

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

BIOMARCADORES ORAIS EM LÍQUEN PLANO ORAL E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL

Trabalho submetido por
Jouhaïna Yamina Bouallag
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

BIOMARCADORES ORAIS EM LÍQUEN PLANO ORAL E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL

Trabalho submetido por
Jouhaïna Yamina Bouallag
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Lucinda Bessa

e coorientado por
Prof. Doutor António Mano Azul

junho de 2023

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Prof. Doutora Lucinda Bessa, minha orientadora, pelo apoio que me deu em cada etapa da elaboração desta dissertação. Desejo sublinhar a sua grande disponibilidade, o seu olhar crítico e as observações sempre pertinentes que me ajudaram a progredir na minha pesquisa e na redação. Por tornar este trabalho possível, o meu muito obrigada.

Em segundo lugar gostaria de agradecer ao Prof. Doutor António Mano Azul, meu coorientador, pela sua disponibilidade permanente, pelos conhecimentos que me transmitiu e pela sua ajuda nos problemas de saúde que tive no início do ano.

A todo o corpo docente e não docente que se cruzou o meu caminho, contribuindo para a minha formação pessoal e profissional.

Agradeço particularmente aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional ao longo da minha vida, pela paixão que me transmitiram e por acreditarem sempre em mim. É um privilégio ter-vos sempre a meu lado. Dizer obrigada não é suficiente para agradecer-vos, sou-vos eternamente grata. Maman, Papa, je vous aime.

Gostaria de agradecer às minhas companheiras de casa, Capucine e Rayane, que estão comigo e apoiam-me durante 5 e 4 anos, respetivamente, e com quem partilhei tudo, incluindo o nosso sonho de sermos Médicas Dentistas. Vocês foram a minha segunda família.

À Gloria e Margot, estudar no estrangeiro foi um desafio real que enfrentámos juntas nos últimos cinco anos, foi um prazer partilhar esse caminho com amigas tão especiais.

A todos os meus colegas de Medicina Dentária que estudaram comigo no Instituto Universitário Egas Moniz.

A todos os meus amigos e família, que sempre acreditaram em mim desde o início, muito obrigada.

RESUMO

A cavidade oral é um ambiente único, exposto ao meio externo, e no qual ocorrem interações complexas envolvendo os tecidos moles e duros do hospedeiro, os alimentos, o ar e os microrganismos. A saliva é o fluido biológico do corpo humano que está mais facilmente disponível, podendo ser obtido de forma não invasiva, e inclui um grande número de compostos inorgânicos e orgânicos que podem ser quantificados e se tornar potenciais biomarcadores da saúde/doença oral e geral. Os diagnósticos baseados na análise da saliva representam uma das promessas mais importantes da medicina moderna personalizada, com um impacto potencial em áreas específicas como o rastreio, o diagnóstico precoce, terapia e monitorização pós-terapia, e prognóstico.

O objetivo desta revisão foi determinar a potencial utilidade de diferentes biomarcadores salivares, entre outros, para ajudar no diagnóstico e prognóstico de doenças da cavidade oral. Entre as numerosas doenças da cavidade oral, esta revisão narrativa centrou-se no líquen plano oral (LPO) e no carcinoma de células escamosas orais (CCEO). Para atingir tal objetivo, foi levada a cabo uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed, Scopus, Web of Science e Google Scholar. A pesquisa centrou-se em publicações científicas publicadas entre 2010 e 2023.

Nesta revisão foram descritas diversas técnicas usadas para a deteção de biomarcadores presentes na saliva. Recentemente, vários estudos têm explorado o uso de biomarcadores salivares, como microRNAs e proteínas, para o diagnóstico precoce e prognóstico de doenças orais. Os vários biomarcadores orais que têm sido detetados e estudados na saliva de pacientes com LPO ou CCEO foram aqui elencados e descritos à luz do conhecimento atual.

A utilização de biomarcadores salivares oferece oportunidades promissoras para a diagnóstico precoce e o prognóstico de doenças da cavidade oral, como o LPO e o CCEO.

Palavras-chave: biomarcador, líquen plano oral, carcinoma de células escamosas orais, saliva.

ABSTRACT

The oral cavity is a unique environment, exposed to the external environment, and where complex interactions occur between different surfaces: the host's soft and hard tissues, food, air and microorganisms. Saliva is the most widely available and easy-to-obtain biological fluid in the human body and includes many inorganic and organic compounds that can be quantified and potentially become biomarkers of overall health. Diagnostics based on saliva analysis represent one of the most important promises of modern personalized medicine, potentially impacting specific areas such as screening, early diagnosis, therapy and post-therapy monitoring, and prognosis.

The purpose of this review was to determine the potential usefulness of different salivary biomarkers, among others, in the diagnosis and prognosis of diseases of the oral cavity. Among the numerous diseases of the oral cavity, this narrative review focused on oral lichen planus (OLP) and oral squamous cell carcinoma (OSCC). To achieve this goal, a literature search was conducted in PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar databases. The search focused on scientific publications published between 2010 and 2023.

In this review, several techniques used for the detection of biomarkers present in saliva were described. Recently, several studies have explored the use of salivary biomarkers, such as microRNAs and proteins for the early diagnosis and prognosis of oral diseases. The various oral biomarkers that have been detected and studied in the saliva of patients with OLP or OSCC have been listed here and described considering the current knowledge.

The use of salivary biomarkers offers promising possibilities for the early diagnosis and prognosis of diseases of the oral cavity, such as OLP and OSCC.

Keywords: biomarker, oral lichen planus, oral squamous cell carcinoma, saliva.

RÉSUMÉ

La cavité buccale est un milieu unique, exposé à l'environnement extérieur dans lequel se produisent des interactions complexes entre les tissus mous, durs, la nourriture, l'air et les micro-organismes. La salive est le liquide biologique le plus facilement disponible, qui peut-être obtenu de manière non invasive et qui contient un grand nombre de composés inorganiques et organiques pouvant être quantifiés et devenir des biomarqueurs potentiels de la santé/maladie bucco-dentaire et générale. Les diagnostics basés sur l'analyse salivaire représentent l'une des promesses les plus importantes de la médecine moderne, avec un impact potentiel dans des domaines spécifiques tels que le dépistage, le diagnostic précoce, la thérapie, le suivi post-thérapeutique ainsi que le pronostic.

L'objectif de cette étude était de déterminer l'utilité potentielle de différents biomarqueurs salivaires, entre autres, pour aider au diagnostic et au pronostic des maladies de la cavité buccale. Parmi les nombreuses maladies de la cavité buccale, cette étude narrative est centrée sur le lichen plan buccal (LPB) et le carcinome épidermoïde buccal (CEB). Pour atteindre cet objectif, une recherche bibliographique a été effectuée dans les bases de données PubMed, Scopus, Web of Science et Google Scholar. La recherche s'est concentrée sur les publications scientifiques publiées entre 2010 et 2023.

Cette revue décrivait différentes techniques utilisées pour la détection de biomarqueurs présents dans la salive. Plusieurs études ont exploré l'utilisation de biomarqueurs salivaires, comme les microARN et les protéines, pour le diagnostic et pronostic des maladies bucco-dentaires. Les différents biomarqueurs buccaux qui ont été détectés et étudiés dans la salive de patients atteints de LPB ou de CEB sont répertoriés ici et décrits à la lumière des connaissances actuelles.

L'utilisation de biomarqueurs salivaires offre des possibilités prometteuses pour la détection précoce, le diagnostic et le pronostic des maladies de la cavité buccale, telles que le LPB et le CEB.

Mots clés : biomarqueur, lichen plan buccal, carcinome épidermoïde buccal, salive

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	15
2. METODO	17
3. BIOMARCADOR.....	19
3.1 DEFINIÇÃO.....	19
3.2 PESQUISA E VALIDAÇÃO DOS ESTUDOS COM BIOMARCADORES.....	21
3.3 BIOMARCADORES NA SALIVA	22
3.3.1 <i>A saliva como fonte de biomarcadores.....</i>	<i>22</i>
3.3.2 <i>Campos de investigação relacionados com a saliva.....</i>	<i>23</i>
3.3.2.1 Proteómica	24
3.3.2.2 Genómica.....	24
3.4 RECOLHA DE AMOSTRAS DE SALIVA	24
3.5 TECNICAS PARA DETEÇÃO DE BIOMARCADORES PRESENTES NA SALIVA	25
4. MICROBIOMA ORAL	27
4.1 DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO	27
4.2 PAPEL DO MICROBIOMA ORAL NAS DOENÇAS ORAIS E NAS DOENÇAS SISTEMICAS	29
4.3 ESTRATEGIAS PREVENTIVAS E TERAPEUTICAS PARA MANTER O EQUILIBRIO DO	
MICROBIOMA ORAL.....	30
5. LIQUEN PLANO ORAL.....	33
5.1 FISIOPATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	33
5.2 PATOGENESE DO LPO.....	34
5.3 MICRORNAs (miRNAs)	35
5.4 BIOMARCADORES DE MALIGNIZAÇÃO.....	36
5.5 EFEITO DE TRATAMENTOS NOS NIVEIS SALIVARES DE BIOMARCADORES.....	38
6. CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS ORAIS	41
6.1 EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA	41
6.2 DIAGNOSTICO	41
6.3 MICRORNA (miRNA) SALIVARES.....	42
6.4 CITOQUINAS SALIVARES	43

6.5	OUTRAS PROTEINAS.....	45
6.6	BIOMARCADORES DO PROGNOSTICO/ TRATAMENTO	45
6.6.1	<i>MiRNAs com papel supressor do tumor</i>	46
6.6.2	<i>Recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)</i>	48
7.	CONCLUSÃO	49
8.	BIBLIOGRAFIA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das fases sequenciais na formação de biofilmes orais. (A) Células planctónicas, agregados, ou coagregados aderem à película adquirida. (B) Crescimento e produção de matriz EPS (*extracellular polymeric substances*) pelas bactérias colonizadoras primárias. (C) Recrutamento de espécies colonizadoras secundárias. (D) Recrutamento adicional de espécies potencialmente patogénicas, em parte devido à capacidade do *Fusobacterium nucleatum* em coagregar com diversas outras espécies (Katharios-Lanwermeier et al., 2014)20

Figura 2. Glândulas salivares. (A), (B), (C): glândulas salivares menores - são coletivamente responsáveis por 8% a 10% do fluxo salivar não estimulado; D) glândula salivar sublingual - gera 5% a 7% do fluxo salivar não estimulado; (E) glândula salivar submandibular - gera 65% do fluxo salivar não estimulado; (F) glândula salivar parótida - gera 20% do fluxo salivar não estimulado. Adaptado de <https://consejodentistas.es/comunicacion/actualidad-del-consejo/publicaciones-del-consejo/libros-del-consejo/item/1445-libro-blanco-sobre-saliva-y-salud-oral.html>.....29

Figura 3. Os principais biomarcadores implicados no diagnóstico e prognóstico do CCEO (Manzano-Moreno et al., 2021)49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de marcadores de acordo com a sua finalidade (Carini et al., 201).....	26
Tabela 2. MicroRNA salivar relacionado com o diagnóstico e prognóstico do LPO (Li et al., 2022).....	38
Tabela 3. Os miRNAs envolvidos na regulação do CCEO (Manzano-Moreno et al., 2021).....	45
Tabela 4. MiRNA como biomarcadores de prognostico do CCEO.....	48
Tabela 5. MiRNA que inibem expressão de genes.....	49

LISTA DE SIGLAS

8-OHdG – 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

BRCA1 – Proteína do *BReast CAncer gene 1*

CCEO – Carcinoma de células escamosas orais

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPD – *Dihydropyrimidine dehydrogenase*

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico

EGFRNSCLC – *Epidermal Growth Factor Receptor mutation no non-small-cell lung cancer*

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

EZH2 – Potenciador de zeste homólogo 2

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

FDA – *Food and Drug Administration*

GLOBOCAN – Observatório Global do Cancro

HER-2 – *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

HIF1 – *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPV – Papilomavírus humano

ICW – *In Cell Western*

IFN- γ – Interferão gamma

IL – Interleucina

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

LPO – Líquen plano oral

OMS – Organização Mundial da Saúde

MMP-9 – *Matrix metalloproteinase 9*

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR – *Mammalian Target of Rapamycin*

microRNA – Micro ácido ribonucleico

NF- κ B – Fator Nuclear Kappa B

NO – Oxido Nítrico

PBM – Fotobiomodulação
pAkt – Proteína quinase B
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PC-R – Proteína c-reativa
PI3K/AKT – Fosfatidilinositol 3-quinase/ Proteína quinase
PKC δ – Proteína quinase C δ
PKC ϵ – Proteína quinase C ϵ
ROC – *Receiver Operating Characteristic*
ROS – Espécies reativas de oxigénio
SERS – *Surface Enhanced RAMAN Scattering*
SOCS1 – *Suppressor of cytokine signaling protein 1*
STAT1 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*
TFRC – *Transferrin Receptor*
TGF- β – *Transforming Growth Factor Beta*
THBS2 – *Thrombospondin-2*
TKI – Inibidor da tirosina quinase
TNF- α – Fatores de Necrose Tumoral Alfa
UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência
VDR – Recetor da vitamina D

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral desempenha um papel importante na digestão e faz a ligação com o sistema respiratório (Segata et al., 2012). O microbioma da cavidade oral é influenciado por vários fatores e a sua composição afeta a saúde oral e geral. Desequilíbrios no microbioma oral podem levar a doenças orais e sistêmicas (Gao et al., 2018). O uso de bactérias probióticas é uma abordagem promissora para promover a saúde oral. Manter um microbioma oral saudável e equilibrado é essencial para prevenir doenças orais e seus efeitos em outros órgãos (López-López et al., 2017).

Biomarcadores são características mensuráveis que estão associadas a processos biológicos ou respostas a intervenções (Carini et al., 2019). Os biomarcadores são sobretudo usados para identificar alterações relacionadas com doenças (Carini et al., 2019).

A saliva é um fluido essencial para a saúde oral e contém elementos protetores para a cavidade oral (Siqueira et al., 2012). Análises de proteômica, genômica, transcriptômica e metabolômica da saliva são úteis para identificar potenciais biomarcadores para diagnóstico (Zhang et al., 2016). A colheita adequada de amostras de saliva é importante, e existem várias técnicas para detetar biomarcadores, nomeadamente ELISA e PCR em tempo real (Gan & Patel, 2013; Kralik & Ricchi, 2017). Essas técnicas têm sido usadas para detetar biomarcadores de doenças orais.

O líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória autoimune da mucosa oral de etiologia desconhecida. Quando desencadeado por fatores identificáveis como stress oxidativo, infeções virais, alergias alimentares e medicamentos (Kurago, 2016), é classificado como reação ou lesão liquenóide (R. Lu & Zhou, 2021). O LPO afeta principalmente mulheres com mais de 40 anos, causando lesões brancas (na forma de estrias ou placas) geralmente assintomáticas ou lesões eritematosas (ulcerativas ou erosivas) que provocam geralmente sintomas como dor ou ardor (González-Moles et al., 2021). Um desequilíbrio do sistema imunológico e citocinas inflamatórias estão associados a esta doença (González-Moles et al., 2019). É objeto de debate se uma

pequena percentagem de casos de LPO pode evoluir para cancro oral (Farah et al., 2021; González-Moles et al., 2019).

O carcinoma de células escamosas orais (CCEO), também conhecido como cancro oral, é um tipo de cancro que se desenvolve em qualquer localização da mucosa orofaríngea. “Segundo a décima primeira revisão, de 2022, da Classificação Internacional de Doenças (atualizada anualmente pela OMS), o CCEO é o 8º cancro mais frequente no mundo, afetando principalmente homens com mais de 50 anos. Os principais fatores de risco são tabagismo e consumo de álcool (Thomson, 2012). O processo de transformação do tecido oral normal em pré-maligno e maligno é complexo e envolve alterações genéticas que afetam a regulação celular, levando a proliferação descontrolada, alterações na diferenciação celular, reparo do DNA, apoptose e imunidade celular (Thomson, 2012). Estudos recentes têm explorado o uso de biomarcadores salivares, como microRNAs e proteínas, para o diagnóstico precoce e prognóstico do cancro oral (Greither et al., 2017; Z. M. Lu et al., 2014; Momen-Heravi & Bala, 2018). Esses biomarcadores podem refletir a expressão genética e desregulação de citocinas, e estão a ser investigados como ferramentas potenciais no acompanhamento da doença e na avaliação do tratamento (Loo & Pui, 2020).

2. MÉTODO

Foi feita uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed, Scopus, Web of Science e Google Scholar, usando várias palavras-chave entre as quais: “*biomarker*”, “*oral lichen planus*”, “*oral squamous cell carcinoma*”, “*saliva*”. Foram consideradas as publicações científicas publicadas entre 2010 e 2023, com exceção de duas (Chevalier et al., 2007; OMS, 2002) que apesar de anteriores a 2010 se mostraram ainda relevantes e úteis atualmente como referência.

3. BIOMARCADOR

3.1 Definição

Segundo a FDA (*Food and Drug Administration*), um biomarcador (ou marcador biológico) é "uma característica definida que é medida como um indicador de processos biológicos normais, de processos patogénicos ou de reações a uma exposição ou intervenção, incluindo intervenções terapêuticas" (<https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/about-biomarkers-and-qualification#what-is>). Por outras palavras, um biomarcador é uma característica biológica que pode ser molecular, fisiológica, histológica, radiográfica ou bioquímica. Estas características podem ser medidas e avaliadas objetivamente. Um biomarcador mostra uma alteração biológica mensurável produzida no organismo que está ligada a uma doença. Existe vários tipos de biomarcadores de acordo com a sua finalidade, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Tipos de marcadores de acordo com a sua finalidade (Carini et al., 2019).

Tipo de biomarcador	Finalidade do biomarcador	Exemplo
Biomarcador de diagnóstico	Diagnosticar uma doença o mais cedo possível	Deteção de RNA do vírus da Hepatite C pós-infecção
Biomarcadores de suscetibilidade/risco	Avaliar o risco de desenvolver uma doença	Deteção do gene <i>BRC1</i> no cancro de mama
Biomarcadores de prognóstico	Verificar a evolução de uma doença (indolente vs agressiva), também pode ser preditivo	HER-2 no cancro de mama
Biomarcadores preditivos	Verificar a resposta e a toxicidade a um determinado tratamento	EGFRNSCLC/gefitinib, DPD no cancro gastrointestinal /fluoropirimidina
Biomarcadores mecanísticos	Ver o(s) mecanismo(s) de ação de um fármaco	Perfil genético sequencial de carcinomas basocelulares tratados com imiquimod
Biomarcadores farmacodinâmicos	Avaliar a resposta farmacológica de um medicamento a fim de monitorizar a resposta clínica. Estes biomarcadores são críticos para compreender a relação entre a dose e resposta de fármacos, fornecendo assim informações importantes durante desenvolvimento de medicamentos	
Biomarcadores substitutos	O benefício clínico de um tratamento. Se um tratamento afetar o biomarcador, o biomarcador servirá como um substituto do ponto final para avaliar o benefício clínico	Hemoglobina A1C
Biomarcadores de segurança	Para prever a toxicidade de uma terapia específica. São importantes na decisão final de escolha de um fármaco, sendo que nenhum outro biomarcador é mais importante nos testes de fármacos do que biomarcador de segurança do medicamento.	

3.2 Pesquisa e validação dos estudos com biomarcadores

Quando um biomarcador é estudado, uma questão importante para o investigador é que esse estudo seja validado por outros. A validação externa requer um estudo com uma coorte diferente daquele que permitiu a observação dos resultados. Uma prática generalizada é dividir a coorte inicial em duas coortes, uma para obter resultados (a chamada coorte de derivação) e a outra para os validar (coorte de validação) (Andre et al., 2011). Esta prática é atualmente muito criticada em termos estatísticos, e com razão, porque as duas subpopulações são semelhantes, uma vez que provêm da mesma população inicial. Por outro lado, as técnicas de reamostragem tornam possível obter uma validação interna de resultados particularmente interessante. A técnica de *bootstrap* permite gerar centenas ou milhares de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) a partir da mesma população, por exemplo para melhor definir o intervalo de confiança da área sob a curva ROC ou para obter um intervalo de confiança do limiar de diagnóstico. Cada vez mais, as revistas de prestígio exigem a utilização de técnicas de reamostragem para permitir, pelo menos, uma validação interna dos resultados e, assim, uma demonstração da sua robustez. Em qualquer caso, a longo prazo, é essencial uma validação externa (outra população, outras condições) (Warner et al., 2010).

3.3 Biomarcadores na saliva

3.3.1 A saliva como fonte de biomarcadores

A saliva é um fluido biológico produzido pelas glândulas salivares. É altamente relevante no contexto local e geral do corpo e é essencial para a saúde oral. As glândulas salivares fazem parte do complexo sistema digestivo e a sua função básica é a produção e secreção da saliva (Figura 2).

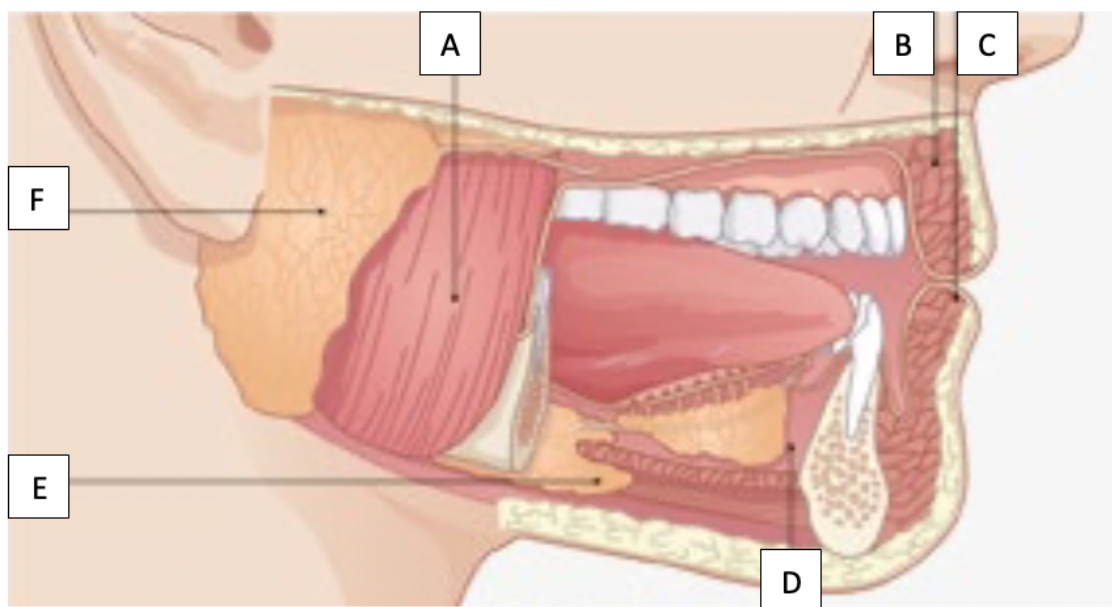


Figura 2. Glândulas salivares.

(A), (B), (C) glândulas salivares menores - são coletivamente responsáveis por 8% a 10% do fluxo salivar não estimulado;

(D) glândula salivar sublingual - gera 5% a 7% do fluxo salivar não estimulado;

(E) glândula salivar submandibular - gera 65% do fluxo salivar não estimulado;

(F) glândula salivar parótida - gera 20% do fluxo salivar não estimulado.

(Adaptado de <https://consejodentistas.es/comunicacion/actualidad-del-consejo/publicaciones-del-consejo/libros-del-consejo/item/1445-libro-blanco-sobre-saliva-y-salud-oral.html>).

A saliva contém elementos que são descritos como protetores e que permitem manter a integridade dos tecidos da cavidade oral. Proteínas, peptídeos, lípidos e outras macromoléculas presentes na saliva aderem à superfície do dente levando à formação da película adquirida do esmalte. Esta película é assim uma fina camada que se forma de maneira dinâmica à superfície dos dentes a partir dos componentes predominantemente da saliva (Siqueira et al., 2012). Uma vez que esta película adquirida constitui a interface entre o dente e o ambiente oral, acaba por ser a essa película que a comunidade microbiana adere e não diretamente ao esmalte dentário. Assim sendo, a película adquirida salivar

determina a composição da comunidade microbiana que inicialmente adere aos dentes (Siqueira et al., 2012).

Existem vários mecanismos para prevenir a colonização da cavidade oral por microrganismos. Um destes mecanismos ocorre naturalmente e envolve o IgA secretora, um anticorpo fornecido pela secreção salivar e concentrado dentro da película adquirida (Hannig et al., 2017).

A utilização da saliva como instrumento de diagnóstico atraiu um interesse considerável e tornou-se um método bem aceite. A capacidade de monitorizar, ver como e quando a doença ocorre, como progride e observar os resultados do tratamento através de técnicas não invasivas é o objetivo primordial na promoção da saúde e do bem-estar (<https://consejodentistas.es/comunicacion/actualidad-del-consejo/publicaciones-del-consejo/libros-del-consejo/item/1445-libro-blanco-sobre-saliva-y-salud-oral.html>).

Todos os seres vivos são constituídos, entre outras coisas, por moléculas chamadas proteínas. Atualmente, as ferramentas proteómicas permitem-nos analisar os proteomas (conjunto de proteínas e suas isoformas expressas em uma amostra biológica) de várias amostras do corpo humano, tais como sangue, saliva ou soros, entre outros (Melguizo-Rodríguez et al., 2020). Várias dessas proteínas poderão potencialmente vir a constituir um biomarcador. É de sublinhar que alguns biomarcadores descobertos na saliva não são específicos de certas doenças e podem ser utilizados para diagnosticar uma variedade de alterações. Como resultado, para obter um diagnóstico e prognóstico muito mais específicos, é necessário avaliar simultaneamente vários biomarcadores que são afetados em cada doença (Melguizo-Rodríguez et al., 2020).

3.3.2 Campos de investigação relacionados com a saliva

A saliva contém uma variedade de biomoléculas, incluindo DNA, mRNA, microRNA, proteínas, e metabolitos e também uma microbiota diversificada. Alterações na concentração dessas biomoléculas ou no tipo de microrganismos na saliva podem ser utilizadas para desenvolver biomarcadores para ajudar a identificar certas doenças, avaliar o seu prognóstico e risco, e monitorizar a resposta a potenciais tratamentos (Spielmann & Wong, 2011). O termo "salivaómica" permite descrever o campo de estudos que envolvem a saliva e as suas biomoléculas e que se desenvolveu ao longo das últimas duas décadas. O sufixo "ómica" aplica-se a várias áreas de estudo que estudam e caracterizam especificamente cada uma das biomoléculas, como por exemplo, a

genômica, a proteômica, a transcriptômica, e a metabolômica. Sendo que todas estas áreas se podem usar no estudo da saliva, nesse sentido podemos falar em “salivaômica”(Zhang et al., 2016).

3.3.2.1 Proteômica

Schulz et al. (Schulz et al., 2013) reviram um conjunto de dados de proteínas no plasma, compilado a partir de estudos anteriores do Projeto Internacional do Proteoma de Plasma Humano. Descobriram que cerca de 30% do total de proteínas na saliva são também encontradas no plasma. Esta partilha de proteínas entre saliva e plasma indica que há ligações que podem ser feitas entre o proteoma da saliva e o de diferentes partes do corpo (Schulz et al., 2013). No entanto, a análise proteômica da saliva é dificultada pela presença abundante de certas proteínas, como a alfa-amilase, albumina e proteínas ricas em prolina, que mascaram ou reduzem a sensibilidade dos testes para detetar as proteínas de baixa abundância que só ocorrem em diferentes condições de doença (Schulz et al., 2013). Ao contrário das proteínas séricas que são relativamente estáveis, as proteínas da saliva parecem ser mais sensíveis aos processos bioquímicos e à degradação (Zhang et al 2014).

3.3.2.2 Genômica

O genoma salivar consiste em DNA humano e microbiano. Quase 70% do genoma salivar é de origem humana, enquanto os 30% restantes vêm da microbiota oral. Análises genéticas e epigenéticas salivares fornecem perfis de transcrição genética que refletem processos genéticos patológicos anormais (Zhang et al., 2014).

3.4 Recolha de amostras de saliva

Para a recolha de saliva, os pacientes devem abster-se de comer, beber e fazer higiene oral durante pelo menos uma hora antes da recolha da saliva. Assim, a altura do dia ideal para a recolha é de manhã, após o acordar. Antes da recolha, deve fazer-se um bochecho de um minuto com água destilada e depois, após cinco minutos, alguns mililitros de saliva devem ser recolhidos. A amostra colhida deve ser processada no laboratório no prazo de uma hora (Khurshid et al., 2016).

A recolha total da saliva pode ser feita de uma forma não estimulada, colhida por fluxo passivo: neste método, basta baixar a cabeça e permitir que a saliva flua do lábio

inferior para o recipiente de recolha. Deixar a saliva fluir não é o mesmo que cuspir. Saliva e cuspe não devem ser confundidos. Alternativamente, a recolha de saliva pode ser feita de uma forma estimulada. Para a estimulação das glândulas salivares, é comum o uso de estimuladores variados tais como pastilha elástica natural, bloco de parafina, ou ácido cítrico (Rathnayake et al., 2017). O processamento da amostra de saliva implica uma centrifugação e utilização de estabilizadores e inibidores de proteases bacterianas para impedir a degradação de muitas moléculas. Posteriormente, o armazenamento é num ambiente refrigerado (4°, -20°, -80° dependendo do tipo de biomarcadores e do tempo de conservação que se pretende) para prevenir a contaminação bacteriana e manter a amostra íntegra para posterior processamento (Chevalier et al., 2007).

3.5 Técnicas para deteção de biomarcadores presentes na saliva

Existe uma multiplicidade de técnicas para detetar e ou quantificar os diferentes biomarcadores em amostras salivares. Técnicas essas que geralmente também podem ser aplicadas a outras amostras biológicas.

A técnica ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) é uma técnica imunoenzimática utilizada para quantificar concentrações de diferentes moléculas presentes em líquidos biológicos. É utilizada especialmente para a dosagem de citocinas, fatores de crescimento, e algumas hormonas. Esta técnica é considerada fiável e com uma elevada reprodutibilidade, uma vez que se baseia no princípio da ligação específica de um antígeno ao seu anticorpo (Gan & Patel, 2013).

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, também chamada de PCR quantitativo, é utilizada para o deteção e quantificação de agentes patogénicos através da amplificação de um segmento do seu DNA. Em casos de identificação bacteriana, esta técnica pode ser utilizada em vez de técnicas de cultura, uma vez que é considerada mais rápida e altamente sensível (Kralik & Ricchi, 2017).

A técnica de SERS (*Surface Enhanced RAMAN Scattering*) é caracterizada pela expansão de campos eletromagnéticos produzidos pela excitação de plasmões de superfície de nanoestruturas metálicas (ouro, prata, cobre) (Langer et al., 2020). A técnica de dispersão de luz RAMAN é descrita como o resultado de processos de dispersão de luz inelástica, levando à libertação de luz dispersa. Esta técnica pode ser não ser considerada suficientemente eficaz, apesar da sua velocidade, precisão e fiabilidade (Langer et al., 2020).

A técnica de UPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência) é atualmente aplicável a partículas de diâmetro inferior a 2 µm para adquirir melhor resolução, velocidade, e sensibilidade relativamente à técnica de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência).

O ensaio baseado em esferas Luminex é um tipo de imunoenensaio, normalmente utilizado em casos de quantificação de marcadores rápidos, uma vez que têm a capacidade de detetar até 100 analitos únicos em simultâneo (Lynch et al., 2014).

A técnica de LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa) é também uma técnica analítica que envolve uma elevada especificidade, possibilidade de medir múltiplos analitos, e a capacidade de identificar a especificidade na amostra (Kushnir et al., 2010).

A técnica de ICW (*in-cell western*) é uma técnica de imunofluorescência quantitativa, que permite medir de forma rápida e precisa os níveis relativos de proteínas em diversos tipos de amostras, sem a necessidade de lisar as células, o que previne possíveis artefactos (Boveia & Schutz-Geschwender, 2015).

Estas diferentes técnicas têm já sido utilizadas para detetar potenciais biomarcadores na saliva e cuja presença se relaciona com várias doenças orais, nomeadamente a periodontite e a cárie. Por exemplo, Grande et al. (Grande et al., 2021) recolheram amostras de saliva estimulada de pacientes com periodontite e sem doença periodontal e foram quantificar os níveis salivares das proteínas C3 e C3c do sistema do complemento utilizando a técnica de ELISA. O sistema complemento está envolvido em respostas inflamatórias tanto na bolsa periodontal como no próprio tecido periodontal, onde pode mediar a destruição dos tecidos. Os resultados permitiram concluir que os níveis de C3c salivares têm o potencial de servir como biomarcadores que preveem a resposta clínica ao tratamento periodontal não cirúrgico.

Noutro estudo, Damle et al. (Damle et al., 2016) concluíram haver uma correlação entre os níveis de cárie dentária em crianças e os níveis salivares de estreptococos do grupo mutans. Usaram a técnica de PCR para detetar e quantificar os estreptococos na saliva.

4. MICROBIOMA ORAL

4.1 Definição e composição

A cavidade oral constitui o início do trato digestivo, mas também faz a ligação entre o ambiente externo e o aparelho respiratório. É constituída por várias estruturas anatómicas, incluindo dentes, gengivas, palato mole, palato duro e língua (Segata et al., 2012). Um corpo humano saudável contém cerca de 3.8×10^{13} de microrganismos residentes, cujo conjunto é conhecido como o microbioma humano (Sender et al., 2016). O microbioma da cavidade oral é muito dinâmico e é suscetível a mudanças frequentes devido à exposição constante a corpos estranhos, nomeadamente alimentos (Sedghi et al., 2021). A sua composição é moldada desde o nascimento (parto normal vs cesariana) e ao longo da vida por fatores genéticos, bem como por fatores ambientais tais como hábitos alimentares, práticas de higiene oral, medicação, níveis de stress e fatores sistémicos (Cobb et al., 2017). Fatores comportamentais e relacionados com o estilo de vida, tais como alterações comportamentais, como por exemplo o tabagismo e o consumo de álcool, também influenciam a composição e diversidade do microbioma oral (Chattopadhyay et al., 2019). A erupção da dentição decídua permite a introdução de novas fontes de colonização microbiana, os dentes, alterando assim o microbioma oral.

Os ecossistemas microbianos orais das populações modernas são significativamente menos diversificados do que os das populações antigas, e isso parece estar relacionado com a incidência de doenças orais crónicas associadas aos estilos de vida pós-industriais (Adler et al., 2013).

Alterações na composição do microbioma oral nuclear (*core*) que levam à inclusão de novas espécies, nomeadamente espécies patogénicas que proliferam em detrimento das residentes (Baker & Edlund, 2019), conduzem a um microbioma designado de disbiótico, que se associa a um estado de doença. Há, portanto, interesse em manter o microbioma oral saudável, não disbiótico (Sedghi et al., 2021). Além disso, sabe-se que o microbioma oral influencia outros microbiomas do corpo humano e impacta a saúde em geral (Zarco et al., 2012).

A capacidade de um microrganismo colonizar a cavidade oral depende largamente da sua capacidade em aderir a um tecido mole ou duro ou até a um recetor salivar, mas também da sua capacidade de coagregação, que é a capacidade de reconhecimento específico e adesão a outros microrganismos geneticamente distintos. A coagregação é

um fenómeno que contribui para a formação de biofilme multi-espécies (Katharios-Lanwermeier et al., 2014), dos quais são exemplos os biofilmes orais (Figura 1).

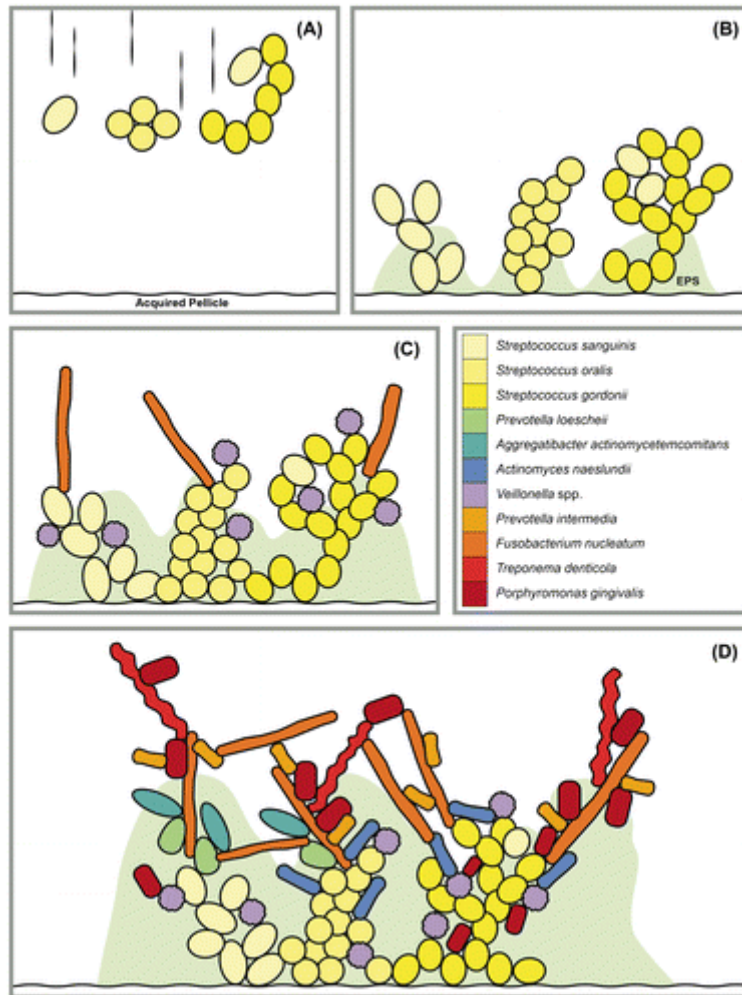


Figura 1. Ilustração das fases sequenciais na formação de biofilmes orais. (A) Células planctônicas, agregados, ou coagregados aderem à película adquirida. (B) Crescimento e produção de matriz EPS (substâncias poliméricas extracelulares) pelas bactérias colonizadoras primárias. (C) Recrutamento de espécies colonizadoras secundárias. (D) Recrutamento adicional de espécies potencialmente patogênicas, em parte devido à capacidade do *Fusobacterium nucleatum* em coagregar com diversas outras espécies. Retirada de (Katharios-Lanwermeier et al., 2014).

4.2 Papel do microbioma oral nas doenças orais e nas doenças sistêmicas

Um desequilíbrio na composição do microbioma oral, devido à incorporação de espécies patogénicas, contribui para o desenvolvimento de doenças orais, mas também tem impacto em várias doenças sistêmicas (Gao et al., 2018). Um dos principais objetivos de investigação na área da saúde é compreender as discrepâncias entre saúde e doença. Nessa transição entre estado de saúde e doença, a comunidade microbiana e as suas interações com o hospedeiro desempenham um papel importante, para além dos fatores genéticos e ecológicos (Gao et al., 2018).

Microrganismos normalmente associados à cavidade oral foram detetados em muitos órgãos fora da cavidade oral, incluindo o intestino delgado, pulmões, coração, placenta e cérebro (Atarashi et al., 2017).

As bactérias orais, os seus metabolitos e os seus fatores de virulência, podem em certas circunstâncias causar inflamação local, cuja cronicidade conduz a uma resposta imunitária que pode exacerbar, à distância, uma patologia de outros órgãos. Inflamação, resposta imunitária e microbiota juntam-se assim num círculo vicioso. As doenças periodontais, associadas ao biofilme subgingival disbiótico e a um sistema imunitário debilitado, são assim fatores de comorbilidade para várias doenças, tais como doenças pulmonares e renais, estando também associadas a artrite reumatóide, doença de Alzheimer, doença de Crohn e doença cardiovascular (Babajko et al., 2020). As doenças periodontais também podem ter impacto na gravidez. Em primeiro lugar, existe uma correlação significativa entre a gravidade da doença periodontal e o risco de bebés prematuros de baixo peso ao nascer; e, em segundo lugar, existe uma associação significativa entre periodontite generalizada e o risco de pré-eclâmpsia (Nabet et al., 2010). A disbiose microbiana da cavidade oral e as doenças metabólicas influenciam-se reciprocamente. Hiperglicemia, dislipidemia ou inflamação sistémica crónica podem alterar o pH e o teor de humidade da cavidade oral e, por conseguinte, alteram também a composição bacteriana da placa dentária, levando ao desenvolvimento da disbiose. Por sua vez, as más condições de higiene oral ou outros fatores extrínsecos facilitam também o desenvolvimento de disbiose, que tem repercussão nas doenças metabólicas (Demmer et al., 2015).

Sendo que o microbioma oral se distingue dos microbiomas de outras regiões do corpo humano, tem sido demonstrada que a presença de numerosas bactérias, que são

comensais da cavidade oral, em órgãos distantes está associada a malignidade nesses órgãos. Existem dois tipos de ligações entre as bactérias orais e as malignidades distantes. O primeiro é visto em alguns câncros onde os microrganismos orais não estão diretamente envolvidos na etiologia do tumor, mas onde existe uma mudança persistente na composição do microbioma oral associado ao cancro, abrindo a possibilidade de utilizar tais alterações como biomarcadores do cancro (Flemer et al., 2018). O segundo tipo de ligação é aquela entre organismos causadores de tumores, como a ligação entre *Fusobacterium nucleatum* e cancro colorretal (Flanagan et al., 2014).

4.3 Estratégias preventivas e terapêuticas para manter o equilíbrio do microbioma oral

Uma das abordagens mais promissoras atualmente a ser explorada é a utilização de bactérias probióticas. Durante os últimos vinte anos, elas têm sido o foco de interesse científico. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro para além dos efeitos nutricionais tradicionais" (www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf). Atualmente, os probióticos são utilizados principalmente para restabelecer o equilíbrio do microbioma intestinal, no entanto, o potencial de várias estirpes de origem intestinal poderem vir a ser usadas para promover a saúde oral tem vindo a ser estudado. Estirpes de lactobacilos e bifidobactérias têm sido as mais estudadas, no entanto, uma desvantagem no uso dessas estirpes para tratamento das doenças orais já foi apontada, que é o facto de essas estirpes serem acidogénicas (López-López et al., 2017). E por isso, espécies benéficas isoladas da própria cavidade oral estão a ser exploradas como sendo mais promissoras. López-López e colaboradores (López-López et al., 2017) descreveram a espécie *Streptococcus dentisani*, que isolaram previamente de placa bacteriana de indivíduos sem cárie dentária, como tendo características adequadas para ser usada como probiótico.

Segundo o estudo de Twetman e Keller (Twetman & Keller, 2012) uma estirpe probiótica ideal para a saúde oral deve ter as seguintes propriedades:

- Não patogénica

- Não tóxica
- Sem expressão de genes resistentes aos antibióticos
- Coloniza e adere a uma superfície da cavidade oral pelo menos temporariamente (as bactérias probióticas não precisam de colonizar permanentemente o hospedeiro)
- Interage com as células imunitárias do hospedeiro
- Produz substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, e compete com agentes patogênicos para sítios de ligação
- É capaz de persistir na cavidade oral
- Deve estar vivo e ser de origem humana (ter sido isolado de um hospedeiro humano)
- Deve ser passível de ser produzido em grandes quantidades para satisfazer objetivos industriais de grande escala
- Deve permanecer estável durante a utilização e armazenamento.

Alguns probióticos orais são concebidos para aumentar a alcalinidade da cavidade oral e da placa dentária e outros estão a ser desenvolvidos para competir com espécies patogênicas específicas (Tvetman & Keller, 2012).

A administração de suplementos, como os contendo arginina, também podem afetar substancialmente a composição e a atividade metabólica do microbioma oral (Ástvaldsdóttir et al., 2016).

5. LÍQUEN PLANO ORAL

5.1 Fisiopatologia e epidemiologia da doença

O líquen plano oral (LPO) é uma doença autoimune, em que linfócitos T auto- citotóxicos desencadeiam a apoptose das células epiteliais da mucosa oral levando a inflamação crónica. Kurago (Kurago, 2016) fez uma revisão sobre a etiologia e patogénese do LPO, onde refere que no LPO a resposta inflamatória leva a um aumento da produção de citocinas inflamatórias. Também sugere que o stress oxidativo pode contribuir para a fisiopatologia do LPO (este tema será explorado na secção seguinte). Os radicais livres, produzidos por processos inflamatórios, podem danificar as células da mucosa oral, o que pode desencadear a resposta auto-imune.

A etiologia exata do LPO permanece controversa. Existem numerosos fatores de desencadeamento potencial envolvidos na patogénese do LPO, incluindo provavelmente fatores sistémicos e locais ainda desconhecidos (Gururaj et al., 2021). Os fatores associados ao líquen plano oral incluem predisposição genética, microrganismos, alergias, trauma mecânico, stress e doenças sistémicas, entre outros. Assim, segundo Sameera (Sameera et al., 2017) o LPO é uma doença imunológica mediada por células T a uma alteração antigénica desconhecida da pele ou das mucosas num doente geneticamente predisposto.

A ativação anormal do sistema imunitário é mediada pela sinalização de várias moléculas que foram estudadas como potenciais biomarcadores salivares para LPO.

O cortisol é um glicocorticóide que regula processos e comportamentos, incluindo a imunomodulação. Níveis elevados de cortisol podem ser causados pela presença de stress e podem levar a distúrbios imunológicos (Montero-López et al., 2017). Os níveis de cortisol na saliva têm sido amplamente estudados em relação aos efeitos de fatores psicológicos relacionados com o stress e a ansiedade nos distúrbios imunológicos. Foram observados níveis mais elevados de cortisol salivar em doentes diagnosticados com LPO do que em doentes saudáveis (Humberto et al., 2018; Lopez-Jornet et al., 2019). Assim, o cortisol tem sido sugerido como um potencial marcador de diagnóstico para esta doença, à luz de relatos de que o stress pode ser a causa de recorrência do LPO (Humberto et al., 2018). Teoricamente, o cortisol reduz o número de linfócitos e outras células imunitárias,

porque causa uma disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o que leva a uma diminuição da sua produção (González-Moles & Scully, 2010).

Lopez-Jornet et al. (Lopez-Jornet et al., 2016) mostraram que os pacientes com LPO tinham níveis mais elevados de adiponectina. Também demonstraram, por ELISA, que os anticorpos IgA e IgG estavam significativamente aumentados nos pacientes com LPO em comparação com pacientes sem a doença (Lopez-Jornet et al., 2016). O tratamento para o LPO depende da gravidade das lesões e pode incluir corticosteroides tópicos ou sistêmicos, medicamentos imunossupressores ou anti-histamínicos (Lodi et al., 2020).

O LPO é mais comum nas mulheres do que nos homens (González-Moles et al., 2021). Pode ocorrer em qualquer idade, mas é mais comum em adultos com mais de 40 anos. As pessoas com LPO podem também apresentar lesões cutâneas características da doença, embora a maioria tenha apenas lesões orais. Pode afetar toda a mucosa oral, mas é mais comum na língua, mucosa jugal e gengivas. Estima-se que o LPO afeta 1,01% da população mundial, com uma maior prevalência na Europa (González-Moles et al., 2021). Debate-se ainda sobre o seu potencial de malignização (Farah et al., 2021; González-Moles et al., 2019).

5.2 Patogénese do LPO

O stress oxidativo é um desequilíbrio na oxirredução resultando em lesões a nível molecular, celular e tecidual. O papel do stress oxidativo no LPO tem sido investigado (Melguizo-Rodríguez et al., 2020) e a patogénese desta doença tem estado relacionada com o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigénio (ROS) (Tvarijonaviciute et al., 2017). Vários estudos descreveram níveis de NO salivares mais elevados em doentes com LPO do que em indivíduos saudáveis (Humberto et al., 2018), e níveis elevados têm sido associados a uma progressão mais grave da doença através da produção de lesões da mucosa (Tvarijonaviciute et al., 2017). Embora as ROS participem no stress oxidativo celular, não existe um consenso claro sobre a relação entre a concentração salivar e os danos oxidativos nos tecidos de pacientes com LPO. A proteína c-reativa (PC-R) é frequentemente utilizada como marcador de inflamação e os seus níveis salivares são mais elevados nos pacientes com LPO do que em indivíduos saudáveis (Tvarijonaviciute et al., 2017), o que sugere um possível papel da PC-R na monitorização da progressão desta doença (Melguizo-Rodríguez et al., 2020).

A patogênese do LPO tem também sido associada a um desequilíbrio entre os linfócitos Th1/Th2. Foram observados também níveis elevados de TNF- α na saliva em doentes com LPO (Humberto et al., 2018; R. Lu et al., 2015; Mozaffari et al., 2017). Os seguintes mediadores encontram-se significativamente elevados nos doentes com LPO: IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α , NF- κ B, citocinas relacionadas com CD44 e CD14 (Hassona & Scully, 2015). IL-4 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos Th2 e exerce efeitos anti-inflamatórios ao bloquear a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Humberto et al., 2018; Mozaffari, Zavattaro, et al., 2019), mas não existem provas suficientes para confirmar a sua utilidade como biomarcador da progressão da doença (Mozaffari, Molavi, et al., 2019). IL-6 é uma citocina secretada por uma variedade de células, é pró-inflamatória e mediadora de respostas imunitárias e inflamatórias. Os níveis de IL-6 na saliva foram significativamente mais elevados em doentes com LPO (Liu et al., 2017). A associação da IL-6 com lesões iniciais e fases avançadas do LPO levou à sua proposta como um biomarcador de resposta terapêutica (Lisa Cheng et al., 2014; R. Lu et al., 2015). A IL-8, outra citocina pró-inflamatória, é produzida em resposta a lesões e os seus níveis salivares são mais elevados em doentes com LPO do que em indivíduos saudáveis (Humberto et al., 2018; Mozaffari et al., 2018). Os níveis salivares de IL-6 e IL-8 estão associados à severidade da LPO (R. Lu et al., 2015), embora alguns autores descrevam a IL-8 na saliva como um biomarcador LPO mais fiável (Mozaffari et al., 2018).

5.3 MicroRNAs (miRNAs)

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA (normalmente entre 19 a 21 nucleótidos) sujeitas a um duplo corte sequencial no núcleo (miRNA primário) e citoplasma (miRNA precursor). Os miRNAs reconhecem RNA mensageiro alvo e, portanto, dependendo do seu nível de complementaridade com o alvo, podem quebrar o RNA mensageiro (mRNA) ou permitir a sua tradução (Li et al., 2022). Assim, os miRNAs regulam a tradução proteica. Existem milhares de microRNAs descritos em humanos, e estão envolvidos em praticamente todos os processos biológicos. Vários miRNAs apresentam uma expressão alterada no LPO. Portanto, dado o envolvimento dos mesmos na patogênese do LPO, esses miRNAs (Tabela 2) têm potencial para ser biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da doença (Li et al., 2022).

Tabela 2: MicroRNA salivar relacionado com o diagnóstico e prognóstico do LPO (Li et al., 2022).

miRNAs	Alvo	Expressão	Função
miRNA-214	CD44	-	Como supressor de tumores, o miR-214 reduzido está associado ao LPO
miRNA-146a	STAT1, IFN- γ , IL-2	+	DQ786243 pode regular a indução e função das células CD4 ⁺ Treg através do eixo Foxp3/miR-146a/NFkB. Foxp3 e miR-146a regulam a progressão do LPO regulando negativamente o TRAF6
miRNA-55	SOCS1	+	Um ciclo de feedback positivo de miR-155 e IFN- γ pode contribuir para a resposta imunitária Th1-dominante em LPO
miRNA-27a/b	TGF- β , p53, p63, Smad	-	A sinalização de vitamina D/VDR pode direcionar a expressão miR-27a/b para exercer efeitos fisiológicos em LPO
miRNA-26a/b	PKC δ / CD38	-	Supressão da via da vitamina D/VDR diminui o anti LPO miR-26a/b

+: regulação positiva

-: regulação negativa

CD44, CD38, glicoproteínas de superfície celular; STAT1, transdutor de sinal e ativador de transcrição 1; IFN- γ , interferon-gama; IL-2, interleucina-2; SOCS1, supressor de sinalização de citocinas 1; TGF- β , transformador do fator de crescimento beta; P53, P56, proteína supressora do tumor; Smad, proteína; PKC, proteína quinase C

5.4 Biomarcadores de malignização

Muito poucos estudos têm sido feitos sobre biomarcadores de malignidade no LPO. González-moles et al. (González-Moles et al., 2019) apresentam resultados consistentes de que há uma subestimação no valor da taxa de transformação maligna relativamente ao LPO e que atualmente é reportada como sendo de 1,14%. As principais razões para esta tendência seriam a aplicação de critérios de diagnóstico restritivos, especialmente a exclusão de casos de LPO com displasia epitelial, bem como períodos de seguimento inadequados e a baixa qualidade de alguns estudos. Verificou-se que o risco de transformação maligna era influenciado pela localização na língua, presença de áreas erosivas e/ou atróficas, consumo de tabaco e/ou álcool, e a infecção com hepatite C.

No corpo humano, existe um mecanismo antioxidante para manter o equilíbrio da oxidação-redução. A quebra deste equilíbrio poderia acrescer aos danos causados

diretamente pelas ROS. De facto, várias doenças foram correlacionadas com um desequilíbrio de oxidação-redução. Agha-Hosseini et al. (Agha-Hosseini et al., 2012), dividiram a capacidade total antioxidante em níveis de peroxidação para calcular o equilíbrio entre o estado oxidante e antioxidante. Este rácio foi significativamente mais baixo em CCEO do que em LPO, e também em LPO do que em indivíduos saudáveis. Isto sugere que existe um desequilíbrio de stress oxidativo em doentes com LPO e CCEO, e os doentes com LPO correm um risco acrescido de desenvolver cancro (Agha-Hosseini et al., 2012).

Foi relatado que as células cancerígenas humanas têm um teor mais elevado de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) (Agha-Hosseini et al., 2012). Parece que as próprias células tumorais produzem ROS espontaneamente, o que resulta num aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) no DNA. A presença de 8-OHdG indica danos oxidativos no DNA. Observaram que o nível salivar de 8-OHdG era significativamente mais elevado tanto em doentes com CCEO como em doentes com LPO, em comparação com indivíduos do grupo controlo (Agha-Hosseini et al., 2012). Isto está de acordo com outros estudos sobre níveis elevados de 8-OHdG no soro e urina da maioria dos doentes com CCEO. Assim sendo, parece que o 8-OHdG salivar é útil para indicar o risco de cancro (Agha-Hosseini et al., 2012).

O estudo imuno-histoquímico de cdk4 e cdk6 na mucosa normal, leucoplasia oral, leucoplasia oral com displasia ligeira e CCEO demonstrou que a sobre-expressão de cdk6 era exclusivamente encontrada no CCEO (Poomsawat et al., 2011). No entanto, houve alguns casos de LPO contendo elevada percentagem de células com cdk6. Portanto, seria interessante avaliar se estes casos de LPO irão desenvolver cancro mais tarde. Poomsawat et al. (Poomsawat et al., 2011) também avaliaram a expressão de cdk4, cdk6 e p16, proteínas importantes na fase G1 da mitose, e postularam que a perda da expressão de p16 pode ser um sinal inicial de malignização em LPO com expressão elevada de cdk4. A expressão alterada de cdk4 e p16 fornece assim indícios do potencial maligno em LPO. Desde modo, a combinação da expressão p16 e cdk4 pode ser uma ferramenta útil na previsão da malignização em LPO.

A IL-8 é também um marcador importante para discriminar entre CCEO e LPO; a IL-8 combinada com o mRNA H3F3A proporciona uma boa discriminação entre CCEO e outras perturbações orais potencialmente malignas. De facto, a concentração proteica de IL-8 foi significativamente mais elevada em doentes com CCEO do que naqueles com displasia ou que serviram de controlos (Gleber-Netto et al., 2016).

Utilizando a técnica de PCR, Mehdipour et al. (Mehdipour et al., 2018) descobriram que os níveis de miRNA-21 e miRNA-125a na saliva estavam significativamente alterados em doentes com LPO, enquanto os níveis de miRNA-31 e miRNA-200a não estavam significativamente alterados nesses mesmos doentes. Os dados atuais demonstram que estes quatro miRNAs salivares podem servir como um biomarcador útil para monitorizar lesões de LPO. Esse estudo também mostrou que a diminuição dos níveis salivares miRNA-125a associados a níveis elevados de miR-21 pode indicar um mau prognóstico em doentes com LPO. Portanto, estes miRNAs podem ser utilizados para detetar transformação maligna em pacientes com LPO. Pelo contrário, a falta de alterações significativas nos níveis de miRNA-200a e miRNA-31 pode indicar a ausência de transformação maligna de lesões da mucosa oral em pacientes com LPO. Estes novos conhecimentos podem ser importantes para uma monitorização rápida do LPO, conveniente e não invasiva (Mehdipour et al., 2018).

5.5 Efeito de tratamentos nos níveis salivares de biomarcadores

Um tratamento com imunossuppressores, tais como corticosteróides e macrólidos não antibióticos, assim como terapias alternativas, tais como extratos de plantas e polifenóis, mostram diminuições dos biomarcadores inflamatórios (González-Moles & Scully, 2010; Hassona & Scully, 2015).

Após tratamento, o propionato de clobetasol tópico a 0,05% foi associado a uma redução significativa dos níveis salivares de IL-1 β (Ferri et al., 2021). Além disso, foram observados resultados superiores em termos de níveis de pós-tratamento de IL-1 β com corticosteróides em comparação com fotobiomodulação (PBM). A fotobiomodulação é o processo pelo qual as nossas células transformam a energia fotónica da luz em energia para a regeneração celular, o equivalente à fotossíntese para as plantas.

Observou-se também uma tendência para a diminuição dos níveis salivares de IL-6 após tratamento com propionato de clobetasol a 0,05% e PBM quando comparado com os níveis de referência (Abboud et al., 2021). Outro estudo mostrou níveis reduzidos de IL-6 salivar após tratamento com dexametasona 0,1% em colutório (Ghallab et al., 2010). Em modelos experimentais de doenças inflamatórias, a PBM conseguiu diminuir os níveis de IL-6, contribuindo para a resolução da inflamação e promovendo a reparação dos tecidos (dos Santos et al., 2020).

Li et al. (Li et al., 2020) mostraram que a abundância relativa de *Streptococcus salivarius* estava significativamente reduzida em doentes com LPO. Além disso, o sobrenadante de *S. salivarius* conseguiu inibir a ativação da via de sinalização NF- κ B. Portanto, a aplicação tópica de *S. salivarius* K12 parece ser eficaz no tratamento da LPO, especialmente na utilização a longo prazo (Li et al., 2020).

Devido ao envolvimento do microbioma na patologia, os probióticos são de interesse enquanto novas estratégias terapêuticas (Zanetta et al., 2022). Os efeitos da toma de probióticos demonstraram ser benéficos sem agravar às condições pré-existentes. Eles regulam de forma específica e dependente do tempo e da dose, a suscetibilidade à infecção bacteriana, a produção de citocinas inflamatórias, a expressão de MMP-9, a via de sinalização NF-B κ B, a apoptose de queratinócitos, a degeneração e ativação de mastócitos, a infiltração, a proliferação e resposta de células T (Zanetta et al., 2022).

6. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS

6.1 Epidemiologia e fisiopatologia

O carcinoma de células escamosas orais (CCEO) também conhecido como cancro oral, é um tipo de cancro que se desenvolve em qualquer localização na mucosa oral. O seu aspeto clínico mais comum é uma lesão ulcerada com uma área central necrótica rodeada por bordos elevados (Pires et al., 2013). Dados do Observatório Global do Cancro (GLOBOCAN) mostram que a incidência anual de CCEO em 2020 foi de 377.713 casos em todo o mundo, com a maioria incidência na Ásia (248.360), seguido pela Europa (65.279) e América do Norte (27.469). A maioria dos casos de CCEO ocorre em doentes idosos de sexo masculino (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>).

Os principais fatores etiológicos e predisponentes do CCEO incluem sobretudo os hábitos tabágicos, o consumo de álcool e a radiação ultravioleta, mas vários outros fatores, como as infeções por papilomavírus humano (HPV) e por *Candida* spp., assim como deficiências nutricionais e a predisposição genética, têm sido também apontados (Pires et al., 2013).

O processo pelo qual a mucosa oral escamosa estratificada normal se transforma em tecido pré-maligno e eventualmente maligno não é bem compreendido. No entanto, reconhece-se que se trata de um processo complexo, multifacetado e com várias etapas, que envolve alterações genéticas acumuladas que perturbam a função normal dos oncogenes e dos genes supressores de tumores. A perturbação do ciclo celular é marcada, nas suas fases iniciais, por desregulação, aumento da proliferação e alterações na diferenciação, reparação do ADN, apoptose e imunidade celular (Thomson, 2012).

6.2 Diagnóstico

Mais de 90% dos cancros orais são carcinomas das células escamosas orais (CCEO) e a maioria destes são diagnosticados numa fase avançada, realçando a necessidade de meios clínicos de diagnóstico para a sua deteção precoce (Cheng et al., 2014).

A análise histológica de uma biópsia é utilizada para fazer o diagnóstico do CCEO na maioria dos casos. A análise salivar, que não requer um procedimento invasivo, é uma

abordagem alternativa apelativa para o diagnóstico e prognóstico desta condição oral (Oh et al., 2020).

A utilização de biomarcadores salivares para a detecção precoce do cancro oral, e para o qual a taxa de sobrevivência de cinco anos é ainda muito baixa (62%), atraiu muito interesse no seio da comunidade científica (Siegel et al., 2013).

Os marcadores tumorais podem ser substâncias derivadas diretamente da oncogénese, ou metabolitos de natureza proteica ou enzimática, hormonas ou imunoglobulinas segregadas pelo próprio tumor ou pelos tecidos afetados pela lesão. A concentração destes marcadores altera-se ao longo do desenvolvimento do tumor e, na maioria dos casos, estes marcadores são uma ferramenta útil no diagnóstico e prognóstico do cancro, bem como na recorrência e metástase causada por eles (Guerra et al., 2015).

Uma vez efetuado o diagnóstico de carcinoma oral, devem ser consideradas as opções de tratamento. O tratamento cirúrgico é o “*gold standard*” no tratamento do cancro oral.

6.3 MicroRNA (miRNA) salivares

A expressão de miRNAs específicos no microambiente tumoral tem sido implicada na desregulação dos supressores tumorais ou oncogenes, contribuindo para o desenvolvimento ou supressão do tumor (Tabela 3). Uma regulação aberrante do miRNAs pode contribuir significativamente para o desenvolvimento do cancro (Sannigrahi et al., 2017). Assim, há uma *up-regulation* dos miRNAs oncogénicos que leva ao silenciamento dos genes supressores do tumor que podem regular a iniciação, o desenvolvimento e a metástase das células cancerígenas. Em contrapartida, os miRNAs com função supressora de tumores sofrem uma *down-regulation*, reduzindo a regulação oncogénica e perpetuando as malignidades (Manzano-Moreno et al., 2021).

Tabela 3. Os miRNAs envolvidos na regulação do CCEO (Manzano-Moreno et al., 2021).

Biomarcador	Resultados	Interesse clínico	Referências
miRNA-24- miRNA 3P miRNA412-3p miRNA 512-3p miRNA302b-3p miRNA 517b-3p miRNA 134 miRNA 486-5p miRNA 4484 miRNA 10b-5p miRNA 200a miRNA 365	Correlação com a fase da doença, tipo histopatológico, e/ou grau de CCEO	Possível meio para o diagnóstico precoce da CCEO; em geral, a expressão destes miRNAs indica mau prognóstico e maior risco de transformação maligna e cancro oral	(Coon et al., 2020 ; He et al., 2020 ; Langevin et al., 2017)
miRNA-27b miRNA-200 miRNA-375 miRNA-26 ^a miRNA-7 miRNA-107 miRNA-218 miRNA let-7 miRNA-125	Papel de supressor de tumores	Níveis mais elevados destes biomarcadores podem ser úteis para o diagnóstico, estágio e prognóstico do CCEO; a expressão destes miRNAs reduz a progressão do CCEO	(Datta et al., 2012; Harris et al., 2012; Kalinowski et al., 2012)
miRNA-21 miRNA-145 miRNA-93 miRNA-184 miRNA-31 miRNA-412-3p miRNA-34 ^a	Papel ativador de tumores; estes miRNAs atuam como um oncogene, promovendo o desenvolvimento e a progressão do CCEO	Concentrações elevadas na saliva oferecem um método fiável para detetar CCEO e lesões orais potencialmente malignas	(Hung et al., 2013; Wiklund et al., 2011; Zahran et al., 2015)

6.4 Citoquinas salivares

A desregulação nos níveis de certas citocinas está relacionada com o aparecimento de vários tipos de cancro, considerando um papel importante como biomarcadores para o diagnóstico e monitorização de certos processos tumorais (Loo & Pui, 2020).

Foram encontradas concentrações elevadas de IL-6 na saliva de pacientes com CCEO nas fases iniciais da doença. A IL-6, juntamente com a TNF- α , foi considerada discriminatória entre o CCEO e a leucoplasia oral (Dikova et al., 2021). Esta citocina, a

IL-6, entre outras proteínas pró-inflamatórias, parece promover o crescimento e invasão tumoral e a angiogênese em doentes com CCEO, aumentando a resistência imunitária do tumor (Dikova et al., 2021). Concentrações elevadas de IL-6 têm sido associadas a uma maior agressividade e gravidade da doença, reduzindo a sobrevivência e aumentando a taxa de recidiva (Arduino et al., 2015). Verificou-se que as concentrações de IL-6 e TNF- α aumentaram exponencialmente com a progressão da CCEO, confirmando o envolvimento destas citocinas pró-inflamatórias nesta doença, através da promoção da sobrevivência e a proliferação de células malignas (Dikova et al., 2021).

Dikova et al (Dikova et al., 2021) descreveram concentrações salivares elevadas de IL-8 em doentes diagnosticados com CCEO. Tal como a IL-6, a IL-8 é responsável pelo crescimento e proliferação de células tumorais e pelo reforço dos seus mecanismos de imunodeficiência, e concentrações elevadas de IL-6 e IL-8 em saliva e em soro têm sido associadas a uma redução da sobrevivência e a um aumento da taxa de recorrência no CCEO (Arduino et al., 2015).

As concentrações de IL-1 β tanto em amostras de saliva estimulada como não estimulada são significativamente mais elevadas em doentes com CCEO do que em pacientes saudáveis (Radhika et al., 2016). Lee et al. (Lee et al., 2018) encontraram um aumento da expressão de IL-1- β não só na saliva, mas também no tecido tumoral de pacientes com CCEO, especialmente nas fases iniciais da doença, o que mostra o potencial valor deste biomarcador no diagnóstico. No entanto, esse resultado não é exclusivo do CCEO, pois os níveis podem ser elevados em doentes com outras doenças inflamatórias da cavidade oral, incluindo a periodontite. Por conseguinte, as concentrações de outros biomarcadores também devem ser tidas em conta para fazer o diagnóstico (Brinkmann et al., 2011). Kamatani et al. (Kamatani et al., 2013) relataram uma diminuição da IL-1 β salivar após ressecção cirúrgica do CCEO, apoiando a utilidade desta citocina no diagnóstico e na deteção da recidiva da doença.

Os antagonistas do recetor da IL-1 (IL-1-Ra) ligam-se ao recetor de célula de membrana para IL-1 sem produzir efeitos intracelulares, inibindo assim a ligação à IL-1 e atuando como seus reguladores negativos. A IL-1-Ra é produzida principalmente por monócitos ativados, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos após estimulação com lipopolissacarídeo e é o primeiro passo para produzir a citocina pró-inflamatória (e.g. IL-1 e TNF) e mediadores de cascata inflamatória (e.g. IL-10 ou IL-1-Ra). A IL-1-Ra tem muito menos afinidade para o recetor do que a IL-1 e requer concentrações mais elevadas para desempenhar a sua função, e além disso, a IL-1-Ra é constitutivamente expressa no

epitélio oral normal, mas desregulada em tecidos neoplásicos (Niklander, 2021). A sua expressão diminui com o envelhecimento tanto em células primárias como displásicas, o que é coerente com a alta frequência de CCEO em pessoas com mais de 50 anos de idade (Acharya & Tayaar, 2012). A sobre-expressão da IL-1-Ra foi demonstrada em células displásicas e neoplásicas e, além de envolvida na sobre-expressão da IL-1 β , pode também promover o crescimento do cancro através da regulação da expressão CD184 (Acharya & Tayaar, 2012).

6.5 Outras proteínas

O proteoma salivar dos pacientes com CCEO pode ser determinado quantitativamente. 24 proteínas foram identificadas como potenciais biomarcadores salivares para o diagnóstico do CCEO (Chu et al., 2019). Para um melhor diagnóstico do CCEO, os níveis salivares de FGA, resistina, SERPINA1 e THBS2 poderiam ser determinados simultaneamente em combinação com o exame oral (Chu et al., 2019).

Mumtaz et al. (Mumtaz et al., 2022) descobriram que a proteína TFRC, a mais abundantemente expressa nos tecidos cancerosos do CCEO, e identificada em todas as linhas de células cancerosas, é um biomarcador não-invasivo especialmente promissor.

O gene *TP53* é chamado de 'Guardião do Genoma'. Geralmente está em modo de espera e sua ativação ocorre em resposta a uma variedade de stresses celulares exógenos e endógenos. A ativação do gene normalmente resulta na formação da proteína p53, que tem 393 aminoácidos e esta proteína em última instância causa paragem do ciclo celular ou apoptose. Em uma célula normal, a sua atividade é estritamente regulada por se tratar de uma molécula biologicamente ativa. A expressão de p53 está associada a uma evolução mais agressiva do CCEO (Deshmukh et al., 2022).

6.6 Biomarcadores do prognóstico/ tratamento

Foram encontrados níveis elevados de IL-10 em doentes com CCEO, sugerindo que níveis muito elevados desta interleucina estão associados ao fenótipo agressivo desta doença e têm um mau prognóstico (Alhamarneh et al., 2011). A supressão dos mecanismos imunitários anti-tumor (prevenção da apresentação de antígenos das células cancerosas transformadas em células T citotóxicas) pela IL-10 promove a propagação do

cancro e reduz a sobrevivência dos doentes (Alhamarneh et al., 2011). Portanto, a IL-10 pode servir como biomarcador de prognóstico, especialmente nas fases iniciais da doença. A produção de IL-10 é muito elevada em fases avançadas devido à sua abundante expressão nos tecidos metastáticos, mantendo simultaneamente um ambiente propício ao crescimento e expansão de células neoplásicas que levam à produção da IL-10 num círculo vicioso (Arantes et al., 2017).

No CCEO, a desregulação da via do EGFR (recetor do fator de crescimento epidérmico) parece ter relevância prognóstica. O protótipo da primeira classe de terapia anti-EGFR é o Cetuximab, capaz de induzir a autofagia nas células cancerosas através da desregulação do mTOR e HIF1 - uma via de sinalização. Por outro lado, o Erlotinib é um inibidor seletivo da tirosina quinase EGFR (EGFR TKI) com uma ação específica e potente no cancro oral; em combinação com a cisplatina, mostrou uma taxa de resposta de 21% e taxas mínimas de toxicidade (Panarese et al., 2019).

6.6.1 MiRNAs com papel supressor do tumor

Como mencionado anteriormente, alguns miRNAs podem ser utilizados como biomarcadores de prognóstico, nomeadamente: miRNA-27b, miRNA-200, miRNA-375, miRNA-26a, miRNA-7, miRNA-107, miRNA-218, miRNA let-7, miRNA-125 (Tabela 4 e Figura 3).

Tabela 4. MiRNA como biomarcadores de prognóstico do CCEO.

MiRNAs	Papel	Referências
MiRNA27b	Inibe a proliferação celular, a migração e a invasão na CCEO	(Momen-Heravi & Bala, 2018)
MiRNA-200	Inibe o crescimento celular em concentrações salivares aumentadas	(Greither et al., 2017)
MiRNA-375	Atua como supressor de tumores em múltiplos cancros incluindo CCEO	(Harris et al., 2012)
MiRNA-26 ^a	Inibe a migração celular e a metástase e diminui a expressão de potenciador de zeste homólogo 2 (EZH2), reduzindo o crescimento celular	(Z. M. Lu et al., 2014)

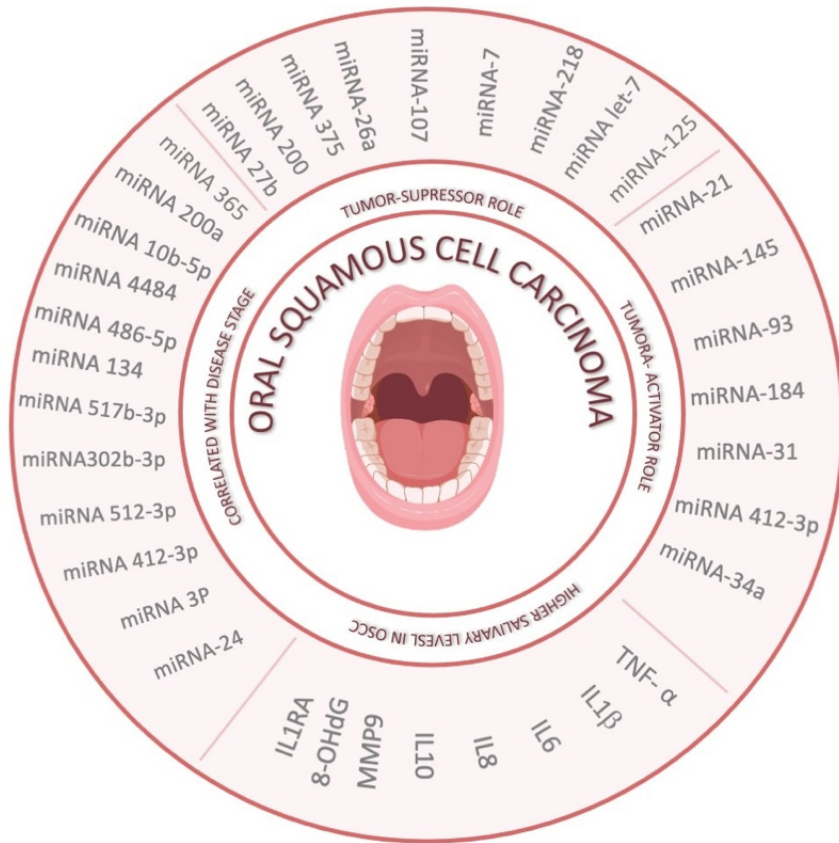


Figura 3. Os principais biomarcadores implicados no diagnóstico e prognóstico do CCEO. Retirada de (Manzano-Moreno et al., 2021).

Muitos miRNAs supressores de tumores atuam inibindo a expressão de genes que promovem a proliferação celular (Tabela 5).

Tabela 5. MiRNA que inibem expressão de genes.

MiRNAs	Papel	Referencias
MiRNA-7	Inibe a expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)	(Kalinowski et al., 2012)
MiRNA-107	Inibe os genes <i>Akt</i> , <i>Stat3</i> , e Rho GTPases através da proteína cinase C ϵ (PKC ϵ)	(Datta et al., 2012)

Kalinowski et al. (Kalinowski et al., 2012) descobriram que o miRNA-7 pode regular a expressão do EGFR e a atividade da proteína Akt (proteína quinase B) nas células cancerígenas do CCEO. Quando o miRNA-7 está ativo, reduz o crescimento das células HN5 que são sensíveis ao inibidor da tirosina quinase EGFR (EGFR TKI), o erlotinib. Esta informação sugere que o miRNA-7 pode ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento do CCEO. O miRNA-7 atuou sinergicamente com o erlotinib para inibir o crescimento de células FaDu resistentes ao erlotinib, um efeito associado a uma maior

inibição da atividade da Akt. A análise das linhas de células HN5 e FaDu transfectadas com miRNA-7 identificou um conjunto comum de genes alvo miRNA-7 desregulados, fornecendo uma visão da função supressora do tumor de miRNA-7. Além disso, foram identificados vários miRNA-7 mRNAs alvo com um papel putativo na sensibilização das células FaDu para o erlotinib. Em conjunto, estes dados apoiam a regulação coordenada da sinalização AKT por miRNA-7 das células do CCEO e sugerem o potencial terapêutico de miRNA-7 sozinho ou em combinação com EGFR TKIs nesta doença (Kalinowski et al., 2012).

Outros miRNAs supressores tumorais inibem a migração celular, invasão, e metástase ao interferirem com as cascatas de sinalização, incluindo: miRNA-218, que inibe a via de adesão focal, impedindo a migração celular; alguns membros da família miRNA let-7; e miRNA- 125 (Z. M. Lu et al., 2014).

6.6.2 Recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

A investigação de biomarcadores para prever a eficácia do inibidor de EGFR é indispensável para determinar o tratamento específico do paciente no CCEO. Lyu et al. (Lyu et al., 2016) descobriram que a proteína Akt é um biomarcador de previsão, mas o que causou a hiper-ativação da Akt não é claro. A via PI3K/AKT é uma via de transdução de sinal intracelular que promove o metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogénese em resposta a sinais extracelulares. Segundo conhecimentos anteriores, a ativação de Akt pode ocorrer não só através da própria sobre-expressão do EGFR, mas também através de alterações genéticas de PIK3CA ou PTEN4. Além disso, as vias anormalmente ativadas que tenham cruzamento com a via EGFR podem também causar a hiper-ativação de Akt. Por exemplo, a amplificação do gene *HER2*, a via de sinalização IGF-1R hiper-ativada e a mutação/amplificação do gene *MET* podem todas resultar na ativação persistente da via de sinalização PI3K/AKT. Na maioria das situações, mesmo em caso de bloqueio EGFR, a via PI3K/AKT pode permanecer ativa e contribuir para a resistência à terapia orientada para inibir o EGFR. Pensam que, nestas situações, a adição de inibidor da Akt pode melhorar a eficácia da terapia anti-EGFR. O estudo demonstra que, nos pacientes com CCEO, a expressão da Akt é um biomarcador preditivo de resposta à quimioterapia de indução baseada no cetuximab (Lyu et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

As principais vantagens da saliva como amostra para diagnóstico de doença são a colheita rápida e não invasiva, e o seu fácil armazenamento. Em consequência disso, os biomarcadores salivares são cada vez mais estudados pela comunidade científica. O crescente número de biomarcadores salivares descobertos, associado ao avanço das tecnologias que são cada vez mais eficientes, permite afirmar que a saliva é um potencial substituto do sangue para a busca de biomarcadores. Sabe-se que os níveis salivares de vários biomarcadores são alterados na presença de doenças orais e, portanto, podem ajudar no diagnóstico e prognóstico das mesmas.

Alguns biomarcadores, como as citocinas pró-inflamatórias, são comuns em muitas doenças, enquanto outros são mais específicos. A sua avaliação na saliva fornece aos médicos uma valiosa ferramenta não invasiva para complementar os resultados clínicos. O uso de biomarcadores combinados parece resultar em maior precisão, com maior sensibilidade e especificidade, em comparação com o uso de biomarcadores isolados. A associação de diferentes biomarcadores, que permitam formar uma assinatura biológica na saliva, é uma área de investigação que se antevê bastante promissora. A utilização de biomarcadores salivares poderá ter um impacto significativo no diagnóstico, tratamento e monitorização do LPO e do CCEO. No entanto, são necessários mais estudos para compreender melhor o valor clínico dos biomarcadores já identificados de modo a poder integrá-los na prática médica diária.

A melhor compreensão da correlação entre a saliva e a saúde geral começa a dar frutos, o que promoverá cada vez melhores práticas médicas que facilitem o diagnóstico e a individualização de terapias direcionadas precisas e indolores. A extensa descoberta de novos biomarcadores salivares e a sua validação irá transformar o campo do diagnóstico do cancro oral e de patologia oral não-maligna.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abboud, C. S., Brandão, E. H. da S., Cunha, K. R. L., de Sousa Brito, K., Gallo, C. de B., Molon, A. C., Horliana, A. C. R. T., Franco, A. S. L., Thongprasom, K., & Rodrigues, M. F. S. D. (2021). Serum and salivary cytokines in patients with oral lichen planus treated with Photobiomodulation. *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/odi.14084>
- Acharya, S., & Tayaar, A. S. (2012). Analysis of clinical and histopathological profiles of oral squamous cell carcinoma in young Indian adults: A retrospective study. *Journal of Dental Sciences*, 7(3), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2012.05.005>
- Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, Bradshaw CJ, Townsend G, Soltysiak A, Alt KW et al (2013) Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet* 45(4):450–455
- Agha-Hosseini, F., Mirzaii-Dizgah, I., Farmanbar, N., & Abdollahi, M. (2012). Oxidative stress status and DNA damage in saliva of human subjects with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 41(10), 736–740. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01172.x>
- Alhamarneh, O., Agada, F., Madden, L., Stafford, N., & Greenman, J. (2011). Serum IL10 and circulating CD4+CD25high regulatory T cell numbers as predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck*, 33(3), 415–423. <https://doi.org/10.1002/hed.21464>
- Andre, F., McShane, L. M., Michiels, S., Ransohoff, D. F., Altman, D. G., Reis-Filho, J. S., Hayes, D. F., & Puztai, L. (2011). Biomarker studies: A call for a comprehensive biomarker study registry. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(3), 171–176. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.4>
- Arantes, L. M. R. B., De Carvalho, A. C., Melendez, M. E., & Carvalho, A. L. (2017). Serum, plasma and saliva biomarkers for head and neck cancer. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 18, Issue 1, pp. 85–112). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1404906>
- Arduino, P. G., Menegatti, E., Cappello, N., Martina, E., Gardino, N., Tanteri, C., Cavallo, F., Scully, C., & Broccoletti, R. (2015). Possible role for interleukins as biomarkers for

- mortality and recurrence in oral cancer. *International Journal of Biological Markers*, 30(2), e262–e266. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000142>
- Ástvaldsdóttir, Á., Naimi-Akbar, A., Davidson, T., Brolund, A., Lintamo, L., Attergren Granath, A., Tranæus, S., & Östlund, P. (2016). Arginine and Caries Prevention: A Systematic Review. In *Caries Research* (Vol. 50, Issue 4, pp. 383–393). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000446249>
- Atarashi, K., Suda, W., Luo, C., Kawaguchi, T., Motoo, I., Narushima, S., Kiguchi, Y., Yasuma, K., Watanabe, E., Tanoue, T., Thaïss, C. A., Sato, M., Toyooka, K., Said, H. S., Yamagami, H., Rice, S. A., Gevers, D., Johnson, R. C., Segre, J. A., ... Honda, K. (2017). Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science*, 358(6361), 359–365. <https://doi.org/10.1126/science.aan4526>
- Babajko, S., Lescaïlle, G., Radoï, L., Thu Bui, A., Baaroun, V., Boyer, E., Delbosc, S., Chardin, H., Barouki, R., & Coumoul, X. (2020). Oral cavity as a target and a marker of environmental exposures: Diseases diagnosed during adulthood. In *Medecine/Sciences* (Vol. 36, Issue 3, pp. 231–234). Editions EDK. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020025>
- Baker, J. L., & Edlund, A. (2019). Exploiting the oral microbiome to prevent tooth decay: Has evolution already provided the best tools? In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03323>
- Bhattacharyya, M., Ghosh, S., & Vishveshwara, S. (2016). Protein Structure and Function: Looking through the Network of Side-Chain Interactions. In *Current Protein and Peptide Science* (Vol. 17).
- Boveia, V., & Schutz-Geschwender, A. (2015). Quantitative analysis of signal transduction with in-cell western immunofluorescence assays. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1314, pp. 115–130). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2718-0_13
- Brinkmann, O., Kastratovic, D. A., Dimitrijevic, M. V., Konstantinovic, V. S., Jelovac, D. B., Antic, J., Nesic, V. S., Markovic, S. Z., Martinovic, Z. R., Akin, D., Spielmann, N., Zhou, H., & Wong, D. T. (2011). Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. *Oral Oncology*, 47(1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.10.009>
- Carini, C., Fidock, M., & van Gool, A. (2019). *Handbook of Biomarkers and Precision Medicine*.
- Chattopadhyay, I., Verma, M., & Panda, M. (2019). Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. In *Technology in Cancer Research and Treatment* (Vol. 18). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1533033819867354>

- Cheng, Y. L., Rees, T., & Wright, J. (2014). A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. *Clinical and Translational Medicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/2001-1326-3-3>
- Chevalier, F., Hirtz, C., Chay, S., Cuisinier, F., Sommerer, N., Rossignol, M., & De Périère, D. D. (2007). Proteomic studies of saliva: A proposal for a standardized handling of clinical samples. *Clinical Proteomics*, 3(1–4), 13–21. <https://doi.org/10.1007/s12014-007-9000-x>
- Chu, H. W., Chang, K. P., Hsu, C. W., Chang, I. Y. F., Liu, H. P., Chen, Y. T., & Wu, C. C. (2019). Identification of salivary biomarkers for oral cancer detection with untargeted and targeted quantitative proteomics approaches. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(9), 1796–1806. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001530>
- Cobb, C. M., Kelly, P. J., Williams, K. B., Babbar, S., Angolkar, M., & Derman, R. J. (2017). The oral microbiome and adverse pregnancy outcomes. In *International Journal of Women's Health* (Vol. 9, pp. 551–559). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S142730>
- Coon, J., Kingsley, K., & Howard, K. M. (2020). MiR-365 (MicroRNA): Potential biomarker in oral squamous cell carcinoma exosomes and extracellular vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms21155317>
- Damle, S. G., Loomba, A., Dhindsa, A., Loomba, A., & Beniwal, V. (2016). *Correlation between dental caries experience and mutans streptococci counts by microbial and molecular (polymerase chain reaction) assay using saliva as microbial risk indicator.* www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1480
- Datta, J., Smith, A., Lang, J. C., Islam, M., Dutt, D., Teknos, T. N., & Pan, Q. (2012). MicroRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase C. *Oncogene*, 31(36), 4045–4053. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.565>
- Demmer, R. T., Jacobs, D. R., Singh, R., Zuk, A., Rosenbaum, M., Papapanou, P. N., & Desvarieux, M. (2015). Periodontal Bacteria and Prediabetes Prevalence in ORIGINS. *Journal of Dental Research*, 94, 201S–211S. <https://doi.org/10.1177/0022034515590369>
- Deshmukh, A. V., Gupta, A., Chaudhari, A. G., & Gangane, N. M. (2022). Correlation of p53 expression with Clinical Presentation and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: A Pilot Study. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 74, 1836–1840. <https://doi.org/10.1007/s12070-020-01859-0>

- Dikova, V., Jantus-Lewintre, E., & Bagan, J. (2021). Potential non-invasive biomarkers for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/jcm10081658>
- Dos Santos, T. C., de Brito Sousa, K., Andreo, L., Martinelli, A., Rodrigues, M. F. S. D., Bussadori, S. K., Fernandes, K. P. S., & Mesquita-Ferrari, R. A. (2020). Effect of Photobiomodulation on C2C12 Myoblasts Cultivated in M1 Macrophage-conditioned Media. *Photochemistry and Photobiology*, 96(4), 906–916. <https://doi.org/10.1111/php.13215>
- Farah, C. S., Fox, S., Shearston, K., Newman, L., Babic, S., & Vacher, M. (2021). Lichenoid dysplasia is not a distinct pathological entity. *Oral Oncology*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105362>
- Ferri, E. P., Cunha, K. R. L., Abboud, C. S., de Barros Gallo, C., de Sousa Sobral, S., de Fatima Teixeira da Silva, D., Horliana, A. C. R. T., Franco, A. L. d. S., & Rodrigues, M. F. S. D. (2021). Photobiomodulation is effective in oral lichen planus: A randomized, controlled, double-blind study. *Oral Diseases*, 27(5), 1205–1216. <https://doi.org/10.1111/odi.13662>
- Flanagan, L., Schmid, J., Ebert, M., Soucek, P., Kunicka, T., Liska, V., Bruha, J., Neary, P., Dezeeuw, N., Tommasino, M., Jenab, M., Prehn, J. H. M., & Hughes, D. J. (2014). Fusobacterium nucleatum associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(8), 1381–1390. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2081-3>
- Flemer, B., Warren, R. D., Barrett, M. P., Cisek, K., Das, A., Jeffery, I. B., Hurley, E., O’Riordain, M., Shanahan, F., & O’Toole, P. W. (2018). The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut*, 67(8), 1454–1463. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314814>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., & Chen, F. (2018). Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. In *Protein and Cell* (Vol. 9, Issue 5, pp. 488–500). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0548-1>
- Ghallab, N. A., El-Wakeel, N., & Shaker, O. G. (2010). Levels of salivary IFN-gamma, TNF-alfa, and TNF receptor-2 as prognostic markers in (Erosive) oral lichen planus. *Mediators of Inflammation*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/847632>

- Gleber-Netto, F. O., Yakob, M., Li, F., Feng, Z., Dai, J., Kao, H. K., Chang, Y. L., Chang, K. P., & Wong, D. T. W. (2016). Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma in a Taiwanese population. *Clinical Cancer Research*, 22(13), 3340–3347. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1761>
- González-Moles, M. Á., Ruiz-Ávila, I., González-Ruiz, L., Ayén, Á., Gil-Montoya, J. A., & Ramos-García, P. (2019). Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. In *Oral Oncology* (Vol. 96, pp. 121–130). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.07.012>
- González-Moles, M. A., & Scully, C. (2010). HPA-suppressive effects of aqueous clobetasol propionate in the treatment of patients with oral lichen planus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24(9), 1055–1059. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03591.x>
- González-Moles, M. Á., Warnakulasuriya, S., González-Ruiz, I., González-Ruiz, L., Ayén, Á., Lenouvel, D., Ruiz-Ávila, I., & Ramos-García, P. (2021). Worldwide prevalence of oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. In *Oral Diseases* (Vol. 27, Issue 4, pp. 813–828). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/odi.13323>
- Grande, M. A., Belstrøm, D., Damgaard, C., Holmstrup, P., Thangaraj, S. S., Nielsen, C. H., & Palarasah, Y. (2021). Complement split product C3c in saliva as biomarker for periodontitis and response to periodontal treatment. *Journal of Periodontal Research*, 56(1), 27–33. <https://doi.org/10.1111/jre.12788>
- Greither, T., Vorwerk, F., Kappler, M., Bache, M., Taubert, H., Kuhnt, T., Hey, J., & Eckert, A. W. (2017). Salivary miR-93 and miR-200a as post-radiotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 38(2), 1268–1275. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5764>
- Guerra, E. N. S., Acevedo, A. C., Leite, A. F., Gozal, D., Chardin, H., & de Luca Canto, G. (2015). Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. In *Oral Oncology* (Vol. 51, Issue 9, pp. 805–818). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.06.010>
- Gururaj N, Hasinidevi P, Janani V, Divynadaniel T. Diagnosis and management of oral lichen planus—Review. *JOral Maxillofac Pathol* 2021;25:383-93
- Hannig, C., Hannig, M., Kensche, A., & Carpenter, G. (2017). The mucosal pellicle – An underestimated factor in oral physiology. In *Archives of Oral Biology* (Vol. 80, pp. 144–152). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.001>

- Harris, T., Jimenez, L., Kawachi, N., Fan, J. B., Chen, J., Belbin, T., Ramnauth, A., Loudig, O., Keller, C. E., Smith, R., Prystowsky, M. B., Schlecht, N. F., Segall, J. E., & Childs, G. (2012). Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. *American Journal of Pathology*, *180*(3), 917–928. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.12.004>
- Hassona, Y., & Scully, C. (2015). *Salivary changes in oral mucosal diseases*.
- He, L., Ping, F., Fan, Z., Zhang, C., Deng, M., Cheng, B., & Xia, J. (2020). Salivary exosomal miR-24-3p serves as a potential detective biomarker for oral squamous cell carcinoma screening. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *121*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109553>
- Humberto, J. S. M., Pavanin, J. V., da Rocha, M. J. A., & Motta, A. C. F. (2018). Cytokines, cortisol, and nitric oxide as salivary biomarkers in oral lichen planus: a systematic review. *Brazilian Oral Research*, *32*. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0082>
- Hung, P. S., Liu, C. J., Chou, C. S., Kao, S. Y., Yang, C. C., Chang, K. W., Chiu, T. H., & Lin, S. C. (2013). miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes. *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079926>
- Kalinowski, F. C., Giles, K. M., Candy, P. A., Ali, A., Ganda, C., Epis, M. R., Webster, R. J., & Leedman, P. J. (2012). Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Erlotinib Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells by miR-7. *PLoS ONE*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047067>
- Kamatani, T., Shioyama, S., Yoshihama, Y., Kondo, S., Shirota, T., & Shintani, S. (2013). Interleukin-1 beta in unstimulated whole saliva is a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Cytokine*, *64*(2), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.08.011>
- Katharios-Lanwermyer, S., Xi, C., Jakubovics, N. S., & Rickard, A. H. (2014). Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. *Biofouling*, *30*(10), 1235–1251. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.976206>
- Khurshid, Z., Zohaib, S., Najeeb, S., Zafar, M. S., Rehman, R., & Ur Rehman, I. (2016). Advances of proteomic sciences in dentistry. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17050728>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>

- Kurago, Z. B. (2016). Etiology and pathogenesis of oral lichen planus: An overview. In *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* (Vol. 122, Issue 1, pp. 72–80). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.03.011>
- Kushnir, M. M., Rockwood, A. L., & Bergquist, J. (2010). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrometry Reviews*, 29(3), 480–502. <https://doi.org/10.1002/mas.20264>
- Langer, J., de Aberasturi, D. J., Aizpurua, J., Alvarez-Puebla, R. A., Auguie, B., Baumberg, J. J., Bazan, G. C., Bell, S. E. J., Boisen, A., Brolo, A. G., Choo, J., Cialla-May, D., Deckert, V., Fabris, L., Faulds, K., Javier García de Abajo, F., Goodacre, R., Graham, D., Haes, A. J., ... Liz-Marzán, L. M. (2020). Present and future of surface-enhanced Raman scattering. In *ACS Nano* (Vol. 14, Issue 1, pp. 28–117). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04224>
- Langevin, S., Kuhnell, D., Parry, T., Biesiada, J., Huang, S., Wise-Draper, T., Casper, K., Zhang, X., Medvedovic, M., & Kasper, S. (2017). Comprehensive microRNA-sequencing of exosomes derived from head and neck carcinoma cells in vitro reveals common secretion profiles and potential utility as salivary biomarkers. *Oncotarget*, 8(47):82459–82474. doi: 10.18632/oncotarget.19614.
- Lee, L. T., Wong, Y. K., Hsiao, H. Y., Wang, Y. W., Chan, M. Y., & Chang, K. W. (2018). Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 47(6), 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.09.016>
- Li, Y., He, Y., Xiang, J., Feng, L., Wang, Y., & Chen, R. (2022). The Functional Mechanism of MicroRNA in Oral Lichen Planus. In *Journal of Inflammation Research* (Vol. 15, pp. 4261–4274). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/JIR.S369304>
- Lisa Cheng, Y.-S., Jordan, L., Gorugantula, L. M., Schneiderman, E., Chen, H.-S., & Rees, T. (2014). Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients with Oral Cancer and Patients with Chronic Oral Inflammatory Diseases. *Journal of Periodontology*, 85(7), 956–965. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130320>
- Liu, J., Shi, Q., Yang, S., Wang, Q., Xu, J., & Guo, B. (2017). The relationship between levels of salivary and serum interleukin-6 and oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. In *Journal of the American Dental Association* (Vol. 148, Issue 10, pp. 743–749.e9). American Dental Association. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2017.05.007>
- Lodi G, Manfredi M, Mercadante V, Murphy R, Carrozzo M. Interventions for treating oral lichen planus: corticosteroid therapies. *Cochrane Database*

- of *Systematic Reviews* 2020, Issue 2. Art. No.: CD001168. DOI: 10.1002/14651858.CD001168.pub3.
- Loo, S. W., & Pui, T. S. (2020). Cytokine and cancer biomarkers detection: The dawn of electrochemical paper-based biosensor. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 20, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s20071854>
- Lopez-Jornet, P., Cayuela, C. A., Tvarijonaviciute, A., Parra-Perez, F., Escribano, D., & Ceron, J. (2016). Oral lichen planus: Salival biomarkers cortisol, immunoglobulin A, adiponectin. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 45(3), 211–217. <https://doi.org/10.1111/jop.12345>
- Lopez-Jornet, P., Zavattaro, E., Mozaffari, H. R., Ramezani, M., & Sadeghi, M. (2019). Evaluation of the salivary level of cortisol in patients with oral lichen planus: A meta-analysis. *Medicina (Lithuania)*, 55(5). <https://doi.org/10.3390/medicina55050213>
- López-López, A., Camelo-Castillo, A., Ferrer, M. D., Simon-Soro, áurea, & Mira, A. (2017). Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: The case of *Streptococcus dentisani*. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00379>
- Lu, R., Zhang, J., Sun, W., Du, G., & Zhou, G. (2015). Inflammation-related cytokines in oral lichen planus: An overview. In *Journal of Oral Pathology and Medicine* (Vol. 44, Issue 1, pp. 1–14). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jop.12142>
- Lu, R., & Zhou, G. (2021). Oral lichenoid lesions: Is it a single disease or a group of diseases? In *Oral Oncology* (Vol. 117). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105188>
- Lu, Z. M., Lin, Y. F., Jiang, L., Chen, L. S., Luo, X. N., Song, X. H., Chen, S. H., & Zhang, S. Y. (2014). Micro-ribonucleic acid expression profiling and bioinformatic target gene analyses in laryngeal carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 7, 525–533. <https://doi.org/10.2147/OTT.S59871>
- Lynch, H. E., Sanchez, A. M., D'Souza, M. P., Rountree, W., Denny, T. N., Kalos, M., & Sempowski, G. D. (2014). Development and implementation of a proficiency testing program for Luminex bead-based cytokine assays. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 409, pp. 62–71). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.04.011>
- Lyu, J., Song, H., Tian, Z., Miao, Y., Ren, G., & Guo, W. (2016). Predictive value of pAKT/PTEN expression in oral squamous cell carcinoma treated with cetuximab-based chemotherapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 121(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.09.002>

- Manzano-Moreno, F. J., Costela-Ruiz, V. J., García-Recio, E., Olmedo-Gaya, M. V., Ruiz, C., & Reyes-Botella, C. (2021). Role of salivary microRNA and cytokines in the diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222212215>
- Mehdipour, M., Shahidi, M., Manifar, S., Jafari, S., Mashhadi Abbas, F., Barati, M., Mortazavi, H., Shirkhoda, M., Farzanegan, A., & Elmi Rankohi, Z. (2018). Diagnostic and prognostic relevance of salivary microRNA-21, -125a, -31 and -200a levels in patients with oral lichen planus - a short report. *Cellular Oncology*, *41*(3), 329–334. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0372-x>
- Melguizo-Rodríguez, L., Costela-Ruiz, V. J., Manzano-Moreno, F. J., Ruiz, C., & Illescas-Montes, R. (2020). Salivary biomarkers and their application in the diagnosis and monitoring of the most common oral pathologies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 14, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21145173>
- Momen-Heravi, F., & Bala, S. (2018). Emerging role of non-coding RNA in oral cancer. In *Cellular Signalling* (Vol. 42, pp. 134–143). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.10.009>
- Montero-López, E., Santos-Ruiz, A., González, R., Navarrete-Navarrete, N., Ortego-Centeno, N., Martínez-Augustín, O., Rodríguez-Blázquez, M., & Peralta-Ramírez, M. I. (2017). Analyses of hair and salivary cortisol for evaluating hypothalamic–pituitary–adrenal axis activation in patients with autoimmune disease. *Stress*, *20*(6), 541–548. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369524>
- Mozaffari, H. R., Molavi, M., Lopez-Jornet, P., Sadeghi, M., Safaei, M., Imani, M. M., Sharifi, R., Moradpoor, H., Golshah, A., & Jamshidy, L. (2019). Salivary and serum interferon-gamma/interleukin-4 ratio in oral lichen planus patients: A systematic review and meta-analysis. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 55, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina55060257>
- Mozaffari, H. R., Ramezani, M., Mahmoudiahmadabadi, M., Omidpanah, N., & Sadeghi, M. (2017). Salivary and serum levels of tumor necrosis factor-alpha in oral lichen planus: a systematic review and meta-analysis study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *124*(3), e183–e189. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.06.117>
- Mozaffari, H. R., Sharifi, R., Mirbahari, S., Montazerian, S., Sadeghi, M., & Rostami, S. (2018). A systematic review and meta-analysis study of salivary and serum interleukin-8 levels in oral lichen planus. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, *35*(6), 599–604. <https://doi.org/10.5114/ada.2018.77611>

- Mozaffari, H. R., Zavattaro, E., Saeedi, M., Lopez-Jornet, P., Sadeghi, M., Safaei, M., Imani, M. M., Nourbakhsh, R., Moradpoor, H., Golshah, A., & Sharifi, R. (2019). Serum and salivary interleukin-4 levels in patients with oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. In *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* (Vol. 128, Issue 2, pp. 123–131). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.04.003>
- Mumtaz, M., Bijnsdorp, I. V., Böttger, F., Piersma, S. R., Pham, T. V., Mumtaz, S., Brakenhoff, R. H., Akhtar, M. W., & Jimenez, C. R. (2022). Secreted protein markers in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Clinical Proteomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12014-022-09341-5>
- Nabet, C., Lelong, N., Colombier, M. L., Sixou, M., Musset, A. M., Goffinet, F., & Kaminski, M. (2010). Maternal periodontitis and the causes of preterm birth: The case-control Epipap study. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(1), 37–45. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01503.x>
- Niklander, S. E. (2021). Inflammatory Mediators in Oral Cancer: Pathogenic Mechanisms and Diagnostic Potential. *Frontiers in Oral Health*, 2. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.642238>
- Oh, S. Y., Kang, S. M., Kang, S. H., Lee, H. J., Kwon, T. G., Kim, J. W., Lee, S. T., Choi, S. Y., & Hong, S. H. (2020). Potential salivary mRNA biomarkers for early detection of oral cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jcm9010243>
- Pires, F. R., Ramos, A. B., de Oliveira, J. B. C., Tavares, A. S., de Luz, P. S. R., & dos Santos, T. C. R. B. (2013). Oral squamous cell carcinoma: Clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *Journal of Applied Oral Science*, 21(5), 460–467. <https://doi.org/10.1590/1679-775720130317>
- Panarese, I., Aquino, G., Ronchi, A., Longo, F., Montella, M., Cozzolino, I., Roccuzzo, G., Colella, G., Caraglia, M., & Franco, R. (2019). Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 19, Issue 2, pp. 105–119). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1561288>
- Poomsawat, S., Buajeab, W., Khovidhunkit, S. on P., & Punyasingh, J. (2011). Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 40(4), 294–299. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.01001.x>
- Radhika, T., Jeddy, N., Nithya, S., & Muthumeenakshi, R. M. (2016). Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma – An insight. In *Journal of Oral Biology and Craniofacial*

- Research* (Vol. 6, pp. S51–S54). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2016.07.003>
- Rathnayake, N., Gieselmann, D.-R., Heikkinen, A., Tervahartiala, T., & Sorsa, T. (2017). Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010007>
- Sameera, A., Reddy Erugula, S., Aziz Ur Rahman, D., Umar Farooq, D., Veldurthi, D., Imran, D., Das Govada, D., & Fatima Heena, D. (2017). Oral Lichen Planus-A Review. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 12(6), 75–80.
<https://doi.org/10.9790/3008-1206027580>
- Sannigrahi, M. K., Sharma, R., Singh, V., Panda, N. K., Rattan, V., & Khullar, M. (2017). Role of host miRNA Hsa-miR-139-3p in HPV-16–induced carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 23(14), 3884–3895. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2936>
- Schulz, B. L., Cooper-White, J., & Punyadeera, C. K. (2013). Saliva proteome research: Current status and future outlook. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 246–259). <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.687361>
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S. v., & Kapila, Y. L. (2021). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. In *Periodontology 2000* (Vol. 87, Issue 1, pp. 107–131). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1111/prd.12393>
- Segata, N., Haake, S. K., Mannon, P., Lemon, K. P., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C., & Izard, J. (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology*, 13(6).
<https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r42>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), 11–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21166>
- Siqueira, W. L., Custodio, W., & McDonald, E. E. (2012). New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *Journal of Dental Research*, 91(12), 1110–1118. <https://doi.org/10.1177/0022034512462578>
- Spielmann, N., & Wong, D. (2011). Saliva: Diagnostics and therapeutic perspectives. In *Oral Diseases* (Vol. 17, Issue 4, pp. 345–354). <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x>

- Thomson, P. (Ed.). (2012). *Oral precancer: diagnosis and management of potentially malignant disorders*. John Wiley & Sons.
- Tvarijonaviciute, A., Aznar-Cayuela, C., Rubio, C. P., Ceron, J. J., & López-Jornet, P. (2017). Evaluation of salivary oxidate stress biomarkers, nitric oxide and C-reactive protein in patients with oral lichen planus and burning mouth syndrome. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 46(5), 387–392. <https://doi.org/10.1111/jop.12522>
- Twetman, S., & Keller, M. K. (2012). Probiotics for caries prevention and control. In *Advances in dental research* (Vol. 24, Issue 2, pp. 98–102). <https://doi.org/10.1177/0022034512449465>
- Warner, D. S., Ray, P., le Manach, Y., Riou, B., & Houle, T. T. (2010). Statistical Evaluation of a Biomarker. In *Anesthesiology* (Vol. 112). <http://pubs.asahq.org/anesthesiology/article-pdf/112/4/1023/250224/0000542-201004000-00039.pdf>
- Wiklund, E. D., Gao, S., Hulf, T., Sibbritt, T., Nair, S., Costea, D. E., Villadsen, S. B., Bakholdt, V., Bramsen, J. B., Sørensen, J. A., Krogdahl, A., Clark, S. J., & Kjems, J. (2011). MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027840>
- Zahran, F., Ghalwash, D., Shaker, O., Al-Johani, K., & Scully, C. (2015). Salivary microRNAs in oral cancer. *Oral Diseases*, 21(6), 739–747. <https://doi.org/10.1111/odi.12340>
- Zanetta, P., Ormelli, M., Amoruso, A., Pane, M., Azzimonti, B., & Squarzanti, D. F. (2022). Probiotics as Potential Biological Immunomodulators in the Management of Oral Lichen Planus: What's New? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073489>
- Zarco, M. F., Vess, T. J., & Ginsburg, G. S. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. In *Oral Diseases* (Vol. 18, Issue 2, pp. 109–120). <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x>
- Zhang, Y., Sun, J., Lin, C. C., Abemayor, E., Wang, M. B., & Wong, D. T. W. (2016). The emerging landscape of salivary diagnostics. In *Periodontology 2000* (Vol. 70, Issue 1, pp. 38–52). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/prd.12099>