
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Optimizarea tehnicilor de diagnostic în cancerele orale și orofaringiene

Doctorand **Cosmin Ioan Faur**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Mihaela Carmen Hedeșiu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Cancerul oral și orofaringian	19
1.1. Epidemiologie	19
1.2. Diagnostic și stadializare	20
1.3. Prognostic și tratament	26
1.4. Provocări în managementul cancerului cervicofacial	27
2. Ampretele biomoleculare ale cancerului cervicofacial	29
2.1. Conceptul de biopsie din lichid biologic	29
2.2. Saliva - lichid pentru biopsie	30
2.3. Tipuri de biomarkeri ai cancerului cervicofacial	30
3. Exosomii salivari și microARN-urile exosomale	33
3.1. Originea exosomilor, încărcătura și rolurile biologice	33
3.2. Metode de izolare și caracterizare a exosomilor	34
3.3. MicroARN-urile exosomale	35
3.4. Mecanismele de acțiune ale microARN-urilor exosomale	35
3.5. Metode de izolare și cuantificare a microARN-urilor exosomale	36
4. Spectroscopia Raman	37
4.1. Descrierea principiului spectroscopiei Raman	37
4.2. Tehnici de spectroscopie Raman și metode de evaluare a probelor	37
4.3. Spectrul Raman	39
4.4. Analiza statistică a spectrului Raman	40
4.5. Eficiența în detectarea cancerului oral și orofaringian	40
4.6. Analiza exosomilor salivari prin tehnici de spectroscopie	40
5. Limitele actuale ale literaturii de specialitate	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Obiective	47
2. Metodologie generală	49
3. Studiul 1. MicroARN-urile exosomale din salivă ca biomarkeri ai detecției cancerului cervicofacial - un review al literaturii	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru și obiective	52
3.3. Material și metodă	52
3.4. Rezultate și discuții	53

3.6. Concluzii	65
4. Studiul 2. Spectroscopia Raman în cancerul oral și orofaringian: review sistematic al literaturii	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru și obiective	69
4.3. Material și metodă	69
4.4. Rezultate	70
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	79
5. Studiul 3. Diagnosticul rapid și neinvaziv al cancerului oral și orofaringian bazat pe spectrul Micro-Raman și FT-IR al salivei	81
5.1. Introducere	81
5.2. Ipoteza de lucru și obiective	82
5.3. Material și metodă	82
5.4. Rezultate	85
5.5. Discuții	92
5.6. Concluzii	95
6. Studiul 4. Detecția cancerului oral și orofaringian cu ajutorul microARN-486-5p și microARN-10b-5p exosomale din salivă	97
6.1. Introducere	97
6.2. Ipoteza de lucru și obiective	98
6.3. Material și metodă	98
6.4. Rezultate	101
6.5. Discuții	107
6.6. Concluzii	108
7. Studiul 5. O nouă metodă de detecție a carcinomului scuamos oral și orofaringian prin analiza multivariată prin Spectroscopie Raman cu Suprafață Îmbunătățită a exosomilor salivari	111
7.1. Introducere	111
7.2. Ipoteza de lucru și obiective	113
7.3. Material și metodă	113
7.4. Rezultate	118
7.5. Discuții	126
7.6. Concluzii	130
8. Concluzii generale	131
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	133
REFERINȚE	135

Cuvinte cheie:carcinom scuamos , cancer oral, cancer orofaringian, spectroscopie Raman, exosomi, salivă, microARN

INTRODUCERE

Patologia malignă cervicofacială prezintă numeroase aspecte care cresc gradul de dificultate al tratamentului, stadiul avansat al bolii prezent în momentul diagnosticului fiind unul dintre cele mai importante criterii care limitează posibilitățile de reabilitare funcțională posterapeutice. Lucrarea de față își propune să exploreze metode biomoleculare și biofizice de diagnostic neinvaziv, bazate pe analiza salivei, care să detecteze precoce leziunile maligne cervicofaciale.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul oral și orofaringian reprezintă o patologie cervicofacială importantă, constituind mai mult de jumătate dintre afecțiunile oncologice ale capului și gâtului. La nivel global, s-a observat în ultima decadă o creștere anuală constantă, de 1%, a numărului de cazuri noi de cancer oral și orofaringian. Tratamentul și prognosticul acestei patologii maligne variază în funcție de stadiul bolii la prima prezentare a pacientului, precum și de caracteristicile histopatologice ale tumorii. Cel mai frecvent tip histopatologic de cancer oral și orofaringian este carcinomul scuamos, reprezentând aproximativ 90% dintre cazuri. Caracterele invazive ale acestuia, precum cel mai rău model de invazie (ex. WPOI 5) și invazia perineurală sau limfovaculară, cresc riscul de diseminare locoregională la nivelul ganglionilor cervicali sau la distanță, prin apariția metastazelor pulmonare și/sau hepatice, reducând astfel rata de supraviețuire la 5 ani. Un alt element histopatologic important asociat cu modificarea prognosticului este prezența infecției cu Virusul Papiloma Uman (HPV), tulpinile oncogene (ex. 11,16, 18). Totuși, s-a observat un prognostic favorabil și un răspuns radioterapeutic bun al carcinomul scuamos orofaringian HPV pozitiv.

Peste jumătate dintre pacienți se prezintă la primul consult de specialitate în stadiile III și IV ale bolii, când rata de supraviețuire la 5 ani scade la aproximativ 50%. Motivele pentru prezentarea tardivă sunt variate, aflându-se în legătură atât cu educația pacienților, cât și cu lipsa metodelor de screening. În aceste stadii avansate ale bolii, tratamentul este agresiv, ducând la o creștere a morbidității post terapeutice. Metode de screening minim sau non-invaziv ar crește complianța pacienților și ar oferi un rezultat diagnostic mai rapid față de standardul de aur actual, reprezentat de examinarea histopatologică a unui fragment tumoral recoltat prin biopsie.

În ultimii ani, au fost intens studiate diferite metode de detecție neinvazivă și rapidă a cancerului cervicofacial, bazate pe principii biomoleculare ale tumorilor maligne și pe metode biofizice și biochimice de identificare a amprentelor celulelor

canceroase. Celulele maligne eliberează în mediul peritumoral compuși biochimici care favorizează invazia locală și diseminarea la distanță. Astfel de produși tumorali sunt celulele tumorale circulante, exosomii și acizii nucleici. În mod particular, exosomii prezintă un interes crescut atât datorită conținutului proteic și genetic care indică apartenența specifică la un anumit tip histopatologic tumoral, cât și datorită prezenței lor în diferite lichide ale organismului, precum sângele sau saliva. Astfel, exosomii pot fi izolați și caracterizați din saliva recoltată neinvaziv de la pacienții cu leziuni suspecte. Mai mult, acțiunea de spălare a tumorii pe care saliva o realizează la nivel oral și orofaringian permite înglobarea unor cantități mai mari de nanovezicule de interes direct de la nivelul formațiunii tumorale.

Exosomii conțin o cantitate crescută de acid dezoxiribonucleic (ARN), sub diferite forme, precum microARN-ul. MicroARN-ul exosomal este implicat în comunicarea intercelulară și interacționează cu ARN mesager (ARNm) producând blocarea transcripției în proteine sau distrugerea mRNA-ului. În acest fel, celula malignă își creează un mediu propice creșterii și dezvoltării. Au fost deja identificate câteva microARN-uri exosomale izolate din salivă, precum microARN-24-5p sau microARN-512-5p, asociate cu celulele carcinoamelor scuamoase orale sau microARN-4484 asociat cu leziuni premaligne (lichen plan). În acest moment însă, studiile pe subiecți umani prezintă limitări precum loturile mici de pacienți.

Identificarea exosomilor se poate face atât prin metode biochimice (ex. ultracentrifugarea și analiza componentelor membranare), cât și prin metode biofizice, precum cele de spectroscopie Raman. Spectroscopia Raman este o metodă biofizică prin care amprenta spectrală a unui compus biochimic este identificată după interacțiunea elementului cu o rază incidentă provenită de la un laser. Neajunsul acestei tehnici aplicate compușilor biomoleculari este eficiența redusă a procesului, datorită intensității reduse a spectrului rezultat. Pentru a contracara această limitare, au apărut variante noi de spectroscopie Raman, precum spectroscopia Raman cu Suprafață Îmbunătățită, care amplifică amprenta biomoleculară a produsului analizat de până la 1011 ori prin adăugarea unui compus coloidal de aur sau argint la substratul analizat. Până în acest moment însă, exosomii nu au fost identificați printr-o astfel de metodă, dar amprente biomoleculare ale exosomilor salivari au fost observate prin spectroscopia în infraroșu transformată Fourier (FTIR).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru

Cunoscând noutățile tehnologice prin care diverse metode biofizice și biochimice detectează amprenta tumorilor maligne, a fost realizată o căutare în literatura de specialitate pentru identificarea unor amprente biomoleculare ale carcinoamelor scuamoase orale și orofaringiene în salivă. Astfel, primele două studii au dorit să fie un promotor documentat din literatura de specialitate pentru următoarele

studii clinico-fundamentale, conturându-se în acest fel metodologia de cercetare a acestora din urmă.

În primul studiu, s-a dorit evaluarea capacității spectroscopiei Raman de a detecta mărci ale carcinomului scuamos oral și orofaringian în salivă și de a identifica o variantă a spectroscopiei Raman care să poată analiza cu succes acest lichid de biopsie.

În al doilea studiu, a fost realizată o căutare în literatură în vederea investigării exosomilor din saliva pacienților cu cancer oral și orofaringian privind metodele de izolare și caracterizare ale acestora, precum și identificarea unor biomarkeri specifici ai carcinoamelor scuamoase orale și orofaringiene prezente în exosomi.

Bazându-se pe aceste două recenzii sistematice ale literaturii, următoarele trei studii au dorit să evalueze exosomii salivari, microARN-urile exosomale din salivă și capacitatea spectroscopiei Raman cu Suprafață Îmbunătățită (SERS) de a detecta carcinoamele scuamoase orale și orofaringiene din probe de salivă.

Studiul trei și-a propus să evalueze saliva integrală și să detecteze modificări ale elementelor biochimice preponderent prezente în probele provenite de la pacienții bolnavi.

În al patrulea studiu s-a dorit evaluarea exosomilor salivari din populația țintă și capacitatea microARN-urilor exosomale miR-486-5p și miR-10b-5p de a detecta carcinomul scuamos oral și orofaringian, precum și influența pe care caracteristicile histopatologice ale tumorilor influențează expresia acestor microARN-uri.

Ultimul studiu s-a concentrat pe detectarea exosomilor salivari cu ajutorul spectroscopiei Raman cu Suprafață Îmbunătățită și pe evaluarea capacității spectrelor Raman ale exosomilor salivari de a detecta carcinomul scuamos oral și orofaringian.

Metodologie generală

Pentru analiza sistematică a literaturii, s-a utilizat protocolul PRISMA pentru recenzii sistematice și meta-analize, în bazele de date internaționale Pubmed și Google Scholar (Academic).

Studiile clinico-fundamentale au fost realizate după obținerea avizelor Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, în conformitate cu Declarația de la Helsinki și completările sale ulterioare.

Pentru studiile clinice, au fost incluși în lotul de pacienți bolnavi subiecți care s-au adresat secțiilor de Chirurgie Orală și Maxilo-facială și Otorinolaringologie ale Spitalului Județean de Urgență Cluj-Napoca în perioada 2020 - 2021, cu diagnostic histopatologic de carcinom scuamos al cavității bucale sau orofaringelui. În grupul de control au fost incluși subiecți sănătoși voluntari care s-au adresat Secției de Chirurgie Orală și Maxilo-Facială pentru extracții dentare. Subiecții care au prezentat antecedente de cancer, tratament anterior prin radioterapie sau chimioterapie și cei care au prezentat infecții acute la momentul examinării clinice de către un specialist maxilo-facial au fost excluși din studiu. Toți pacienții au semnat consimțământul informat scris, aprobat de comitetul de etică al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Leziunile maligne au fost stadializate conform celei de a

8-a clasificării a Comisiei Americane Comune pentru Cancer. Datele demografice, precum și consumul de alcool și indicele de fumat, au fost colectate din fișa medicală și din anamneza pacienților, iar examenul histopatologic a fost furnizat de către Secția de Patologie a Spitalului Județean de Urgență Cluj-Napoca.

Probele de salivă recoltate de la subiecții incluși în studiu au fost obținute înainte de orice manoperă terapeutică. A fost aplicat un protocol de recoltare pasivă a salivei dimineața, între orele 7:00 și 10:00, la 15 minute după clătirea cavității bucale cu apă. Pacienții au fost instruiți să exprime pasiv saliva, într-un recipient steril special conceput pentru recoltarea salivei și să nu tușească sau să scuiepe cu forță saliva, pentru a colecta doar salivă nestimulată. S-a colectat o cantitate de salivă cuprinsă între 0,8 până la 1,6 ml de la fiecare subiect. Probele au fost depuse la congelator la -20° Celsius timp de maxim 1 săptămâna, iar apoi au fost depozitate la -80° Celsius până la prelucrarea ulterioară.

Saliva integrală a fost analizată la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, printr-un protocol descris pe larg în studiul "Studiul 3. Diagnosticul rapid și neinvaziv al cancerului oral și orofaringian bazat pe spectrul Micro-Raman și FT-IR al salivei". Pe scurt, lichidul a fost centrifugat la 9000 g și 10° C timp de 20 de minute pentru a îndepărta celulele epiteliale și alte resturi, obținând astfel saliva purificată. Probele au fost ulterior investigate folosind atât tehnica spectroscopică de micro-Raman, cât și FT-IR, iar spectrele au fost analizate statistic cu ajutorul metodelor chemometrice.

Evaluarea exosomilor salivari s-a realizat în Centrul de Genomică al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Descrierea exactă a metodei se regăsește în studiul "Studiul 4. Detecția cancerului oral și orofaringian cu ajutorul microARN-486-5p și microARN-10b-5p exosomale din salivă". Pe scurt, izolarea exosomilor s-a realizat prin tehnica ultracentrifugării diferențiale, care presupune o serie de centrifugări la diferite viteze și intervale de timp. Caracterizarea exosomilor s-a realizat cu ajutorul instrumentului NanoSight, obținându-se astfel dimensiunea și distribuția particulelor în soluție.

Ulterior, analiza Raman a exosomilor salivari s-a realizat la Centrul Medfuture al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, printr-un protocol de examinare prin Spectroscopie Raman cu Suprafață Îmbunătățită utilizând nanoparticule coloidale de argint pe suprafață solidă. Tehnica este descrisă pe larg în studiul "Studiul 5. O nouă metodă de detecție a cancerului oral și orofaringian prin analiza multivariată prin Spectroscopie Raman cu Suprafață Îmbunătățită a exosomilor salivari".

În final, examinarea microARN-urilor exosomale a fost efectuată la centrul Centrul de Genomică al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca prin metode moleculare descrise în studiul "Studiul 4. Detecția cancerului oral și orofaringian cu ajutorul microARN-486-5p și microARN-10b-5p exosomale din salivă". Pentru cuantificarea expresiei genice a fost utilizat qRT-PCR.

Studiu 1. MicroARN-urile exosomale din salivă ca biomarkeri ai detecției cancerului cervicofacial - un review al literaturii

Exosomii salivari pot fi izolați cu succes din saliva pacienților cu cancer oral și orofaringian cu ajutorul ultracentrifugării. Există însă și alte metode, precum filtrele sau kiturile, dar acestea prezintă dezavantajul costurilor crescute și a lipsei de predictibilitate a concentrației de exosomi rezultate. La caracterizarea exosomilor din probele pacienților cu cancer s-a observat o creștere a concentrației și a dimensiunii exosomilor comparativ cu loturile de pacienți sănătoși. Caracterizarea se poate face și cu ajutorul Microscopiei Electronice de Transmisi, FLOW-Citometriei sau analizei Western-Blot.

Extracția microARN-urilor din exosomii izolați se face cu ajutorul kiturilor specifice. S-au observat modificări ale expresiei microARN-urilor miR-4484 și miR-1246 în lichenul plan oral și ale miR-10B-5p, miR-486-5p, miR-486-3p, miR-302b-3p, miR-517-3p, miR-512-3p, miR-412-3p, miR-24-3p, miR-134 și miR-200a în carcinomul scuamos oral și orofaringian. miR-10B-5p, miR-486-5p au prezentat un interes special.

Studiu 2. Spectroscopia Raman în cancerul oral și orofaringian: Review sistematic al literaturii

Detecția cancerului oral și orofaringian bazată pe examinarea Raman este intens studiată începând cu anul 2015, însă majoritatea acestor articole din literatura de specialitate includ un număr limitat de subiecți. Spectroscopia Raman poate fi utilă în detecția carcinomului oral și orofaringian, diferențierea histopatologică, evaluarea recurenței bolii și eficacității tratamentului.

Investigarea leziunilor maligne se poate face, *ex vivo* pe țesutul tumoral sau fluide biologice precum sângele, saliva sau urina, dar și pe celulele exfoliate. De asemenea, tehnicile de spectroscopie Raman pot fi folosite *in vivo* sau experimental *in vitro*.

Amprente biochimice asociate cu carcinomul oral și orofaringian au fost evaluate în regiunea amprentelor spectrale și în regiunea undelor înalte. Proteinele, lipidele și acizii nucleici au fost indicate de majoritatea studiilor ca fiind principalii discriminatori pentru diagnosticul carcinomului scuamos oral și orofaringian,

O creștere a intensității semnalului Raman pentru proteine, acizi nucleici și apă și o scădere a intensității pentru lipide și carotenoizi a fost găsită în probele de cancer indiferent de tehnica biofizică sau de tipul probei.

Studiu 3. Diagnosticul rapid și neinvaziv al cancerului oral și orofaringian bazat pe spectrul Micro-Raman și FT-IR al salivei. (14 pct)

Intensitatea spectrelor Raman variază în probele pacienților cu cancer oral și orofaringian comparativ cu subiecții sănătoși. S-a observat o creștere a benzilor localizate la 530, 754, 927, 1448 și 2064 cm^{-1} , în lotul control comparativ cu cele ale lotului de cancer, care sunt atribuite compușilor lizozim, triptofan, glicoproteine și tiocianat salivar. Valori mai mari ale vârfului benzilor 1001 și 1665 cm^{-1} au fost detectate în probele de cancer, fiind asociate fenilalaninei și amidei I în proteine. În regiunea spectrală de undă înaltă pentru banda de absorbție a tiocianatului la 2064 cm^{-1} , aria calculată a acestei benzi a fost de 1,91 ori mai mare în probele de control decât în cele de carcinom scuamos.

La analiza statistică prin PCA și PCA-LDA a setului de date, necesară discriminării între spectrele Raman obținute din probele de salivă de control și cancer, s-a obținut o diferențiere între cele două loturi. Primele 10 PC-uri care au rezultat în urma PCA, au reprezentat variația totală de 93,6% în setul de date, fiind utilizate ca date de intrare pentru clasificarea PCA-LDA. Ratele de clasificare corectă pentru pacienții cu cancer și voluntarii de control au fost de 90%, respectiv 92,5%. Precizia totală a fost de 91%. Validarea încrucișată a fost folosită pentru a testa modelul PCA-LDA și a arătat că ratele de clasificare pentru datele de antrenament au fost de 89% pentru spectrele de cancer și 91% pentru cele de control.

Studiul 4. Detecția cancerului oral și orofaringian cu ajutorul microARN-486-5p și microARN-10b-5p exosomale din salivă(14 pct)

Acest studiu a înrolat 50 de pacienți (25 de pacienți în grupul de cancer și 25 în grupul de control), cu vârsta medie de 59 ± 9 ani în grupul cu cancer și 54 ± 14 ani în grupul de control, fără nicio diferență statistică între grupuri.

Chiar dacă rezultatele nu au prezentat semnificație statistică, s-a observat că populația de exozomi din proba tumorală a fost mai heterogenă și de dimensiuni mai mari în comparație cu grupul de control.

Expresia miR-10b-5p a fost scăzută și expresia miR-486-5p a fost crescută în probele din grupul de cancer în comparație cu eșantioanele martorilor. MiR-486-5p a avut o expresie mai mare în cancerul orofaringian comparativ cu cancerul cavității bucale. S-a observat că expresia miR-486-5p este mai mare în carcinoamele G1 comparativ cu G3, iar miR-10b-5p a prezentat o reducere a expresiei în G2 și o creștere a expresiei în G1 și G3. MiR-urile au fost exprimate diferit în tumorile nekeratinizante: miR-10b-5p a fost subregulat și miR-486-5p a fost supraregulat.

Curbele ROC exprimă sensibilitatea și specificitatea pentru fiecare miARN, AUC indicând puterea de discriminare a biomarkerului. MiR-486-5p și miR-10b-5p au prezentat AUC relative de 0,72 și 0,59 pentru identificarea carcinomului scuamos oral și orofaringian.

Studiul 5. O nouă metodă de detecție a carcinomului scuamos oral și orofaringian prin analiza multivariată a exosomilor salivari cu Spectroscopia Raman cu Suprafață Îmbunătățită

Exosomii salivari exprimă spectre Raman la analiza SERS datorita componentelor structurale ale acestora.

Spectrele medii SERS ale probelor de exozomi izolate de la lotul martori și de pacienți cu cancer au prezentat diferențe semnificative între cele două grupuri la lungimile de undă 350, 700, 960, 1170, 1320, 1500 cm^{-1} , dar mai ales în intervalul 1740-2540 cm^{-1} . Toate spectrele au fost colectate în condiții experimentale identice. Marea majoritate a benzilor vibraționale sunt în general atribuite acizilor nucleici, proteinelor și lipidelor. Cea mai intensă bandă de vibrații (2110 cm^{-1}) observată în ambele grupuri poate fi atribuită tiocianatului, cu un vârf al benzii aproape dublu în cazul probelor martor comparativ cu cele de cancer.

La analiza multivariată prin PCA s-a observat o discriminare între cele două loturi de până la 99.04% prin utilizarea primelor 19 componente principale. La analiza PCA-LDA s-a obținut o sensibilitate și specificitate de 75.9% și 66.7%, cu un AUC de 73.6% și precizie a testului de 71.0%.

Concluzii generale

Carcinomul scuamos oral și orofaringian produce diverși biomarkeri care îi semnalează prezența în salivă. Exosomii sunt biomolecule cu rol deosebit de important în extinderea locală și la distanță a carcinomului scuamos și pot fi detectați prin metode biofizice și biochimice non-invazive bazate pe salivă. Aceștia se regăsesc ca o populație heterogenă, cu dimensiuni crescute în saliva pacienților cu cancer oral și orofaringian comparativ cu saliva pacienților sănătoși. Mai mult, exosomii prezintă o amprentă spectrală Raman caracteristică identificabilă prin examinarea SERS pe un suport de nanoparticule plasmonice de argint.

Exosomii conțin material nucleic, în mod particular microARN, care se găsește în cantități crescute în exosomii salivari față de microARN-ul liber din sânge sau salivă, datorită învelișului lipidic al exosomilor care îl protejează de degradarea enzimatică a ribonucleazelor. microARN-ul-486-5p și microARN-ul-10b-5p prezintă expresii modificate în cancerul oral și orofaringian, care sunt influențate de diferite

caracteristici ale tumorii precum localizare, keratinizare sau grad de diferențiere. microARN-ul-486-5p este supraexprimat încă din stadiul II de cancer.

Saliva este un lichid biologic complex care înglobează diverși biomarkeri ai malignității. Acești biomarkeri oferă un spectru Raman caracteristic al salivei globale analizate prin diverse metode de spectroscopie Raman. Astfel, saliva se prezintă ca un fluid biologic cu potențial de lichid de biopsie.

Metodele chemometrice de analiză statistică sunt necesare procesării unui set de date foarte mare generat de analiza prin spectroscopie Raman a salivei integrale sau a unor componente salivare asociate carcinomului scuamos oral și orofaringian, precum exosomii. Cu ajutorul acestor metode s-a putut obține o acuratețe de detecția a cancerului la analiza Raman a exosomilor salivari de 71%.

PhD THESIS SUMMARY

Optimization of the Oral and Oropharyngeal cancers diagnostic techniques

Ph.D. student **Cosmin Ioan Faur**

Ph.D. Thesis advisor Prof. dr. **Mihaela Carmen Hedeşiu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
STATE OF THE ART	
1. Oral and oropharyngeal cancer	19
1.1. Epidemiology	19
1.2. Diagnosis and staging	20
1.3. Prognosis and treatment	26
1.4. Head and neck cancer challenges	27
2. Head and neck cancer biomolecular fingerprints	29
2.1. Liquid biopsy concept	29
2.2. Saliva – liquid biopsy	30
2.3. Head and neck cancer biomarkers	30
3. Salivary exosomes and exosomal microRNA	33
3.1. Origin, cargo and biological patterns	33
3.2. Exosomes isolation and characterization	34
3.3. Exosomal microRNAs	35
3.4. Exosomal microRNAs pathways	35
3.5. Isolation and expression assessment of exosomal microRNAs	36
4. Raman spectroscopy	37
4.1. Description of Raman spectroscopy technique	37
4.2. Raman spectroscopy techniques and samples evaluation	37
4.3. Raman spectra	39
4.4. Statistical analysis of Raman spectra	40
4.5. Efficacy of oral and oropharyngeal cancer detection	40
4.6. Raman spectroscopy assessment of salivary exosomes	40
5. Current limits of literature	43
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Work hypothesis	47
2. General methodology	49
3. Study 1. Salivary exosomal microRNAs as biomarkers for head and neck cancer detection—a literature review	51
3.1. Introduction	51
3.2. Work hypothesis and objectives	52
3.3. Materials and methods	52
3.4. Results and Discussion	53
3.6. Conclusion	65

4. Study 2. Raman Spectroscopy Raman in oral and oropharyngeal cancer: systematic review of literature	67
4.1. Introduction	67
4.2. Work hypothesis and objectives	69
4.3. Materials and methods	69
4.4. Results	70
4.5. Discussion	74
4.6. Conclusion	79
5. Study 3. Rapid and noninvasive diagnosis of oral and oropharyngeal cancer based on micro-Raman and FT-IR spectra of saliva	81
5.1. Introduction	81
5.2. Work hypothesis and objectives	82
5.3. Materials and methods	82
5.4. Results	85
5.5. Discussion	92
5.6. Conclusion	95
6. Study 4. Salivary Exosomal microRNA-486-5p and microRNA-10b-5p in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma	97
6.1. Introduction	97
6.2. Work hypothesis/objectives	98
6.3. Materials and methods	98
6.4. Results	101
6.5. Discussion	107
6.6. Conclusion	108
7. Study 5. A new detection method of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma based on multivariate analysis of Surface Enhanced Raman Spectra of salivary exosomes	111
7.1. Introduction	111
7.2. Work hypothesis/objectives	113
7.3. Materials and methods	113
7.4. Results	118
7.5. Discussion	126
7.6. Conclusion	130
8. General conclusions	131
9. Originality and innovative contributions of the thesis	133
REFERENCES	135

KEYWORDS: squamous cell carcinoma, oral cancer, oropharyngeal cancer, Raman spectroscopy, exosomes, saliva, microRNA

INTRODUCTION

Head and neck malignant pathology presents numerous aspects that increase the degree of the treatment difficulty, the advanced stage of the disease at the time of diagnosis being one of the most important criteria that limits the possibilities of post-therapeutic functional rehabilitation. The present work aims to explore biomolecular and biophysical non-invasive diagnostic methods, based on saliva analysis, to detect early head and neck malignant lesions.

STATE OF THE ART

Oral and oropharyngeal cancer represents an important head and neck pathology, being more than half of head and neck oncological conditions. Globally, a constant 1% annual increase in new cases number of oral and oropharyngeal cancer has been observed over the last decade. The treatment and prognosis of this malignant pathology vary depending on the stage of the disease at the first presentation of the patient, as well as on the histopathological characteristics of the tumor. The most common histopathological type of oral and oropharyngeal cancer is squamous cell carcinoma, accounting for approximately 90% of cases. Its invasive features, such as the worst pattern of invasion (e.g. WPOI 5) and perineural or lymphovascular invasion, increase the risk of dissemination to the locoregional cervical nodes or through the appearance of lung and/or liver metastases, thus reducing the 5-year survival rates. Another important histopathological element associated with the prognosis changing is the presence of infection with the Human Papilloma Virus (HPV), the oncogenic variants (ex. 11,16, 18). However, a favorable prognosis and a good radiotherapeutic response of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma have been observed.

More than half of the patients address to the first specialist consultation in stages III and IV of the disease, when the 5-year survival rates drop to approximately 50%. The reasons for late presentation are varied, relating to both patient education and the lack of screening methods. In these advanced stages of the disease, treatment is aggressive, leading to an increase in post-therapeutic morbidity. Minimal or non-invasive screening methods would increase patient compliance and provide a faster diagnostic result compared to the current gold standard, represented by the histopathological examination of a tumor fragment harvested by biopsy.

In recent years, various methods of non-invasive and rapid detection of head and neck cancer have been intensively studied, based on biomolecular principles of malignant tumors and on biophysical and biochemical methods for identifying the

fingerprints of cancer cells. Malignant cells release into the peritumoral environment biochemical compounds that favor local invasion and distant metastasis. Such tumor products are circulating tumor cells, exosomes, and nucleic acids. In particular, exosomes are of increased interest both due to their protein and genetic content that indicates specific belonging to a certain tumor histopathological type, and due to their presence in different body fluids, such as blood or saliva. Thus, exosomes can be isolated and characterized from saliva collected noninvasively from patients with suspicious lesions. Moreover, the washing action of the tumor that the saliva achieves at the oral and oropharyngeal sites allows the inclusion of larger amounts of nanovesicles of interest directly from the tumor formation.

Exosomes contain an increased amount of ribonucleic acid (RNA) in various forms, such as microRNA. Exosomal microRNA is involved in intercellular communication and interacts with messenger RNA producing blocking protein transcription or mRNA destruction. In this way, the malignant cell creates an environment conducive to its growth and development. Several exosomal microRNAs isolated from saliva have already been identified, such as microRNA-24-5p or microRNA-512-5p, associated with oral squamous carcinoma cells or microRNA-4484 associated with premalignant lesions (lichen planus). At this point, however, human studies have limitations such as small patient groups.

The identification of exosomes can be done both by biochemical methods (e.g. ultracentrifugation and analysis of membrane components) and by biophysical methods, such as Raman spectroscopy. Raman spectroscopy is a biophysical method by which the spectral signature of a biochemical compound is identified after the interaction of the element with an incident beam from a laser. The drawback of this technique applied to biomolecular compounds is the reduced efficiency of the process, due to the reduced intensity of the resulting spectrum. To counter this limitation, new variants of Raman spectroscopy have emerged, such as Surface Enhanced Raman spectroscopy, which amplifies the biomolecular fingerprint of the analyte up to 10^{11} folds by adding a colloidal gold or silver compound to the analyte substrate. Until now, exosomes have not been identified by such a method, but biomolecular fingerprints of salivary exosomes have been observed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR).

PERSONAL CONTRIBUTION

Work hypothesis

Knowing the technological innovations by which various biophysical and biochemical methods that detect the fingerprint of malignant tumors, a search in the specialized literature was carried out to identify biomolecular fingerprints of oral and oropharyngeal squamous carcinomas in saliva. Thus, the first two studies aimed to be a

documented promoter from the specialized literature for the following clinical-fundamental studies, shaping in this way the further research methodology.

The first study objectives were to evaluate the ability of Raman spectroscopy to detect markers of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in saliva and to identify a variant of Raman spectroscopy that could be applied to a potential biopsy fluid.

In the second study, a literature search was conducted to investigate exosomes from the saliva of oral and oropharyngeal cancer patients regarding isolation and characterization methods, as well as the identification of stable biomarkers of these cancers present in the exosomes.

Based on these two systematic literature reviews, the following three studies aimed to evaluate salivary exosomes, salivary exosomal microRNAs, and the ability of Surface-Enhanced Raman spectroscopy (SERS) to detect oral and oropharyngeal carcinomas in saliva samples.

Study number three aimed to evaluate the whole saliva Raman spectra and to detect modification of the biochemical elements predominantly present in samples from cancer patients.

In the fourth study, we aimed to evaluate the salivary exosomes from the target population and the ability of the exosomal microRNAs miR-486-5p and miR-10b-5p to detect oral and oropharyngeal squamous carcinoma, as well as the influence that the histopathological features of the tumors may induce to the expression of these microRNAs.

The latter study focused on the detection of salivary exosomes using SERS and the evaluation of the ability of SERS spectra of salivary exosomes to detect oral and oropharyngeal cancer.

General methodology

For the systematic analysis of the literature, the PRISMA protocol for systematic reviews and meta-analyses was used in the international Pubmed and Google Scholar (Academic) databases.

The clinical-fundamental studies were carried out after obtaining the approvals of the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, in accordance with the Declaration of Helsinki and its updates.

For the clinical studies, subjects who addressed the departments of Oral and Maxillofacial Surgery and Otorhinolaryngology of the Cluj-Napoca County Emergency Hospital between 2020 and 2021, with a histopathological diagnosis of squamous cell carcinoma, were included in the group of oral and oropharyngeal cancer patients. The control group included healthy volunteer patients who were referred to the Department of Oral and Maxillofacial Surgery for dental extractions. Subjects with a history of cancer, previous treatment with radiotherapy or chemotherapy, and those with acute infections at the time of clinical examination by a maxillofacial specialist were excluded from the study. All patients signed the written informed consent,

approved by the ethics committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Malignant lesions were staged according to the 8th American Joint Cancer Committee classification. Demographic data, as well as alcohol consumption and smoking index, were collected from the medical record and from the patients' anamnesis, and the histopathological examination was provided by the Department of Pathology of the Cluj County Emergency Hospital.

Saliva samples collected from subjects included in the study were obtained before any therapeutic intervention. A passive saliva collection protocol was applied in the morning between 7:00 and 10:00, 15 minutes after rinsing the oral cavity with water. Patients were instructed to passively express saliva, into a sterile container specially designed for saliva collection, and not to cough or forcefully spit saliva, to collect only unstimulated saliva. An amount of saliva ranging from 0.8 to 1.6 ml was collected from each subject. The samples were frozen at -20°C Celsius for a maximum of 1 week and then stored at -80°C Celsius until further processing.

Integral saliva was analyzed at the National Research-Development Institute for Isotopic and Molecular Technologies, through a protocol described in detail in the study "Study 3. Rapid and non-invasive diagnosis of oral and oropharyngeal cancer based on Micro-Raman and FT-IR spectrum of saliva". Briefly, the fluid was centrifuged at 9000 g and 10°C for 20 min to remove epithelial cells and other debris, thus obtaining purified saliva. The samples were subsequently investigated using both micro-Raman and FT-IR spectroscopic techniques, and the spectra were statistically analyzed using chemometric methods.

The evaluation of salivary exosomes was carried out in the Genomics Center of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca. The exact description of the method can be found in the study "Study 4. Detection of oral and oropharyngeal cancer using exosomal microRNA-486-5p and microRNA-10b-5p from saliva". Briefly, exosomes were isolated using the differential ultracentrifugation technique, which involves a series of centrifugations at different speeds and time intervals. Characterization of exosomes was performed using the NanoSight instrument, thus obtaining the size and distribution of particles in solution.

Later, the Raman analysis of salivary exosomes was carried out at the Medfuture Center of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, through a Surface Enhanced Raman Spectroscopy examination protocol using colloidal silver nanoparticles on a solid surface. The technique is described in detail in the study "Study 5. A new method of detecting oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma by multivariate analysis by Surface Enhanced Raman Spectroscopy of salivary exosomes".

Finally, the examination of exosomal microRNAs was performed at the Genomics Center of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca by molecular methods described in the study "Study 4. Detection of oral and oropharyngeal cancer using exosomal microRNA-486-5p and microRNA-10b-5p from saliva". qRT-PCR was used to quantify gene expression.

Study 1. Salivary exosomal microRNAs as biomarkers for head and neck cancer detection—a literature review

Salivary exosomes can be successfully isolated from the saliva of oral and oropharyngeal cancer patients using ultracentrifugation. However, there are other methods, such as filters or kits, but these have the disadvantage of increased costs and the lack of predictability of exosomes concentration assessment. When characterizing exosomes from cancer patient samples, an increase in the concentration and size of exosomes was observed compared to groups of healthy patients. Characterization can also be done using Transmission Electron Microscopy, Flow-Cytometry or Western-Blot analysis.

Extraction of microRNAs from isolated exosomes is done using kits. Changes in the expression of microRNAs miR-4484 and miR-1246 in oral lichen planus and miR-10B-5p, miR-486-5p, miR-486-3p, miR-302b-3p, miR-517-3p were observed, miR-512-3p, miR-412-3p, miR-24-3p, miR-134 and miR-200a in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. miR-10b-5p and miR-486-5p were of particular interest.

Study 2. Raman Spectroscopy Raman in oral and oropharyngeal cancer: systematic review of literature

Detection of oral and oropharyngeal cancer based on Raman examination has been intensively studied since 2015, but most of these articles in the specialized literature included a limited number of subjects. Raman spectroscopy may be useful in the detection of oral and oropharyngeal carcinoma, histopathological differentiation, evaluation of disease recurrence, and treatment efficacy.

The investigation of malignant lesions can be done *ex vivo* on tumor tissue or biological fluids such as blood, saliva, or urine, as well as on exfoliated cells. Also, Raman spectroscopy techniques can be used *in vivo* or experimentally *in vitro*.

Biochemical fingerprints associated with oral and oropharyngeal carcinoma were evaluated in the spectral fingerprint region and in the high wave region. Proteins, lipids, and nucleic acids have been indicated by most studies as the main discriminators for the diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma,

An increase in Raman signal intensity for proteins, nucleic acids, and water and a decrease in intensity for lipids and carotenoids was found in cancer samples regardless of biophysical technique or sample type.

Study 3. Rapid and noninvasive diagnosis of oral and oropharyngeal cancer based on micro-Raman and FT-IR spectra of saliva

The intensity of Raman spectra varies in oral and oropharyngeal cancer patient samples compared to healthy subjects. An increase in the bands located at 530, 754, 927, 1448, and 2064 cm^{-1} was observed in the control group compared to those of the cancer group, which are attributed to the compounds of lysozyme, tryptophan, glycoproteins, and salivary thiocyanate. Higher peak values of the 1001 and 1665 cm^{-1} bands were detected in cancer samples, being associated with phenylalanine and amide I in proteins. In the high-wavelength spectral region for the thiocyanate absorption band at 2064 cm^{-1} , the calculated area of this band was 1.91 times greater in the control samples than in the cancer samples.

On statistical analysis by PCA and PCA-LDA of the data set required to discriminate between the Raman spectra obtained from control and cancer saliva samples, a differentiation between the two groups was obtained. The first 10 PCs resulting from PCA, which accounted for 93.6% of the total variation in the data set, were used as input data for PCA-LDA classification. Correct classification rates for cancer patients and control volunteers were 90% and 92.5%, respectively. The overall accuracy was 91%. Cross-validation was used to test the PCA-LDA model and showed that the classification rates for the training data were 89% for the cancer spectra and 91% for the control ones.

Study 4. Salivary Exosomal MicroRNA-486-5p and MicroRNA-10b-5p in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

This study enrolled 50 patients (25 patients in the cancer group and 25 in the control group), with a mean age of 59 ± 9 years in the cancer group and 54 ± 14 years in the control group, with no statistical difference between groups.

Even though the results did not show statistical significance, it was observed that the exosome population of the tumor sample was more heterogeneous and larger in size compared to the control group.

The expression of miR-10b-5p was decreased and the expression of miR-486-5p was increased in the samples from the cancer group compared to the control samples. MiR-486-5p had higher expression in oropharyngeal cancer compared to oral cavity cancer. The expression of miR-486-5p was observed to be higher in G1 squamous cell carcinoma compared to G3, and miR-10b-5p showed a reduction in expression in G2 and an increase in expression in G1 and G3. MiRs were differentially expressed in non-keratinizing squamous cell carcinoma: miR-10b-5p was downregulated and miR-486-5p was upregulated.

The ROC curves express the sensitivity and specificity for each miRNA, with the AUC indicating the discriminatory power of the biomarker. MiR-486-5p and miR-10b-5p showed relative AUCs of 0.72 and 0.59 for the identification of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.

Study 5. A new detection method of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma based on multivariate analysis of Surface Enhanced Raman Spectra of salivary exosomes

Salivary exosomes express Raman spectra in SERS analysis by their components.

The average SERS spectra of exosomes samples isolated from controls and cancer patients showed significant differences between the two groups at wavelengths 350, 700, 960, 1170, 1320, and 1500 cm^{-1} , but especially in the range of 1740 -2540 cm^{-1} . All spectra were collected under identical experimental conditions. The vast majority of vibrational bands are generally attributed to nucleic acids, proteins, and lipids. The most intense vibrational band (2110 cm^{-1}) observed in both groups can be assigned to thiocyanate, with a nearly double peak of the band in the control compared to cancer samples.

In the multivariate analysis by PCA, discrimination between the two groups of up to 99.04% was observed using the first 19 principal components. The PCA-LDA analysis obtained a sensitivity and specificity of 75.9% and 66.7%, with an AUC of 73.6% and a test precision of 71.0%.

General conclusions

Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma produces various biomarkers that signal its presence in saliva. Exosomes are biomolecules with a particularly important role in the local and distant spread of squamous cell carcinoma and can be detected by non-invasive saliva-based biophysical and biochemical methods. They are found as a heterogeneous population, with increased size and concentration in the saliva of patients with oral and oropharyngeal cancer compared to the saliva of healthy patients. Furthermore, exosomes exhibit a characteristic Raman spectral signature identifiable by SERS examination on a plasmonic silver nanoparticle support.

Exosomes contain nucleic material, particularly microRNA, which is found in increased amounts in salivary exosomes compared to free microRNA in blood or saliva, due to the lipid coating of exosomes that protects it from enzymatic degradation by ribonucleases. microRNA-486-5p and microRNA-10b-5p show altered expressions in oral and oropharyngeal cancer, which are influenced by different tumor characteristics such as location, keratinization, or degree of differentiation. microRNA-486-5p is overexpressed in the early II stage of cancer.

Saliva is a complex biological fluid that encompasses various biomarkers of malignancy. These biomarkers provide a characteristic Raman spectrum of global saliva analyzed by various Raman spectroscopy methods. Thus, saliva presents itself as a biological fluid with potential for biopsy fluid.

Chemometric statistical analysis methods are necessary to process a very large dataset generated by Raman spectroscopy analysis of whole saliva or some salivary components associated with oral and oropharyngeal squamous carcinoma, such as exosomes. With the help of these methods, a cancer detection accuracy of 71% could be achieved in the Raman analysis of salivary exosomes.