2B; 2C)

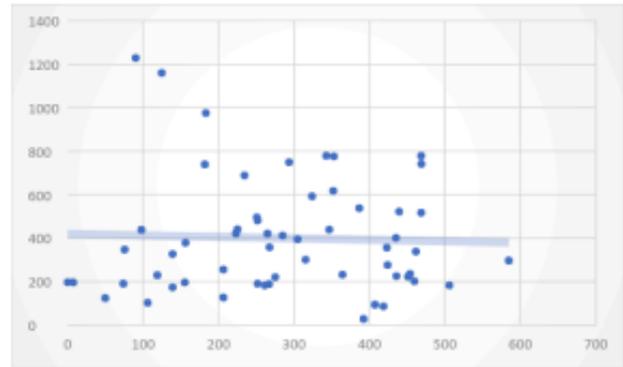


Figure 2A

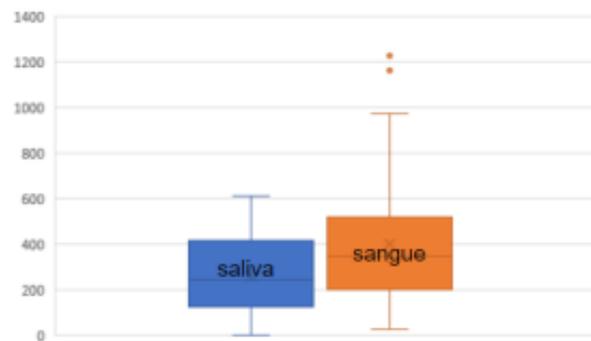


Figure 2B

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

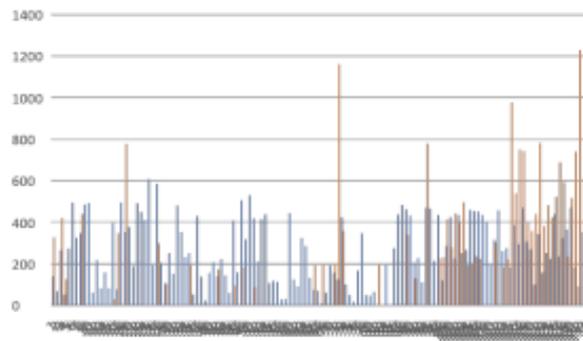


Figure 2C

