

KELLY ANDRADE CASTILLO

**ANÁLISE DOS BIOMARCADORES SALIVARES PARA O  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Clínica área de concentração Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia “Professor Albino Coimbra Filho” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Campo Grande – MS

2014

KELLY ANDRADE CASTILLO

**ANÁLISE DOS BIOMARCADORES SALIVARES PARA O  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Clínica área de concentração Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia “Professor Albino Coimbra Filho” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros

Campo Grande – MS

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

KELLY ANDRADE CASTILLO

**ANÁLISE DOS BIOMARCADORES SALIVARES PARA O CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Clínica área de concentração Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia “Professor Albino Coimbra Filho” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado \_\_\_\_\_

Campo Grande (MS), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que me rodeiam, pois direta ou indiretamente influenciaram no meu crescimento humano e sucesso profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por terem me indicado o caminho do conhecimento e da sabedoria, me apoiar nas opções que escolhi para trilhar e segurar a minha mão sempre que me sinto insegura. Acredito que ser pai e mãe é isso. Acompanhar e apoiar a trajetória de seu filho, aconselhando, porém respeitando suas decisões.

Aos professores por transmitirem seus conhecimentos, compartilharem situações passíveis de encontrar no cotidiano da clínica e por me orientar nos caminhos da vida profissional. A Universidade Federal do Mato Grosso do Sul por ter a Faculdade de Odontologia “Prof. Albino Coimbra Filho” integrada ao seu campus e esta me conceder a oportunidade de realizar o mestrado no programa de Pós-graduação em Odontologia Clínica.

Aos profissionais que contribuíram para a elaboração deste trabalho minha orientadora Prof. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros, minha irmã Hozana Andrade Castillo, ao colega de mestrado Mateus Benjamim Benaglia e ao meu noivo Saulo Roberto Miotto da Costa, pois sem as vossas colaborações eu não teria concluído esta pesquisa.

Ao meu noivo que tem me acompanhado em todos os meus cursos, desde antes do meu ingresso na Universidade, meu stress a cada novo desafio, a e minha ansiedade a cada situação inesperada, os meus desabafos a cada frustração e que apesar de tudo isso continua ao meu lado, me apoiando e me dando forças. Admiro-te por estar ao meu lado todos esses anos e saber respeitar as minhas escolhas, mesmo que as vezes a contra gosto.

À Deus pela vida, pelas pessoas que colocou no meu caminho, minha família, amigos, colegas e até as pessoas que não simpatizo, pois cresço e aprendo com tudo e com todos.

A todos muito obrigada!

Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna (Baltasar Gracián).

## RESUMO

**Castillo KA. Análise dos biomarcadores salivares para o carcinoma epidermoide bucal.** Campo Grande; 2014. [Dissertação – Faculdade de Odontologia “Prof. Albino Coimbra Filho” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O carcinoma epidermoide bucal é uma neoplasia maligna, considerado um problema de saúde pública, pois apesar dos avanços da cirurgia, radioterapia e quimioterapia, não houve mudanças em sua taxa de mortalidade e morbidade nas últimas décadas. Visando mudar este quadro clínico crônico, o campo de grande promessa é a Oncologia Molecular, no qual estão sendo identificados os biomarcadores que são expressos diferencialmente em pacientes que apresentam esta doença. Inúmeros testes moleculares que utilizam sangue, saliva e outros fluidos corporais têm sido utilizados para caracterizar as alterações moleculares que ocorrem no organismo destes pacientes. Diante disso, este estudo tem como objetivo realizar uma metanálise para verificar os biomarcadores expressos diferencialmente na saliva dos pacientes com carcinoma epidermoide bucal, comparado a pacientes controles saudáveis de acordo com cada teste molecular. Para isso, foi feita uma busca detalhada de literatura nas bases de dados: PubMed, MedLine e The Cochrane Library para selecionar os artigos que utilizaram as palavras chave: “oral cancer”, “salivary”, “biomarkers”, “tumor markers”. Foram encontrados 179 artigos que foram submetidos a dois testes de relevância, onde foram selecionados apenas seis artigos. Os resultados desses artigos foram tabulados e submetidos à análise estatística, obtendo os biomarcadores que foram expressos diferencialmente entre os pacientes com carcinoma epidermoide bucal e pacientes controles. Concluiu-se que alguns dos biomarcadores estudados se expressam mais em pacientes com carcinoma epidermoide bucal, outros se expressam mais em pacientes controles e outros não se expressam diferencialmente entre nenhum dos grupos.

Palavras-chave: Câncer bucal, Saliva, Diagnóstico precoce

## ABSTRACT

**Castillo KA. Salivary biomarkers analysis for oral squamous cell carcinoma**  
Campo Grande; 2014. [Dissertação – Faculdade de Odontologia “Prof. Albino Coimbra Filho” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Oral squamous cell carcinoma is a malignant neoplasia, considered a public health problem, with no changes in the rate of mortality and morbidity on last decade despite surgery advances, radiotherapy and chemotherapy. Aiming to change this chronic clinical condition, Molecular Oncology is a great promise, where differentially expressed biomarkers are being identified in patients with this disease. Several molecular tests using blood, saliva and other body fluids have been used to characterize molecular alterations that occur in these patients body. Therefore, this study aims to conduct a meta-analysis to verify the differentially expressed biomarkers in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma, compared to healthy control patients according to each molecular test. For this, a detailed search was performed in those databases : PubMed , Medline , and The Cochrane Library to select articles that used this keywords : " Oral Cancer " , " salivary " , " biomarkers " , " tumor markers ". From 179 found articles, only six were selected after being submitted to two tests of relevance. The results of these articles were tabulated and submitted to statistical analysis, getting the biomarkers that were differentially expressed between patients with oral squamous cell carcinoma and controls. It was found that some of the biomarkers studied are more expressed in patients with oral squamous cell carcinoma, others are more expressed in control patients and others are non-differentially expressed between any of the groups.

Keywords: Oral cancer, Saliva, Early diagnosis

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – IL-8 / ELISA.....	33
Tabela 2 – M2BP / ELISA.....	33
Tabela 3 – TNF- $\alpha$ / ELISA.....	33
Tabela 4 – IL-1 $\beta$ / ELISA.....	34
Tabela 5 – IL-6 / ELISA .....	34
Tabela 6 – ET / IMUNOSOLVENTE.....	34
Tabela 7 – IL-8 / qPCR .....	35
Tabela 8 – miRNA-200a / qPCR.....	35
Tabela 9 – miRNA-125a / qPCR.....	35
Tabela 10 – miRNA-93 / qPCR.....	35
Tabela 11 – miRNA-142 / qPCR.....	36
Tabela 12 – H3F3A / qPCR.....	36
Tabela 13 – DUSP / qPCR.....	36
Tabela 14 – IL-1 $\beta$ / qPCR.....	37
Tabela 15 – OAZ1 / qPCR.....	37
Tabela 16 – SAT1 / qPCR.....	37
Tabela 17 – S100P / qPCR.....	38

.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Teste de relevância 1 .....	29
Quadro 2 – Teste de relevância 2 .....	30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da pesquisa.....	31
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

24-merZNF510- nível 24-mer da proteína 510 de ligação ao zinco  
CEB – carcinoma epidermoide bucal  
CycD1- ciclina e carbonilas D1  
DUSP1- especificidade dupla da fosfatase-1  
ET-1- endotelina-1  
FUT2- fucosiltransferase 2  
H3F3A – família 3ª da histona H3  
IL-1 – interleucina-1  
IL-1 $\beta$ - interleucina-1 $\beta$   
IL-6 – interleucina-6  
IL-8 – interleucina-8  
LDH- lactato desidrogenase  
M2BP- proteína de ligação mac-2  
miRNA – micro RNA  
MMP-9- matriz metaloproteinase 9  
MRP14- proteína de ligação de cálcio 14  
OAZ1- antienzima descarboxilase de ornitina-1  
OGG1- oxoguanina glicosilase-1  
PCR – reação em cadeia polimerase  
PSA – antígeno prostático específico  
S100P- proteína de ligação P de cálcio  
SAT – acetiltransferase de espermidina  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral- $\alpha$   
TR- teste de relevância  
ZNF510- proteína 510 de ligação ao zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Câncer.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Carcinoma epidermoide .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Saliva .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Biomarcadores ou marcadores tumorais .....</b>	<b>23</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>29</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460 – 375 a.C.). O câncer não é uma doença recente, ele foi detectado em múmias egípcias há mais de três mil anos antes de Cristo (BRASIL, 2011a).

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças, que tem em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (BRASIL, 2011b).

O câncer bucal compõe 2 a 3% de todas as neoplasias, com mais de 300 mil novos casos diagnosticados anualmente em todo o mundo, sendo que, mais de 90% destes casos são classificados como carcinoma epidermoide bucal (CEB) (JOU *et al.*, 2011).

O carcinoma epidermoide ou carcinoma de células escamosas pode envolver qualquer região anatômica da boca. O seu surgimento está associado a uma série de mutações moleculares que podem ser desencadeados por alguns fatores de risco como o estilo de vida, o consumo do tabaco associado ou não ao álcool, a herança genética, faixa etária, gênero, condições imunológicas e nutricionais, ação de microrganismos virais e ao trauma. O epitélio bucal exposto a esses carcinógenos desencadeia uma série de mutações genéticas, com a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (GONZALES-MOLES *et al.*, 2000; ARELLANO-GARCIA *et al.*, 2008; Jepsen *et al.*, 2008).

Mesmo com o avanço significativo no tratamento do carcinoma epidermoide bucal, a taxa de sobrevida está em torno de 50% e a expectativa de vida em média de cinco anos, não havendo muitas alterações nos últimos 50 anos. Uma provável hipótese para justificar esta situação é a detecção tardia, pois a maioria das lesões, em sua fase inicial, são pequenas e assintomáticas e são facilmente ignoradas ou mal interpretadas (YANG *et al.*, 2010; BRINKMANN *et al.*, 2011).

A detecção precoce teria um grande impacto na taxa de sobrevivência, mortalidade e morbidade de pacientes com carcinoma epidermoide bucal. Por isso, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas visando encontrar biomarcadores que possam realizar o diagnóstico precoce desta patologia. Através destes estudos foi possível verificar que a mutação das células cancerosas pode ser encontrada de

forma idêntica nos fluidos corporais como são apresentadas nos tumores primários (LI *et al.*, 2004).

Com isso, a saliva ganhou atenção notável como meio utilizado em diagnóstico, pois sua coleta é simples, não invasiva e de baixo custo. Na saliva é possível detectar DNA, proteínas e eletrólitos, possibilitando estudos mais detalhados de determinadas doenças. As pesquisas demonstram o potencial das proteínas salivares como biomarcadores para essas doenças. (Jessie *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

Os biomarcadores ou marcadores tumorais são macromoléculas que estão presentes no sangue, saliva, urina, outros líquidos biológicos e no tumor. São produzidos pelo organismo ou pelo próprio tumor, indicando a presença da neoplasia. A maioria dos marcadores tumorais é constituída de proteínas ou pedaços de proteínas, incluindo hormônios, enzimas, antígenos de superfície e proteínas citoplasmáticas (CAPELOZZI, 2001; SILVEIRA, 2005).

A detecção de alterações genéticas das células cancerosas pode prevenir as manifestações clínicas resultantes do câncer, contribuindo na detecção precoce, avaliação de risco, acompanhamento do prognóstico e tratamento do câncer. Por isso, há a necessidade dos profissionais que diagnosticam este tipo de patologia se atentar à evolução das tecnologias, visando utilizar também o recurso dos biomarcadores como meio diagnóstico (HU *et al.*, 2008, HOFFMANN *et al.*, 2011).

Os estudos com biomarcadores estão direcionados na identificação de novos marcadores tumorais que possam prevenir, diagnosticar e acompanhar o carcinoma epidermoide bucal.

Este trabalho teve como objetivo realizar uma metanálise para verificar os biomarcadores expressos diferencialmente na saliva dos pacientes com carcinoma epidermoide bucal, comparado a pacientes controle saudáveis de acordo com cada teste molecular.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer

A primeira descrição do câncer foi encontrada em um papiro descrito por Edwin Smith cerca de 3000 anos (a.C.), o manuscrito referia-se a um câncer de mama (HAJDU, 2011a).

Hipócrates (460 – 375 a.C.) e seus discípulos acreditavam que a origem do câncer era o excesso ou deficiência de sangue, muco e bile, especialmente na velhice. Foi Hipócrates o primeiro a utilizar a palavra câncer, pois ele comparou a doença ao caranguejo devido sua semelhança em agarrar as estruturas ao seu redor, similar às garras do caranguejo. Para Cláudio Galeno (130 – 200 d.C) o acúmulo da bile negra e espessa causava a ulceração e o câncer incurável, enquanto a bile amarela era responsável pelo câncer não ulcerado e curável. Esta teoria foi aceita por médicos e religiosos, não havendo muitas modificações por 16 séculos, período da Idade Média (ZHANG, YUE, 2012).

Henri de Modeville (1260 – 1320 d.C.) rejeitou a teoria de Galeno e afirmou que o câncer era dividido em simples e composto de acordo com a história das lesões anteriores. E também introduziu a classificação dos cânceres de acordo com o tamanho, localização e se os tumores eram superficiais ou profundos localmente (HAJDU, 2011a).

Para Zacutus Lusitani (1575 – 1642) e Nicholas Tulp (1593 – 1674) o câncer era uma doença contagiosa, pois era encontrado em membros da mesma família, muito comum com o câncer de mama (HAJDU, 2011b).

Herman Lebert (1813 – 1878) descreveu e ilustrou núcleos aumentados, macronúcleos e múltiplos núcleos como característicos de células malignas, e que as células cancerosas têm maior proporção núcleo-citoplasma. Para James Paget (1811 – 1899) as mitoses das células cancerosas eram encaradas como desfavoráveis. Rudolph Virchow (1821 – 1902) afirmou que todas as células vêm de células e implantou a teoria de que as células cancerígenas derivam de células pré-existentes que sofreram alterações químicas intracelulares (HAJDU, 2012).

Para Theodor Boveri (1862 – 1915) um dos pré-requisitos para que houvesse a transformação de células em células malignas era a alteração na constituição cromossômica das mesmas. Esta modificação no cromossomo resultava na aceleração e divisão nuclear anormal. Em 1960 houve a descoberta de um pequeno

cromossomo em células leucêmicas (cromossomo Filadélfia) que deu impulso para o campo da citogenética (ZHANG, YUE, 2012).

Em 1928 Karl Heinrich Bauer, desenvolveu e justificou a teoria da origem da mutação de tumores através de fenômenos intracelulares, divisão e proliferação celular, metástase e crescimento tumoral e ainda tirou conclusões sobre tratamento do câncer e advertiu sobre fatores exógenos e prevenção. Essas conclusões foram extraídas através de argumentos probabilísticos (EDLER, KOPP-SCHNEIDER, 2005).

Em 1939 foi introduzida a teoria de mutação do gene como origem do câncer e em 1969 Todaro Huebner introduziu o conceito de oncogene (ZHANG, YUE, 2012).

Smith e Wilcox, em 1970, deram origem à revolução molecular e indústria de biotecnologia com a identificação de enzimas que usavam bactérias de forma defensiva para decompor sítios específicos do DNA, abrindo caminho para o sequenciamento do genoma (DE VITA JÚNIOR, ROSENBERG, 2012).

Em 1978, Potter e Pierce esboçaram um modelo de renovação celular simulando como se inicia a carcinogênese. Durante o processo de divisão há um comprometimento em uma determinada célula filha que dá origem a outras células filhas transmitindo sua diferenciação e assim, há uma proliferação de células terminalmente diferenciadas (SELL, 1993).

Em 1971 os Estados Unidos criou o Instituto Nacional do Câncer que tinha como objetivo apoiar a investigação e a aplicação dos resultados da pesquisa para reduzir a incidência, morbidade e mortalidade por câncer. O auge do Instituto ocorreu no início de 1980 com a descoberta de genes que impulsionam ou suprimem o crescimento celular e a regulação complexa dos sistemas de sinalização usados por células normais e células cancerosas de se comunicar umas com as outras e seu meio ambiente. Essas descobertas abriram caminho para a pesquisa de sequenciamento do genoma humano que ocorreu em 2000, e em 2002 foi relatado a descoberta dos microRNAs (miRNA) no câncer e a epigenética no câncer. Através destas pesquisas pôde-se revelar a complexidade do câncer e também mostrar o risco aumentado daquele genoma para o desenvolvimento de um câncer comparando tecidos pré-malignos e tecidos malignos (DE VITA JÚNIOR, ROSENBERG, 2012).

## 2.2 Carcinoma Epidermoide

Câncer é o nome genérico dado ao conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento e multiplicação desordenada de células capazes de invadir tecidos e órgãos, dando origem à formação de tumores malignos. Quando os tumores têm início em células de tecidos epiteliais, são denominados carcinomas (BRASIL, 2011b).

O carcinoma epidermoide bucal ou carcinoma de células escamosas bucal é considerado a neoplasia maligna de maior frequência e envolve qualquer região anatômica da boca. A lesão se origina do epitélio de revestimento e está associada principalmente ao perfil dos homens acima dos 40 anos, normalmente etilista e tabagista (BRENER *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que o estilo de vida, o consumo do tabaco associado ou não ao álcool parecem contribuir para o desenvolvimento dessa patologia. A herança genética, faixa etária, gênero, condições imunológicas e nutricionais bem como a ação de microrganismos virais, têm papel importante entre os carcinógenos (GONZALES-MOLES *et al.*, 2000).

Ainda como fatores de risco comum estão os dentes fraturados, doença periodontal e a utilização de próteses mal adaptadas (JEPSEN *et al.*, 2008).

Para Feller e Lemmer (2012), a probabilidade de desenvolver o carcinoma epidermoide bucal aumenta conforme uma maior exposição aos fatores de risco e com a progressão da idade, pois há um aumento na dimensão de alterações mutagênicas e epigenéticas relacionadas à idade. Nos países ocidentais o carcinoma epidermoide bucal afeta o ventre de língua entre 20-40% e o assoalho de boca entre 15-20% dos casos. Isso se deve porque essas regiões são revestidas por um epitélio fino e não queratinizado e com isso, os produtos do tabaco e do álcool podem penetrar facilmente neste epitélio e comprometer as células progenitoras com os produtos carcinogênicos.

Clinicamente pode-se mostrar como uma lesão exofítica, de superfície irregular ou papilar, de coloração normal, vermelha ou branca, ou também como uma lesão endofítica, ulcerada ou não, no qual a úlcera normalmente exhibe formato irregular e bordas elevadas, acometendo língua, lábio inferior, assoalho bucal, mucosa jugal, gengiva e palato (NEVILLE *et al.*, 2009).

A exposição do epitélio bucal aos carcinógenos acaba por desencadear uma série de mutações genéticas, com a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (TAKEDA *et al.*, 2006).

Na célula normal, diferentes classes de genes produzem proteínas com atividades específicas; como os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são produtores de proteínas que estimulam a proliferação celular, se estes genes sofrerem mutação se convertem em oncogenes; enquanto que os genes supressores de tumor inibem o ciclo celular (SCULLY & FIELD, 1997).

A ativação dos oncogenes pode ocorrer de várias maneiras, sendo as mais frequentes: mutação, amplificação, superexpressão e translocação, resultando em excessiva multiplicação (BRAAKHUIS *et al.*, 2004).

Para Hu *et al.*, (2008) a carcinogênese oral surge através de uma série de estágios histopatológicos, da hiperplasia benigna à displasia, para o carcinoma *in situ* seguido do carcinoma de células escamosas invasivo. Ao nível molecular o desenvolvimento do carcinoma epidermoide é um processo de múltiplos passos acompanhado por mutações genéticas e modificações de diversos genes que conduzem um crescimento celular descontrolado. A heterogeneidade molecular e celular do carcinoma epidermoide e o grande número de genes potencialmente envolvidos na carcinogênese oral enfatiza a importância de se estudar os genes e vias de sinalização envolvidos nesse processo.

Para Rothenberg e Ellisen (2012), independente da heterogeneidade biológica dos subsítios, a análise molecular deve ser realizada para que possa revelar os perfis genômico do carcinoma e relacionar com o comportamento clínico, pois os genes envolvidos no desenvolvimento e progresso do câncer desempenham pelo menos quatro caminhos funcionais que são: proliferação celular; diferenciação do epitélio escamoso; sobrevivência e invasão celular; metástase. E o conhecimento mais refinado da biologia epitelial e genética do câncer, abordando as proteínas alvo permitirá um avanço clínico no progresso contra esta patologia.

O carcinoma epidermoide tem aparência heterogênea e há múltiplos caminhos celulares no progresso da carcinogênese, sendo assim, as pesquisas tentam identificar biomarcadores úteis para o diagnóstico rápido e preciso de amostras salivares para o carcinoma epidermoide e diferenciar suas fases de progressão (JOU *et al.*, 2011).

Para o diagnóstico do carcinoma epidermoide a biópsia continua sendo o padrão ouro, porém, há a busca dos biomarcadores excelentes através da saliva (BRINKMANN *et al.*, 2011).

### 2.3 Saliva

A saliva é composta por mais de 99% de água e o remanescente, menos de 1%, consiste principalmente de proteínas e eletrólitos. Este fluido contribui na ação antibacteriana, capacidade tampão, mastigação, deglutição, fala e lubrificação do epitélio (FEJERSKOV, KIDD, 2005).

Moura *et al.*(2007), relataram que a saliva durante muito tempo era utilizada apenas para monitorar o risco de cárie através do meio biológico medido pela capacidade tampão e avaliação microbiana. Porém, afirmaram que a saliva também pode ser utilizada para estudos mais detalhados, pois se sabe que determinadas doenças sistêmicas podem influenciar na qualidade e na quantidade de saliva produzida, afetando os constituintes químicos e as propriedades físicas. A saliva está sendo utilizada como meio de diagnóstico de doenças com envolvimento de agentes biológicos infecciosos, doenças neoplásicas malignas, psiquiátricas, doenças auto-imunes e endócrinas, algumas dessas doenças podem ser diagnosticadas através da utilização do DNA que está presente na saliva.

Para Arellano-Gracia *et al.* (2008), a saliva ganhou atenção notável como diagnóstico por ser simples a sua coleta, não invasivo e baixo custo. As pesquisas estudam o potencial das proteínas salivares como marcadores para várias doenças.

Estudo realizado por Streckfus *et al.* (2000) analisou marcadores tumorais do câncer de mama presentes na saliva, estudando em conjunto com a análise mamográfica. Verificou-se que o fragmento solúvel do oncogene c-erbB-2, um marcador prognóstico do câncer de mama e o antígeno 15-3 para câncer (CA 15-3), foram significativamente maiores na saliva e no soro de mulheres com diagnóstico de câncer, quando comparado com mulheres saudáveis e indivíduos com tumores benignos.

As mutações das células cancerosas no tumor primário podem ser encontradas de forma idêntica nos fluidos corporais. Com isso, tem aumentado o desenvolvimento de tecnologias que se utilizam de métodos que permitam o rastreamento de alterações genéticas pela saliva (Li *et al.*, 2004).

Para Hu *et al.* (2008) as células do câncer bucal estão imersas no meio da saliva, por isso a análise dos proteomas salivares de pacientes com tumores representa uma abordagem potencialmente promissora para encontrar biomarcadores potenciais para a doença, no entanto, a alta quantidade de amilase salivar e imunoglobulinas pode interferir em alguns teste moleculares.

O primeiro relato do uso da saliva como ferramenta de diagnóstico para o carcinoma epidermoide bucal foi publicado em 2000 por Liao *et al.* no qual os autores compararam os dados encontrados na saliva entre pacientes saudáveis e pacientes com o câncer para confirmar a mutação da proteína p53. Além de constatarem que há alteração de expressão do p53, eles afirmaram que esta proteína pode ser um biomarcador para o carcinoma epidermoide bucal e verificaram também que a quantidade de DNA recuperado a partir da saliva, na maioria dos casos, é suficiente e de qualidade adequada para permitir a amplificação para o teste molecular PCR, realizando assim, pesquisas de mutações.

A saliva é uma fonte conveniente de DNA, oferecendo uma abordagem não invasiva, podendo ser utilizada para descrever o perfil genômico desta patologia, contudo, estudos com uma grande amostra de participantes são necessários para avaliar o papel do polimorfismo dos genes no desenvolvimento do carcinoma epidermoide bucal. O campo da análise sistemática genômica e proteômica dos biomarcadores salivares facilita a identificação de parâmetros sensíveis e específicos para o câncer bucal, podendo fortalecer e transformar o monitoramento, diagnóstico e prognóstico desta doença (SHAH *et al.*, 2011).

Descobrir e validar proteínas diferencialmente expressas na saliva de pacientes com câncer bucal foi o objetivo de Hu *et al.*, em 2008. Eles identificaram a presença de proteínas salivares e avaliaram seu potencial para a detecção de carcinoma epidermoide bucal e verificaram que 52 proteínas estavam presentes apenas nos pacientes com CEB, 29 proteínas estavam presente apenas nos pacientes saudáveis e 409 estavam presentes em ambos os grupos. Os pesquisadores selecionaram as proteínas que havia anticorpos comercialmente disponíveis. Com isso, 12 proteínas integraram a segunda etapa da pesquisa e foi possível concluir que cinco candidatos a biomarcadores foram validados com sucesso. A combinação destes biomarcadores pode gerar uma sensibilidade de 90% e especificidade de 83%. Todavia, ainda é um desafio traduzir estes resultados para as aplicações clínicas.

## 2.4 Biomarcadores ou Marcadores tumorais

Os biomarcadores ainda não são sensíveis o suficiente para serem usados como diagnóstico primário de câncer, sendo, normalmente, utilizados junto com outros testes, com exceção do antígeno prostático específico (PSA) que é utilizado para rastreamento de neoplasia prostática (GUIMARÃES *et al.*, 2002).

Segundo, Schwartz (1993), os marcadores tumorais podem ser de dois tipos: marcadores intermediários – que medem alterações celulares e moleculares antes do aparecimento da malignidade, e marcadores diagnósticos – presentes em associação com a malignidade.

Para Capelozzi (2001) é necessário identificar e validar o marcador tumoral para uso clínico, e este deve passar pelos seguintes processos: identificação inicial feita em linhagens celulares do tumor em questão; teste do marcador em tecido proveniente de biópsias de pacientes com diagnóstico estabelecido do tumor em questão; teste em biópsias de tecidos normais e com processo inflamatório; teste em escarro, sangue, urina ou saliva para validação como teste não invasivo que possa ser usado em população de alto risco.

Em 2005, Rhodus *et al.*, selecionaram 13 pacientes controle e 13 pacientes com CEB para comparar e determinar o nível de várias citocinas, visando identificar alterações entre processos inflamatórios e tecidos normais. Verificaram que o fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) foram elevados na saliva de todos os pacientes com carcinoma epidermoide bucal em comparação com os controles.

Para Li *et al.* (2004) as alterações genéticas das células cancerosas levam a alterações da expressão dos genes padrões, que podem ser identificados muito antes das manifestações dos fenótipos resultantes de câncer. Essas mudanças podem ser utilizadas como marcadores tumorais, que quando identificados com precisão podem contribuir na detecção precoce e avaliação de risco para o câncer. Em sua pesquisa estes autores avaliaram nove RNAs mensageiros (mRNAs) presentes na saliva como candidatos a biomarcadores. No entanto, apenas sete mRNAs confirmaram-se quantitativamente determinantes. Desses sete, apenas quatro foram validados, indicando que o paciente tinha CEB. A combinação das proteínas IL-8, acetiltransferase de espermidina (SAT) e família 3A da histona H3 (H3F3A) sugerem uma previsão de CEB com sensibilidade de 90,6%.

Arellano-Garcia *et al.* (2008), afirmaram que a utilização dos marcadores tumorais está se desenvolvendo com sucesso e ainda podem levar a exames clínicos simples na detecção precoce e acompanhamento do prognóstico e tratamento da doença, pois eles realizaram uma pesquisa para determinar a eficácia de duas tecnologias diferentes: single-plex e multiplex - para a medição de proteínas salivares. Para isso, eles selecionaram vinte pacientes com CEB e vinte indivíduos controle saudáveis e dez pacientes com periodontite para examinar se a IL-8 e IL-1 $\beta$  presente na saliva apresentam diferenças significativas entre os grupos. Concluíram que estes biomarcadores são verdadeiramente discriminatórios para o CEB, pois apesar dos pacientes com periodontite apresentarem alterações nos níveis de IL-8 e IL-1 $\beta$ , estes não se apresentam tão elevados como nos pacientes com CEB.

Em 2009, Shpitzer *et al.*, examinaram a presença de oito biomarcadores na saliva de 19 pacientes com CEB e 19 controle. E concluíram que todos os oito biomarcadores salivares (matriz metaloproteinase-9 - MMP-9, carbonyls, Ki67, ciclina e carbonilas D1 - CycD1, oxoguanina glicosilase -1 - OGG1, Phospho-Src, lactato desidrogenase - LDH e Maspin) foram altamente significativos. Por isso, foram caracterizados com alta sensibilidade e especificidade.

Em 2009, Park *et al.* compararam mRNAs da saliva de pacientes com carcinoma de células escamosas e pacientes controles saudáveis da mesma idade, gênero, etnia e histórico de tabagismo e concluíram que os mRNAs são expressos diferencialmente quando comparadas as células cancerosas com as células normais.

Em 2010 Jou *et al.* identificaram biomarcadores salivares para o estágio inicial do carcinoma epidermoide bucal através da identificação proteômica da transferrina salivar presente nos pacientes com a doença. Além disso, constataram que a combinação de proteína de ligação Mac-2 - M2BP, proteína de ligação de cálcio-14 - MRP14, CD59, profilin e catalase como candidatos a biomarcadores apresentou uma sensibilidade de 90% e especificidade de 83%.

Jou *et al.* (2011) buscaram identificar um novo biomarcador salivar para o diagnóstico precoce do CEB através da proteína 510 de ligação ao zinco (ZNF510) e identificaram o peptídeo nível 24-mer da proteína 510 de ligação ao zinco (24-merZNF510) como biomarcador salivar relacionado ao CEB, e este mostrou-se útil no diagnóstico auxiliar para a detecção precoce desta patologia.

Brinkmann *et al.* (2011), avaliaram em pacientes da Sérvia biomarcadores salivares descobertos e validados em pesquisa anterior realizada com pacientes americanos para o carcinoma epidermoide bucal e constataram que estes biomarcadores não puderam diferenciar gênero e hábito de fumo, além disso, o marcador antienzima descarboxilase de ornitina-1 (OAZ1) não foi expresso nos participantes com CEB da Sérvia, levantando hipóteses de haver alterações de expressões das proteínas de acordo com a etnia. Embora sejam promissores os resultados de biomarcadores salivares, mais estudos são necessários para validá-los.

Cheng *et al.*, 2011, investigaram a viabilidade do uso da saliva na detecção da endotelina-1 (ET-1) como biomarcador para o diagnóstico do câncer epidermoide bucal e concluíram que o ET-1 pode ser um bom biomarcador para o desenvolvimento do CEB, no entanto, são necessários estudos em grande escala que investiguem se os níveis salivares do ET-1 podem sofrer influência de doenças sistêmicas.

Em busca de biomarcadores salivares que validem a detecção precoce do carcinoma epidermoide bucal Elashoff *et al.*, em 2012, selecionaram indivíduos com carcinoma epidermoide bucal e indivíduos controle num total de trezentos e noventa e cinco pessoas, que foram distribuídos em cinco grupos de validação independentes. Os grupos 1 e 2 foram distribuídos conforme sexo e estágio da doença. Os grupos 3, 4 e 5 foram distribuídos por idade, sexo, etnia e história de tabagismo. Estes grupos foram utilizados para validar sete mRNAs e três proteínas presentes na saliva relatados anteriormente como biomarcadores capazes de discriminar pacientes com carcinoma epidermoide bucal. Com isso, concluíram que a idade não apresentou diferença estatística entre grupo controle e grupo com CEB. No que diz respeito ao desempenho dos biomarcadores individuais, dois (IL-8 e SAT) foram significativamente aumentados em todos os grupos, enquanto que outros quatro biomarcadores (IL-1 $\beta$ , especificidade dupla da fosfatase-1- DUSP1, OAZ1 e H3F3A) foram aumentados significativamente em apenas três grupos e um biomarcador (proteína P de ligação de cálcio - S100P) foi significativamente aumentado em dois grupos.

Brailo *et al.*, 2012, compararam as concentrações séricas salivares de interleucina 1 beta (IL-1B), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ) em pacientes com leucoplasia oral, CEB e controles saudáveis. Sendo 28 com

câncer, 29 com leucoplasia e 31 controle, num total de 88 indivíduos. Concluíram que a IL-1B e IL-6 foram significativamente maiores em pacientes com CEB do que em pacientes com leucoplasia e grupo controle. Não houve diferença estatística do TNF-  $\alpha$  entre qualquer um dos grupos que foram observados.

Jessie *et al.* (2013), buscavam alterações na expressão de proteínas salivares de doze pacientes com carcinoma epidermoide bucal comparando a saliva de doze pacientes saudáveis e concluíram que há evidências de níveis de alteração de proteínas que podem ser utilizadas como diagnóstico precoce e até mesmo como monitor do carcinoma epidermoide bucal, mas é necessário a validação das proteínas encontradas nesta pesquisa clinicamente em um grupo de representação popular.

Em 2013, Yang *et al.*, avaliaram o potencial de uma abordagem não invasiva para avaliar o risco e o progresso de lesões pré-cancerígenas com análise de micro RNA (miRNA) salivar e eles puderam constatar que o uso da saliva se mostra promissor para o monitoramento, detecção precoce e progressão do câncer através do uso do miRNA salivar.

Ensinck *et al.*, 2013 analisaram a expressão do gene fucosiltransferase-2 (FUT2) e CD44 presente na saliva de pacientes com lesões pré-cancerígenas e com carcinoma epidermoide bucal e concluíram que o gene FUT2 não é um biomarcador confiável de transformação de uma lesão pré-cancerígena em lesão cancerígena. Já o gene CD44 se apresenta superexpresso em pacientes com câncer, podendo ser considerado um biomarcador de risco em pacientes com lesões orais.

Em 2013, Vajaria *et al.*, avaliaram o ácido siálico total e a  $\alpha$ -L-fucosidase presente na saliva e no soro, buscando uma melhor compreensão da utilidade da saliva no acompanhamento de mudanças que ocorrem durante a progressão do câncer bucal. Para isso participaram 100 indivíduos com carcinoma epidermoide bucal, 100 indivíduos saudáveis para o controle e 50 indivíduos com lesão pré-cancerígena. E concluíram que a relação salivar do ácido siálico total e a  $\alpha$ -L-fucosidase foi elevada com maior magnitude quando comparada com os níveis séricos, sugerindo que estes biomarcadores podem ser utilizados como método não invasivo para a detecção precoce de mudanças que ocorrem durante a carcinogênese oral.

Em 2014, Wang *et al.*, realizaram um trabalho para investigar o potencial dos biomarcadores salivares na detecção precoce do carcinoma epidermoide bucal.

Participaram da pesquisa 30 indivíduos saudáveis e 30 indivíduos com CEB, os quais forneceram saliva não estimulada para análise da pesquisa. Eles encontraram quatro biomarcadores com concentrações significativamente diferentes entre os grupos, podendo ser potenciais biomarcadores salivares para o CEB, sendo necessárias pesquisas futuras com um número maior de participantes.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma metanálise para verificar os biomarcadores expressos diferencialmente na saliva dos pacientes com carcinoma epidermoide bucal comparado a pacientes controles saudáveis.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia desse trabalho seguiu as orientações do manual Cochrane dos revisores (COCHRANE, 2011).

Foi feita uma busca detalhada da literatura para identificar ensaios clínicos nas bases de dados PubMed, MedLine, The Cochrane Library, utilizando as palavras-chave “câncer oral”, “oral cancer”, “saliva”, “salivary”, “biomarcadores”, “biomarkers”, “marcadores tumorais”, “tumor markers” em português e em inglês a partir do ano 2000. O intuito desta busca foi obter apenas os estudos que representem a interseção do conjunto.

Os artigos, que puderam ser identificados de imediato, sobre relatos de casos, revisão bibliográfica e comunicações foram automaticamente descartados.

Após a coleta dos resultados, foi realizada uma conferência manual entre os trabalhos, tendo como intuito o descarte dos trabalhos duplicados. Em seguida os trabalhos foram submetidos à etapa de classificação por dois avaliadores independentes que fizeram a leitura do título e do resumo de todos os trabalhos e aplicaram o primeiro teste de relevância para cada resumo (Quadro 1).

Quadro 1 – Teste de relevância 1

<b>TESTE DE RELEVÂNCIA – 1</b>		
1 – O trabalho é sobre carcinoma epidermoide bucal?	( ) Sim	( ) Não
2 – A pesquisa é com seres humanos?	( ) Sim	( ) Não
3 – O artigo é um relato de caso ou revisão bibliográfica ou comunicado?	( ) Sim	( ) Não
4 – Foi realizado teste com a saliva?	( ) Sim	( ) Não
5- Foram encontrados marcadores tumorais para o carcinoma epidermoide a partir da saliva?	( ) Sim	( ) Não

Nos casos em que houve divergência entre os avaliadores, um terceiro avaliador classificou ou desclassificou o resumo em questão.

Depois da seleção dos resumos relevantes, os avaliadores leram na íntegra todos os trabalhos classificados e aplicaram um segundo teste de relevância (Quadro 2).

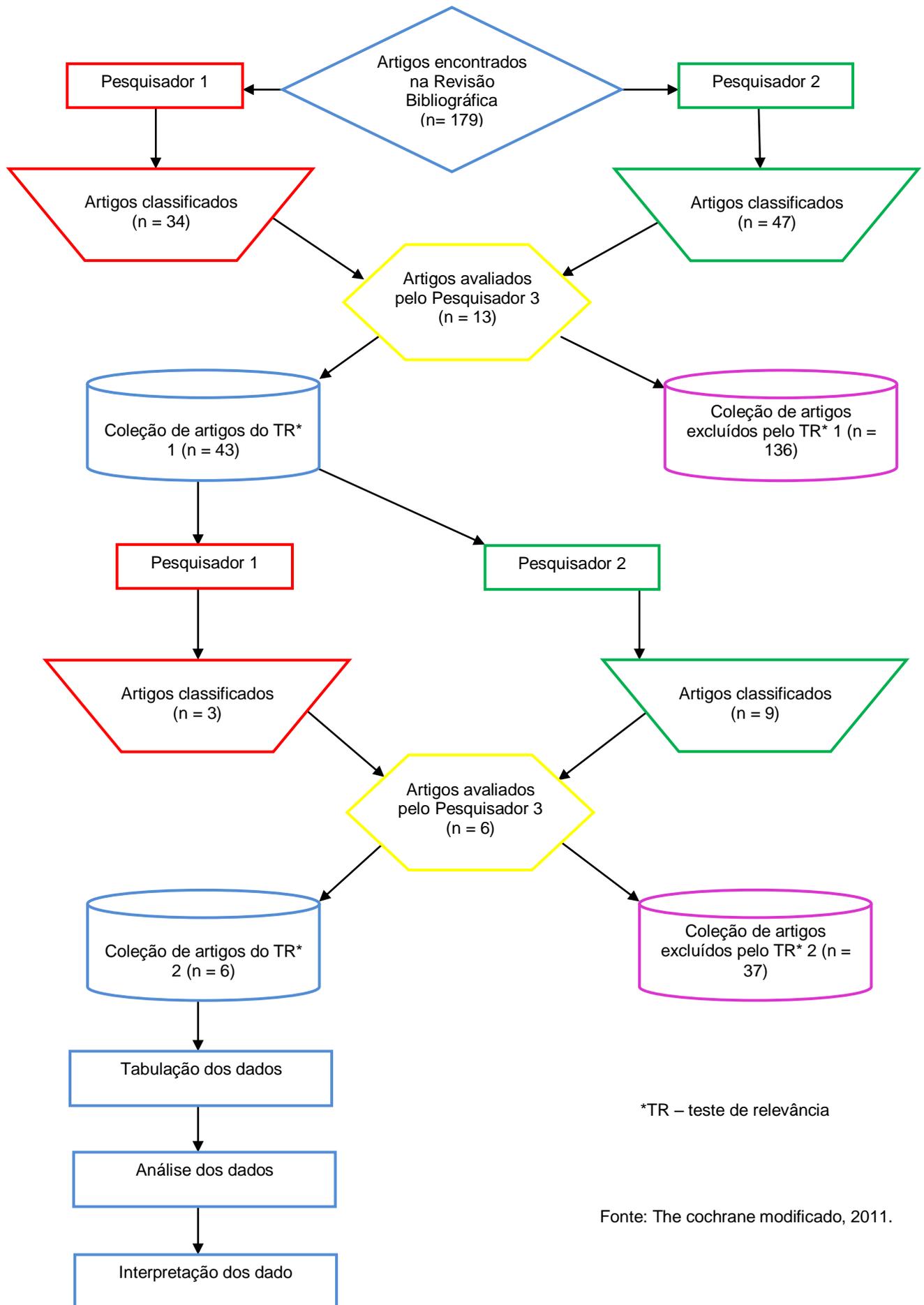
Quadro 2 – Teste de relevância 2

TESTE DE RELEVÂNCIA – 2		
1- Foi feita biopsia da lesão e análise histopatológica?	( ) Sim	( ) Não
2 – Foi confirmado carcinoma epidermóide bucal?	( ) Sim	( ) Não
3 – A pesquisa foi separada por sexo?	( ) Sim	( ) Não
4 – A pesquisa utilizou pacientes controle?	( ) Sim	( ) Não
5 – Foi avaliado o histórico de saúde dos pacientes?	( ) Sim	( ) Não
6 – Foi levada em consideração a nacionalidade/etnia dos pacientes?	( ) Sim	( ) Não
7 – Os pacientes foram separados pelo estágio da lesão?	( ) Sim	( ) Não
8 – Foi mencionado o(s) teste(s) molecular(es) utilizado(s) para encontrar os marcadores tumorais através da saliva	( ) Sim	( ) Não
9 – Foi utilizado algum teste para a amplificação dos marcadores tumorais encontrados a partir da saliva?	( ) Sim	( ) Não
10 – Foi utilizado algum teste para validar os marcadores tumorais encontrados na saliva?	( ) Sim	( ) Não
11 – Foram relatados os marcadores tumorais salivares diagnosticados através da saliva?	( ) Sim	( ) Não
12 – Há diferença entre os marcadores tumorais salivares encontrados nos pacientes controle e pacientes com a lesão?	( ) Sim	( ) Não
13- Houve combinação de testes para avaliar os marcadores tumorais salivares?	( ) Sim	( ) Não

Nos casos em que houve divergência entre os avaliadores, um terceiro avaliador classificou ou desclassificou o trabalho em questão.

Ao final, os artigos classificados foram enviados a um estatístico para verificar a homogeneidade e realizar a análise estatística entre os trabalhos, tendo assim, uma metanálise (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma da pesquisa



Os trabalhos selecionados no teste de relevância 2 foram tabulados no Excel, extraindo informações sobre número de pacientes controle e com CEB avaliados, qual biomarcador havia sido estudado, tipo de teste molecular utilizado, resultados encontrados para cada grupo. Então, foi realizada a análise estatística, considerando a diferença entre os grupos CEB e controle e o efeito geral dos mesmos em relação à expressão dos biomarcadores. Esta análise foi realizada com o auxílio do programa Review Manager (RevMan), versão 5.2.10, usando o modelo de efeito randômico, considerando um nível de significância de 5% com intervalo de confiança de 95%. Os resultados da análise foram apresentados em tabelas e gráficos do tipo floresta, mostrando a diferença entre as médias e o intervalo de confiança de 95% da diferença, para cada um dos trabalhos selecionados, bem como para o efeito geral do tratamento.

## 5 RESULTADOS

Os resultados estão descritos nas tabelas abaixo conforme os biomarcadores e o teste moleculares utilizados pelos autores.

Tabela 1 – IL-8 / ELISA\*

Study or Subgroup	OSCC			Controle			Weight	Mean Difference		Year	Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		IV, Random, 95% CI	Year		
Rhodus, 2005	3.1541	1.0232	13	1.58	0.789	13	35.0%	1.57	[0.87, 2.28]	2005	
Arellano-Garcia, 2008a	3.3132	3.3856	20	1.0617	1.9788	20	5.8%	2.25	[0.53, 3.97]	2008	
Arellano-Garcia, 2008b	2.8349	3.3856	20	0.9473	2.0368	20	5.8%	1.89	[0.16, 3.62]	2008	
Elashoff, 2012b	2.14	2.282	31	0.739	1.002	70	24.6%	1.40	[0.56, 2.24]	2012	
Elashoff, 2012a	2.563	2.179	36	0.808	1.132	54	28.8%	1.76	[0.98, 2.53]	2012	
<b>Total (95% CI)</b>			<b>120</b>			<b>177</b>	<b>100.0%</b>	<b>1.64</b>	<b>[1.23, 2.06]</b>		

Heterogeneity: Tau<sup>2</sup> = 0.00; Chi<sup>2</sup> = 1.00, df = 4 (P = 0.91); I<sup>2</sup> = 0%  
Test for overall effect: Z = 7.75 (P < 0.00001)

\*Para este marcador, os valores originais foram divididos por 1000 para ser possível apresentar o gráfico de floresta.

Tabela 2 – M2BP / ELISA\*

Study or Subgroup	OSCC			Controle			Weight	Mean Difference		Year	Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		IV, Random, 95% CI	Year		
Elashoff, 2012a	0.998	0.741	36	0.549	0.998	54	49.8%	0.45	[0.09, 0.81]	2012	
Elashoff, 2012b	1.012	0.873	31	0.968	0.765	70	50.2%	0.04	[-0.31, 0.40]	2012	
<b>Total (95% CI)</b>			<b>67</b>			<b>124</b>	<b>100.0%</b>	<b>0.25</b>	<b>[-0.15, 0.64]</b>		

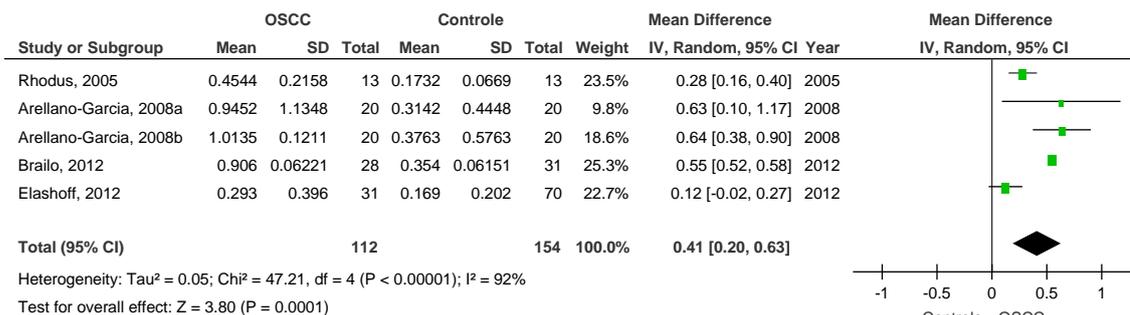
Heterogeneity: Tau<sup>2</sup> = 0.05; Chi<sup>2</sup> = 2.46, df = 1 (P = 0.12); I<sup>2</sup> = 59%  
Test for overall effect: Z = 1.21 (P = 0.23)

\*Para este marcador, os valores originais foram divididos por 1000 para ser possível apresentar o gráfico de floresta.

Tabela 3 – TNF-α / ELISA

Study or Subgroup	OSCC			Controle			Weight	Mean Difference		Year	Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		IV, Random, 95% CI	Year		
Rhodus, 2005	34	21.58	28	38	3.23	31	50.0%	-4.00	[-12.07, 4.07]	2005	
Brailo, 2012	28.9	14.6	13	3	1.9	13	50.0%	25.90	[17.90, 33.90]	2012	
<b>Total (95% CI)</b>			<b>41</b>			<b>44</b>	<b>100.0%</b>	<b>10.95</b>	<b>[-18.35, 40.26]</b>		

Heterogeneity: Tau<sup>2</sup> = 430.18; Chi<sup>2</sup> = 26.57, df = 1 (P < 0.00001); I<sup>2</sup> = 96%  
Test for overall effect: Z = 0.73 (P = 0.46)

Tabela 4 – IL-1 $\beta$  / ELISA\*

\*Para este marcador, os valores originais foram divididos por 1000 para ser possível apresentar o gráfico de floresta.

Tabela 5 - IL-6 / ELISA

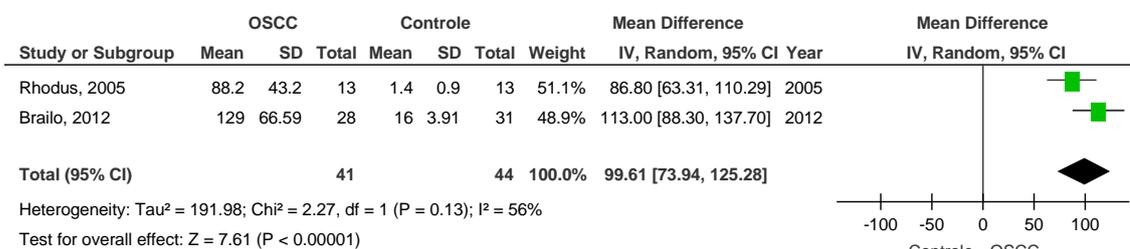
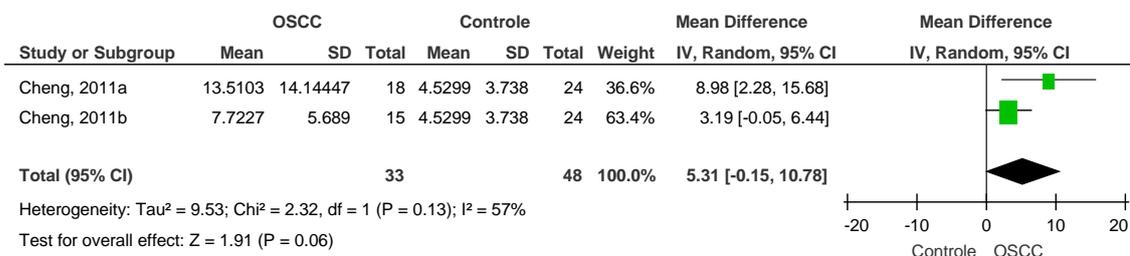


Tabela 6 - ET / ELISA



\*Para este marcador, os valores originais foram divididos por 1000 para ser possível apresentar o gráfico de floresta.

O teste ELISA pode ser dividido em diversos métodos, os principais são: direto ou sanduíche; indireto; competitivo ou de bloqueio; captura. Estes testes se baseiam em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas (KAMPA *et al.*, 2007).

Tabela 7 - IL-8 / qPCR

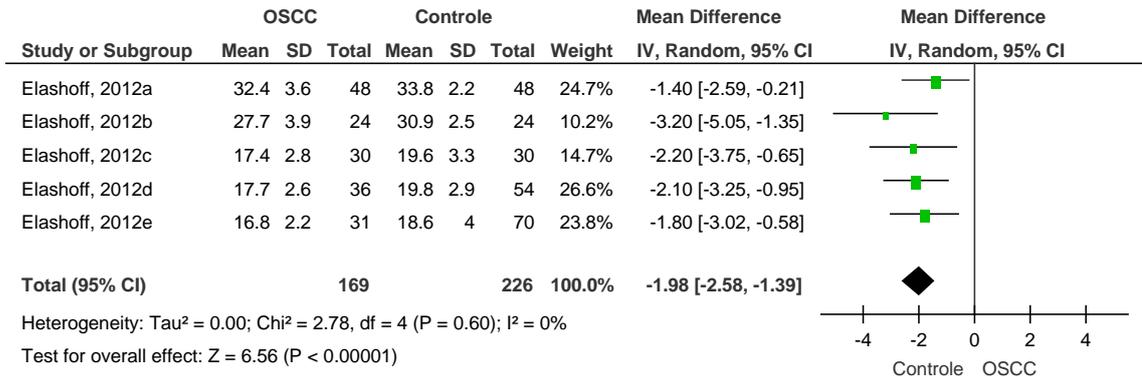


Tabela 8 - miR-200a / qPCR

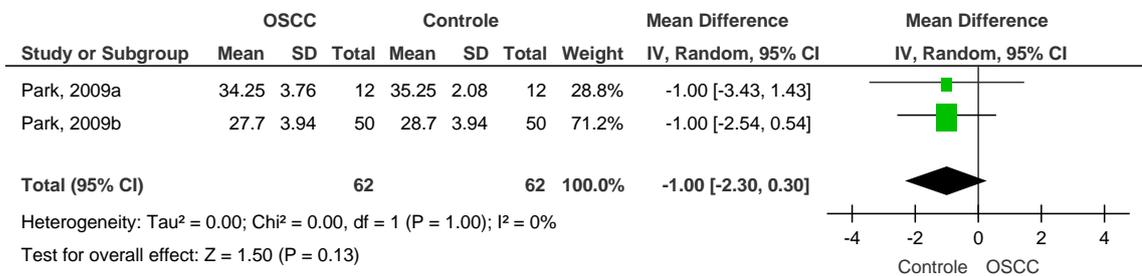


Tabela 9 - miR-125a / qPCR

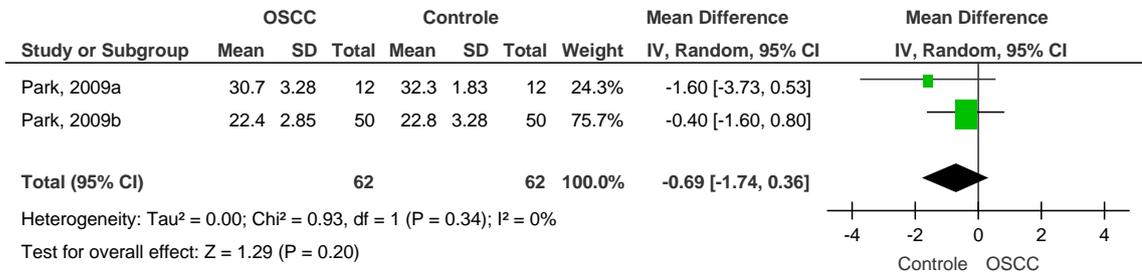


Tabela 10 - miR-93 / qPCR

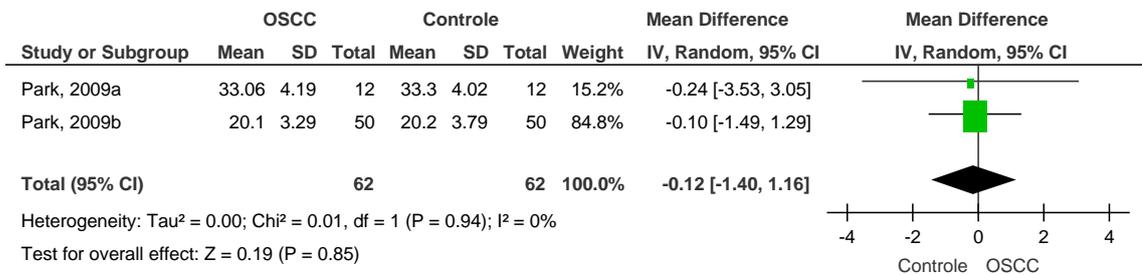


Tabela 11 - miR-142 / qPCR

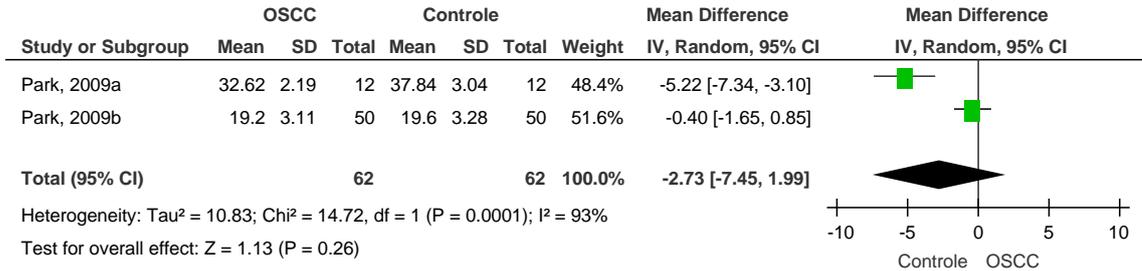


Tabela 12 - H3F3A / qPCR

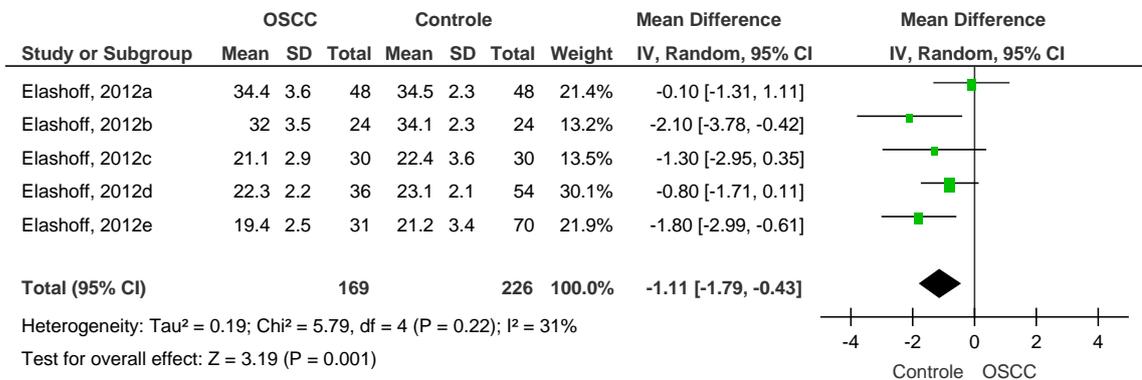


Tabela 13 - DUSP / qPCR

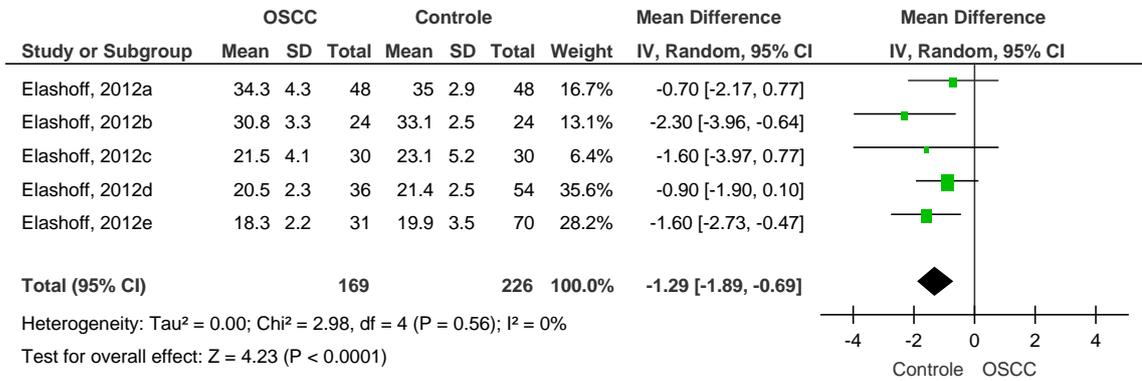


Tabela 14 - IL-1β / qPCR

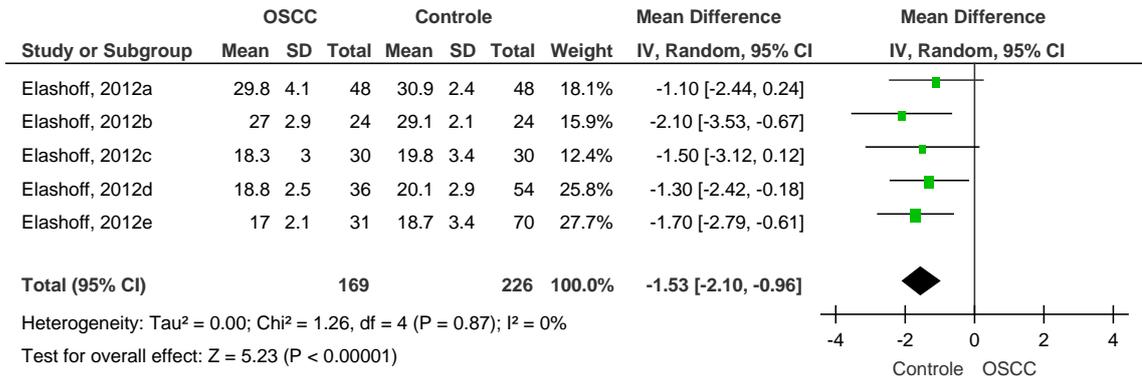


Tabela 15 - OAZ1 / qPCR

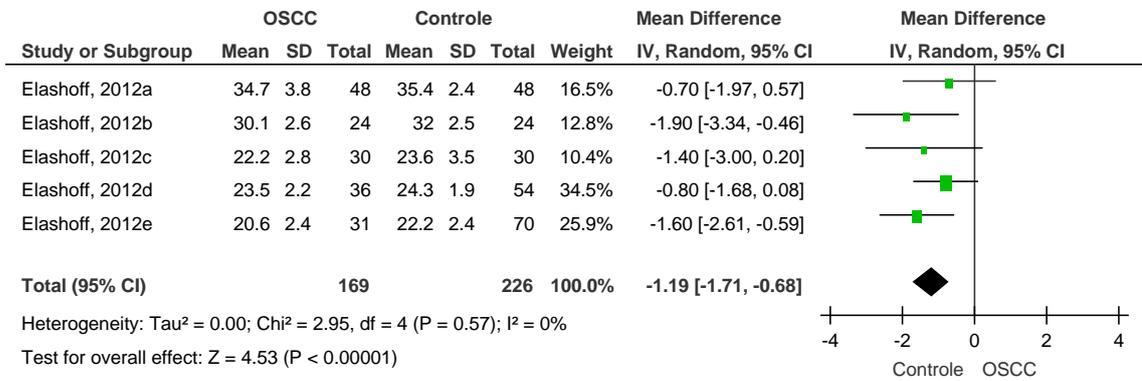


Tabela 16 - SAT1 / qPCR

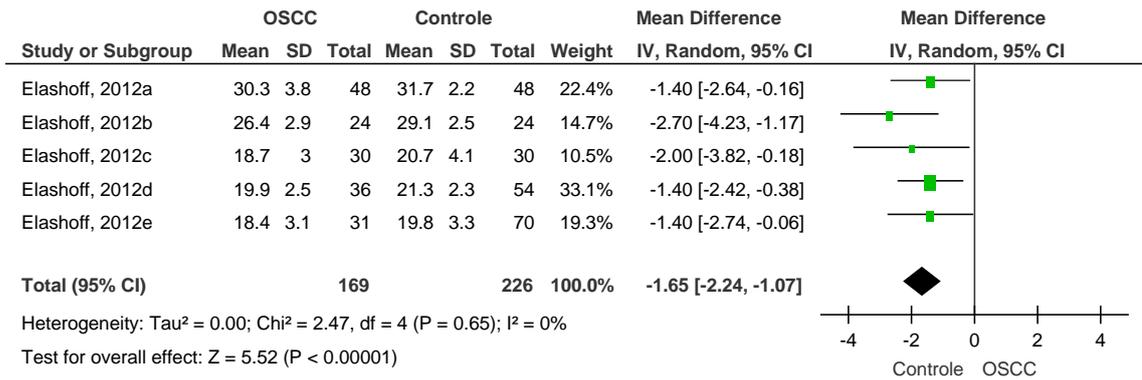


Tabela 17 - S100P / qPCR

Study or Subgroup	OSCC			Controle			Weight	Mean Difference IV, Random, 95% CI	Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
Elashoff, 2012a	31.9	3.8	48	32.4	2.3	48	20.3%	-0.50 [-1.76, 0.76]	
Elashoff, 2012b	28.4	2.5	24	30.7	2.4	24	17.6%	-2.30 [-3.69, -0.91]	
Elashoff, 2012c	22.5	3.3	30	24.6	4.7	30	9.4%	-2.10 [-4.16, -0.04]	
Elashoff, 2012d	22.5	2.5	36	23.1	2	54	28.0%	-0.60 [-1.58, 0.38]	
Elashoff, 2012e	21.7	2.5	31	22.6	2.66	70	24.8%	-0.90 [-1.98, 0.18]	
<b>Total (95% CI)</b>			<b>169</b>			<b>226</b>	<b>100.0%</b>	<b>-1.09 [-1.77, -0.42]</b>	

Heterogeneity: Tau<sup>2</sup> = 0.18; Chi<sup>2</sup> = 5.75, df = 4 (P = 0.22); I<sup>2</sup> = 30%  
 Test for overall effect: Z = 3.16 (P = 0.002)

-4    -2    0    2    4  
 Controle    OSCC

O teste molecular qRT-PCR ou PCR em tempo real é uma variação da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação qRT-PCR quantifica a expressão gênica em determinada amostra ou tecido biológico, utilizando-se de um sistema fluorescente capaz de detectar a luz que é emitida da reação de amplificação. Com isso, é possível monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado em cada ciclo da PCR. Uma das vantagens da qRT-PCR em comparação ao PCR convencional é a rapidez do processo, pois o qRT-PCR dispensa a análise na eletroforese em gel de agarose. Além disso, o qRT-PCR facilita a quantificação da expressão gênica em determinada amostra biológica (VALARINI *et al.*, 2011).

## 6 DISCUSSÃO

Podemos destacar no CEB sua heterogeneidade, pois anatomicamente a cavidade oral é constituída de várias estruturas distintas como lábio, língua, orofaringe que possuem características microscópicas diferentes, com isso, pode-se destacar a diversidade desta patologia, resultando em diferentes subsítios. Considerando ainda a heterogeneidade molecular e celular do CEB podemos citar os múltiplos caminhos para o progresso da carcinogênese, podendo ocorrer alterações genéticas nas fases de proliferação celular, diferenciação do epitélio escamoso, células de sobrevivência e invasão e na fase de metástase, tendo um grande número de genes envolvidos e podendo conduzir a um crescimento celular descontrolado em diversas vias da formação do CEB. Por isso, é importante estudar as mudanças de expressão de genes em seus diferentes caminhos de formação numa escala global (HU *et al.*, 2008; JOU *et al.*, 2011; ROTHEMBERG, ELLISEN, 2012; WANG *et al.*, 2013).

Alguns autores relatam que alterações na imunidade do hospedeiro, inflamação, alterações patológicas sistêmicas podem ser fatores que contribuem para a progressão da patogênese do CEB. As citocinas pró inflamatórias: interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), podem ser encontradas em quantidade elevada no local do câncer, sendo produzidas de um modo desregulado e contribuindo no crescimento celular, invasão, interrupção de supressão do tumor, estado imunitário e até mesmo na sobrevivência celular. Estas citocinas são encontradas na saliva de pacientes com câncer oral e pacientes com lesões pré-cancerígenas quando comparadas a pacientes controles, sugerindo ser um indicador de transformação de uma lesão pré-cancerígena para um câncer oral. (RHODUS *et al.*, 2005; ARELLANO-GARCIA *et al.*, 2008; BRINKMANN *et al.*, 2011; SHAH *et al.*, 2011; ELASHOFF *et al.*, 2012).

No entanto, o TNF- $\alpha$  não se apresentou significativamente expresso no grupo controle e nem no grupo CEB. Porém, a IL-8, IL-1 $\beta$  e IL-6 apresentaram significativamente expressas. Quando utilizado o teste molecular ELISA eles se expressaram mais no grupo CEB, confirmando os estudos em que as citocinas pró inflamatórias se elevam com a presença do câncer. Assim como no teste molecular qPCR estes marcadores se expressaram diferentemente entre os grupos estudados. Apesar dos resultados da metanálise mostrarem os biomarcadores IL-8 e IL-1 $\beta$  mais

expressos no grupo paciente controle, os autores Elashoff *et al.*, 2012 afirmaram em seu estudo que a IL-8 se apresentou aumentada em pacientes com CEB em todos os cinco estudos cortes e a IL-1 $\beta$  foi significativamente maior no grupo CEB em três estudos cortes.

O biomarcador proteína de ligação mac-2 (M2BP), um antígeno de tumor, o qual sugere um diagnóstico precoce do CEB, apresentou-se altamente significativo na fase inicial do câncer bucal na pesquisa de Brinkmann *et al.*, 2011, mas não teve resultado significativo entre os grupos estudados na metanálise, apesar de em estudos anteriores com outros tipos de cânceres terem sido encontradas significativamente maiores em pacientes portadores da doença (HU *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2011).

A endotelina 1 (ET-1) é um potente vasoconstritor encontrado na biologia vascular e em várias condições patológicas, incluindo a inflamação, cicatrização de feridas e carcinogênese, incluindo a diferenciação de tecidos e desenvolvimento e produção hormonal, promovendo o crescimento e a progressão de uma variedade de tumores. Contudo, este biomarcador não teve expressão diferencial entre os grupos estudados na metanálise, o qual corrobora com a pesquisa de Hoffmann *et al.*, 2011, no qual realizaram um estudo com grupos distintos para idade, sexo e história de hipertensão, e concluíram que não houve diferença significativa entre os grupos., descartando a hipótese de influência das variações sistêmicas sobre este biomarcador, não sendo, portanto, um bom biomarcador salivar para o CEB (CHENG *et al.*,2011).

Os micro RNAs (miRNAs) foram descobertos inicialmente como reguladores chave do desenvolvimento do animal, porém, recentes descobertas mostraram que o miRNAs desempenham funções importantes no crescimento celular, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse, a resposta imune e secreção de glicose. Park *et al.*, 2009 verificaram a presença dos miRNAs na saliva e determinaram seu potencial como biomarcador do CEB. Dos 314 miRNAs estudados apenas quatro se apresentaram como possíveis biomarcadores, os demais se degradaram ou não se apresentaram significativamente diferentes entre os grupos, sugerindo que os miRNA específicos para o CEB sofrem degradação mais rápida e/ou têm uma meia vida mais curta. E concluíram que o miRNA 125a e o 200a se apresentam em níveis mais baixos na saliva de pacientes com câncer do que pacientes saudáveis. Contudo, quando o resultado desta pesquisa foi submetido à metanálise observou-

se que existiu uma grande variação dos valores obtidos dentro do mesmo grupo no intervalo de segurança, tornando-o sem uma diferença estatística considerável.

Já biomarcador H3F3A que está presente na atividade de ligação do DNA é comumente utilizado como um marcador de proliferação, este biomarcador se mostrou estatisticamente significativo entre os grupos estudados. Corroborando com pesquisas realizadas por Li *et al.* 2004 e Elashoff *et al.*, 2012. Porém, nestes estudos o biomarcador se apresentou aumentado no grupo CEB, enquanto que na metanálise os dados fornecidos pelos autores mostraram este biomarcador aumentado no grupo controle.

A especificidade dupla da fosfatase-1 (DUSP1) é um biomarcador responsável pela modificação da proteína, transdução do sinal e estresse oxidativo. Este biomarcador foi investigado por Li *et al.* 2004, Brinkmann *et al.*, 2011, Elashoff *et al.*, 2012 e em todas as pesquisas foi confirmado a presença significativamente diferente deste biomarcador entre os grupos de pacientes com CEB e pacientes saudáveis. Concordando com os dados encontrados nesta pesquisa, enaltecendo o poder discriminatório deste marcador tumoral.

A anti enzima descarboxilase de ornitina-1 (OAZ1) é prevista como um supressor de tumor com base na sua função inibitória. Na pesquisa de Brinkmann *et al.*, 2011, este biomarcador foi o único que não apresentou diferença estatística significativa, sugerindo que pudesse haver expressões de genes divergentes de acordo com a etnia da população pesquisada. No entanto, na pesquisa de Li *et al.* 2004 e Elashoff *et al.*, 2012 este biomarcador foi estatisticamente significativo, estando estes trabalhos de acordo com o resultado encontrado na metanálise.

O biomarcador SAT-1 está envolvido no metabolismo da poliamina e tem se apresentado significativamente expresso no CEB, assim como a proteína P de ligação de cálcio (S100 P). Esta é conhecida por estar associada à progressão do câncer e com a imortalização de células epiteliais humanas *in vitro* e em alguns tipos de câncer pode também estar presente nos estágios iniciais de desenvolvimento de câncer, como foi detectado no câncer de mama *in vivo*. Ambos os marcadores podem ser utilizados como biomarcador discriminatório para o CEB quando comparado com paciente saudável. Todavia, na metanálise estes biomarcadores mostraram-se aumentados no grupo controle, divergindo dos trabalhos analisados em que concluíram que este biomarcador se apresentou aumentado no grupo CEB (LI *et al.*, 2004; BRINKMANN *et al.*, 2011; ELASHOFF *et al.*, 2012).

Os dados divergentes entre a metanálise e os resultados encontrados no artigo de Elashoff *et al.*, 2012, se devem ao fato de que a análise realizada no artigo foi feita através da área abaixo da curva (AUC) existente entre os grupos controle e CEB e a estatística realizada na metanálise considerou os valores contidos em cada grupo, bem como o desvio padrão dos mesmos, gerando uma inversão de expressão dos biomarcadores IL-8, IL-1 $\beta$ , H3F3A, SAT-1 e S100P.

Diversos estudos para identificar biomarcadores tentam explicar a patogênese multifatorial e heterogênea do CEB e entender o perfil das alterações moleculares, e com isso, almejam tornar possível associar estas características ao fenótipo resultante do câncer. Contudo, é mínima a possibilidade de encontrar um único biomarcador que detectará o CEB com alta especificidade e sensibilidade. Diante disso, estudos recentes avaliam a combinação de biomarcadores para aumentar o poder de previsibilidade dos biomarcadores para o mundo real e sugerem a validação dos biomarcadores em larga escala de pacientes (Li *et al.*, 2004; SHPITZER *et al.*, 2009; BRINKMANN *et al.*, 2011; SHAH *et al.*, 2011; ELASHOFF *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014).

Na pesquisa de Li *et al.*, em 2004, foi utilizada a combinação da IL-8, SAT1 e H3F3A, visando a previsão do CEB, e esta combinação gerou sensibilidade de 90,6% e especificidade de 90,6%. Para Brinkmann *et al.* (2011) a combinação dos marcadores IL-1 $\beta$ , SAT1 e DUSP1 demonstrou um poder de sensibilidade de 89% e de especificidade de 78% para diagnosticar o CEB. Wang *et al.*, 2014 combinaram Choline, betaine, ácido pipercolínico e L-carnitina para prever o CEB e concluíram que esta combinação gerou 99,7% de sensibilidade e 96,7% de especificidade, distinguindo grupo controle, do grupo CEB estágio I e do grupo CEB estágio II.

No entanto, há uma falta de padronização dos estudos realizados e dos trabalhos publicados, dificultando pesquisas relacionadas à revisão sistemática com e sem análise estatística.

## 7 CONCLUSÃO

Através da metanálise foi possível verificar e identificar os biomarcadores que são expressos mais em pacientes controles saudáveis de acordo com o teste molecular utilizado, os que são expressos mais em pacientes com carcinoma epidermoide bucal e ainda os que não diferem entre os grupos.

Para o teste ELISA os biomarcadores IL-8, IL-1 $\beta$  e IL-6 se expressaram com maior intensidade no grupo CEB. Já os marcadores tumorais TNF- $\alpha$  e M2BP não se expressaram diferente entre os grupos controle e CEB.

Para o teste qPCR os biomarcadores ET-1, miRNA-200a, miRNA-125a, miRNA-93, miRNA-142 não tiveram diferenças estatísticas entre os grupos. Contudo, os marcadores tumorais H3F3A, IL-8, DUSP, IL-1 $\beta$ , OAZ-1, SAT-1 E S100P foram expressos aumentados no grupo controle.

## REFERÊNCIAS

Alleno-Garcia ME, Hu S, Wnag J, Henson B, Zhou H, Chia D, *et al.* Multiplex immunobead-based assay for detection oral câncer protein biomarkers in saliva. *Oral Dis.* 2008; 14:705-12.

Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Biocina-Lukend D, Zilic-Alajbeg I, Milenovic A, Balija M. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med. Oral Patol. Cir. Bucal* 2012;17(1):10-5.

a.Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estatísticas do câncer: Vigilância do câncer e de fatores de risco. Rio de Janeiro: INCA; 2003. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em: 06 de jun. 2011.

b.Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto Nacional de Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Braakhuis MJB; Leeman RC, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol & Med* 2004; 33: 337-321.

Brener S, Jeunon FA, Barbosa AF, Grandinetti HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão da literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Canc.* 2007;53(1):63-9.

Brinkmann O, Katrastovic Da, Dimitrijevic MV, Konstantinovic VS, Jelovac DB, Antic J, *et al.* Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian populacion. *Oral Oncol.* 2011; 47:51-5.

Capelozzi VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol.* 2001;27(6):321-8.

Cheng YSL, Rees T, Jordan L, Oxford L, O'Brien J, Chen HS, Wong D. Salivary endothelin-1 potential for detecting oral cancer in patients with oral lichen planua or oral cancer in remission. *Oral Oncol.* 2011;47:1122-6.

Cochrane, 2011. Disponível em: <http://handbook.cochrane.org/> e <http://www.cochrane.org/training/cochrane-handbook>

De Vita Júnior VT, Rosenberg AS. Two hundred years of cancer research. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(23):2207-14.

Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, *et al.* Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2012; 21(4):664-72.

Elder L, Kopp-Schneider A. Origins of the mutational origin of cancer. *Int. J. Epidemiol.* 2005, 1168-70.

Ensinck MA, Valles M, Lebensohn N, Cotorruelo C, Biondi C. Expression of the FUT2 gene and CD44 marker in patients with oral lesions. *Inmunología* 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org.10.1016?j.inmuno.2013.04.003>

Fejerskov O, Kidd E. *Carie Dentária: a doença e seu tratamento clínico*. São Paulo: Santos; 2005.

Feller L, Lemmer J. Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment. *J. Cancer Therapy* 2012;3:263-8.

Gonzales-Moles MA, Galindo P, Gutierrez-Fernandez J, Rodrigues-Archilla A, Ruiz-Avila I, Sanchez-Fernandez E. Expression of the p53 protein in oral squamous cell carcinoma associated with Epstein-Barr Vírus. *Microbios*.2000;102(403):147-54.

Guimarães RC, Rodrigues VH, Pádua CAJ, Andrade FAF. Uso dos marcadores tumorais na prática clínica. *Rev. Prática Hospital*. 2002;4(23):1-8.

a.Hadju, SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 2011; 117:1097-102.

b.Hadju, SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer* 2011; 117:2811-20.

Hadju, SI. A note from history: landmarks in history of cancer, part 3. *Cancer* 2012; 118:1155-68.

Hoffmann RR, Yurgel LS, Campos MM. Evaluation of salivary endothelin-1 levels in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia. *Regulatory Peptides* 2011; 166:55-8.

Hu S, Arellano M, Bootheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, *et al.* Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(19):6246-52.

Jepsen SA, Closmann JJ. The insidious nature and presentation of oral squamous cell carcinoma in the low- risk population. 2008, Jan-Feb; 56(1): 78-82; quiz 83-4, 111-2.

Jessie K, Jayapalan JJ, Ong KC, Rahim ZHA, Zain RM, Wong KT, Hashim OH. Aberrant proteins in the saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Electrophoresis* 2013;34:2495-502.

Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Chen CH, Kao JY, Vhen SY, *et al.* Proteomic identification of salivary transferring as a biomarker for early detection of oral cancer. *Analytica Chimica Acta* 2010:681:41-8.

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.* 2011; 412:1357-65.

Kampa J, Stahl K, Renström LHM, Alenius S. Evaluation of a commercial E<sup>ms</sup>-capture ELISA for detection of BVDV in routine diagnostic cattle serum samples. *Acta Veter. Scand.* 2007; 49(7):1-7.

Li Y, Maie JAR, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RCK, *et al.* Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2004;15(10): 8442-8450.

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 Oncol.* 2000;36(3), 272-276.

Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Oliveira Filho AS. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2007;7(2):187-94.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial.* 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E *et al.* Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5473-77.

Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NFκB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect. And Prev.* 2005;29:42-5.

Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Invest.* 2012;122(6):1951-7.

Schwartz MK. Cancer marker. In: De Vita JR, Hellman S, Rosenberg AS, eds. *Cancer: principles and practices of oncology.* 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1993.

Scully C, Field J. Genetic aberrations in squamous cell carcinoma of the head and neck with reference to oral. *Int J Oncol* 1997; 10(6): 8-21.

Sell S. Cellular origin of cancer: differentiation or stem cell maturation arrest? *Environmental Health Perspectives* 1993;101 (suppl. 5):15-26.

Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN, *et al.* A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Ind. J. Clin. Biochem.* 2011;26(4):326-34.

Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi T, *et al.* Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *British J. Cancer* 2009;101(70):1194-8.

Silveira AS. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil RA. *Fatores prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico.* Florianópolis: UFSC, 2005.

Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Trigpen JT. The presence of soluble cerbB-2 concentrations in the saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2363-79.

Takeda T. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. Accepted for publication March 28, 2006.

Vajaria BN, Patel KR, Begum R, Shah FD, Patel JB, Shukla SN, Patel PS. Evaluation of serum and salivary total sialic acid and  $\alpha$ -L-fucosidase in patients with oral precancerous conditions and oral cancer. *Oral Medicine* 2013;115(6):764-71.

Valarini N, Doi RK, Maciel SM, Poli-Frederico RC. Biologia molecular na odontologia: métodos comumente utilizados na cariologia. *Odontol. Clin-Cient* (online). 2011;10(1).

Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta* 2014; 427:79-85.

Yang WCV, Chung HR, Wu JY, Yi C, Wang DJ, Lee SY. Potential biomarkers for the cytologic diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *J. Dent. Sci.* 2010;5(2):60-9.

Yang Y, Li Y, Yang X, Jiang L, Zhou Z, Zhu Y. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. *BMC Cancer*,2013;13:129-37.

Zhang B, Yue H. Thoughts about the origin of cancer. *Chineses-German J. Clin. Oncol.* 2012;10(11):572-4.