



ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

PROTEÍNAS SALIVARES COMO BIOMARCADORES PARA O CANCRO ORAL

Samuel Armando Leça Oliveira

PORTO
2013



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

PROTEÍNAS SALIVARES COMO BIOMARCADORES PARA O CANCRO ORAL

Samuel Armando Leça Oliveira

*Aluno do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária
mimd08011@fmd.up.pt*

Monografia apresentada à Faculdade de
Medicina Dentária da Universidade do Porto no
âmbito da unidade curricular “Monografia de
Investigação” do Mestrado Integrado em
Medicina Dentária

Orientador

João Miguel Silva e Costa Rodrigues

*Professor auxiliar convidado, regente das
disciplinas de Bioquímica I e II do MIDM da FMDUP*

PORTO
2013

Resumo

O cancro oral é um flagelo comum, podendo passar despercebido devido às suas características clínicas, que podem ser confundidas com outro tipo de lesões benignas. É, por isso, frequentemente detetado num estado avançado, apresentando elevadas taxas de mortalidade. O objetivo deste trabalho é de recolher as informações mais relevantes acerca dos biomarcadores salivares do cancro oral que permitam um diagnóstico precoce. Para tal, foram procurados e analisados diversos artigos científicos indexados na base de dados online *PubMed*. Os resultados obtidos foram promissores, existindo diversas proteínas salivares capazes de detetar com elevada eficácia a presença de neoplasias orais em estados precoces, através da sua análise individual ou em conjunto com outros biomarcadores. Contudo, são necessários mais estudos com um maior número de participantes, de modo a validar um conjunto de biomarcadores e procedimentos de análise que possam ser utilizados universalmente por todos os profissionais de saúde.

Palavras-chave: cancro oral, carcinoma epidermóide, saliva, biomarcadores, proteínas salivares, defensina, interleucina, citoqueratina, cd44

Abstract

Oral cancer is a common scourge that may go largely unnoticed due to its clinical characteristics, which can be easily mistaken with other types of benign lesions. Therefore, it's often detected in an advanced stage, presenting a high mortality rate. This essay's goal is to gather the most relevant information about salivary biomarkers for oral cancer that allows early diagnosis. Several scientific articles indexed in PubMed online database were searched and analyzed. The results were promising, several salivary proteins were found capable of detecting with high efficacy the presence of oral cancer in early states, through their individual analysis or in conjunction with other biomarkers. Nonetheless, further studies with a larger number of participants are needed, in order to validate a set of biomarkers and analysis procedures that can be universally used by all healthcare professionals.

Keywords: oral cancer, squamous cell carcinoma, saliva, biomarker, salivary proteins, defensin, interleukin, cytokeratin, cd44

Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Rodrigues por toda a ajuda, orientação, disponibilidade e apoio na realização deste trabalho,

À minha família por todo o apoio incondicional:

- *à minha mãe Ana Leça por todo o esforço e força para permitir que a minha formação fosse possível,*
- *a minha irmã por me suportar nos melhores e piores momentos,*
- *à Tia Céu e ao Zé Carlos por todo o apoio incondicional e por fazerem com a que a vida tenha outra cor,*
- *ao Tio Nel por me inculir o prazer do conhecimento desde cedo,*
- *à Calu por ouvir as minhas queixas e por mostrar o que é ter força interior.*

Aos meus amigos pelas experiências vividas:

- *ao Super Grupo por uma amizade que permitiu que a vida académica fosse muito mais que estudo,*
- *aos meus binómios pela ajuda e por me estarem sempre a “buscar” material,*
- *à Tis pela amizade e por proporcionar as melhores boleias de sempre com sonhos loucos à mistura,*
- *ao Paulo e à Ana pela amizade de tantos anos e por terem escolhido profissões que proporcionam histórias ainda mais caricatas que as minhas.*

Aos funcionários da FMDUP, por muitas horas de convívio, risos e entreajuda, fazendo com que estes anos fossem passados da melhor maneira possível.

Índice

1. Introdução	2
2. Materiais e Métodos	8
3. A Saliva.....	8
3.1 Composição.....	8
3.2 Reflexo das condições sistémicas e vantagens como método de análise	10
3.3 Colheita	11
3.4 Armazenamento	12
4. Biomarcadores.....	13
4.1 Uso no diagnóstico de Cancro Oral.....	14
4.2 Validação e uso prático como método de análise.....	15
4.3 Proteínas na saliva.....	16
4.3.1 Interleucinas 6 e 8	21
4.3.2 Defensinas	22
4.3.3 Citoqueratina	23
4.3.4 CD 44	25
4.4 Genética salivar	26
5. Conclusão.....	28
6. Referências Bibliográficas	29
7. Anexos.....	38

Índice de Tabelas

Tabela I- Incidência, Mortalidade e Prevalência dos vários tipos de cancro em Portugal	3
Tabela II- Taxas padronizadas de cancro do lábio e cavidade oral na Europa	4
Tabela III- Alterações histológicas e moleculares no desenvolvimento do OSCC	6
Tabela IV- Proteínas presentes na composição salivar e suas funções	9
Tabela V- Proteínas e moléculas alteradas no desenvolvimento de OSCC	17
Tabela VI- Biomarcadores associados à classificação histopatológica do OSCC	19

Índice de Figuras

Figura 1 - Taxa de incidência e mortalidade dos tipos de cancro em Portugal	2
Figura 2 - Incidência padronizada por idade do cancro do lábio e cavidade oral na Europa	5
Figura 3 - Método Salivette® para recolha de saliva	12
Figura 4- Fases de validação clínica para biomarcadores	15
Figura 5- Comparação da concentração da IL-8 salivar entre pacientes com OSCC, pacientes com lesões pré-cancerosas e do grupo de controlo	21
Figura 6- Concentrações de Cyfra 21-1 salivar em pacientes com OSCC e saudáveis	24
Figura 7 – Concentrações salivares de biomarcadores em pacientes saudáveis e com OSCC	26

Abreviaturas:

- **ASR** (Age-standardised Rate) – Taxa Padronizada por Idade
- **CK19** – Citoqueratina 19
- **CXPA** (Carcinoma ex pleomorphic adenoma) - Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
- **EDRN** - *Early Detection Research Network*
- **ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- **FDA** – *Food and Drug Administration*
- **hBDs** (human β -defensins) - β -defensinas humanas
- **HBV** (Hepatitis B Virus) – Vírus da Hepatite B
- **HIF-1- α** (Hypoxia-inducible factor 1- α) – Subunidade α do fator 1 induzido por hipoxia
- **HIV** (Human Immunodeficiency Virus type 1) – Vírus da Imunodeficiência Humana
- **HNP-1** (Human Neutrophil Peptide 1) - α -defensina humana
- **HNSCC** (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) – Carcinoma Epidermóide da Cabeça e Pescoço
- **HPV** (Human Papilloma Virus) – Vírus do Papiloma Humano
- **HSP** (Human Saliva Proteome) - Proteoma Salivar Humano
- **MAGE-A12** (Melanoma-associated antigen 12) – Antígeno 12 associado a melanoma
- **MeSH** - *Medical Subject Headings*
- **MnSOD-2** (Manganese Superoxide Dismutase) – Superóxido Dismutase
- **OSCC** (Oral Squamous Cell Carcinoma) – Carcinoma Epidermóide Oral
- **PRP** (Proline rich protein) – Proteína rica em prolina
- **qRT-PCR** – *Reverse transcription polymerase chain reaction combined technique*
- **RHAAM** (Hyaluronan-mediated motility receptor) – Recetor de motilidade associado ao ácido hialurónico
- **RP-HPLC** (Reversed Phase High-performance liquid chromatography) – Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa
- **SL** – Glândula Sublingual
- **SM** – Glândula Submandibular
- **TFF** - *Trefoil factor*

1. Introdução

O cancro oral é um dos mais comuns no mundo, sendo mais frequente em pacientes que apresentem alto índice de consumo de tabaco, bebidas alcoólicas e exposição ao vírus do papiloma humano (HPV) tipos 16 e 18. [1-4] Nos Estados Unidos da América, para o ano de 2013 são previstos 41.000 novos casos de cancro na cavidade oral e faringe, dos quais 7.800 resultarão em morte. [5] Em Portugal, dados de 2008 mostram que as neoplasias do lábio e cavidade oral foram responsáveis pela morte de cerca de 350 pessoas anualmente, com uma incidência de 1025 novos casos anuais. A situação torna-se mais preocupante analisando o panorama europeu, onde Portugal figura em sexto lugar na classificação de países com maior incidência desta patologia. [6, 7] A taxa de incidência é duas vezes mais elevada em pessoas do sexo masculino do que feminino. Durante 4 anos, de 2005 a 2009, a taxa de incidência manteve-se estável nos pacientes de sexo masculino, diminuindo a um ritmo de 0,9% por ano nas mulheres. Contudo, nos Estados Unidos da América, estudos mais recentes mostraram que a incidência está a aumentar para cancros da orofaringe associados ao HPV. [5]

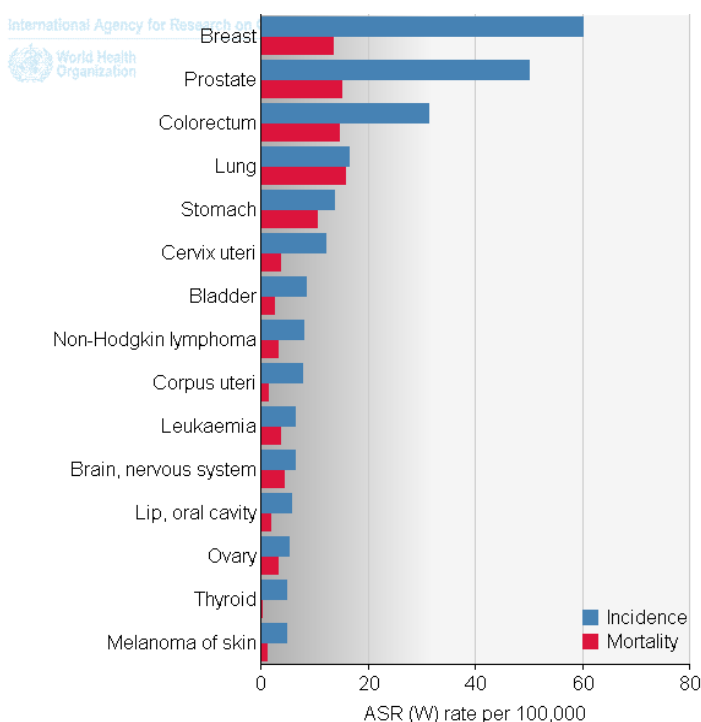


Figura 1 - Taxa de incidência e mortalidade dos tipos de cancro em Portugal (Globocan, 2008)

O tipo de cancro mais comum na cavidade oral é o carcinoma epidermóide, OSCC - *Oral Squamous Cell Carcinoma* na sigla anglo-saxónica, perfazendo 95% dos casos. A restante percentagem é composta por adenocarcinomas com origem nas glândulas salivares, melanomas e outros tipos mais raros. O carcinoma epidermóide pode formar-se em qualquer parte da cavidade oral, contudo existem locais onde este se forma com mais frequência, tais como a superfície ventral da língua, o pavimento da boca, lábio inferior,

palato mole e gengiva. Morfologicamente, nos estados iniciais o cancro apresenta-se em forma de placas firmes e elevadas ou como áreas de mucosa espessa irregular, áspera ou verrugosa, sendo facilmente confundida com uma leucoplasia. Há medida que estas lesões progridem, criam massas ulceradas e salientes com bordos irregulares. Histologicamente estas lesões apresentam-

se como displasias que podem tornar-se carcinoma *in situ* – uma displasia que afeta toda a espessura da mucosa - antes de invadir o tecido conjuntivo. O carcinoma apresenta uma multiplicidade de comportamentos e características, podendo ir de neoplasias queratinizantes bem diferenciadas a tumores anaplásicos, de lenta ou rápida progressão. Os tumores têm tendência a infiltrar-se localmente antes de metastizarem para outros locais tais como os nódulos linfáticos cervicais, ou para órgãos mais distantes tais como os pulmões, fígado, ossos e nódulos linfáticos do mediastino.^[8]

Tabela I- Incidência, Mortalidade e Prevalência dos vários tipos de cancro em Portugal. (GLOBOCAN, 2008)

Tipo de Cancro	Incidência			Mortalidade			Prevalência a 5 anos		
	Número	(%)	ASR	Número	(%)	ASR	Número	(%)	Prop.
Coloretal	6952	16.1	31.4	3691	15.2	14.6	19126	16.3	211.6
Mama	5333	12.3	60.0	1537	6.3	13.5	21272	18.2	451.7
Próstata	5140	11.9	50.1	2021	8.3	15.2	19440	16.6	449.2
Pulmão	3288	7.6	16.4	3319	13.7	15.8	3771	3.2	41.7
Estômago	2889	6.7	13.7	2423	10.0	10.4	4814	4.1	53.3
Bexiga	1935	4.5	8.5	721	3.0	2.5	5915	5.0	65.4
Linfoma não-Hodgkin	1476	3.4	8.0	697	2.9	3.1	3934	3.4	43.5
Leucemia	1087	2.5	6.5	784	3.2	3.7	2426	2.1	26.9
Lábio e cavidade oral	1025	2.4	5.8	341	1.4	1.8	2681	2.3	29.7
Cérebro e Sistema Nervoso	989	2.3	6.3	753	3.1	4.3	1142	1.0	12.6
Colo do Útero	949	2.2	12.2	346	1.4	3.6	3097	2.6	65.8
Corpo do Útero	852	2.0	7.7	199	0.8	1.4	3003	2.6	63.8
Pâncreas	807	1.9	3.7	1064	4.4	4.5	524	0.4	5.8
Melanoma da Pele	799	1.8	4.7	219	0.9	1.1	2905	2.5	32.2
Rim	691	1.6	3.8	347	1.4	1.4	2130	1.8	23.6
Tiroide	635	1.5	4.8	66	0.3	0.3	2739	2.3	30.3
Esôfago	634	1.5	3.5	607	2.5	3.2	716	0.6	7.9
Laringe	612	1.4	3.5	416	1.7	2.2	1833	1.6	20.3
Todos os cancros (excluindo melanoma da pele)	43284	100.0	223.2	24302	100.0	106.3	117186	100.0	1296.8

Valores de incidência e mortalidade para todas as idades. Prevalência a 5 anos apenas para a população adulta. Age-standardised Rate (ASR) mundial e proporções por cada 100,000 pessoas

Tabela II- Taxas padronizadas de cancro do lábio e cavidade oral na Europa, por cada 100.000 pessoas. (GLOBOCAN, 2008) ^[6]

1	Hungria	9.40	21	Malta	4.26
2	Espanha	6.67	22	Sérvia	4.22
3	Albânia	6.66	23	Polónia	4.16
4	Eslováquia	6.35	24	Moldova	4.10
5	Luxemburgo	6.09	25	Itália	4.03
6	Portugal	5.79	26	Alemanha	3.97
7	França (metropolitana)	5.68	27	Bulgária	3.93
8	Bélgica	5.53	28	Noruega	3.77
9	Croácia	5.40	29	Finlândia	3.73
10	Montenegro	5.36	30	Irlanda	3.72
11	Dinamarca	5.28	31	Suécia	3.69
12	Rússia	4.82	32	Reino Unido	3.63
13	Roménia	4.81	33	Suíça	3.58
14	Estónia	4.78	34	Áustria	3.51
15	Ucrânia	4.67	35	Macedónia	3.43
16	Bielorrússia	4.66	36	Bósnia-Herzegovina	3.37
17	Eslovénia	4.66	37	Letónia	2.97
18	Países Baixos	4.66	38	Islândia	2.54
19	Rep. Checa	4.52	39	Chipre	2.00
20	Lituânia	4.40	40	Grécia	1.76

As neoplasias da cabeça e do pescoço são classificadas com um estadiamento de I a IV baseada na classificação da American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis-staging system. ^[9]

Quando descoberto no seu primeiro estado (I), sem invasão dos nódulos linfáticos e tecidos adjacentes, o cancro oral tem uma taxa de sobrevivência a 5 anos de aproximadamente 82%. Quando existe envolvimento dos nódulos linfáticos ou tecidos adjacentes (estado II), esta percentagem é de 57%. Num estado mais avançado (III e IV), com envolvimento de

outros órgãos esta percentagem é tão baixa como 30%. ^[5, 10] A sobrevivência também é marcadamente diminuída aquando da formação de diversos tumores primários – a taxa de formação de novos tumores primários nesta patologia está entre 3% a 7% por ano, mais alta do que qualquer outro cancro maligno. ^[11] Múltiplos tumores primários desenvolvem-se independentemente no trato aerodigestivo superior como resultado de anos de exposição crónica da mucosa a componentes cancerígenos. Devido a este fenómeno conhecido como “*field cancerization*”, um indivíduo que sobreviva 5 anos após a descoberta e tratamento do seu tumor inicial, tem 35% de probabilidade de desenvolver um novo tumor primário durante esse período. ^[12] A taxa de sobrevivência após a descoberta do primeiro tumor é alta, desde que seja descoberto no estado inicial, mas em indivíduos que desenvolvam mais tumores primários a taxa de mortalidade é elevada, sendo a principal causa de morte em pacientes com esta doença. ^[13]

De acordo com a maioria dos autores, a taxa de sobrevivência de pacientes com este tipo de patologia não sofreu alterações significativas nas últimas décadas ^[1, 14, 15], ao contrário da Sociedade Americana de Cancro, que afirma que a taxa de mortalidade tem vindo a diminuir lentamente, com uma diminuição mais expressiva nos anos de 2005 a 2009. ^[5]

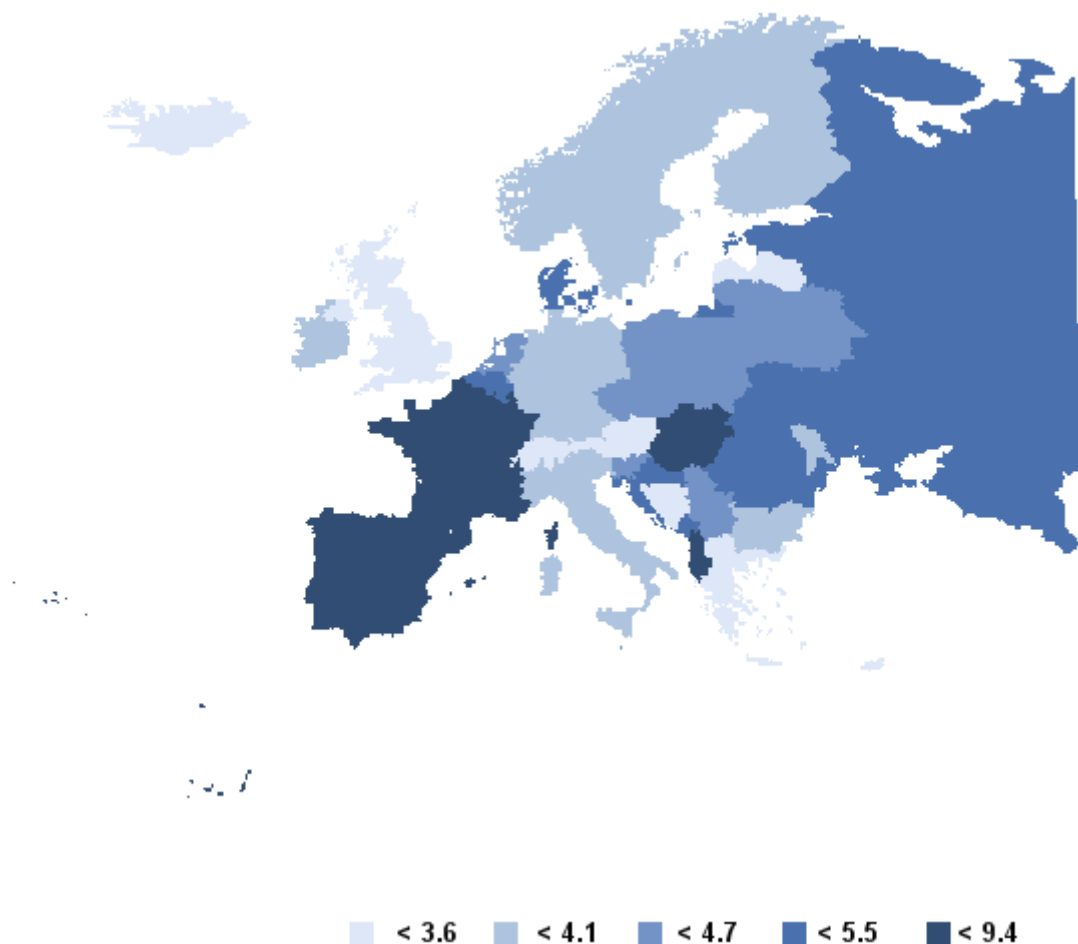


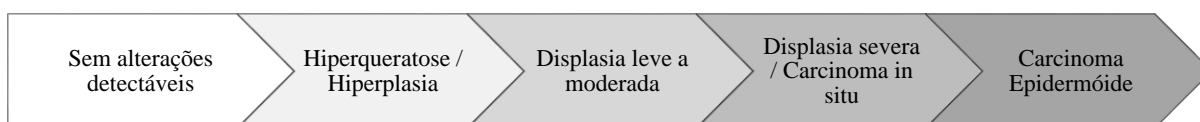
Figura 2 - Incidência padronizada por idade do cancro do lábio e cavidade oral na Europa. Dados por 100.000 pessoas, sem distinção de gênero ou idade. (GLOBOCAN, 2008)

A patogénese do carcinoma epidermóide é multifatorial, estando associado a uma utilização crónica de tabaco e álcool, sendo que pessoas que simultaneamente fumam e ingerem bebidas alcoólicas têm um risco aumentado devido ao efeito sinérgico que estes dois fatores apresentam no desenvolvimento da doença. O HPV (tipos 16 e 18) também está implicado no desenvolvimento.^[16] Devido à cronicidade destes hábitos, o carcinoma epidermóide é considerada uma doença de indivíduos de meia-idade.^[17] Além do tabaco e álcool, existem evidências que apontam para um risco aumentado em pacientes com história familiar de carcinoma oral, devido a uma instabilidade genética herdada.^[18] Fumar cachimbo e a radiação actínica também se apresentam como fatores para o cancro localizado no lábio inferior.^[8] A nível molecular, a evolução da doença envolve a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais numa dada população celular. Embora não tenham sido descobertas todas as alterações genéticas envolvidas no processo de carcinogénese, *Mao et al.* determinaram

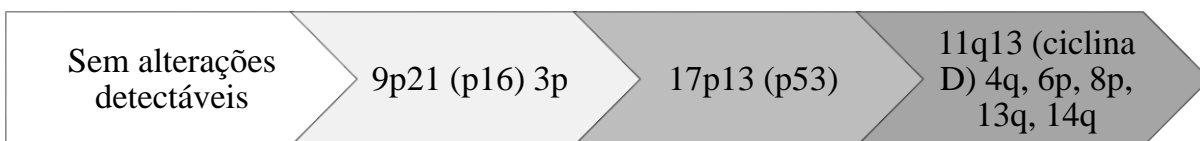
um modelo molecular do desenvolvimento da neoplasia, começando com a perda de informação genética de 3p e 9p21. ^[19] A inibição do gene p16, uma cinase dependente de ciclina, resulta da perda de heterozigosidade em conjunto com a hipermetilação do promotor. A nível histológico, esta alteração manifesta-se na passagem de um tecido normal para uma hiperqueratose ou hiperplasia, sem ocorrer displasia. A perda de heterozigosidade a nível de 17p com a subsequente mutação de p53, um importante supressor tumoral, leva a que ocorra a displasia. ^[20]

Tabela III- Alterações histológicas e moleculares no desenvolvimento do OSCC (Robbins and Cotran, 2010)

Alterações histológicas



Alterações moleculares



De acordo com *Rosin et al.*, alterações genéticas graves bem como deleções em 4q, 6p, 8p, 11q, 13q, e 14q podem ser usadas como um bom fator de progressão para malignidade. ^[21] Segundo alguns estudos, em estados avançados de displasia, a amplificação e sobre-expressão do gene da ciclina D1, que ativa constitutivamente a progressão do ciclo celular, localizado no cromossoma 11q13 confere à célula uma capacidade invasiva. ^[22]

A taxa de sobrevivência e o prognóstico dos pacientes dependem da altura em que a lesão é detetada, sendo que quanto mais precoce o diagnóstico é efetuado melhor o prognóstico. ^[2, 17, 23-26] Os indicadores tradicionais de prognóstico incluem o tamanho do tumor, estadiamento, idade, estado dos recetores esteroides, estado de menopausa, entre outros. O sistema de estadiamento histológico tem sido utilizado durante várias décadas classificando o OSCC como altamente diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado, prevendo o seu comportamento clínico. Contudo, esta classificação baseada na diferenciação ou maturação das

células tumorais em cooperação com indicadores fisiológicos para prognóstico continua a ser insatisfatória.^[27, 28]

Atualmente, a detecção do OSCC é clínica, baseando-se no exame do trato aéreo superior e em análises histológicas, contudo pode passar despercebido e até mesmo indetetável em locais pouco acessíveis tais como as criptas da base da língua ou amígdalas.^[26, 29, 30] Além do mais, a análise histológica pressupõe a ocorrência de três eventos separados: o exame oral para detetar a lesão suspeita; a biópsia ou o esfregaço e por último a análise patológica.^[15] Pelo contrário, a análise de substâncias salivares cuja concentração se altera mediante a presença de patologia apresenta-se como sendo um método simples e não invasivo para fazer um diagnóstico precoce do cancro oral, ajudando também a analisar a progressão da doença e respostas a tratamentos efetuados.^[31] Tais substâncias são denominadas por biomarcadores, discutidos em detalhe na seção 4.^[32]

A falta de um conjunto de biomarcadores salivares estandardizado para a detecção precoce do cancro oral, bem como a falta de um método padrão de análise, são os principais problemas que se colocam no desenvolvimento deste método de diagnóstico.^[15] Bastantes diagnósticos baseados em análises moleculares com diferentes graus de especificidade e sensibilidade foram usados para detetar o OSCC, entre eles marcadores de ADN, instabilidade de microssatélites, a presença do HPV e detecção de sequências genómicas do vírus Epstein-Barr.^[33-36] A análise de microssatélites revela-se promissora, tendo sido encontrado um painel de 23 marcadores capazes de identificar o OSCC em 79% dos pacientes analisados. Contudo, a análise de microssatélites não é sensível e necessita de uma grande quantidade de ADN tumoral, normalmente na relação de 1 célula tumoral para 200 saudáveis, além de ser necessária uma grande quantidade de biomarcadores, o que torna difícil a execução do teste em vários pacientes.^[37-40] Entre outros biomarcadores, destacam-se as proteínas libertadas para o fluido salivar pelas células tumorais, entre elas a CD44, fragmentos de citoqueratina 19 e níveis de telomerase.^[41, 42]

2. Materiais e Métodos

A base de dados PUBMED foi a utilizada para procurar os artigos relevantes para esta revisão bibliográfica, sendo utilizados termos MeSH e palavras de modo a pesquisar na extensa base de dados. A fórmula de pesquisa foi “(Saliva AND Biomarker) AND (OSCC OR "Oral cancer" OR HNSCC OR "Squamous Cell Carcinoma")”;“(cytokeratin OR cyfra OR Defensin OR CD44 OR Interleukin) AND (biomarker OR marker) AND saliva AND (OSCC OR "Oral cancer" OR HNSCC OR "Squamous Cell Carcinoma" or Dysplasia)”. Nos critérios de inclusão foram aceites todos os artigos escritos nos últimos cinco anos, que associassem o cancro oral, saliva e a análise de biomarcadores. De seguida, e após análise e escolha dos biomarcadores específicos a rever, foram aceites todos os artigos que se relacionassem com as premissas pesquisadas sem qualquer restrição temporal. Foram também consultados livros contendo informação clínica sobre o cancro oral e websites que disponibilizam as estatísticas mais recentes sobre a patologia.

3. A Saliva

A saliva humana contém diversos tipos de péptidos e proteínas que desempenham variadas funções fisiológicas, tendo a particularidade de mimetizar as condições de saúde oral e sistémica, tornando-se numa ferramenta de diagnóstico clínico particularmente atrativa.^[43, 44] No passado, a literatura apenas relacionava a saliva com alterações nas estruturas da cavidade oral, como a dentição, periodonto, língua e mucosa oral.^[43] Contudo, desde o advento da eletroforese em gel bidimensional têm sido descobertas cada vez mais proteínas salivares que podem ser usadas como potenciais biomarcadores.^[45] O grande desafio reside na descoberta de biomarcadores específicos para as várias doenças entre a composição complexa da saliva e avaliar a sensibilidade e especificidade desses mesmos biomarcadores.^[46] A grande variabilidade de proteínas existentes, bem como a igualmente diversa gama de concentrações (variando de mg/ml como no caso da albumina a pg/ml no caso das citocinas) torna a análise do proteoma salivar humano (HSP) num desafio.^[32]

3.1 Composição

Os fluidos orgânicos originam-se maioritariamente nos três pares de glândulas salivares major, as parótidas, sublinguais e submandibulares, além de um grande número de glândulas salivares minor. As parótidas são compostas inteiramente por glândulas serosas uma vez que não

secretam mucina, enquanto que as sublinguais e submandibulares são classificadas como sendo glândulas muco-serosas. No grupo das glândulas minor encontramos as glândulas de Von Ebner e as glândulas linguais anteriores. [47]

Noventa e nove por cento da saliva é composta por água, sendo que a concentração dos componentes sólidos dissolvidos varia de pessoa para pessoa podendo até mesmo variar no próprio indivíduo durante alturas distintas do dia. As espécies inorgânicas são compostas principalmente por íons fortes e fracos incluindo Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , HPO_3^{2-} , HCO_3^- , Mg^{2+} , e NH_3 . Os componentes orgânicos consistem principalmente em produtos da secreção corporal tais como ureia, ácido úrico e creatinina; putrescina e cadaverina em pequenas quantidades; colesterol, ácidos gordos e mais de 400 tipos diferentes de proteínas, sendo que as mais comuns encontram-se descritas na Tabela IV. [32, 48]

Tabela IV- Proteínas presentes na composição salivar e suas funções (Chiappin *et al.*, 2007)

Proteína salivar	Origem	Função	Concentração
α -amilase	Glândulas salivares	Digestão do amido	3257 ± 1682 U/ml, 1080.0 ± 135.6 IU/l, 476 ± 191 $\mu\text{g/ml}$
Albumina	Plasma	Regular a pressão osmótica do sangue	0.2 ± 0.1 mg/ml, 0.8–192 mg/dl
Cistatinas	SM (+) e SL (-)	Antimicrobiano (inibidor da cisteína-protease)	Forma 14.3 kDa 58 ± 25 $\mu\text{g/ml}$; Forma 14.2 kDa 91 ± 46 $\mu\text{g/ml}$
Histatina	Parótida	Antifúngico	1190 ± 313 $\mu\text{g/ml}$
IgA	Linfócitos B	Antimicrobiano	124.3–335.3 $\mu\text{g/ml}$
Lactoferrina	G. Mucosas (+) e G. Serosas (-)	Antimicrobiano	3.7 ± 2.5 $\mu\text{g/ml}$
Lisozima	SL (+) e SM, P (-)	Antimicrobiano	$3.5\text{--}92.0$ $\mu\text{g/ml}$, 21.8 ± 2.5 mg/dl, $59.7\text{--}1062.3$ $\mu\text{g/ml}$
Mucinas	Glândulas mucosas	Lubrificação	MUC5B: 2.4 ± 1.7 U/ml
PRP	Parótida	Ligação às bactérias e polifenóis da dieta	PRP ácidos: 456 ± 139 $\mu\text{g/ml}$ PRP básicos: 165 ± 69 $\mu\text{g/ml}$
Estaterina	Parótida e Submandibular	Impedir a precipitação de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	4.93 ± 0.61 $\mu\text{mol/l}$, 36 ± 18 $\mu\text{g/ml}$
Transferrina	Plasma	Transporte de ferro	0.58 ± 0.2 mg/dl
Total de proteínas			0.47 ± 0.19 mg/ml, 0.9 ± 0.2 mg/ml, $4.3\text{--}710.0$ mg/dl, 2.67 ± 0.54 mg/ml

3.2 Reflexo das condições sistêmicas e vantagens como método de análise

Através da análise bioquímica da saliva é possível detetar diversas condições patológicas através de diferentes métodos, tais como: infeções congénitas, virais, agentes patogénicos da doença periodontal e cárie dentária, HIV-1, HBV, presença de *Helicobacter pylori*, rubéola, dengue, através de métodos imunológicos; análise de níveis hormonais, importantes na deteção de patologias como o síndrome de Cushing, análise de estrogénio como forma de predição de parto pré-termo, além do potencial para comercialização de um auto-teste para controlar o ciclo fértil; deteção de doenças autoimunes como o síndrome de Sjögren através da deteção de citocinas específicas; predição de suscetibilidade a doenças cardiovasculares e a deteção de neoplasias malignas ou pré-malignas. [32, 44, 48]

A razão pela qual a saliva pode ser considerada um bom instrumento de análise para patologias locais (como o OSCC) e sistêmicas deve-se ao facto de apenas existir uma fina camada de epitélio a separar os ductos salivares da circulação sistémica proveniente da carótida, o que permite a transferência de substâncias do plasma sanguíneo para o fluido salivar através de transporte ativo, difusão através de membrana celular ou difusão passiva devido ao diferente gradiente de concentração.^[32] Além disso, a descamação normal que ocorre a nível do epitélio oral torna a saliva o primeiro método de eleição para o rastreio e identificação de biomarcadores para o OSCC. [30]

Comparativamente ao sangue, que contém concentrações de várias proteínas com diferentes valores e semividas variando de meros segundos a vários meses, a saliva é constitutivamente mais simples. A sua composição não é tão variada e complexa, dando uma ideia relativamente precisa do estado de saúde num determinado momento. [43] Em última análise, a saliva contém proteínas expressas localmente além de outras substâncias que podem ser usadas como biomarcadores de doenças, uma vez que a sua concentração pode variar bastante quando está presente alguma patologia. A dinâmica da cavidade oral faz com que a saliva secretada seja engolida e renovada constantemente, refletindo assim a atividade metabólica dos elementos que a secretam num dado momento. Pelo contrário, o sangue possui mais proteínas que a saliva, fazendo com que a pesquisa de biomarcadores (tais como oncogenes) resulte num maior risco de interferência não específica e uma maior probabilidade de interações hidrostáticas entre as proteínas do sangue e os biomarcadores. [43] Interferências adicionais podem ocorrer devido à natureza fisiológica do fluido sanguíneo que conecta todos os órgãos do corpo humano, sendo que os efeitos de comorbidade de uma doença podem influenciar o perfil proteico de outra. Como existe uma escassez relativamente aos efeitos de

comorbilidade na concentração de biomarcadores, esta variável pode não ter tanta influência com uma análise salivar relativamente à análise sanguínea. [43]

Desde que a saliva foi sugerida em 1990 como método fiável de diagnóstico por Mandel^[49], têm decorrido estudos com o objetivo de identificar e catalogar o proteoma do fluido oral, sendo criada a denominada “Salivary Proteome Knowledge Base”.^[50]

Além das vantagens na vertente bioquímica, a saliva é também um método barato de análise, fácil e não-invasivo, eliminando assim o custo, desconforto e dor associados à recolha de sangue e o pudor associado à recolha de urina, sendo mais fácil de armazenar. Além do mais, a colheita de saliva pode ser realizada por pessoal minimamente qualificado e quantas vezes as necessárias sem prejuízo para o paciente. [31, 32, 44, 46, 48, 51]

3.3 Colheita

A saliva pode ser colhida facilmente, porém existe um conjunto de pré-requisitos que devem ser cumpridos para que a análise subsequente reflita a realidade. Os pacientes devem ser informados que não devem escovar os dentes antes da colheita; devem evitar a ingestão de comida, líquidos (excetuando água) e pastilhas elásticas por pelo menos 30 minutos antes da colheita. Devem também bochechar a boca com água destilada antes da colheita. Se necessário podem ser adicionados aditivos específicos antes da colheita ou da análise, caso contrário as amostras podem ser congeladas antes da análise laboratorial. A padronização da colheita salivar através do cumprimento dos pré-requisitos é de suma importância, devido aos vários fatores que podem influenciar a composição e fluxo salivar. Estão disponíveis vários métodos para recolha salivar geral, recolha de fluido crevicular, saliva dos ductos salivares e transudado mucoso, apesar do método mais fácil e fiável ser a recolha do fluido salivar geral. A recolha não necessita de ser feita por especialistas, podendo ser efetuada pelo próprio paciente. [48]

A saliva não-estimulada pode ser colhida para vários contentores de fluidos orais disponíveis no mercado. Existem dois tipos de recolha deste tipo de saliva: o salivar passivo, sem movimentos orais, que permite que a saliva escorra do lábio inferior para o recipiente [52, 53] e o cuspir diretamente para o coletor. Esta última alternativa apresenta um número maior de microrganismos presentes comparativamente ao salivar passivo. [52]

A saliva estimulada pode ser obtida fazendo movimentos orais como, por exemplo, a mastigação suave, ou utilizando ácido cítrico, que apresenta o potencial de estimular a secreção salivar. Contudo, tem a desvantagem de baixar o pH salivar para < 3.0, podendo também interferir com estudos imunológicos e hormonais. [54, 55] Um método eficaz de recolher a saliva

estimulada é através da colocação de um rolo de algodão estéril na boca (por exemplo o kit Salivette® da empresa Sarstedt, reproduzido na Figura 3), sendo este mastigado durante um a dois minutos, colocado no recipiente plástico e centrifugado para recolher a saliva. Contudo, devido ao uso do algodão podem ocorrer variações em análises imunológicas e endócrinas, em que algumas substâncias ficam retidas no rolo. [48] Alternativas ao algodão como material de coleta incluem o poliestireno [56], seda artificial [57] e poliéster [58]. Contudo, o estudo efetuado por *Lu et al.* demonstra que o poliestireno e o poliéster absorvem grande parte do estrogénio presente na saliva. [59] Devido a estes problemas, existe a possibilidade de recolher a saliva estimulada através de métodos não-absorventes, tais como mascar um pedaço de cera de parafina de tamanho padronizado [60] ou mastigar uma pastilha elástica de base neutra. [43, 53] Neste caso, a pastilha é colocada na boca do paciente, pedindo a este que engula toda a saliva acumulada previamente e que comece a mastigar a um ritmo regular, podendo-se usar um metrónomo para este efeito. Quando existir uma acumulação de saliva considerável, o paciente deve expetora-la periodicamente para um copo de plástico descartável pesado *a priori* – este procedimento deve ser repetido até que se recolham cerca de 2 a 5ml de saliva. O volume e a taxa de secreção salivar devem ser apontados, juntamente com a descrição do aspeto da amostra. [43, 61]



Figura 3 - Método Salivette® para recolha de saliva. (Reprodução do catálogo da companhia Sarstedt)

3.4 Armazenamento

O método de armazenamento das amostras salivares tem influência na concentração dos seus compostos, alterando-os. [48] Após a sua colheita, as amostras de saliva devem ser colocadas em gelo, aliquotadas e congeladas o mais rapidamente possível de modo a manter a sua integridade. Se necessário deve ser também prevenido o crescimento bacteriano. A saliva contém numerosas proteases bacterianas que podem degradar proteínas salivares importantes na análise, como por exemplo a s-IgA que pode ser degradada à temperatura ambiente. [52] Também a concentração de catecolaminas pode ser alterada uma vez que estas substâncias possuem uma semivida curta e rápida degradação. [62] O método de armazenamento deve ser escolhido tendo em conta as substâncias a analisar uma vez que existem compostos salivares que permanecem estáveis durante um longo período [52] e outros que se degradam rapidamente após a colheita. Chiappin *et al.* listam os possíveis métodos de armazenamento: [48]

- a) Armazenar imediatamente as alíquotas de saliva sem processamento - as amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente quando a análise for efetuada até 90 minutos após a colheita. Quando a análise é efetuada até 6 horas após a colheita as amostras devem ser armazenadas a 4 °C. Quando a análise é efetuada mais tardiamente (de dias a meses), deve ser armazenada preferencialmente a -80 °C, apesar de também ser possível o armazenamento a -20 °C;
- b) O congelamento rápido das amostras em azoto líquido, de modo a inibir a atividade das proteases bacterianas que podem degradar compostos salivares como a s-Iga^[52] – misturar cada alíquota de saliva com um igual volume de 80% de glicerol em água, submergindo de seguida a amostra no azoto líquido;
- c) Inibir a atividade enzimática presente na saliva através da adição de inibidores enzimáticos na proporção de 10:1;
- d) Adição de azida de sódio (NaN₃) às amostras de modo a retardar o crescimento bacteriano. Contudo, a interação da azida de sódio com componentes da análise imunológica deve ser tida em consideração;^[63]
- e) Adição de ácido trifluoroacético (CF₃COOH) a 10% em solução aquosa, de modo a desnaturar enzimas salivares que podem degradar proteínas e hormonas esteroides.

4. Biomarcadores

A definição de biomarcador é variada, não existindo nenhuma que englobe adequadamente todos os seus aspetos e aplicações. A *Early Detection Research Network* (EDRN) do *National Cancer Institute* define biomarcador como sendo qualquer alteração celular, bioquímica, molecular ou genética pela qual um processo biológico normal ou patológico pode ser monitorizado e medido objetivamente, através medições resultantes de um meio biológico tal como tecidos, células ou fluidos.^[51, 64] Wagner *et al.* afirma que uma resposta fisiológica à presença de um carcinoma pode ser definida como biomarcador, tal como uma substância secretada pelo próprio carcinoma.^[65] Alterações numa sequência genética, na sua expressão, na estrutura e função da proteína daí resultante, podem ser usados para detetar cancro, determinar um prognóstico e monitorizar a progressão da doença, bem como a resposta ao tratamento. O biomarcador deve ser estável, não suscetível à indução de artefactos, não mutável durante o armazenamento, deve ser determinado por uma análise específica, sensível, reprodutiva e robusta; deve estar isento de fatores interferentes resultantes da dieta; deve ser acessível num

tecido-alvo e deve ser detetável e mensurável dentro dos limites de deteção de um método de análise considerado de confiança. [32] Idealmente, estas substâncias devem ser recolhidas no soro sanguíneo, plasma, saliva, expectoração, urina e outros fluidos corporais que permitam um método de deteção não invasivo. [51]

Novas descobertas na área da oncologia molecular e biologia do cancro demonstraram que a acumulação de alterações genéticas leva a que lesões displásicas ou neoplásicas evoluam para derivados altamente malignos – este processo não envolve apenas células tumorais mas também células normais como fibroblastos, células da imunidade inata e adaptativa, células epiteliais e células endoteliais, no microambiente tumoral. [66] Moléculas derivadas de células tumorais tais como fatores angiogénicos e quimiocinas detêm um papel importante na génese, manutenção e expansão do tumor, facto pelo qual se tornam boas candidatas a biomarcadores tumorais. [67]

4.1 Uso no diagnóstico de Cancro Oral

Apesar de terem sido publicados centenas de artigos relatando a descoberta de biomarcadores com potencial uso clínico, apenas alguns chegaram de facto a ser usados. [51, 68] Um biomarcador frequentemente usado para avaliar o OSCC é o SCC-Ag (antigénio contra o carcinoma epidermóide). [69] Existem vários fatores que o tornam fiável para usar como marcador para monitorizar o pós-operatório e detetar relapsos – a sua frequência no soro sanguíneo aumenta com o evoluir do estado clínico ou a extensão da doença, mas raramente está elevado em fases iniciais, ao mesmo tempo que pode estar elevado em patologias benignas tão banais como infeção pulmonar e disfunção renal. [70]

É pouco provável que apenas um único biomarcador seja capaz de permitir a deteção da presença de cancro devido aos grandes níveis de heterogeneidade entre grandes populações. Uma análise a um biomarcador específico pode ter, por exemplo, alta sensibilidade e pouca especificidade – o resultado irá ser positivo na maioria dos indivíduos com cancro, mas também o será em indivíduos saudáveis. Por outro lado, um biomarcador com alta especificidade e baixa sensibilidade irá ter um resultado negativo para indivíduos saudáveis mas também o fará em bastantes casos para indivíduos com cancro. [51] A EDRN desenvolveu e implementou um sistema de linhas de orientação para descobrir, avaliar e validar biomarcadores. A fase 1 inclui os estudos exploratórios para identificar potenciais biomarcadores úteis. A fase 2, chamada fase de validação, compreende o estudo dos biomarcadores em relação à sua capacidade para diferenciar casos de cancro e casos de pacientes saudáveis. Na fase 3 são utilizadas informações de amostras clínicas recolhidas longitudinalmente através de estudos de coortes, para determinar a

capacidade de um biomarcador na detecção de uma lesão cancerosa pré-clínica. Os estudos de rastreio prospetivos são considerados como parte da fase seguinte, a fase 4. Por fim, a fase 5 compreende os estudos de grande escala populacional que avaliam não apenas o papel do biomarcador para detecção de cancro, mas também o impacto geral do rastreio na população. [51, 71]

4.2 Validação e uso prático como método de análise

Para ter a credibilidade necessária para ser usada rotineiramente como método de análise, algumas lacunas devem ser devidamente preenchidas relativamente à capacidade dos biomarcadores salivares detetarem doenças sistémicas. Para a detecção precoce de patologias, vários fatores devem ser tidos em conta segundo a Organização Mundial de Saúde [72]:

- a) A patologia deve ser comum e associada a uma elevada taxa de mortalidade;
- b) O tratamento resultante do rastreio deve melhorar o prognóstico;
- c) Os potenciais benefícios devem ser maiores que os malefícios e custos do rastreio;
- d) Os métodos de rastreio devem efetivamente detetar a doença num estado precoce.

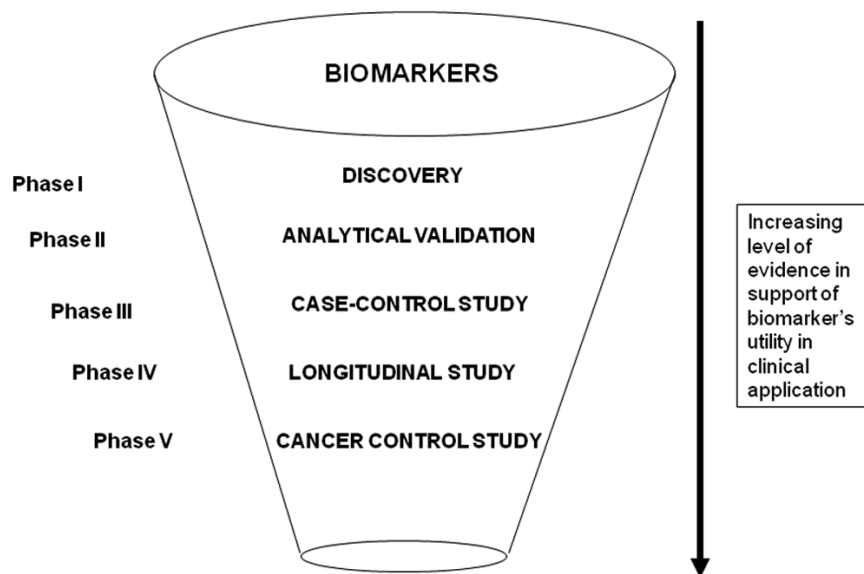


Figura 4- Fases de validação clínica para biomarcadores (Baum et al)(ERN)

A detecção de neoplasias através de biomarcadores salivares cumpre todos os critérios pedidos, sendo então um método a ter em consideração.

Um estudo clínico em larga escala conduzido por uma entidade reconhecida internacionalmente, por exemplo como a Food and Drug Administration (FDA) deveria ser

realizado de modo a comprovar a deteção de doenças sistémicas como o cancro através de biomarcadores. Caso os biomarcadores passassem nesse estudo, teriam atingido um estatuto privilegiado e regulado como método de diagnóstico não invasivo, despertando um maior interesse neste campo.^[43] Outra lacuna enquadra-se no aspeto fisiológico – de que maneira uma doença distal, como o cancro pancreático ou da mama, comunica ou sinaliza as glândulas salivares, e como pode contribuir para a alteração encontrada em determinados biomarcadores? Pensa-se que a estimulação das glândulas salivares que leva à alteração do perfil de biomarcadores ocorre devido a mediadores libertados de tumores locais ou remotos. Descobertas recentes demonstram que os biomarcadores salivares (proteicos e transcriptómicos) são contidos em exossomas libertados pelas células – pequenas vesículas com 40 a 100 nm de diâmetro – o que não só explicaria a sua estabilidade incomum na saliva, mas também forneceria um mecanismo onde estas nano-vesículas mediarium um eixo de transdução/comunicação para despoletar a libertação de conteúdos exossómicos específicos (tais como biomarcadores, constituintes moleculares de mRNA, miRNA e proteínas proto-oncogénicas e proto-angiogénicas) dirigidos a estruturas anatómicas específicas tais como as glândulas salivares. Esta capacidade de comunicação sistémica através de exossomas é exercida através de tipos celulares distintos, sendo importante na modulação do sistema imunitário bem como na oncogénese.^[51, 73, 74] Contudo, para responder a esta questão seriam necessários rigorosos estudos fisiológicos usando modelos animais. Esta abordagem permitiria responder às questões de eficiência clínica e de mecanismo fisiológico.^[43]

4.3 Proteínas na saliva

É especulado por alguns autores que as glândulas salivares podem funcionar como sensores que não só detetam mudanças na composição do plasma sanguíneo como também amplificam o sinal relacionado com as células tumorais.^[75] Esta teoria é suportada pelo facto de o primeiro biomarcador cancerígeno encontrado na saliva ter sido HER/neu, um biomarcador do cancro da mama.^[43] Com a evolução no campo da espectrometria de massa, cada vez são encontradas mais proteínas que funcionam potencialmente como biomarcadores do OSCC. Citocinas pró-angiogénicas e pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8 foram encontradas em níveis consideravelmente mais elevados em pacientes com OSCC, quando comparados com pacientes com lesões pré-malignas e pacientes do grupo de controlo.^[76] O antigénio polipéptico tecidual

(TPA, CK 8, 18, 19), o fragmento libertado pela citoqueratina 19 – cyfa 21-1 -; citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e IL-8, defensinas e anticorpos reativos a anomalias genéticas, tais como anticorpos anti-p53, foram alguns dos biomarcadores identificados tanto na saliva como no sangue de pacientes com OSCC. [30] Uma lista completa dos biomarcadores alterados em pacientes com OSCC pode ser encontrada na Tabela V.

Tabela V- Proteínas e moléculas alteradas no desenvolvimento de OSCC

Biomarcador	Função	Referência
8-OHdG	Marcador de dano no ADN	[77]
Albumina	Proteína do plasma sanguíneo	[78]
Anticorpos p53	Usado para detetar níveis aberrantes de p53	[70, 79]
Bactérias		[80]
Biomarcadores de RNA		[81]
CA 15-3	Marcador tumoral do cancro da mama	[82]
CA 72-4	Glicoproteína encontrada na superfície de células cancerígenas	[82]
CA125		Marcador tumoral do cancro do ovário
CA128	Antígeno hidrocarbonado 128	[69, 84]
CA19-9	Antígeno hidrocarbonado 19-9	[69, 84, 85]
Catalase	Enzima catalizadora da decomposição do peróxido de hidrogénio	[14]
CD44	Glicoproteína envolvida em interações intercelulares	[86]
CD59	Glicoproteína inibidora do complexo de ataque à membrana	[14]
CEA	Antígeno carcino-embriónico	[69, 81, 84, 87]
Cofilina-1	Gene do cromossoma 11	[23]
Cyfra 21-1	Fragmento da citoqueratina 19	[81, 85, 88-91]
DUSP1	Regulador mitótico	[81, 92]
EGF	Fator de crescimento epidérmico	[93]
Endotelina-1	Péptido constritor dos vasos sanguíneos	[94]
Glutationa	Antioxidante	[95]
HA3	Oncogene	[81, 92]
Hipermetilação de ADN	Inativação de genes	[1, 26, 86, 96]
IAP SCC	Inibidor da Apoptose	[89]
IGF	Fator de crescimento	[97]
IgG	Imunoglobulina	[97]

IL-1 α		[76]
IL-1 β	Quimiocinas, mediadoras da resposta inflamatória	[98]
IL-6		[4, 76, 98, 99]
IL-8		[76, 81, 98, 100]
LDH		Desidrogenase láctica, marcador de dano tecidual
LOH	Perda de heterozigidade/de regiões cromossômicas específicas	[62]
M2BP	Proteína de ligação a Mac-2	[14]
MMP-11 MMP-2	Metaloproteinases	[97]
MRP14	Proteína envolvida na regulação da progressão do ciclo celular e diferenciação celular	[14]
OAZ1	Regulador da síntese de poliamina	[81, 101]
Profilina	Proteína do turnover do citoesqueleto	[14]
Região gama da cadeia pesada da imunoglobulina		[23]
RNS	Espécies reativas de azoto	[77]
S100P	Proteína de ligação ao cálcio, regulador da mitose e diferenciação celular	[23, 81]
SAD	Adenosina deaminase salivar	[93]
SAT	Metabolismo das poliaminas	[81, 92, 101]
SCC	Antigénio associado ao CE	[69, 81, 84, 102]
Sec IgA	Imunoglobulina da mucosa	[97]
Telomerase	Formação do telómero	[103]
TFF 2 TFF 3	Proteínas expressas na mucosa gastro-intestinal	[93]
TNF- α	Citocina envolvida na inflamação sistémica	[76, 104]
TPA	Antigénio polipéptido tecidual	[85, 88, 105]
TPS	Antigénio polipéptido tecidual específico	[81, 90, 91]
Transferrina	Glicoproteína plasmática transportadora de ferro	[23]
Transtiretina	Proteína transportadora de hormona tireoideia	[23]
α -amilase	Enzima salivar	[106]
β fibrina	Proteína envolvida na coagulação	[23]

Mutações de genes específicos e/ou a sobre-expressão ou sub-expressão das proteínas resultante são frequentemente encontradas em casos de OSCC. ^[107] Esses genes podem ser objetivo de estudo de modo a separar um bom de um fraco prognóstico na altura do diagnóstico, sendo úteis também para confirmar o sucesso ou insucesso da terapia aplicada. ^[108] Os genes que estão associados à progressão histológica do OSCC podem ser usados como potencial biomarcadores predicativos do diagnóstico e prognóstico. Na Tabela VI estão descritos alguns desses biomarcadores. Os marcadores na categoria de alto risco expressos em tumores em fases mais precoces (Gx, G1 e G2) indicam que o tumor tem alta probabilidade de se tornar maligno.

Conclui-se que todos os tumores de alto risco apresentam valores aumentados de recetor do ativador de plasminogénio do tipo uroquinase, inibidor tecidual de metaloproteinase-2, trofoblasto 2, queratina 8, RHAMM. A expressão aumentada de galectina-1, trofoblasto 2, ciclina B1, CXCR4, p65, queratina 8, p21 e perda de E-caderina estão relacionados com as metástases do OSCC. Já o aumento nos valores de transcriptase inversa de telomerase humana, inibidor tecidual de metaloproteinase-2, IL-6, c-Met e sindecano-1 estão associados à recorrência do OSCC. [30] Estudos demonstram que a troca de E-caderina para N-caderina, diminuição de sindecano-1 celular em simultâneo com aumento de sindecano-1 do estroma e sobre-expressão de p63 em pacientes com OSCC estavam associados a uma menor taxa de sobrevivência. [109-112]

Tabela VI- Biomarcadores associados à classificação histopatológica do OSCC

Diferenciação das células cancerígenas	Progressão da doença	
	Baixo risco	Alto risco
Gx o grau de diferenciação não pode ser avaliado.	<ul style="list-style-type: none"> • Angiogénese e proteína p53 na região central e periférica^[107] • HIF-1-α^[113] 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Recetor do ativador de plasminogénio do tipo Uroquinase^[114, 115] ↑ Transcriptase inversa de telomerase humana^[116] ↑ Inibidor tecidual de metaloproteinase-2^[117] <ul style="list-style-type: none"> ↑ p63^[116] ↑ Queratina 8^[118] ↑ RHAMM^[119] ↑ Trofoblasto 2^[120] ↓ E-Caderina^[121] ↓ Tríade de Histidina frágil^[122] Troca de E-Caderina por N-Caderina^[110]
G1 bem diferenciado	<ul style="list-style-type: none"> • Angiogénese e proteína p53 na região central e periférica^[107] • p16, p53, e ↑Ki-67^[123] • Transcriptase inversa de telomerase humana^[116] • Sindecano-1^[111] • HIF-1-α^[113] • MAGE-A12^[124] • Proteína CD97^[125] 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Inibidor tecidual de metaloproteinase-2^[117] <ul style="list-style-type: none"> ↑ p63^[116] ↑ Queratina 8^[118] ↑ Recetor do ativador de plasminogénio do tipo Uroquinase^[114, 115] <ul style="list-style-type: none"> ↑ RHAMM^[119] ↑ Transcriptase inversa de telomerase humana^[116] <ul style="list-style-type: none"> ↑ Trofoblasto 2^[120] ↓ E-Caderina^[121] ↓ Tríade de Histidina frágil^[122] Troca de E-Caderina por N-Caderina^[110]
G2 moderadamente diferenciado	<ul style="list-style-type: none"> • Angiogénese e proteína p53 na região central e periférica do tumor^[107] • Sindecano-1^[111] 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ c-Met^[126] ↑ Inibidor tecidual de metaloproteinase-2^[117] <ul style="list-style-type: none"> ↑ p63^[116] ↑ Queratina 8^[118] ↑ Recetor do ativador de plasminogénio do tipo Uroquinase^[114, 115] <ul style="list-style-type: none"> ↑ RHAMM^[119] ↑ Transcriptase inversa de telomerase humana^[116] <ul style="list-style-type: none"> ↑ Trofoblasto 2^[120] ↓ Tríade de Histidina frágil^[122] ↓ E-Caderina^[121] Troca de E-Caderina por N-Caderina^[110]

<p>G3 pouco diferenciado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Metaloproteinase-7 de matriz ativa^[127] • Angiogénese e proteína p53 na região central e periférica^[107] • p16, p53, e ↑Ki-67^[123] • Transcriptase inversa de telomerase humana^[116] • Galectina-1^[128] • Proteína CD97^[125] 	<p>↑Antigénio Ki-67 e p53 na porção profunda do tumor invasivo^[129]</p> <p>↑Aurora-B^[130]</p> <p>↑CD109^[131]</p> <p>↑CiclinaB1^[132]</p> <p>↑c-Met^[126]</p> <p>↑Inibidor tecidual de metaloproteinase-2^[117]</p> <p>↑MnSOD 2^[133]</p> <p>↑p53 + ↓p63^[134]</p> <p>↑p63^[112]</p> <p>↑Podoplanina^[135]</p> <p>↑Queratina 8^[118]</p> <p>↑Recetor do ativador de plasminogénio do tipo Uroquinase^[114, 115]</p> <p>↑RHAMM^[119]</p> <p>↑Transcriptase inversa de telomerase humana^[116]</p> <p>↑Trofoblasto 2^[120]</p> <p>↑β-catenina associada a WNT-1, E-Caderina, γ-Catenina e Ki-67^[136]</p> <p>↓E-Caderina com Δ-Np63 e Δ-Np73L^[137]</p> <p>↓E-Caderina^[121]</p> <p>↓Sindecano celular-1^[109, 111]</p> <p>Tríade de Histidina frágil^[122]</p> <p>Troca de E-Caderina por N-Caderina^[110]</p>
<p>G4 indiferenciado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Metaloproteinase-7 de matriz ativa^[127] • Proteína CD97^[125] 	<p>↑Antigénio Ki-67 e p53 na porção profunda do tumor invasivo^[129]</p> <p>↑Aurora-B^[130]</p> <p>↑CD109^[131]</p> <p>↑c-Met^[126]</p> <p>↑CXCR4^[138]</p> <p>↑Inibidor tecidual de metaloproteinase-2^[117]</p> <p>↑MnSOD-2^[133]</p> <p>↑p63^[112]</p> <p>↑Podoplanina^[135]</p> <p>↑Queratina 8^[118]</p> <p>↑Recetor do ativador de plasminogénio do tipo Uroquinase^[114, 115]</p> <p>↑RHAMM^[119]</p> <p>↑Transcriptase inversa de telomerase humana^[116]</p> <p>↑Trofoblasto 2^[120]</p> <p>↑β-catenina associada a WNT-1, E-Caderina, γ-Catenina e Ki-67^[136]</p> <p>↓E-Caderina com Δ-Np63 e Δ-Np73L^[137]</p> <p>↓E-Caderina^[121]</p> <p>↓Sindecano celular-1^[109, 111]</p> <p>Tríade de Histidina frágil^[122]</p> <p>Troca de E-Caderina por N-Caderina^[110]</p>

4.3.1 Interleucinas 6 e 8

As interleucinas são encontradas tanto no soro sanguíneo como na saliva. A análise da concentração destas proteínas revelou que um aumento do nível de IL-8 no fluido salivar em conjunto com a elevação da concentração de IL-6 no soro sanguíneo são um bom método de detecção de OSCC, uma vez que apresenta altas taxas de sensibilidade e especificidade. [139] Contudo, parecem não ser úteis no diagnóstico precoce uma vez que o aumento de concentração de interleucina na saliva e soro sanguíneo não é significativo, apesar de existir ainda alguma controvérsia neste campo. [93,98]

As interleucinas são mediadores pró-inflamatórios pertencentes à família das quimiocinas. Têm um papel importante na patogenicidade do OSCC. Por exemplo, a IL-6 demonstrou promover a falta de resposta imune, a indução de caquexia e a hipercalcemia, sinais que são tipicamente observados em pacientes com mau prognóstico. [140] A IL-8 tem um papel importante na estimulação da angiogénese, proliferação e quimiotaxia de granulócitos e macrófagos, proeminentes no estroma do OSCC. [93, 139]

Um estudo efetuado por *St John et al.* [139], demonstrou que a interleucina 8 foi detetada em maiores concentrações na saliva em pacientes com OSCC. Simultaneamente a interleucina 6 foi encontrada numa maior concentração apenas no soro sanguíneo dos mesmos pacientes, usando técnicas de qRT-PCR e ELISA. Esta concentração não aparenta ser influenciada pelo género, idade ou consumo de álcool e tabaco, tornando-se útil para diagnosticar pacientes com diferentes *backgrounds*. A análise do aumento da concentração de IL-8 na saliva e IL-6 no soro sanguíneo

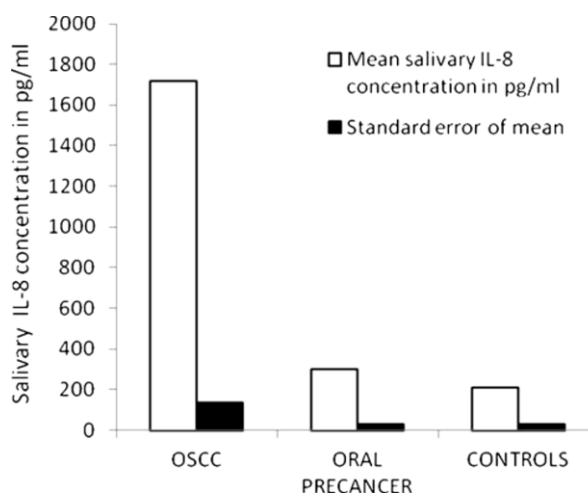


Figura 5- Comparação da concentração da IL-8 salivar entre pacientes com OSCC, pacientes com lesões pré-cancerosas e do grupo de controlo (Punyani *et al.*, 2013)

mostrou ter uma sensibilidade de 99% e especificidade de 90%. Em contrapartida, a análise individual do aumento de cada interleucina mostrou ter uma sensibilidade mais baixa (80% para a IL-8 na saliva e 58% para a IL-6 no soro sanguíneo), mostrando assim que o uso simultâneo de dois biomarcadores aumenta a sensibilidade do diagnóstico. [139]

Contudo, um estudo efetuado por *Punyani et al.* revelou não existirem diferenças estatisticamente significativas na concentração salivar de IL-8 entre pacientes

com lesões pré-cancerosas e o grupo de controlo. [93]

Estudos efetuados por Katakura *et al.* [98] e SahebJamee *et al.* [99] contrariam os resultados acima descritos. Globalmente estes conflitos podem ser devidos a diferentes técnicas usadas, bem como ao facto da população estudada ter uma amostra menor nos estudos de *St John et al.* e *Punyani et al.* Apesar do aumento da sua concentração não ser detetável na saliva, o aumento dos níveis de IL-6 no soro sanguíneo pode ajudar a determinar o prognóstico da doença, sendo que quanto mais elevado for o seu nível em pacientes com HSCC não tratado, pior será o *outcome* da doença. [4]

4.3.2 Defensinas

As defensinas são proteínas com diversas funções de defesa, expressas pela mucosa epitelial com arquitetura normal e por neutrófilos. [141] Em casos de neoplasia, diversos grupos destas proteínas sofrem alterações na sua concentração, havendo uma diminuição de determinadas defensinas e o aumento de outras. [67, 142] A análise dos níveis salivares de defensinas através da técnica de cromatografia revela-se um campo promissor para a deteção de OSCC, necessitando contudo de mais estudos que suportem as conclusões já apresentadas.

As defensinas são pequenos péptidos catiónicos [141] antimicrobianos, constituídos por 29 a 34 aminoácidos ricos em arginina [143], secretados como parte da imunidade inata [144], sendo expressos em biópsias de tecidos normais, com displasia, em carcinoma *in situ* e em casos de OSCC. [145] As defensinas têm um alto espectro de propriedades biológicas – em concentrações micromolares são bactericidas contra *St. aureus*, *E.coli*, fungos e vírus. [143] Os dois grandes grupos de defensinas são as α e as β , diferindo apenas no emparelhamento da cisteína das pontes de dissulfeto. Quatro dos seis subtipos de defensinas α são encontradas nos grânulos dos neutrófilos, sendo chamadas de péptidos neutrofílicos humanos (HNPs). Já as defensinas β são expressas em todo o tecido epitelial. [141] O epitélio oral expressa constitutivamente β -defensinas (hBDs)-1,-2 e -3. No epitélio normal, a expressão de hBD-1 e -2 está associada a células epiteliais diferenciadas nas camadas granulosa, espinhosa e queratinizada, enquanto que a expressão de hBD-3 é observada em células da camada basal. [145] Em casos de biópsia de carcinoma *in situ*, todo o tecido revelou expressar hBD-3, com pouca ou nenhuma expressão de hBD-1 e -2, sugerindo que a sobre expressão de hBD-3 e perda de hBD-2 em células neoplásicas pode ser uma assinatura de ativação de oncogenes, levando à transformação celular e lesões pré-cancerosas. [145] Uma vez secretado por lesões cancerosas e pré-cancerosas é facilmente detetado

no fluido salivar, tornando-se, em conjunto com a diminuição da expressão de hBD-1 e -2 um bom biomarcador para o OSCC.^[67] A expressão aumentada de hBD-3 leva ao recrutamento de macrófagos associados a tumor (TAM), que produzem metaloproteases de matriz e outras enzimas que levam à proteólise da matriz extracelular, libertando fatores de crescimento ligados à heparina e estimulando a angiogénese.^[145] Foi também afirmado que a hBD-3 é um bom biomarcador para prever as metástases linfáticas do OSCC, devido a estimular a produção de recetores para o tecido linfático.^[146] O gene para a hBD-1, um potencial gene supressor tumoral, mostrou ter perda de heterozigidade em patologias neoplásicas como o carcinoma de células renais e o cancro da próstata. Observações semelhantes ocorrem em lesões pré-malignas orais, indicando um possível papel da hBD-1 na transformação maligna.^[147] Contudo, a expressão variada de hBD-2 e a sobre expressão de hBD-3 nestes tumores levam a crer que estas moléculas hajam como proto-oncogenes.^[148]

Um estudo efetuado por *Mizukawa et al.*^[142] usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa revelou a presença de α -defensina 1 (HNP 1) em maiores concentrações na saliva de pacientes com OSCC, quando comparados com controlos saudáveis e pacientes com outros tipos de cancro como adenocarcinoma, podendo ser um indicador específico da presença desta patologia, em associação com a análise dos níveis de hBPs.

Sendo as defensinas péptidos secretados, uma vez produzidos por lesões cancerosas e pré-cancerosas entram na circulação sanguínea e fluidos que banham a lesão, sendo detetados na saliva.^[67]

4.3.3 Citoqueratina

A citoqueratina é um componente do citoesqueleto, que sob a ação de caspases liberta um fragmento, Cyfra 21-1, para o meio extra-celular.^[149] Em tecidos normais, este fragmento de citoqueratina é liberto em pequenas quantidades, sendo que é produzido em maior quantidade no tecido neoplásico^[150], apesar de diferentes estudos apontarem para diferentes taxas de aumento do mesmo^[85, 151]. Parece ser também uma boa ferramenta para prever a recorrência da neoplasia; contudo o seu uso pode estar limitado devido à baixa sensibilidade que apresenta.^[151]

A citoqueratina 19 (CK 19) é um componente proteico do citoesqueleto celular, com peso de 40 kDa. É uma citoqueratina ácida do tipo I, com um ponto isoelétrico de 5.2.^[152] A clivagem da CK 19 ocorre através da atividade da caspase-3, resultando na libertação de Cyfra 21-1, um fragmento solúvel, para o meio celular cancerígeno.^[149] O aumento da concentração de

Cyfra 21-1 na saliva pode ser explicado devido ao aumento da expressão de CK 19 no tecido afetado pela neoplasia. Na mucosa oral normal, a CK 19 é apenas expressa na camada basal da mucosa; já em tecido atípico hiperplásico é expressa na camada basal e suprabaasal, enquanto que em tecido cancerígeno é expressa em toda a mucosa.^[150] Contudo diferentes estudos apontam diferentes valores para o aumento da expressão de CK19, variando de 29% a 100%,^[151] havendo mesmo estudos que advocam um aumento de 400%.^[85]

Num estudo efetuado por Zhong *et al.* foram medidos os níveis salivares de Cyfra 21-1 em pacientes com OSCC e saudáveis, através do método ELISA, medindo também os níveis de CK19 nos tecidos cancerígenos através de imunohistoquímica e RT-PCR de fluorescência.^[151] Foi observado que as concentrações salivares de Cyfra 21-1 em pacientes com OSCC eram significativamente maiores quando comparadas com as de pacientes saudáveis, sendo este aumento relacionado com o aumento da expressão de CK19 no tecido cancerígeno. Outro dado importante relativamente a esta proteína reside no facto de estar relacionada com a previsão de recorrência da doença, uma vez que a sua concentração em pacientes que sofreram recidivas parece ser significativamente maior relativamente aos que não sofreram.^[151] Já relativamente à taxa de sobrevivência esta proteína revelou não ser uma boa ferramenta preditiva. Outro fator que pode excluir o uso único desta proteína como biomarcador de deteção do cancro oral é a sua

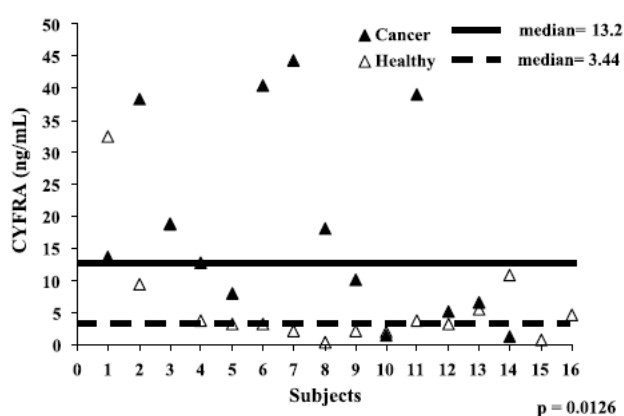


Figura 6- Concentrações de Cyfra 21-1 salivar em pacientes com OSCC e saudáveis. (Nagler et al, 2006)

sua baixa sensibilidade e especificidade (50% e 86,7% respetivamente) - contudo, estes valores podem não ser os reais, uma vez que a amostra utilizada no estudo que os determinou foi relativamente pequena (n=60). São necessários mais estudos e uma maior amostra para avaliar o valor deste biomarcador para o diagnóstico e prognóstico do OSCC.^[151]

4.3.4 CD 44

A CD44 é uma proteína estudada na detecção precoce de diversas patologias cancerígenas da cavidade oral, como por exemplo o carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma epidermóide e papilomas ductais.^[153, 154] É expressa em tecidos normais, sofrendo uma brusca redução quando patologias benignas como o papiloma ductal se tornam malignas.^[154] Contudo, estudos efectuados revelaram existir um aumento da concentração da forma solúvel de CD44 em casos de carcinomas da cabeça e pescoço, existindo uma relação entre os níveis proteicos totais salivares, os níveis de CD44, a localização da neoplasia, uma possível recorrência e prognóstico.^[86, 155] No entanto, convém destacar que os resultados promissores encontrados relativamente ao uso de CD44 solúvel como biomarcador são quase exclusivos de apenas um grupo de investigação, que realizou estudos em 2005, 2007 e 2012 respetivamente.^[86] Novos estudos, com diferentes autores e métodos semelhantes são aconselhados de modo a reproduzir as conclusões encontradas.

A CD44 é uma glicoproteína expressa na membrana celular, estando envolvida na comunicação intercelular, na adesão e migração.^[156] Existem várias isoformas desta proteína resultantes do processo de splicing alternativo de exões, bem como uma forma solúvel em fluidos corporais, denominada de CD44 solúvel (solCD44).^[155] Um estudo efetuado por Yang *et al.*, concluiu que a diminuição da expressão de CD44 promovia a recorrência e a carcinogénese do carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXPAs)^[153], um tumor maligno raro que afeta as glândulas salivares, com maior incidência na parótida e na submandibular, apesar de poder atingir as glândulas salivares minor.^[157] Foi também demonstrado por Franchi *et al.* que a perda das isoformas proteicas CD44v3 e CD44v6 estava associada ao estabelecimento de CXPAs, promovendo invasão do estroma, contribuindo eventualmente para o desenvolvimento de metástases.^[158] Carcinoma na laringe, língua, mama, ovário, próstata, carcinoma urotelial, melanoma, tumor do estroma gastro-intestinal e tumores carcinoídes foram algumas das neoplasias onde a perda de expressão de CD44 revelou estar associada a um pior prognóstico.^[154] Todas estas descobertas suportam a perda de CD44 como uma alteração associada a malignidade e invasividade. Pensa-se que a perda de adesão subsequente à perda de CD44 permita maiores níveis de invasão, levando a um aumento da malignidade em certos tipos de neoplasias.^[154]

Apesar de trabalhos de diversos autores apontarem para a redução de CD44 em casos de neoplasia – sendo as neoplasias hematológicas como o mieloma múltiplo e o linfoma não-Hodgkin uma exceção^[154] - um estudo recente efetuado por Franzmann *et al.*, revelou que os

níveis de solCD44 no fluido salivar, detetados através do método ELISA, estão aumentados em casos de HNSCC. ^[86] Indivíduos com elevadas concentrações de solCD44 associados a altos níveis proteicos no fluido oral revelam ter 25 vezes mais suscetibilidade de desenvolver cancro oral que indivíduos sem essas elevadas concentrações. ^[86] Outro estudo realizado pelos mesmos autores revelou que a deteção de HNSCC através do aumento da concentração de solCD44 tem uma especificidade de 88% e sensibilidade de 62%. ^[86]

O local onde o tumor está localizado parece ter importância nos níveis de solCD44, uma vez que foram detetadas concentrações mais elevadas em neoplasias na cavidade oral e orofaringe, quando comparado com os níveis das neoplasias da laringe e laringofaringe. ^[86] Esta diferença pode ser devida ao facto do tumor estar localizado numa zona mais afastada da cavidade oral, interferindo menos na concentração salivar da proteína. ^[155]

Há uma discreta relação entre o aumento dos níveis de solCD44 em pacientes fumadores e com fraca higiene oral, embora esta relação não seja estatisticamente significativa. Contudo, pensa-se que este biomarcador possa estar a detetar casos bastante precoces de displasia celular uma vez que o tabaco é um fator de risco para esta patologia. ^[86]

Esta proteína revela-se promissora na deteção de HNSCC, sendo comparável em termos de sensibilidade ao uso do antígeno específico para o cancro da próstata e ao teste do Papanicolau para a deteção do cancro do colo do útero. ^[155] Contudo, quando analisada conjuntamente com o nível total de proteínas no fluido salivar revela uma maior sensibilidade e especificidade para a deteção de HNSCC. ^[86]

4.4 Genética salivar

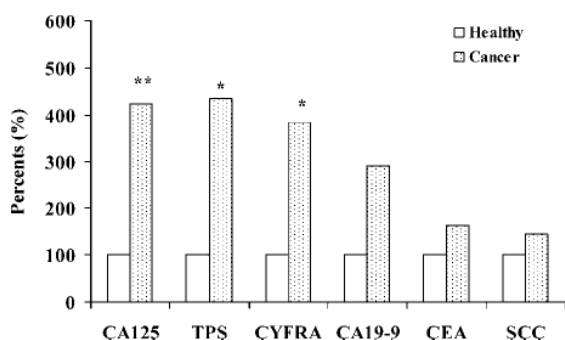


Figura 7 – Concentrações salivares de biomarcadores em pacientes saudáveis (n=16) e com OSCC (n=14). (Nagler et al, 2006)

Além de proteínas, ADN tumoral específico pode ser usado como biomarcador para OSCC. ^[159] Um estudo efetuado por *Liao et al.* demonstrou ter encontrado genes p53 mutados na saliva. ^[160] Outros estudos sugerem um array de metilação de ADN salivar como um meio efetivo de deteção precoce do OSCC. *Mager*

et al. advocam que contagens elevadas de microrganismos específicos como *C. gingivalis*, *P.*

melaninogenica e *S.mitis* presentes na saliva podem estar envolvidos no desenvolvimento do cancro oral.^[80] Uma vez que o mRNA é o precursor direto das proteínas, muitos mRNA salivares têm sido amplamente identificados como sendo biomarcadores usando o método do microarray.^[159]

Expressões alteradas de CD44, IL-1 β , IL-8 e proteína de ligação ao cálcio S100 foram descritas usando estudos genómicos para identificação de biomarcadores. A hipermetilação no ADN do promotor do gene para a p16 também foi identificada tanto no soro sanguíneo como na saliva.^[96, 161, 162] Polimorfismos no ADN de IL-1 β ^[162], IL-6^[163], IL-8^[164], TNF- α ^[165] e VEGF^[166] foram identificados como estando relacionados com o desenvolvimento do carcinoma epidermoide. OSCC associado ao uso de carcinogénios ambientais tais como o tabaco e o tabaco de mascar (betel) está diretamente relacionado com os polimorfismos de p53^[167, 168], VEGF^[169] e TNF- α ^[170].

Os polimorfismos e as proteínas alteradas devido a carcinogénios ambientais descritos foram principalmente identificados no soro sanguíneo – a sua expressão salivar resultante da descamação de células epiteliais cancerígenas requer mais estudos para ser avaliada.^[30]

5. Conclusão

O cancro oral tem uma taxa de cura superior a 80% quando detetado nos seus estados iniciais. Esta percentagem baixa drasticamente quando a neoplasia é detetada mais tardiamente, apresentando valores de menos de 30%.^[5, 10] Apesar das vantagens que os biomarcadores oferecem na descoberta precoce do OSCC, o exame histológico continua a ser o meio mais utilizado para o diagnóstico de lesões malignas na cavidade oral.^[26, 29, 30] As desvantagens deste método incluem a não deteção de lesões displásicas localizadas em diferentes pontos na cavidade oral, que podem evoluir para carcinoma. Nestes casos, a análise molecular pode ser usada, aproveitando todas as vantagens dos biomarcadores no campo do diagnóstico e prognóstico. A análise salivar pode ser das melhores escolhas para o rastreio primário em pacientes com alto risco para o cancro oral, uma vez que o procedimento não é invasivo e o meio contém menos substâncias que podem interferir com os valores da concentração dos biomarcadores, bem como menos substâncias inibitórias.^[43] Nesta revisão bibliográfica foram abordados os principais biomarcadores presentes na saliva, e em alguns casos apenas estudados no soro sanguíneo, que se encontram alterados na ocorrência de displasias e OSCC.

Existem diversas proteínas que podem ser usadas como biomarcadores de neoplasias da cabeça e pescoço. Apenas uma proteína não deve ser usada para realizar o diagnóstico, uma vez que podem existir variações de concentração no fluido salivar que levem à suspeita de carcinoma, quando na verdade pode tratar-se de uma simples alteração benigna como inflamação, baixando a sensibilidade do diagnóstico. Contudo, a associação de vários biomarcadores e a análise da variação da sua concentração pode ser um método eficaz e fiável para a deteção precoce de neoplasias. As grandes barreiras atuais à sua utilização prendem-se com o facto desse grupo de biomarcadores-chave não estar definido, não existir um método universal de análise da saliva que seja eficaz, rápido e barato para todos os biomarcadores selecionados, e não existir uma cooperação governamental, académica e privada para estabelecer protocolos de atuação. Uma vez ultrapassados estes obstáculos, abre-se caminho para a deteção precoce, e subsequente melhor prognóstico de uma das neoplasias com menor taxa de sobrevivência devido à sua descoberta tardia.

6. Referências Bibliográficas

1. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, et al. **Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients.** *Cancer research*. 2001;61(3):939-42.
2. Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Tang CH, Huang SH, Tsai MH, et al. **Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412(15-16):1357-65.
3. Franzmann EJ, Reategui EP, Pedrosa F, Pernas FG, Karakullukcu BM, Carraway KL, et al. **Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2007;16(7):1348-55.
4. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, et al. **Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients.** *Cancer*. 2008;113(4):750-7.
5. American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society, 2013.
6. Ferlay J SH, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. **GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10** [Internet] Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. URL: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso a 25-03-2013
7. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. **Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008.** *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132(5):1133-45.
8. RS RSKVC. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010.
9. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Balch CM, Fritz AG. **AJCC cancer staging handbook: from the AJCC cancer staging manual**: Springer Verlag; 2002.
10. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. **Head and neck cancer.** *The New England journal of medicine*. 1993;328(3):184-94.
11. Anderson WF, Hawk E, Berg CD. **Secondary chemoprevention of upper aerodigestive tract tumors.** *Seminars in oncology*. 2001;28(1):106-20.
12. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. **A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications.** *Cancer research*. 2003;63(8):1727-30.
13. Lippman SM, Hong WK. **Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease.** *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1989;17(3):691-4.
14. Hu S, Arellano M, Boonthueung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. **Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(19):6246-52.
15. Wong DT. **Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer 'oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be explored for health and disease surveillance'**. *Expert review of molecular diagnostics*. 2006;6(3):267-72.
16. Decker J, Goldstein JC. **Risk factors in head and neck cancer.** *The New England journal of medicine*. 1982;306(19):1151-5.
17. Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Chen CH, Kao JY, Chen SY, et al. **Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer.** *Analytica chimica acta*. 2010;681(1-2):41-8.
18. Jefferies S, Foulkes WD. **Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Oral oncology*. 2001;37(2):115-26.
19. Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, et al. **Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment.** *Nature medicine*. 1996;2(6):682-5.
20. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. **The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer.** *Cancer research*. 1993;53(19):4477-80.

21. Rosin MP, Lam WL, Poh C, Le ND, Li RJ, Zeng T, et al. **3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites.** *Cancer research.* 2002;62(22):6447-50.
22. Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarguen H, Lee JS, Ro JY, et al. **Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification.** *Oncogene.* 1998;17(18):2313-22.
23. Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M. **Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis.** *Journal of proteomics.* 2008;71(2):168-75.
24. de Planell-Saguer M, Rodicio MC. **Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review.** *Analytica chimica acta.* 2011;699(2):134-52.
25. Mashberg A, Samit A. **Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers.** *CA: a cancer journal for clinicians.* 1995;45(6):328-51.
26. Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, et al. **Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(4):1179-85.
27. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. **Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas.** *Scandinavian journal of dental research.* 1987;95(3):229-49.
28. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. **New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas.** *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 1989;18(8):432-7.
29. Brinkmann O, Kastratovic DA, Dimitrijevic MV, Konstantinovic VS, Jelovac DB, Antic J, et al. **Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population.** *Oral oncology.* 2011;47(1):51-5.
30. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, et al. **Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma.** *Oral oncology.* 2010;46(4):226-31.
31. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. **Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review.** *Omics : a journal of integrative biology.* 2011;15(6):353-61.
32. Liu J, Duan Y. **Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring.** *Oral oncology.* 2012;48(7):569-77.
33. Erber R, Conradt C, Homann N, Enders C, Finckh M, Dietz A, et al. **TP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer.** *Oncogene.* 1998;16(13):1671-9.
34. Gleich LL, Wang J, Gluckman JL, Fenoglio-Preiser CM. **Microsatellite instability as a predictor of survival in head and neck cancer -- is there a link with colon cancer?** *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties.* 2003;65(4):193-8.
35. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. **Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring.** *Cancer.* 1997;79(3):595-604.
36. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. **Association of Epstein-Barr virus with oral cancers.** *Human pathology.* 2002;33(6):608-14.
37. Sidransky D. **Emerging molecular markers of cancer.** *Nature reviews Cancer.* 2002;2(3):210-9.
38. Ishwad CS, Ferrell RE, Rossie KM, Appel BN, Johnson JT, Myers EN, et al. **Microsatellite instability in oral cancer.** *International journal of cancer Journal international du cancer.* 1995;64(5):332-5.
39. Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ. **Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings.** *Oral oncology.* 2000;36(6):525-8.
40. Shin KH, Park KH, Hong HJ, Kim JM, Oh JE, Choung PH, et al. **Prevalence of microsatellite instability, inactivation of mismatch repair genes, p53 mutation, and human papillomavirus infection in Korean oral cancer patients.** *International journal of oncology.* 2002;21(2):297-302.

41. Xu XC, Lee JS, Lippman SM, Ro JY, Hong WK, Lotan R. **Increased expression of cytokeratins CK8 and CK19 is associated with head and neck carcinogenesis.** Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 1995;4(8):871-6.
42. Nagler R. **[Oral cancer--molecular aberrations and tumor markers cellular aberrations].** Harefuah. 2003;142(4):272-6, 318, 7.
43. Streckfus CF, Dubinsky WP. **Proteomic analysis of saliva for cancer diagnosis.** Expert review of proteomics. 2007;4(3):329-32.
44. Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC. **Saliva: reflection of the body.** International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2010;14(3):e184-8.
45. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, et al. **Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry.** Proteomics. 2005;5(6):1714-28.
46. Lee YH, Wong DT. **Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases.** American journal of dentistry. 2009;22(4):241-8.
47. Carranza M, Ferraris ME, Galizzi M. **Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis.** Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2005;34(6):374-9.
48. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. **Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation.** Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2007;383(1-2):30-40.
49. Mandel ID. **The diagnostic uses of saliva.** Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 1990;19(3):119-25.
50. University of California, Los Angeles. **Salivary Proteome Knowledge Base.** URL: <http://www.skb.ucla.edu/cgi-bin/spkbcgi-bin/main.cgi>2005. Acesso a 25-03-2013
51. Baum BJ, Yates JR, 3rd, Srivastava S, Wong DT, Melvin JE. **Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics.** Advances in dental research. 2011;23(4):360-8.
52. Nurkka A, Obiero J, Kayhty H, Scott JA. **Effects of sample collection and storage methods on antipneumococcal immunoglobulin A in saliva.** Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2003;10(3):357-61.
53. Dawes C, Tsang RW, Suelzle T. **The effects of gum chewing, four oral hygiene procedures, and two saliva collection techniques, on the output of bacteria into human whole saliva.** Archives of oral biology. 2001;46(7):625-32.
54. Schwartz EB, Granger DA, Susman EJ, Gunnar MR, Laird B. **Assessing salivary cortisol in studies of child development.** Child development. 1998;69(6):1503-13.
55. Granger DA, Schwartz EB, Booth A, Curran M, Zakaria D. **Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults.** Psychoneuroendocrinology. 1999;24(5):567-79.
56. Hodinka RL, Nagashunmugam T, Malamud D. **Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids.** Clinical and diagnostic laboratory immunology. 1998;5(4):419-26.
57. Mylonas PG, Makri M, Georgopoulos NA, Theodoropoulou A, Leglise M, Vagenakis AG, et al. **Adequacy of saliva 17-hydroxyprogesterone determination using various collection methods.** Steroids. 2006;71(3):273-6.
58. Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ. **Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results.** Psychoneuroendocrinology. 2001;26(2):165-73.
59. Lu YC, Chatterton RT, Jr., Vogelsong KM, May LK. **Direct radioimmunoassay of progesterone in saliva.** Journal of immunoassay. 1997;18(2):149-63.
60. Laine M, Pienihakkinen K, Leimola-Virtanen R. **The effect of repeated sampling on paraffin-stimulated salivary flow rates in menopausal women.** Archives of oral biology. 1999;44(1):93-5.

61. Navazesh M, Christensen CM. **A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures.** Journal of dental research. 1982;61(10):1158-62.
62. Kennedy B, Dillon E, Mills PJ, Ziegler MG. **Catecholamines in human saliva.** Life sciences. 2001;69(1):87-99.
63. Whembolua GL, Granger DA, Singer S, Kivlighan KT, Marguin JA. **Bacteria in the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva.** Hormones and behavior. 2006;49(4):478-83.
64. Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salaman CR. **Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches.** Trends in biotechnology. 2004;22(8):411-6.
65. Wagner PD, Verma M, Srivastava S. **Challenges for biomarkers in cancer detection.** Annals of the New York Academy of Sciences. 2004;1022:9-16.
66. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. **Immunity, inflammation, and cancer.** Cell. 2010;140(6):883-99.
67. Jin G. **Using biomarkers to detect oral cancer holds potential for saving lives when the cancer is most curable.** Biomarkers in medicine. 2010;4(6):835-8.
68. Ludwig JA, Weinstein JN. **Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection.** Nature reviews Cancer. 2005;5(11):845-56.
69. Krimmel M, Hoffmann J, Krimmel C, Cornelius CP, Schwenzer N. **Relevance of SCC-Ag, CEA, CA 19.9 and CA 125 for diagnosis and follow-up in oral cancer.** Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 1998;26(4):243-8.
70. Yamazaki Y, Chiba I, Ishikawa M, Satoh C, Notani K-i, Ohiro Y, et al. **Serum p53 antibodies as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma.** Odontology / the Society of the Nippon Dental University. 2008;96(1):32-7.
71. **National Cancer Institute. Early Detection Research Network.** URL: <http://edrn.nci.nih.gov/resources/sample-reference-sets2013>. Acesso a 30-03-2013
72. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, et al. **The case for early detection.** Nature reviews Cancer. 2003;3(4):243-52.
73. Sharma S, Rasool HI, Palanisamy V, Mathisen C, Schmidt M, Wong DT, et al. **Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM, and force spectroscopy.** ACS nano. 2010;4(4):1921-6.
74. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT. **Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes.** PloS one. 2010;5(1):e8577.
75. Wong DT. **Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics.** Journal of the American Dental Association. 2006;137(3):313-21.
76. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. **NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma.** Cancer detection and prevention. 2005;29(1):42-5.
77. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. **Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile.** Cancer. 2007;109(1):54-9.
78. Chen CH, Lin YS, Lin CC, Yang YH, Ho YP, Tsai CC. **Elevated serum levels of a c-erbB-2 oncogene product in oral squamous cell carcinoma patients.** Journal of Oral Pathology & Medicine. 2004;33(10):589-94.
79. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R, Johnson N, Tavassoli M. **Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients.** The Journal of pathology. 2000;192(1):52-7.
80. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. **The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects.** Journal of translational medicine. 2005;3:27.
81. Nagler RM. **Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis.** Oral oncology. 2009;45(12):1006-10.
82. Zoller J, Fiehn W, Mende U, Hotz G. **[The diagnostic value of the tumor markers CEA, "Ca 19-9", "Ca 125", "Ca15-3" and "SCC" for the detection of recurrent tumors in patients with tumors**

- of the head and neck]. *Deutsche Zeitschrift für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. 1990;14(4):254-9.
83. Rafael N, Gideon B, Thomas S, Raphael F. **Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(13):3979-84.
84. Hoffmann J, Munz A, Krimmel M, Alfter G. **Intraoperative and postoperative kinetics of serum tumor markers in patients with oral carcinoma**. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1998;56(12):1390-3.
85. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. **Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(13):3979-84.
86. Franzmann EJ, Reategui EP, Pereira LH, Pedroso F, Joseph D, Allen GO, et al. **Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma**. *Head & neck*. 2012;34(5):687-95.
87. Zoller J. [The value of "tumor markers" in the therapy and aftercare of carcinoma of the oral mucosa]. *Deutsche Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde mit Zentralblatt*. 1992;80(6):351-7.
88. Sawant SS, Zingde SM, Vaidya MM. **Cytokeratin fragments in the serum: their utility for the management of oral cancer**. *Oral oncology*. 2008;44(8):722-32.
89. Kurokawa H, Yamashita Y, Tokudome S, Kajiyama M. **Combination assay for tumor markers in oral squamous cell carcinoma**. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1997;55(9):964-6.
90. Bhatavdekar JM, Patel DD, Vora HH, Balar DB. **Circulating prolactin and TPS in monitoring the clinical course of male patients with metastatic tongue cancer: a preliminary study**. *Anticancer research*. 1993;13(1):237-40.
91. Yen TC, Lin WY, Kao CH, Cheng KY, Wang SJ. **A study of a new tumour marker, CYFRA 21-1, in squamous cell carcinoma of the head and neck, and comparison with squamous cell carcinoma antigen**. *Clinical otolaryngology and allied sciences*. 1998;23(1):82-6.
92. Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, et al. **Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(24):8442-50.
93. Punyani SR, Sathawane RS. **Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma**. *Clinical oral investigations*. 2013;17(2):517-24.
94. Pickering V, Jordan RC, Schmidt BL. **Elevated salivary endothelin levels in oral cancer patients--a pilot study**. *Oral oncology*. 2007;43(1):37-41.
95. Almadori G, Bussu F, Galli J, Limongelli A, Persichilli S, Zappacosta B, et al. **Salivary glutathione and uric acid levels in patients with head and neck squamous cell carcinoma**. *Head & neck*. 2007;29(7):648-54.
96. Viet CT, Jordan RC, Schmidt BL. **DNA promoter hypermethylation in saliva for the early diagnosis of oral cancer**. *Journal of the California Dental Association*. 2007;35(12):844-9.
97. Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R, Nagler RM. **A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis**. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2007;133(9):613-7.
98. Katakura A, Kamiyama I, Takano N, Shibahara T, Muramatsu T, Ishihara K, et al. **Comparison of salivary cytokine levels in oral cancer patients and healthy subjects**. *The Bulletin of Tokyo Dental College*. 2007;48(4):199-203.
99. SahebJamee M, Eslami M, Atarbashimoghadam F, Sarafnejad A. **Salivary concentration of TNFalpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma**. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2008;13(5):E292-5.
100. Tan W, Sabet L, Li Y, Yu T, Klokkevold PR, Wong DT, et al. **Optical protein sensor for detecting cancer markers in saliva**. *Biosensors & bioelectronics*. 2008;24(2):266-71.
101. Zimmermann BG, Park NJ, Wong DT. **Genomic targets in saliva**. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098:184-91.
102. Hellner D, Klapdor R, Gundlach KH, Schmelzle R. [Results with the use of the SCC antigen in squamous cell carcinomas of the oral cavity]. *Deutsche Zeitschrift für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. 1989;13(4):291-5.

103. Zhong LP, Chen GF, Xu ZF, Zhang X, Ping FY, Zhao SF. **Detection of telomerase activity in saliva from oral squamous cell carcinoma patients.** International journal of oral and maxillofacial surgery. 2005;34(5):566-70.
104. Ye DX, Xu Q, Chen WT, Zhu HG, Lin GC, Jiang CH, et al. **[Immunodetections and analysis of peripheral blood for patients with oral cancer undergoing operation].** Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology. 2004;13(2):83-6.
105. Zhong LP, Zhou XJ, Wei KJ, Yang X, Ma CY, Zhang CP, et al. **[Application of serum tumor markers and support vector machine in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma].** Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology. 2008;17(5):457-60.
106. Chen YC, Li TY, Tsai MF. **Analysis of the saliva from patients with oral cancer by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2002;16(5):364-9.
107. Abbas NF, Labib El-Sharkawy S, Abbas EA, Abdel Monem El-Shaer M. **Immunohistochemical study of p53 and angiogenesis in benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma.** Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2007;103(3):385-90.
108. Conley BA, Taube SE. **Prognostic and predictive markers in cancer.** Disease markers. 2004;20(2):35-43.
109. Mathe M, Suba Z, Nemeth Z, Tatrai P, Fule T, Borgulya G, et al. **Stromal syndecan-1 expression is an adverse prognostic factor in oral carcinomas.** Oral oncology. 2006;42(5):493-500.
110. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, et al. **Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome.** Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2007;35(1):1-9.
111. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Takamori K, et al. **Reduced syndecan-1 expression is correlated with the histological grade of malignancy at the deep invasive front in oral squamous cell carcinoma.** Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2006;35(5):301-6.
112. Lo Muzio L, Campisi G, Farina A, Rubini C, Pastore L, Giannone N, et al. **Effect of p63 expression on survival in oral squamous cell carcinoma.** Cancer investigation. 2007;25(6):464-9.
113. Lin PY, Yu CH, Wang JT, Chen HH, Cheng SJ, Kuo MY, et al. **Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan.** Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2008;37(1):18-25.
114. Bacchiocchi R, Rubini C, Pierpaoli E, Borghetti G, Procacci P, Nocini PF, et al. **Prognostic value analysis of urokinase-type plasminogen activator receptor in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study.** BMC cancer. 2008;8:220.
115. Nozaki S, Endo Y, Nakahara H, Yoshizawa K, Hashiba Y, Kawashiri S, et al. **Inhibition of invasion and metastasis in oral cancer by targeting urokinase-type plasminogen activator receptor.** Oral oncology. 2005;41(10):971-7.
116. Chen HH, Yu CH, Wang JT, Liu BY, Wang YP, Sun A, et al. **Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan.** Oral oncology. 2007;43(2):122-9.
117. de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Lopez Arranz JS. **Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma.** Oral oncology. 2005;41(6):568-79.
118. Matthias C, Mack B, Berghaus A, Gires O. **Keratin 8 expression in head and neck epithelia.** BMC cancer. 2008;8:267.
119. Yamano Y, Uzawa K, Shinozuka K, Fushimi K, Ishigami T, Nomura H, et al. **Hyaluronan-mediated motility: a target in oral squamous cell carcinoma.** International journal of oncology. 2008;32(5):1001-9.
120. Fong D, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, et al. **TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity.** Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2008;21(2):186-91.

- 121.** Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antunez-Lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. **Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma.** *Oral oncology.* 2006;42(2):190-200.
- 122.** Guerin LA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. **Decreased fragile histidine triad gene protein expression is associated with worse prognosis in oral squamous carcinoma.** *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2006;130(2):158-64.
- 123.** Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, Del Sordo R, Sidoni A, et al. **Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity.** *Anticancer research.* 2008;28(5A):2535-9.
- 124.** Mollaoglu N, Vairaktaris E, Nkenke E, Neukam FW, Ries J. **Expression of MAGE-A12 in oral squamous cell carcinoma.** *Disease markers.* 2008;24(1):27-32.
- 125.** Mustafa T, Eckert A, Klonisch T, Kehlen A, Maurer P, Klintschar M, et al. **Expression of the epidermal growth factor seven-transmembrane member CD97 correlates with grading and staging in human oral squamous cell carcinomas.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2005;14(1):108-19.
- 126.** Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Coccia E, Capogreco M, Colella G, et al. **Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2006;27(3):115-21.
- 127.** Chuang HC, Su CY, Huang HY, Huang CC, Chien CY, Du YY, et al. **Active matrix metalloproteinase-7 is associated with invasion in buccal squamous cell carcinoma.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2008;21(12):1444-50.
- 128.** Chiang WF, Liu SY, Fang LY, Lin CN, Wu MH, Chen YC, et al. **Overexpression of galectin-1 at the tumor invasion front is associated with poor prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma.** *Oral oncology.* 2008;44(4):325-34.
- 129.** Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T, et al. **The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma.** *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2005;34(10):602-7.
- 130.** Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, et al. **Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer.** *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2007;450(3):297-302.
- 131.** Hagiwara S, Murakumo Y, Sato T, Shigetomi T, Mitsudo K, Tohnai I, et al. **Up-regulation of CD109 expression is associated with carcinogenesis of the squamous epithelium of the oral cavity.** *Cancer science.* 2008;99(10):1916-23.
- 132.** Harada H, Omura K, Nakajima Y, Hasegawa S, Mogi S. **Cyclin B1 is useful to predict occult cervical lymph node metastases in tongue carcinoma.** *Journal of experimental & clinical cancer research : CR.* 2006;25(3):351-6.
- 133.** Ye H, Wang A, Lee BS, Yu T, Sheng S, Peng T, et al. **Proteomic based identification of manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) as a metastasis marker for oral squamous cell carcinoma.** *Cancer genomics & proteomics.* 2008;5(2):85-94.
- 134.** de Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. **Prognostic impact of p53 and p63 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma.** *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2007;36(4):191-7.
- 135.** Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, et al. **Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome.** *Cancer.* 2006;107(3):563-9.
- 136.** Zhang WM, Lo Muzio L, Rubini C, Yan G. **Effect of WNT-1 on beta-catenin expression and its relation to Ki-67 and tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma.** *Oncology reports.* 2005;13(6):1095-9.
- 137.** Foschini MP, Cocchi R, Morandi L, Marucci G, Pennesi MG, Righi A, et al. **E-cadherin loss and Delta Np73L expression in oral squamous cell carcinomas showing aggressive behavior.** *Head & neck.* 2008;30(11):1475-82.

138. Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, et al. **CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma.** *International journal of oncology.* 2006;28(1):61-6.
139. St John MA, Li Y, Zhou X, Denny P, Ho CM, Montemagno C, et al. **Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma.** *Archives of otolaryngology--head & neck surgery.* 2004;130(8):929-35.
140. Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, Hakozaiki M, Abe T, Iizuka N, et al. **Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer research.* 1996;56(12):2776-80.
141. Swain N, Kumar SV, Richa, Pathak J. **DEFENSINS: potent biomarkers in oral squamous cell carcinoma.** *Oral oncology.* 2012;48(8):e29-30.
142. Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S, et al. **Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients.** *Anticancer research.* 1998;18(6B):4645-9.
143. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T. **Defensin-1, an antimicrobial peptide present in the saliva of patients with oral diseases.** *Oral diseases.* 1999;5(2):139-42.
144. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. **Isolation and characterization of human beta - defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic.** *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(8):5707-13.
145. Kawsar HI, Weinberg A, Hirsch SA, Venizelos A, Howell S, Jiang B, et al. **Overexpression of human beta-defensin-3 in oral dysplasia: potential role in macrophage trafficking.** *Oral oncology.* 2009;45(8):696-702.
146. Mizukawa N, Sawaki K, Yamachika E, Fukunaga J, Ueno T, Takagi S, et al. **Presence of human beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma.** *Anticancer research.* 2000;20(3B):2005-7.
147. Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam JP, et al. **Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity.** *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2008;37(7):660-3.
148. Winter J, Pantelis A, Reich R, Martini M, Kraus D, Jepsen S, et al. **Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation.** *Cancer investigation.* 2011;29(3):196-201.
149. Dohmoto K, Hojo S, Fujita J, Yang Y, Ueda Y, Bando S, et al. **The role of caspase 3 in producing cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) in human lung cancer cell lines.** *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2001;91(4):468-73.
150. Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. **Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis.** *Journal of surgical oncology.* 2003;82(1):34-50.
151. Zhong LP, Zhang CP, Zheng JW, Li J, Chen WT, Zhang ZY. **Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients.** *Archives of oral biology.* 2007;52(11):1079-87.
152. Yamamoto K, Oka M, Hayashi H, Tangoku A, Gondo T, Suzuki T. **CYFRA 21-1 is a useful marker for esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer.* 1997;79(9):1647-55.
153. Yang S, Wang HP, Wang XY, Guo LJ, Tang XF, Gao QH, et al. **Expression of CD44V6 in parotid pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma.** *Expert opinion on investigational drugs.* 2010;19 Suppl 1:S101-8.
154. Fitzpatrick SG, Montague LJ, Cohen DM, Bhattacharyya I. **CD44 Expression in Intraoral Salivary Ductal Papillomas and Oral Papillary Squamous Cell Carcinoma.** *Head and neck pathology.* 2013;7(2):122-8.
155. Franzmann EJ, Reategui EP, Carraway KL, Hamilton KL, Weed DT, Goodwin WJ. **Salivary soluble CD44: a potential molecular marker for head and neck cancer.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2005;14(3):735-9.
156. Mariano FV, Rincon D, Gondak RO, Jorge R, Lopes MA, Altemani A, et al. **Carcinoma ex-pleomorphic adenoma of upper lip showing copy number loss of tumor suppressor genes.** *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology.* 2013.

157. Olsen KD, Lewis JE. **Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review.** Head & neck. 2001;23(9):705-12.
158. Franchi A, Moroni M, Paglierani M, Santucci M. **Expression of CD44 standard and variant isoforms in parotid gland and parotid gland tumours.** Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 2001;30(9):564-8.
159. Zimmermann BG, Wong DT. **Salivary mRNA targets for cancer diagnostics.** Oral oncology. 2008;44(5):425-9.
160. Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. **Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas.** Oral oncology. 2000;36(3):272-6.
161. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Hino S, Hamakawa H. **Detection of p16 promoter methylation in the serum of oral cancer patients.** International journal of oral and maxillofacial surgery. 2006;35(4):362-5.
162. Vairaktaris E, Serefoglou Z, Yapijakis C, Stathopoulos P, Vassiliou S, Derka S, et al. **The interleukin-1 beta gene polymorphism +3953 C/T is not associated with risk for oral cancer.** Anticancer research. 2007;27(6B):3981-6.
163. Vairaktaris E, Yiannopoulos A, Vylliotis A, Yapijakis C, Derka S, Vassiliou S, et al. **Strong association of interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphism with increased risk of oral cancer.** The International journal of biological markers. 2006;21(4):246-50.
164. Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, et al. **The interleukin-8 (-251A/T) polymorphism is associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma.** European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology. 2007;33(4):504-7.
165. Vairaktaris E, Vylliotis A, Spyridonodou S, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, et al. **A DNA polymorphism of stromal-derived factor-1 is associated with advanced stages of oral cancer.** Anticancer research. 2008;28(1A):271-5.
166. Yapijakis C, Vairaktaris E, Vassiliou S, Vylliotis A, Nkenke E, Nixon AM, et al. **The low VEGF production allele of the +936C/T polymorphism is strongly associated with increased risk for oral cancer.** Journal of cancer research and clinical oncology. 2007;133(10):787-91.
167. Chang KC, Su IJ, Tsai ST, Shieh DB, Jin YT. **Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesions in taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association.** Oncology. 2002;63(4):362-9.
168. Wong YK, Liu TY, Chang KW, Lin SC, Chao TW, Li PL, et al. **p53 alterations in betel quid- and tobacco-associated oral squamous cell carcinomas from Taiwan.** Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 1998;27(6):243-8.
169. Wong YK, Liu CJ, Kwan PC, Chao SY. **Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel-associated oral squamous cell carcinoma.** Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2003;61(11):1257-62.
170. Su TR, Chang KL, Lee CH, Chen CH, Yang YH, Shieh TY. **Expression of tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in betel-quid-chewing patients at different stages of treatment for oral squamous cell carcinoma.** Oral oncology. 2004;40(8):804-10.

7. Anexos

- 1. Parecer do orientador**
- 2. Declaração de autoria do trabalho apresentado**

PARECER



Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo estudante Samuel Armando Leça Oliveira com o título “Proteínas salivares como biomarcadores para o cancro oral” está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra -se em condições de ser apresentado em provas públicas.

3 de Junho de 2013

DECLARAÇÃO



Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

3 de Junho de 2013

O Investigador