

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CANCRO ORAL**

Trabalho submetido por  
**Gaspard Loutaty**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Setembro de 2024**





EGAS MONIZ SCHOOL  
of HEALTH & SCIENCE

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
EGAS MONIZ

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CANCRO ORAL**

Trabalho submetido por

**Gaspard Loutaty**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

**Professor Doutor Carlos Manuel Zagalo Fernandes Ribeiro**

Trabalho co-orientado por

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Barroso**

**Setembro de 2024**



## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, o Professor Doutor Carlos Manuel Zagalo Fernandes Ribeiro, pelo seu apoio, conselhos e disponibilidade na realização deste trabalho. Mas também pelas suas aulas, que sempre tornou fascinantes ao longo do curso.

A minha co-orientadora, a Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Barroso, pela sua ajuda, simpatia e profissionalismo.

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu, aidé, conseillé, aimé. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour l'éducation que vous m'avez donné et pour cet environnement épanouissant dans lequel j'ai pu grandir. Je ne serais pas celui que je suis aujourd'hui sans vous.

A mes grands parents, Bouba qui m'a donné tant d'amour et de soutien, Mami qui a toujours été si attentionnée, Papi et Dada qui les premiers m'ont donné le goût pour les sciences.

A tous mes amis de Vincennes, Ruben, Ilan, Yohann, Antoine, Mathieu, Maximilien, Aurélien, Paul, Octave, Matthieu, Zouari, Youssef. Nous ne nous voyions pas parfois pendant des mois, et pourtant au moment de se retrouver c'était comme si nous ne nous étions jamais quittés.

A ces amis qui sont devenus une deuxième famille, Marie et Alexis, pour tous les moments de bonheur passé avec vous dans notre coloc. Pour tous ces instants que l'on a partagé qui font que ces 5 années au Portugal sont passées à une vitesse folle.

A Pierre, mon ami, mon frère, mon binôme de clinique, merci pour tous ces instants à tes côtés. Tu as été un véritable pilier pour moi ici et sans toi cette expérience n'aurait pas été la même.

A Axel, le plus méritant d'entre nous. Tu es un ami en or avec le coeur sur la main et toujours prêt à rendre service Il me tarde de poursuivre nos aventures à Toulouse et ailleurs.

A Romain, pour nos shabbats, nos Roch Hachana, nos Pessah, pour tous ces petits instants de vie juive qui m'ont fait me sentir moins loin de chez moi.

A Charlotte, pour toutes ces fois où tu m'as écouté et conseillé. Merci pour tous ces moments passés ensemble, je garderai ces souvenirs précieusement.

A toutes les personnes formidables que j'ai pu rencontrer ici au Portugal, Boudin, Domecq, Ema, Léna, Pennec, Emma, Adam, Valentin, Lucas et tous les autres.



## **Resumo**

Atualmente, o cancro oral afecta mais de 370 000 novos casos por ano em todo o mundo e a sua taxa de sobrevivência aos cinco anos continua a ser relativamente baixa: menos de 50%.

No entanto, a taxa de cura é significativamente mais elevada quando a doença é diagnosticada numa fase inicial. Esta elevada taxa de mortalidade do cancro oral resulta, de facto, do facto de a doença ser frequentemente diagnosticada tardiamente. Por conseguinte, parece necessário desenvolver novos métodos de diagnóstico fiáveis, rápidos, fáceis de utilizar e pouco dispendiosos, a fim de permitir o diagnóstico precoce da doença.

Uma abordagem interessante, que já foi objeto de vários estudos, é a utilização de biomarcadores salivares específicos. A longo prazo, estes poderiam levar ao desenvolvimento de testes salivares de diagnóstico rápido.

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos recorrendo a PubMed, Google Scholar, e Cochrane com o objetivo de realizar uma revisão narrativa sobre a possível existência de biomarcadores salivares específicos do cancro oral e da sua possível utilização como ferramentas de diagnóstico precoce.

Palavras chave: Cancro oral, Diagnostico precoce, Saliva, Biomarcadores



## **Abstract**

Oral cancer currently affects more than 370,000 new cases worldwide every year, and its five-year survival rate remains relatively low: less than 50%.

Yet the cure rate is significantly higher when the disease is diagnosed at an early stage. This high mortality rate from oral cancer is in fact the result of the disease often being diagnosed late. It therefore seems necessary to develop new diagnostic methods that are reliable, rapid, easy to use and inexpensive, in order to enable early diagnosis of the disease.

One interesting approach, which has already been the subject of several studies, is the use of specific salivary biomarkers. In the long term, these could lead to the development of rapid salivary diagnostic tests.

A search for scientific articles was carried out using the Pubmed, Google Scholar and Cochrane databases, with the aim of producing a narrative review on the possible existence of salivary biomarkers specific to oral cancer and their possible use as an early diagnosis tool.

**Keywords:** Oral Cancer, Early Diagnosis, Saliva, Biomarkers



## **Résumé**

Le cancer oral touche actuellement plus de 370 000 nouvelles personnes dans le monde chaque année, et son taux de survie à cinq ans reste relativement faible : moins de 50 %. Pourtant, le taux de guérison est nettement plus élevé lorsque la maladie est diagnostiquée à un stade précoce. Cette mortalité élevée liée au cancer oral est en fait le résultat d'un diagnostic souvent tardif de la maladie. Il semble donc nécessaire de développer de nouvelles méthodes de diagnostic qui soient fiables, rapides, faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses afin de permettre un diagnostic précoce de la maladie. Une piste intéressante, qui a déjà fait l'objet de plusieurs études, serait l'utilisation de biomarqueurs salivaires spécifiques. À long terme, ceux-ci pourraient permettre la mise en place de tests salivaires de diagnostic rapide.

Une recherche d'articles scientifiques a été réalisée à l'aide de des bases de données Pubmed, Google Scholar et Cochrane, dans l'objectif de réaliser une revue narrative sur l'existence éventuelle de biomarqueurs salivaires spécifiques du cancer oral et leur possible utilisation comme outil de diagnostic précoce.

Mots-clés: Cancer Oral, Diagnostic Précoce, Salive, Biomarqueurs



# Índice Geral

1. Introdução	15
2. Desenvolvimento	17
2.1. O Cancro Oral	17
2.1.1. Epidemiologia e prevalência	17
2.1.1.1. Estatísticas mundiais e regionais	17
2.1.1.2. Grupos de alto risco	18
2.1.2. Patologia e Classificação do Cancro Oral	20
2.1.2.1. Os tipos de Cancros orais	20
2.1.2.2. Classificação dos cancros	24
2.1.2.3. Importância do diagnóstico precoce	26
2.1.3. Métodos de diagnóstico atuais	26
2.1.3.1. As técnicas convencionais e suas limitações	26
2.1.3.2. Demoras no atendimento	29
2.2. Os biomarcadores	30
2.2.1. Compreensão dos biomarcadores	30
2.2.1.1. Definição e tipos	30
2.2.1.2. Relevância no contexto do Cancro Oral	31
2.2.2. Os biomarcadores salivares do Cancro Oral	32
2.2.2.1. A saliva como meio	32
2.2.2.2. Técnicas de recolha e análise de saliva para o estudo dos biomarcadores	34
2.2.2.3. Biomarcadores Promissores	35
2.2.2.3.1 Biomarcadores Não Orgânicos	36
2.2.2.3.2 Biomarcadores Proteicos	37
2.2.2.3.3 Outros marcadores	46
2.3. Perspetivas Futuras	50
2.3.1. Potencial Clínico dos Biomarcadores Salivares	50
2.3.1.1. Vantagens em Relação aos Métodos Convencionais	50
2.3.1.2. Integração Possível na Prática Dentária Diária	51
2.3.2. Desafios e Limitações	52

2.3.2.1 Obstáculos Potenciais à Implementação	52
2.3.2.2 Necessidades de Investigação	54
3. Conclusão	57
4. Bibliografia	59

## Índice de figuras

Figura 1- Proporção de homens e mulheres na incidência global	17
Figura 2- Incidência regional	18
Figura 3- Carcinoma Espino Celular. Mulher 49 anos (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C)	21
Figura 4- Osteosarcoma. Mulher 18 anos (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C)	23
Figura 5- Corte histológica de um osteosarcoma (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C).	24
Figura 6-	
Figura 7- Tomografia computadorizada de um paciente com osteosarcoma (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C)	28
Figura 8- Demoras no tratamento de doentes com cancro oral	30
Figura 9- Mecanismo de passagem das moléculas do soro para a saliva	34



## **Índice de Tabelas**

Tabel 1. Principais biomarcadores de cancro oral

46



## Lista de Siglas

AJCC - American Joint Committee on Cancer  
bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico  
CCND1- Ciclina D1  
DOI - « *Depth of Invasion* »  
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)  
FGF - Fatores de crescimento dos fibroblastos  
IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$   
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 - Interleucina 8  
IL-10 - Interleucina 10  
LDH - Lactato Desidrogenase  
MMPs - Metaloproteinases da matriz  
OLP - Líquen plano oral  
OPN - Osteopontina  
OSCC - Carcinoma epidermoide oral  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
Rb - Retinoblastoma  
SolCD44 - Proteína solúvel CD44  
TME - Microambiente tumoral  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa  
UICC - União Internacional contra o Cancro



# 1. Introdução

O cancro é uma patologia complexa e representa uma das principais causas de mortalidade no mundo. Em 2020, cerca de 10 milhões de mortes foram atribuídas ao cancro, tornando-o uma preocupação de grande relevância para a saúde pública. Entre os diferentes tipos de cancro, o cancro oral é particularmente preocupante devido à sua elevada taxa de mortalidade (Gupta et al, 2017). Este tipo de cancro é frequentemente diagnosticado numa fase avançada, o que reduz consideravelmente as hipóteses de cura e sublinha a importância do diagnóstico precoce para melhorar o prognóstico dos pacientes.

As actuais metodologias de diagnóstico para o cancro oral, embora eficazes, são muitas vezes invasivas (Mercadante et al., 2012) e apresentam limitações em termos de custo, complexidade e rapidez. Estas restrições evidenciam a necessidade urgente de desenvolver novas técnicas de diagnóstico que sejam precisas, acessíveis e não invasivas.

Neste contexto, o estudo de biomarcadores surge como uma via promissora. Os biomarcadores são moléculas biológicas presentes em vários fluidos corporais que podem fornecer informações cruciais sobre a presença e progressão dos cancros (Ptolemy & Rifai, 2010). A saliva, em particular, oferece um potencial único como fonte de biomarcadores para o diagnóstico do cancro oral. Não só é fácil de recolher, como também contém uma variedade de compostos que podem refletir as alterações biológicas associadas ao cancro.

A exploração dos biomarcadores salivares pode abrir caminho para métodos de diagnóstico mais eficazes e menos invasivos, melhorando assim o acompanhamento dos pacientes com cancro oral. Os biomarcadores salivares podem oferecer um método de rastreio acessível e não invasivo, permitindo uma deteção precoce e, potencialmente, uma melhoria nas taxas de sobrevivência (Kaur et al., 2018).

Espera-se que, através deste estudo, seja possível identificar um conjunto de biomarcadores salivares específicos para o cancro oral, capazes de detectar a doença nas suas fases iniciais. As perspetivas futuras envolvem a aplicação desses biomarcadores a outros tipos de cancro, expandindo o seu uso e tornando o diagnóstico oncológico mais acessível e eficaz em diferentes contextos clínicos.



## 2. Desenvolvimento

### 2.1. O Cancro Oral

#### 2.1.1. Epidemiologia e prevalência

##### 2.1.1.1. Estatísticas mundiais e regionais

Anualmente, há 300.000 novos casos de cancro oral no mundo (Rivera, 2015), e cerca de 145.000 mortes de acordo com Gupta et al. (2017). Isso faz desta condição o 6º cancro mais comum e um dos mais mortais (Warnakulasuriya, 2009). Existem muitas disparidades em torno da sua prevalência, seja em relação ao sexo dos indivíduos ou à região estudada (Figura 1 e 2).

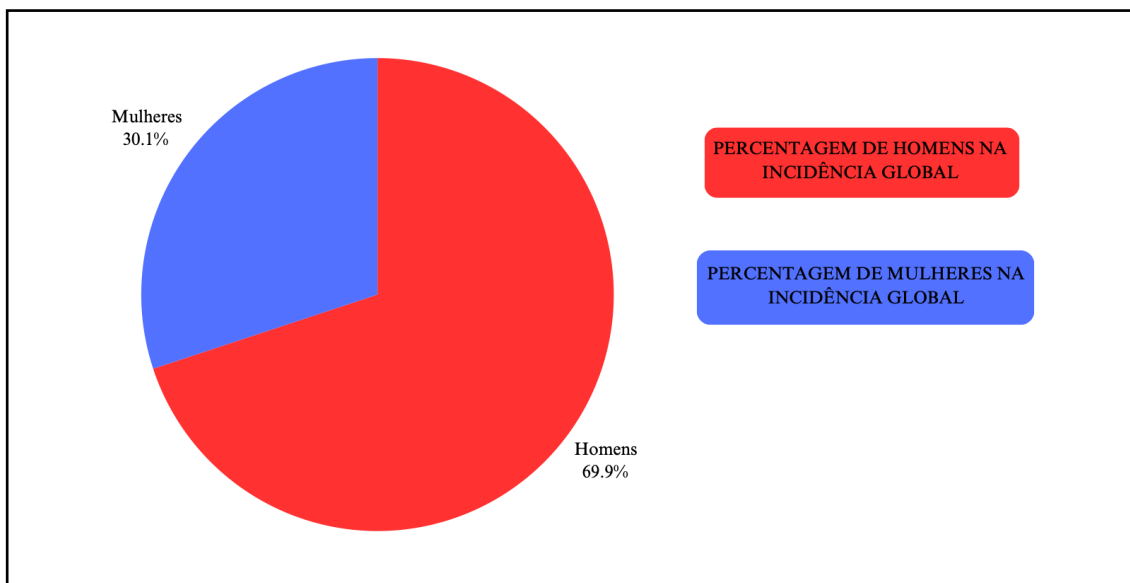


Figura 1: Proporção de homens e mulheres na incidência global

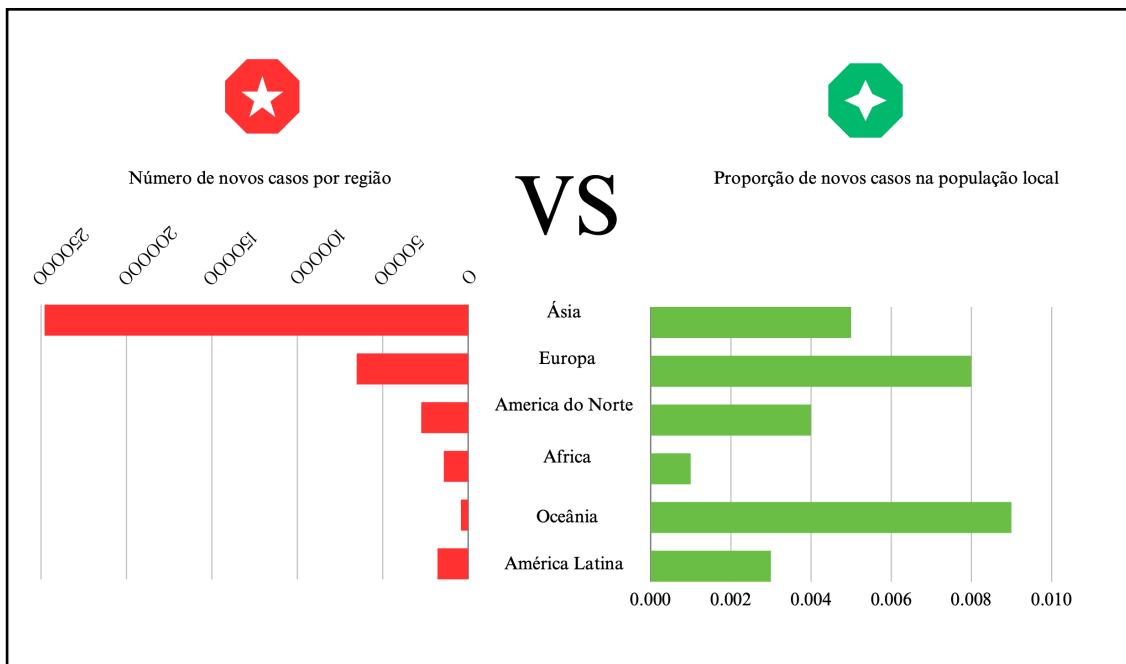


Figura 2: Incidência regional

Esses números explicam-se em grande parte por uma diferença de exposição aos fatores de risco ambientais e sociais entre os grupos.

### 2.1.1.2. Grupos de alto risco

No contexto do cancro oral, vários fatores comportamentais, genéticos e ambientais contribuem para o seu desenvolvimento e progressão. Os hábitos de consumo de álcool e tabaco são fatores de risco principais para o cancro oral (Paré & Joly, 2017), especialmente entre os homens, cujo consumo é maior (Castañeda-Avila et al., 2020). No entanto, observa-se recentemente um aumento do número de casos de cancros orais entre as mulheres, principalmente porque os seus hábitos de consumo evoluem com as mudanças sociais (Gupta et al., 2017). Alguns estudos mostram até que o risco de cancro oral é mais elevado nas mulheres do que nos homens com o mesmo consumo de tabaco (Muscat et al., 1996).

Foi também demonstrada a existência de uma sinergia entre o consumo de álcool e tabaco relativamente à prevalência do cancro oral. Assim, um indivíduo fumador e consumidor regular de álcool tem até 48 vezes mais probabilidade de desenvolver um

carcinoma oral do que um indivíduo não fumador e que não consome álcool, como mostra um estudo de Petti e Scully (2005). Onde o álcool sozinho aumenta o risco relativo em 14 e o tabaco sozinho em 5 (Poschl, 2004). O consumo de bétel quid, um hábito ancestral no Sul e Sudeste da Ásia, é outro fator de risco importante (Lin et al., 2011). A mastigação repetida e a ação química dos componentes do bétel quid podem induzir stress oxidativo e mutações celulares, tornando a mucosa oral mais suscetível a agentes cancerígenos. Os homens são maiores consumidores que as mulheres, e o consumo começa desde a infância, por volta dos 12 anos. Este hábito também persiste nas comunidades dessas regiões na Europa e na América do Norte (P. Gupta & Ray, 2004). O impacto dos hábitos culturais de consumo torna-se ainda mais claro quando se observam os números relativos a comunidades de imigrantes. Nestes grupos, encontram-se taxas de câncros orais semelhantes às observadas nos países de origem, devido à manutenção dos hábitos culturais na exposição aos riscos. Por exemplo, no Reino Unido, a comunidade indiana apresenta uma prevalência muito mais elevada do que o resto da população britânica (Warnakulasuriya, 2009), sendo a Índia o país mais afetado pelo cancro oral com mais de 100.000 novos casos por ano.

### **Fatores ambientais e profissionais**

A exposição a certos vírus como o VIH, o vírus de Epstein-Barr, a sífilis ou o HPV, que se encontra em 45% dos pacientes com cancro oral (Zhao et al., 2005), representa um conjunto de fatores de risco para o cancro oral, tornando as populações que vivem em regiões onde estas doenças são pouco controladas mais vulneráveis. A poluição do ar, a exposição profissional a metais pesados ou solventes, uma dieta pobre em frutas e vegetais mas rica em produtos processados, uma má higiene bucodental e a exposição regular ao sol são também fatores de risco ambientais e profissionais (Sarode et al., 2023), (Yan et al., 2016).

### **Predisposições genéticas**

Certas predisposições genéticas parecem aumentar o risco de cancro oral, nomeadamente entre os judeus asquenazes, que apresentam até duas vezes mais casos da doença do que os outros judeus de Israel (Gorsky et al., 1994). Assim, polimorfismos genéticos como aqueles envolvidos no metabolismo de xenobióticos (Glutathione S-transferase M1, CYP1A1) estariam associados a um risco aumentado de 20 a 50%. Uma compreensão aprofundada destes fatores comportamentais, genéticos e ambientais é essencial para prevenir e tratar eficazmente o cancro oral, bem como para desenvolver estratégias de saúde pública adaptadas a diferentes populações.

## **2.1.2. Patologia e Classificação do Cancro Oral**

### **2.1.2.1. Os tipos de Cancros orais**

O diagnóstico do cancro oral engloba um conjunto de tumores malignos que afetam os tecidos duros e moles da esfera oral. Esta subparte visa fornecer uma visão geral dos principais tipos de cancros orais, destacando as suas características clínicas e distribuição anatómica. Os principais tipos de cancros orais encontrados são o Carcinoma Epidermoide, o melanoma, os tumores malignos das glândulas salivares, os Sarcomas e os Linfomas.

O carcinoma epidermoide oral (OSCC) representa, por si só, 90% dos casos de cancros orais e é principalmente caracterizado por sintomas como lesões variáveis de cor branca, eritematosas, mistas, nodulares ou ulceradas, podendo causar desconforto, dor ou limitar a mobilidade dos tecidos. Este tipo de cancro geralmente se origina no epitélio da mucosa da cavidade oral após o aparecimento de lesões leucoplásicas ou eritroplásicas. É mais frequentemente encontrado na língua, no soalho bucal ou no lábio inferior, em homens fumadores com mais de 40 anos. Devido às suas características histológicas, é suscetível de deixar vestígios na saliva pelo contato direto entre as células tumorais e a saliva (Feller & Lemmer, 2012).



Figura 3: Carcinoma Espino Celular. Mulher 49 anos (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C)

O melanoma oral caracteriza-se principalmente por sintomas como a presença de nódulos ou massas nas cavidades orais ou nasais, hemorragias nasais, o aparecimento de manchas escuras dentro da boca e nos lábios e a formação de ulcerações. Geralmente não há sinais precursores e, ao contrário de outros melanomas, o melanoma oral nem sempre apresenta pigmentação significativa, o que torna o seu diagnóstico difícil. No entanto, um diagnóstico precoce é essencial, pois é um tipo de cancro muito agressivo. O local de predileção do melanoma oral é a mucosa da cavidade oral, em particular o palato, as gengivas e os lábios (Hicks & Flaitz, 2000).

Para os tumores malignos das glândulas salivares, a presença de uma massa indolor na região da cabeça e pescoço é o sintoma mais comum. Outros sintomas podem incluir: dor local ou regional, assimetrias visíveis, parestesias, dificuldade em engolir, epistaxe ou perda de funções motoras. Ao contrário dos tumores benignos, os tumores malignos são frequentemente duros, nodulares e aderentes ao tecido adjacente com um contorno mal definido. Os tumores malignos das glândulas salivares apresentam uma variedade de características histológicas distintas, cuja evolução clínica e prognóstico são muito diferentes de um para o outro (Spiro & Lim, 2006).

Os sarcomas dos tecidos moles podem ser assintomáticos nos seus estágios iniciais, podendo o tumor desenvolver-se sem causar sintomas. Quando a massa tumoral cresce, pode comprimir os tecidos circundantes, como os nervos, tornando-se então dolorosa e dificultando os movimentos (Gorsky & Epstein, 1998). Os sarcomas afetam todas as idades, incluindo crianças, embora a maioria seja diagnosticada após os 55 anos (Stavrakas et al., 2016). Alguns tipos de sarcomas são, no entanto, mais frequentes em adultos jovens. Os sarcomas dos tecidos moles orais podem apresentar uma grande variedade de tipos histológicos, incluindo o fibrossarcoma, o lipossarcoma, o rabiomiossarcoma, o leiomiossarcoma, o angiossarcoma e o neurossarcoma. Do ponto de vista histológico, estes sarcomas caracterizam-se por uma proliferação anárquica de células mesenquimais atípicas, com características morfológicas próprias de cada subtipo. Ao contrário dos carcinomas, os sarcomas geralmente mantêm características histológicas reconhecíveis dos tecidos moles normais, embora de forma desorganizada. O exame histológico é frequentemente difícil (Stavrakas et al., 2016), necessitando do recurso a técnicas de imunohistoquímica complementares para refinar o diagnóstico. Os sarcomas dos tecidos moles orais tendem a ser tumores infiltrantes, com um crescimento rápido e um risco elevado de recidiva local e de metástases à distância (Gorsky & Epstein, 1998).

Tal como os sarcomas dos tecidos moles, os sarcomas do osso mandibular podem manifestar-se por uma massa indolor, inchaço ou dor na mandíbula inferior (figura 4). A mobilidade dentária e a dificuldade em abrir a boca podem também ser sintomas. À medida que o tumor se desenvolve, pode comprimir os nervos e músculos circundantes, causando dores e disfunções. Os sarcomas ósseos, que incluem os sarcomas da mandíbula, geralmente afetam uma população mais jovem do que os sarcomas dos tecidos moles. Alguns tipos de sarcomas ósseos, como o sarcoma de Ewing, são mais frequentes em crianças e adolescentes. Embora possam desenvolver-se em qualquer osso, os sarcomas ósseos tendem a afetar mais frequentemente os ossos planos, como a bacia, as costelas e a coluna vertebral. Na cavidade oral, a mandíbula é um local de predileção para este tipo de sarcoma (Bennett et al., 2000). Os sarcomas ósseos da mandíbula são tumores malignos primitivos desenvolvidos à custa da estrutura óssea.



Figura 4: Osteosarcoma. Mulher 18 anos (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C)

Do ponto de vista histológico, caracterizam-se por uma proliferação anárquica de células mesenquimais atípicas que produzem osso ou substância osteóide. Os principais tipos histológicos encontrados são o osteossarcoma, o condrossarcoma e o sarcoma de Ewing. O osteossarcoma é o tipo mais frequente, distinguindo-se pela presença de um estroma sarcomatoso e de uma produção de matriz óssea ou osteóide pelas células tumorais. O aspeto histológico pode, por vezes, ser difícil de interpretar, necessitando do recurso a exames complementares como a imunohistoquímica. Os sarcomas ósseos da mandíbula apresentam características clínicas e histológicas que lhes são próprias e que são diferentes das dos sarcomas dos ossos longos (Bennett et al., 2000).

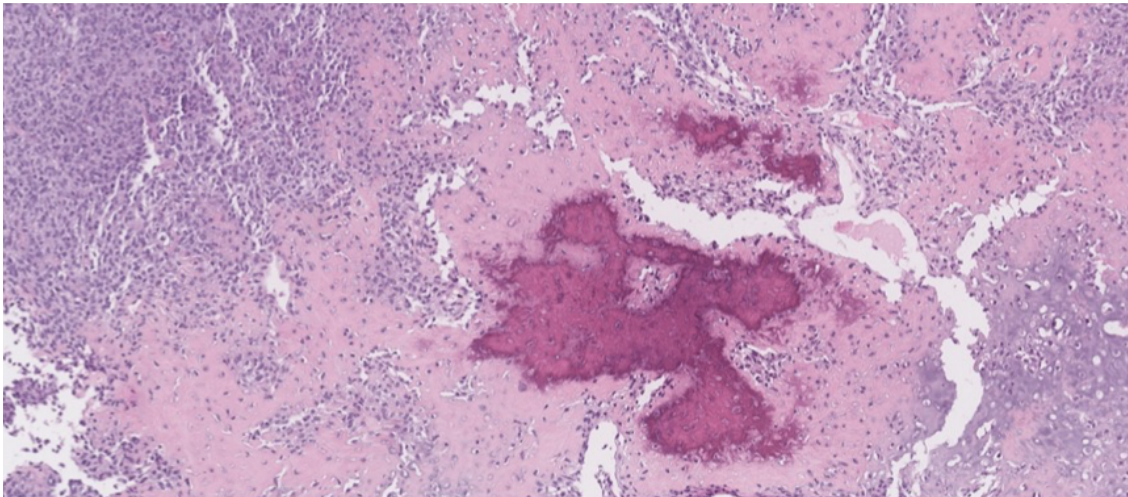


Figura 5: Corte histológica de um osteosarcoma (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C)

Finalmente, os linfomas não-Hodgkin da cavidade oral podem manifestar-se por sintomas como uma tumefação indolor, eventualmente ulcerada, na cavidade bucal. Atingem principalmente os tecidos moles em torno do maxilar e o osso mandibular. Neste último caso, observam-se alterações radiográficas e algumas fontes relatam uma parestesia do lábio inferior que ocorre numa fase precoce da doença. Os indivíduos do sexo masculino são mais frequentemente afetados por este tumor. Os linfomas não-Hodgkin da cavidade oral são tumores malignos primitivos desenvolvidos à custa da estrutura linfóide da cavidade oral. Do ponto de vista histológico, caracterizam-se por uma proliferação anárquica de células linfóides B ou T, frequentemente com características morfológicas específicas.

### **2.1.2.2. Classificação dos cancros**

Além de diferenciar os tipos de cancro, eles são classificados em diferentes estágios. Esta classificação dos diferentes estágios do cancro é um processo crucial para avaliar o avanço e a gravidade da doença, determinar o prognóstico e planear o tratamento. Os principais sistemas de classificação dos estágios do cancro são o sistema TNM e o sistema de estágio numerado de I a IV.

## O sistema TNM

O sistema TNM é um dos sistemas mais comumente utilizados para classificar os estágios do cancro. Foi desenvolvido pela União Internacional contra o Cancro (UICC) e pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC). A última edição da classificação TNM foi implementada em 2018 pela AJCC e introduziu um novo conceito na classificação, a « *Depth of Invasion* » (DOI). A DOI considera a profundidade até onde o tumor penetra nos tecidos, uma componente que até então não era incluída, mas que é de grande importância. De facto, um tumor pequeno à superfície pode ser mais agressivo se tiver uma profundidade de invasão significativa. Além disso, uma maior profundidade de penetração aumenta o risco de metástases. Assim, no geral, quanto maior a profundidade de penetração, pior é o prognóstico. A DOI, portanto permite refinar o diagnóstico e proporcionar um melhor tratamento.

- T (Tumor): Indica o tamanho e a extensão do tumor primário.
- T0: Nenhum tumor primário detectado.
- T1-T4: Indica o tamanho e/ou a extensão do tumor. Quanto maior o número, maior ou mais invasivo é o tumor.
  
- N (Gânglios linfáticos): Indica se o cancro se espalhou para os gânglios linfáticos próximos.
- N0: Nenhuma metástase nos gânglios linfáticos detectada.
- N1-N3: Indica o número e/ou a localização dos gânglios linfáticos afetados. Quanto maior o número, maior o número de gânglios afetados ou mais extensa é a sua localização.
  
- M (Metástases): Indica se o cancro se espalhou para partes distantes do corpo.
- M0: Nenhuma metástase à distância.
- M1: Metástases à distância presentes.

O sistema de estágios numerados é frequentemente usado em complemento ao sistema TNM para fornecer uma visão geral simplificada do estágio do cancro.

- Estádio I: Cancro localizado. O tumor é geralmente pequeno e não invasivo.
- Estádio II e Estádio III: Cancro localmente avançado. O tumor é maior e/ou se espalhou para os gânglios linfáticos próximos, mas não para partes distantes do corpo.
- Estádio IV: Cancro metastático. O cancro se espalhou para partes distantes do corpo.

### **2.1.2.3. Importância do diagnóstico precoce**

O cancro oral tem um mau prognóstico; de acordo com Dioguardi et al. (2022), a taxa de sobrevivência a 5 anos é inferior a 50%. No entanto, quando o cancro oral é detectado no estágio I ou II, a taxa de sobrevivência a 5 anos é de 80%. O problema é que mais da metade dos cancros orais são detectados em um estágio avançado da doença (estádio III, IV), quando os sintomas se tornam realmente incômodos para o paciente: dor, massa na boca ou no pescoço, sangramentos, etc. (Abati et al., 2020). Nesse ponto, o tratamento torna-se mais complexo e o prognóstico é pior. Portanto, é crucial detectá-lo o mais cedo possível e implementar novas medidas para mudar o padrão existente.

### **2.1.3. Métodos de diagnóstico atuais**

#### **2.1.3.1. As técnicas convencionais e suas limitações**

O diagnóstico do cancro oral baseia-se, antes de tudo, no exame oral realizado por um profissional de saúde. O papel dos dentistas é, portanto, primordial, pois são eles que têm mais probabilidade de descobrir uma lesão durante um exame de rotina. Este exame deve ser rigoroso e levar em consideração todas as estruturas da cavidade oral (figura 6) para não perder uma lesão potencial (British Dental Association, 2010).

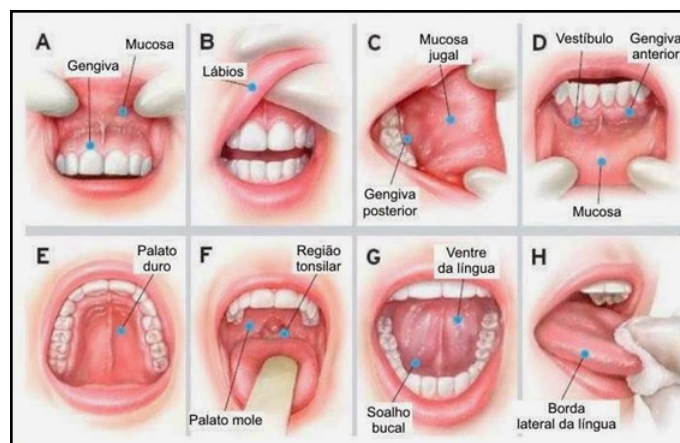


Figura 6: As 8 etapas do exame oral, adaptado de Chaudhary (2023)

No entanto, há uma real falta de conhecimento por parte dos dentistas, e o exame das mucosas é muitas vezes muito rápido ou até mesmo ausente. Muitos dentistas com pouco conhecimento das patologias da mucosa oral são obrigados a encaminhar os pacientes para um especialista, mesmo para lesões benignas (Shadid et al., 2022). Isso, em primeiro lugar, aumenta o tempo de espera para o tratamento dos pacientes antes mesmo do diagnóstico ser feito. Em segundo lugar, sobrecarrega os serviços especializados com pacientes que apresentam patologias benignas, retardando ainda mais o tratamento dos pacientes que realmente necessitam de atenção.

Após o exame oral, o diagnóstico deve ser confirmado por meio de exames complementares:

- O exame com luz azul utiliza uma luz azul para visualizar melhor as mudanças de cor e textura dos tecidos, podendo ajudar a identificar lesões pré-cancerosas ou cancerosas (Scully et al., 2008). Existem várias técnicas diferentes, mas o princípio permanece o mesmo. Aplica-se localmente, ou injeta-se por via intravenosa, uma solução que se fixa nos tecidos examinados. Em seguida, ilumina-se a área com uma luz azul cuja comprimento de onda é geralmente compreendido entre 400 e 480 nm. Os tecidos saudáveis aparecem azuis, enquanto que uma lesão cancerosa apresenta uma cor diferente, que varia de acordo com a técnica utilizada.
- A imagiologia médica, como radiografia, ressonância magnética, tomografia computadorizada (figura 7) ou tomografia por emissão de positrões, pode ser utilizada para avaliar o tamanho, localização e extensão das lesões cancerosas (Handsichel et al., 2012).



Figura 7: Tomografia computadorizada de um paciente com osteosarcoma (Ambel-Barranco, J & Zagalo, C)

- O exame citológico por esfregaço consiste em coletar células da superfície da lesão para análise microscópica, permitindo detectar alterações celulares pré-cancerosas (Scully et al., 2008).

- Finalmente, a biópsia com análise histológica é atualmente considerada o "padrão-ouro" para confirmar o diagnóstico e determinar especificamente o tipo de cancro oral (Scully et al., 2008). Este método invasivo envolve a coleta de uma amostra de tecido que é então analisada em laboratório. Existem dois tipos de biópsia: a biópsia excisional, que consiste em remover toda a lesão, e a biópsia incisional, na qual apenas uma parte da lesão é removida.

O problema é que todas essas técnicas são muito dispendiosas em termos de dinheiro e tempo. Além disso, requerem a intervenção de pessoal especializado. Estudos realizados com estudantes de medicina dentária e praticantes de todos os níveis de experiência mostram que poucos dentistas hoje se sentem capazes de realizar uma biópsia (Murgod et al., 2011), e a menos que haja mudanças significativas no conteúdo do ensino universitário, parece improvável que as futuras gerações o façam em maior número. Além disso, de acordo com Ford e Farah (2013), os pacientes tendem mais a procurar seu médico de família para uma consulta sobre o cancro oral do que um dentista. Mesmo que, num inquérito realizado no Reino Unido, 97% dos médicos entrevistados tenham afirmado não se sentir capazes de diagnosticar uma lesão oral e preferirem

redirecionar o paciente para um dentista, devido ao fraco ensino recebido durante os seus estudos (Wade et al., 2009).

### **2.1.3.2. Demoras no atendimento**

O tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o primeiro contacto com um profissional de saúde é frequentemente muito longo. Isso deve-se a uma falta geral de conhecimento por parte dos pacientes, ao seu desinteresse pela saúde oral, ou mesmo ao medo do dentista. Mas também, por vezes, devido à dificuldade em obter uma consulta médica. É igualmente necessário ter em conta o tempo necessário para obter as consultas para efetuar os diferentes exames, o tempo de espera para obter os resultados e o tempo necessário para obter o diagnóstico definitivo. Os estudos sobre o assunto atribuem a ambos os lados, pacientes e profissionais de saúde, a responsabilidade pela demora no atendimento (McLeod et al., 2005). No total, o tempo decorrido entre o momento em que o doente tomou conhecimento dos sintomas e o início do tratamento foi, em média, de 205 dias (Peacock et al., 2008). A repartição deste tempo é apresentada na Figura 8.

Por isso, é primordial implementar medidas de saúde pública para realizar a prevenção e conduzir campanhas de rastreio nas áreas com poucos médicos e, especialmente, junto das populações mais vulneráveis, que são frequentemente aquelas que não consultam regularmente um dentista. Foi demonstrado que este atraso entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o início do tratamento é suficientemente longo para permitir um desenvolvimento significativo da doença, e está relacionado com uma menor taxa de sobrevivência (Saka-Herrán et al., 2021). Parece, portanto, necessário desenvolver novas técnicas de diagnóstico, menos dispendiosas e mais simples, que possam ser realizadas diretamente em consulta pelos dentistas, higienistas dentários e médicos de família, com uma formação mínima. Isto permitiria reduzir os atrasos no atendimento dos pacientes com cancro oral e orientá-los melhor.

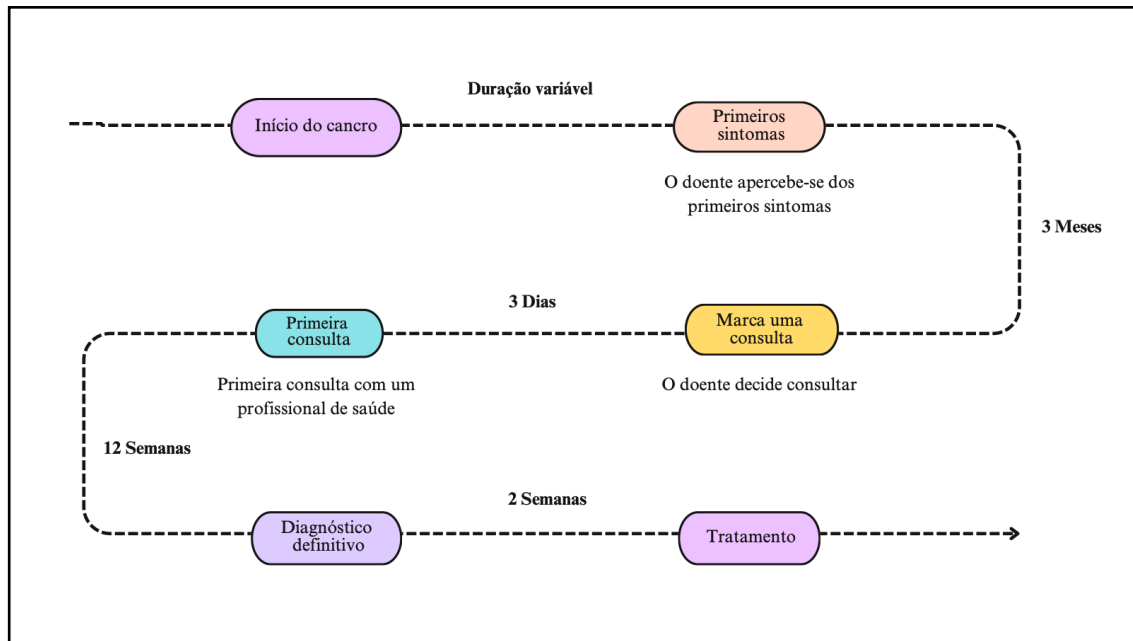


Figura 8: Demoras no tratamento de doentes com cancro oral

## 2.2. Os biomarcadores

### 2.2.1. Compreensão dos biomarcadores

#### 2.2.1.1. Definição e tipos

Um biomarcador é um parâmetro biológico mensurável que pode ser usada como um indicador objetivo de um processo biológico normal ou patológico, ou da resposta a uma intervenção terapêutica. Esses marcadores podem ser encontrados em vários tipos de fluídos biológicos, como sangue, urina, saliva ou tecidos tumorais. São frequentemente utilizados em investigação clínica e médica, e são divididos em diferentes categorias, conforme a natureza da característica biológica que medem (Ptolemy & Rifai, 2010):

- Biomarcadores bioquímicos: São moléculas específicas presentes no corpo, como proteínas, hormonas, enzimas, metabolitos, etc. Podem ser detetados através de técnicas bioquímicas como o ensaio imunológico, cromatografia ou espectrometria de massa (Dehoux, 2012).

- Biomarcadores genéticos: São alterações no genoma de um indivíduo, como mutações genéticas ou variações na expressão dos genes. São frequentemente detetados através de técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou o sequenciamento de ADN.
- Biomarcadores celulares: São características das próprias células, como o seu tamanho, forma, estrutura ou atividade metabólica. Podem ser observados ao microscópio ou detetados através de técnicas de imagem celular.
- Biomarcadores fisiológicos: São parâmetros fisiológicos mensuráveis, como a pressão arterial, a frequência cardíaca, a temperatura corporal, etc. São frequentemente utilizados para avaliar a função fisiológica de um órgão ou sistema biológico (Ferrer & Artigas, 2011b).

Assim, os biomarcadores são ferramentas essenciais na investigação médica e clínica, oferecendo informações valiosas sobre o estado de saúde de um indivíduo, a progressão das doenças e a eficácia dos tratamentos. Eles desempenham um papel crucial no diagnóstico precoce, na monitorização e no tratamento das doenças, contribuindo assim para a melhoria dos resultados clínicos e para a personalização dos cuidados de saúde.

### **2.2.1.2. Relevância no contexto do Cancro Oral**

No contexto do cancro oral, os biomarcadores poderiam ser relevantes por várias razões:

- Diagnóstico Precoce: Os biomarcadores poderiam permitir um diagnóstico precoce do cancro oral, o que é essencial para melhorar as hipóteses de sucesso do tratamento. Ao identificar as alterações moleculares ou celulares associadas ao cancro oral numa fase precoce, os biomarcadores podem ajudar a detetar a doença antes do aparecimento de sintomas clínicos evidentes (Califf, 2018).
- Monitorização da Progressão da Doença: Uma vez diagnosticado o cancro oral, os biomarcadores poderiam ser utilizados para monitorizar a progressão da doença e avaliar a eficácia do tratamento. Eles permitem detetar recaídas

precoces ou metástases, o que pode orientar as decisões terapêuticas e melhorar os resultados clínicos (Kulasingam & Diamandis, 2008).

- **Prognóstico e Estratificação de Riscos:** Alguns biomarcadores poderiam fornecer informações sobre o prognóstico da doença, identificando os pacientes com alto risco de recaída ou progressão da doença. Isso permite uma estratificação mais precisa dos pacientes conforme o seu risco, o que pode orientar as decisões terapêuticas e os planos de acompanhamento (Thierry & Tanos, 2018).
- **Orientação do Tratamento Personalizado:** Os biomarcadores também podem ajudar a orientar o tratamento para abordagens mais personalizadas. Ao identificar as características moleculares específicas dos tumores, os biomarcadores podem ajudar a prever a resposta a diferentes tratamentos, permitindo escolher a terapia mais adequada para cada paciente (Thierry & Tanos, 2018).
- **Desenvolvimento de Novas Terapias:** A identificação de biomarcadores específicos associados ao cancro oral também poderia abrir caminho para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas. Ao compreender os mecanismos biológicos subjacentes da doença, os biomarcadores podem servir como alvos para novos medicamentos ou terapias inovadoras (Kulasingam & Diamandis, 2008).

Os biomarcadores poderiam, portanto, apresentar interesse em vários níveis dos cuidados aos pacientes com cancro oral, particularmente no que diz respeito ao diagnóstico.

## **2.2.2. Os biomarcadores salivares do Cancro Oral**

### **2.2.2.1. A saliva como meio**

A saliva é um fluido biológico produzido pelas glândulas salivares situadas na cavidade bucal. É composta principalmente por água, cerca de 99%, mas contém também

eletrólitos, enzimas, anticorpos, mucinas e vários metabolitos. Estes componentes desempenham papéis essenciais na digestão, proteção da cavidade bucal e manutenção do equilíbrio hídrico. As enzimas salivares, como a amílase, iniciam a digestão dos hidratos de carbono, enquanto as mucinas lubrificam e protegem os tecidos bucais. Os anticorpos e as enzimas antimicrobianas, como a lisozima, ajudam a prevenir infeções, neutralizando os agentes patogénicos (Almeida & all, 2008). A sua utilização como meio de análise dos biomarcadores, especialmente no contexto do cancro oral, apresenta muitas vantagens significativas. Em primeiro lugar, a saliva é considerada um excelente meio de análise, sendo frequentemente descrita como um "espelho do corpo" (Wong, 2006), refletindo o estado geral de saúde do indivíduo. De facto, a saliva contém muitas moléculas provenientes do sangue, o que a torna comparável ao soro em termos de riqueza em biomarcadores potenciais (Hofman, 2001). A passagem dessas moléculas do soro para a saliva é explicada na figura 9. Essa equivalência com o soro é particularmente interessante, pois permite obter informações semelhantes às de uma análise sanguínea, mas de forma muito menos invasiva. A facilidade de recolha da saliva é outra vantagem importante. Ao contrário das colheitas de sangue ou das biópsias, a recolha de saliva é não invasiva, indolor e pode ser realizada sem equipamento especializado ou pessoal médico. Esta simplicidade permite colheitas frequentes e repetidas, o que é particularmente útil para o acompanhamento regular de pacientes com cancro oral ou em risco (Liu & Duan, 2012).

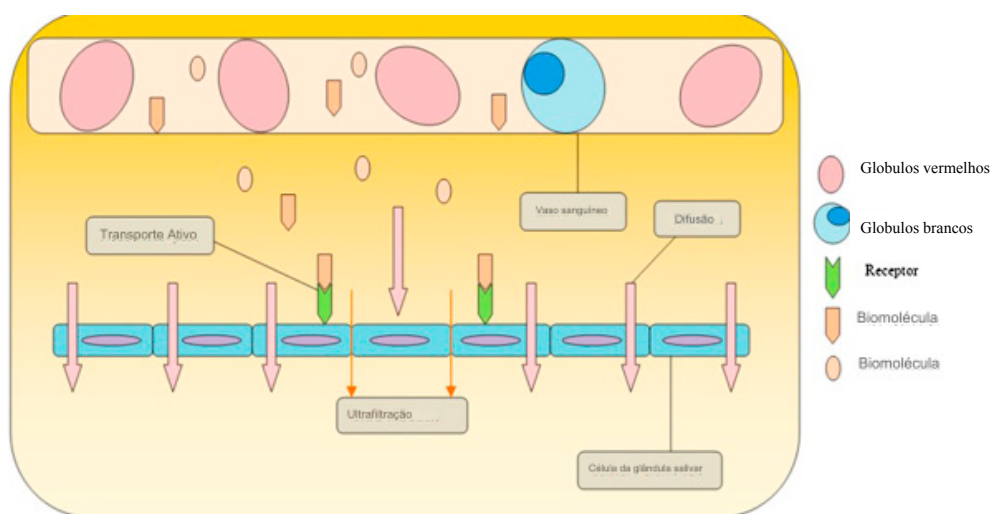


Figura 9: Mecanismo de passagem das moléculas do soro para a saliva, adaptado de Javaid & al. (2015)

No contexto específico do cancro oral, a saliva apresenta uma vantagem única: está em contacto direto com os tecidos potencialmente cancerígenos da cavidade bucal (Khurshid et al., 2018). Esta proximidade pode, potencialmente, permitir a deteção precoce de biomarcadores específicos do cancro oral, antes mesmo do aparecimento de sinais clínicos visíveis.

### **2.2.2.2. Técnicas de recolha e análise de saliva para o estudo dos biomarcadores**

Na maioria dos estudos realizados, a saliva dos pacientes é colhida de forma não estimulada, embora alguns optem por uma técnica de recolha estimulada. As condições relativas ao momento da colheita, à conservação da amostra e à sua preparação são muito diversas. Algumas amostras são analisadas diretamente após a colheita, enquanto outras são conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alguns estudos analisam a saliva no seu todo, enquanto outros utilizam a centrifugação para a separar em diferentes fases e estudar uma em particular. Várias metodologias de análise são então utilizadas, dependendo dos biomarcadores estudados, tais como:

- A espectrometria, que mede a absorvência ou transmitância da luz através de uma substância em função do comprimento de onda. Pode cobrir uma vasta gama de comprimentos de onda, incluindo o ultravioleta, o visível e o infravermelho. A espectrofotometria fornece um espectro completo, mostrando como uma substância absorve a luz em diferentes comprimentos de onda (Princípio da Espectrometria | Plataforma Química Analítica - Universidade de Grenoble Alpes, s.d.).
- O Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), que se baseia na interação específica entre um antigénio e um anticorpo. Quando um antigénio, está presente numa amostra, liga-se a um anticorpo específico. Este complexo antigénio-anticorpo é então detetado por uma enzima ligada a um segundo anticorpo (anticorpo secundário). A enzima catalisa uma reação que produz um sinal mensurável, geralmente uma mudança de cor (mas pode também ser outros sinais como fluorescência). Existem vários tipos de ELISA: ELISA Direta: O

antigénio é fixado a uma superfície, e um anticorpo conjugado a uma enzima liga-se diretamente ao antigénio. ELISA Indireta: O antigénio é fixado a uma superfície, um anticorpo primário liga-se ao antigénio e, em seguida, um anticorpo secundário conjugado a uma enzima liga-se ao anticorpo primário. ELISA de Sandwich: São utilizados dois anticorpos específicos. O antigénio é capturado entre um anticorpo de captura fixado à superfície e um anticorpo de deteção ligado a uma enzima. ELISA Competitiva: Ocorre competição entre o antigénio da amostra e um antigénio marcado para a ligação a um anticorpo específico (Shah & Maghsoudlou, 2016).

- A Polymerase Chain Reaction (PCR) ou Reação de polimerização em cadeia, é uma técnica de biologia molecular utilizada para amplificar de forma exponencial uma sequência específica de ADN. Este método permite gerar milhões de cópias de um segmento alvo de ADN a partir de uma quantidade inicial muito pequena, possibilitando a análise detalhada do ADN para várias aplicações (Poitras & Houde, 2002).
- A imunocitoquímica (ou imunohistoquímica quando aplicada aos tecidos) é uma técnica de laboratório utilizada para visualizar e localizar proteínas específicas ou antigénios em células ou secções de tecidos, usando anticorpos específicos ligados a marcadores detetáveis. Este método permite determinar a distribuição, quantidade e localização subcelular das proteínas de interesse nas células individuais. Esta técnica baseia-se na utilização de anticorpos que se ligam especificamente à proteína ou antigénio alvo. Estes anticorpos estão acoplados a marcadores, como enzimas, fluoróforos ou metais, que permitem a deteção visual da ligação antigénio-anticorpo (Duerr, 2006).

Todas estas técnicas apresentam a vantagem de serem fiáveis e facilmente reproduzíveis, mesmo em larga escala.

### **2.2.2.3. Biomarcadores Promissores**

Um número considerável de biomarcadores já foi estudado e apresentou uma ligação potencial com o cancro oral. O objetivo aqui é descrever os biomarcadores mais estudados e mais relevantes no contexto do diagnóstico precoce.

### **2.2.2.3.1 Biomarcadores Não Orgânicos**

Um biomarcador não orgânico é uma substância com uma estrutura não-carbonácea. Ao contrário dos biomarcadores orgânicos, que são compostos principalmente por moléculas orgânicas como proteínas, ácidos nucleicos ou lipídios, os biomarcadores não orgânicos incluem elementos e compostos inorgânicos, como metais e iões minerais. Alguns estudos indicam que não há diferença significativa na composição mineral da saliva, em função da idade ou dos hábitos de consumo de tabaco e álcool. Isso representa uma vantagem na comparação de amostras.

#### **Sódio**

O sódio é um metal alcalino presente na saliva, principalmente na forma de iões, contribuindo para a manutenção do equilíbrio osmótico, facilitando a deglutição e participando de outros processos fisiológicos na cavidade oral. Em pacientes com cancro oral, a concentração salivar de sódio aumenta. Os maiores aumentos são encontrados em casos de câncer do pavimento da boca, e os menores em casos de câncer de língua ou glândula parótida (Dziewulska et al., 2013).

#### **Cálcio**

O cálcio está presente na saliva na forma catiónica e desempenha um papel importante nos processos de desmineralização e remineralização do esmalte. Em um estudo de Shpitzer e colaboradores (2007), a concentração de cálcio na saliva de 25 pacientes com cancro oral foi comparada à de 25 pacientes saudáveis. As medições foram obtidas usando espectrometria de absorção atômica e mostraram um aumento de 59% ( $P = 0,05$ ) na concentração de cálcio. Assim como o sódio, as maiores concentrações são

encontradas em casos de câncer do assoalho da boca e as menores para câncer de língua (Shpitzer et al., 2007).

### **Potássio**

O potássio desempenha um papel semelhante aos dois biomarcadores anteriores na saliva. No entanto, ao contrário do sódio e do cálcio, vários estudos demonstraram que sua concentração diminui, conforme explicado em uma revisão por Ghosh e colaboradores (Ghosh et al., 2018).

### **2.2.2.3.2 Biomarcadores Proteicos**

#### **Citoquinas**

Nicod (1993) define citoquinas como um grupo de proteínas de baixo peso molecular que atuam como mediadores em diferentes processos, como crescimento e diferenciação celular, inflamação, imunidade e reparação tecidual. Aqueles envolvidos nos mecanismos de estimulação ou controle da inflamação são particularmente estudados na medicina. Jarczak e Nierhaus (2022) explicam numa revisão que muitos microrganismos patogênicos, distúrbios genéticos ou doenças estimulam fortemente células imunológicas, induzindo uma resposta inflamatória e um grande aumento de citoquinas, levando à inflamação e iniciando um ciclo vicioso. No caso do cancro oral, vários estudos mostraram que os níveis de citoquinas salivares estão fortemente desregulados (Chiamulera et al., 2021). Entre as citoquinas estudadas, as de maior potencial incluem certas interleucinas (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10), além de TNF- $\alpha$  e osteopontina.

#### **Interleucina 6**

A interleucina (IL-6) é definida por Song e Kellum (2005) como uma citoquina pleiotrópica com uma ampla gama de atividades biológicas. Ela é produzida por células linfoides e não linfoides e ajuda a regular a reatividade imunológica, a resposta de fase aguda, a inflamação, a oncogênese e a hematopoiese. A IL-6 desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão do câncer oral, particularmente através de sua

participação na via de sinalização IL-6/JAK2/STAT3 (Huang et al., 2022). No contexto do câncer oral, a IL-6 é superexpressa e contribui para a criação de um microambiente tumoral favorável ao crescimento e disseminação de células malignas. A via IL-6/STAT3 é particularmente importante, uma vez que ativa o fator de transcrição STAT3, o qual regula a expressão de muitos genes envolvidos na progressão tumoral. Essa ativação pode ser desencadeada por alterações na microbiota oral, resultando em uma diminuição dos ácidos gordos de cadeia curta e uma modificação da expressão dos receptores FFAR2, levando a uma resposta inflamatória e a um aumento do risco de cancro. Num estudo conduzido por Selvam e Sadaksharam (2015), amostras de saliva foram recolhidas de 75 indivíduos divididos em 3 grupos de 25. O Grupo 1 consistiu em indivíduos com leucoplasia oral, o Grupo 2 em indivíduos afetados por carcinoma espinocelular oral (OSCC) e o Grupo 3 foi um grupo controle. A concentração de IL-6 das amostras foi então medida usando a técnica ELISA. Os resultados obtidos mostraram um aumento na concentração salivar de IL-6 em indivíduos com leucoplasia oral ou OSCC, sendo resultados semelhantes observados em outros estudos. Assim, o uso de IL-6 como biomarcador salivar para cancro oral apresenta um potencial promissor para a deteção precoce e monitorização da doença. Altos níveis de IL-6 na saliva poderiam indicar a presença ou progressão do câncer oral, permitindo um diagnóstico mais rápido e, potencialmente, intervenções mais eficazes.

### **Interleucina 8**

A interleucina 8 (IL-8) é uma citocina pró-inflamatória conhecida pelo seu papel na atração e ativação de neutrófilos (Hébert & Baker, 1993). No entanto, além de suas funções imunológicas clássicas, a IL-8 desempenha um papel na progressão de vários cânceres, incluindo o câncer oral, particularmente o carcinoma espinocelular oral.

No contexto do cancro oral, a IL-8 está envolvida em vários processos patológicos. Ela promove a proliferação, invasão e migração das células cancerígenas através da ativação de vias de sinalização específicas, como o eixo IL-8/AKT/p-ACLY. Esta via metabólica é particularmente importante porque regula a síntese lipídica nos fibroblastos associados ao cancro, que, por sua vez, apoiam a progressão tumoral. De facto, a IL-8 secretada pelas células OSCC ativa a via AKT, levando à fosforilação da

ATP citrato liase nos fibroblastos associados ao cancro, aumentando assim a síntese lipídica e fornecendo os lípidos necessários ao crescimento tumoral (P. Liu et al., 2023). Além disso, a IL-8 tem sido estudada pelo seu potencial como biomarcador salivar para o diagnóstico e monitorização do cancro oral. Níveis elevados de IL-8 na saliva têm sido correlacionados com a presença e progressão do cancro oral, o que a torna um candidato promissor para a deteção precoce e acompanhamento da doença (Sahibzada et al., 2017). A sua implicação em vias de sinalização chave e a sua presença detetável na saliva fazem dela uma ferramenta valiosa para o diagnóstico e monitorização terapêutica do cancro oral.

### **Interleucina-1 $\beta$**

A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) intervém no desenvolvimento e progressão do cancro oral, atuando como um mediador pró-inflamatório. Esta citocina está envolvida em vários processos relacionados com a carcinogénese, incluindo a proliferação celular, sobrevivência e migração das células tumorais. No contexto do cancro oral, a IL-1 $\beta$  é produzida em quantidades elevadas pelas células tumorais e pelo microambiente tumoral (TME), contribuindo assim para a inflamação crónica que caracteriza esta doença (Lee et al., 2014). Estudos demonstraram que a IL-1 $\beta$  favorece a ativação dos fibroblastos associados ao cancro e estimula a glicólise anaeróbia no estroma tumoral, estabelecendo uma troca de lactato entre o estroma e as células epiteliais cancerígenas. Este mecanismo apoia o crescimento rápido das células tumorais, fornecendo-lhes nutrientes essenciais. Além disso, a IL-1 $\beta$  induz a expressão de genes glicolíticos nos fibroblastos, tais como o transportador de glucose 1, a hexocinase 2 e o transportador de monocarboxilato 4, reforçando assim o metabolismo tumoral (Zhang & Hwang, 2019). A importância da IL-1 $\beta$  na patogénese do cancro oral é também sublinhada pelo seu papel na ativação do inflamassoma NLRP3 e da piroptose, um tipo de morte celular inflamatória. Estes processos contribuem para a amplificação da resposta inflamatória e para a progressão tumoral (Wang et al., 2018). Devido à sua significativa implicação no cancro oral, a IL-1 $\beta$  apresenta um potencial promissor como biomarcador salivar. A sua deteção na saliva poderia permitir o diagnóstico precoce e o acompanhamento da progressão do cancro oral. A sobre-expressão da IL-1 $\beta$  nos tecidos cancerígenos e a sua presença na saliva dos pacientes com cancro oral tornam-na um candidato interessante

para o desenvolvimento de testes diagnósticos. Além disso, a medição dos níveis de IL-1 $\beta$  poderia ajudar a avaliar a eficácia dos tratamentos e a prever o prognóstico dos pacientes (Idris et al., 2015).

### **Interleucina-10**

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina pleiotrópica conhecida pelos seus efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios (Dewaalmalefyt et al., 1992). O seu papel no cancro oral é complexo e tem sido objeto de numerosos estudos. No contexto do cancro oral, a IL-10 influencia significativamente o TME. Ela pode tanto promover a citotoxicidade como inibir as respostas antitumorais, o que sublinha a sua natureza complexa na progressão da doença (Dewaalmalefyt et al., 1992). A IL-10 participa na modulação da resposta imunológica, o que pode favorecer a evasão imune das células cancerígenas e influenciar o crescimento tumoral. Estudos têm explorado a ligação entre os polimorfismos do promotor da IL-10 e a suscetibilidade ao cancro oral. Uma meta-análise de sete estudos, envolvendo 2141 controlos e 1928 casos, revelou uma associação significativa entre o polimorfismo do gene IL-10-1082A/G e a suscetibilidade ao cancro oral em todos os modelos genéticos estudados (Vairaktaris et al., 2008). O uso potencial da IL-10 como biomarcador salivar para o cancro oral é um campo de interesse crescente. A deteção de níveis elevados de IL-10 na saliva parece indicar a presença da doença e poderia, portanto, ajudar no diagnóstico precoce, acompanhamento da progressão da doença e avaliação da eficácia dos tratamentos (Chiamulera et al., 2021).

No entanto, é importante notar que o papel da IL-10 no cancro oral é complexo e por vezes contraditório. Alguns estudos sugerem que a IL-10 pode ter efeitos protetores contra o cancro, enquanto outros indicam que ela pode favorecer a progressão tumoral.

### **Fator de Necrose Tumoral Alfa**

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória que influencia significativamente o microambiente tumoral (TME) ao promover a proliferação celular, invasão e migração das células cancerígenas. Estudos demonstraram que a presença aumentada de TNF- $\alpha$  no TME favorece a invasão dos tecidos pelo cancro (Alim et al., 2024), nomeadamente ao promover fenótipos pró-inflamatórios e pró-invasivos nas

células cancerígenas, bem como ao mediar o recrutamento e a ativação das células inflamatórias por um mecanismo parácrino.

O TNF- $\alpha$  está também envolvido na regulação das células imunitárias, e a sua superprodução tem sido associada a uma susceptibilidade aumentada a várias doenças humanas, incluindo o cancro. Pesquisas têm explorado a ligação entre os polimorfismos do gene TNF- $\alpha$  e o risco de cancro oral. Embora alguns estudos não tenham encontrado uma associação significativa entre o polimorfismo TNF- $\alpha$  -308 G/A e o risco de cancro oral em certas populações, outros mostraram que os polimorfismos que afetam a expressão do gene TNF- $\alpha$  estão fortemente associados a um risco aumentado de desenvolvimento de cancro oral e lesões pré-cancerosas.

O uso potencial do TNF- $\alpha$  como biomarcador salivar para o cancro oral está a suscitar um interesse crescente. Estudos recentes têm explorado a quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$  na saliva de pacientes com carcinoma oral, sugerindo o seu potencial como indicador prognóstico (Sahibzada et al., 2017b).

No entanto, é importante destacar que o papel do TNF- $\alpha$  no cancro oral é complexo. Embora possa favorecer a progressão tumoral, também ativa as células imunitárias, contribuindo assim para a modulação da resposta imunitária antitumoral.

### **Osteopontina**

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína de ligação ao cálcio envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o cancro oral. Esta proteína participa na adesão das células ósseas, na atividade osteoclástica e na mineralização da matriz óssea. Contudo, a sua implicação em processos patológicos, nomeadamente no cancro oral, também foi documentada.

No contexto do cancro oral, a OPN contribui para a progressão da doença ao ativar a via PI3K/AKT/mTOR, que promove a proliferação celular, invasão, metastização, angiogénese e resistência aos tratamentos (Santos et al., 2020). Em particular, a OPN pode induzir um fenótipo maligno nas células ao ativar estas vias de sinalização, facilitando o crescimento e a disseminação das células cancerígenas. Esta capacidade de modular diversos aspetos do comportamento tumoral faz da OPN um ator importante na patogénese do cancro oral.

Estudos mostraram que os níveis de OPN estão significativamente elevados na saliva de

pacientes com cancro oral em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo que a OPN pode ser utilizada para diagnosticar e avaliar a progressão da doença (Katakura et al., 2007).

### **Proteína Solúvel CD44**

A proteína solúvel CD44 (SolCD44) desempenha um papel significativo no desenvolvimento e progressão do cancro oral, particularmente no OSCC. O CD44 é uma glicoproteína transmembranar envolvida na regulação da adesão celular, migração, proliferação e sobrevivência celular. O SolCD44, a forma solúvel do CD44, é libertado nos fluidos corporais, incluindo a saliva, pelas células tumorais e pelas células estromais circundantes.

Os níveis elevados de SolCD44 na saliva de pacientes com cancro oral têm sido associados a uma progressão tumoral aumentada e a um prognóstico desfavorável. O SolCD44 atua facilitando a interação entre as células cancerígenas e a matriz extracelular, o que favorece a invasão e metastização das células tumorais. Além disso, o SolCD44 pode interagir com fatores de crescimento e citocinas, alterando assim o microambiente tumoral para favorecer o crescimento e sobrevivência das células cancerígenas.

A sua deteção na saliva como biomarcador oferece uma oportunidade de diagnóstico não invasivo e monitorização dos pacientes com cancro oral. No entanto, são necessárias mais pesquisas para validar plenamente a sua utilização clínica e determinar os limiares clinicamente significativos para uma aplicação prática (Seyedmajidi et al., 2018).

### **Staterina**

A staterina é uma proteína salivar multifuncional que intervém na manutenção da homeostasia da cavidade bucal. Produzida principalmente pelas glândulas parótidas, está envolvida na regulação da mineralização do esmalte dentário e na prevenção da formação de cálculos salivares graças à sua capacidade de inibir a precipitação de sais de cálcio. Além disso, a staterina possui propriedades antimicrobianas e antivirais, contribuindo assim para a defesa contra infeções orais. No contexto do cancro oral,

estudos recentes sugerem que os níveis de staterina podem estar alterados.

Estudos mostraram que a concentração de staterina na saliva pode ser significativamente mais baixa em pacientes com cancro oral em comparação com indivíduos saudáveis (Amado et al., 2010). Os mecanismos exatos desta alteração ainda não são completamente compreendidos, mas é hipotético que as mudanças na secreção de staterina possam ser devidas à disfunção das glândulas salivares induzida pela presença do tumor ou aos efeitos secundários de tratamentos como a radioterapia.

### **Lactato Desidrogenase**

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima ubíqua que desempenha um papel importante no metabolismo celular, catalisando a conversão reversível do lactato em piruvato. No contexto do cancro oral, a LDH pode ter uma importância significativa devido à sua implicação no efeito Warburg, um fenómeno metabólico característico das células cancerígenas. As células tumorais tendem a favorecer a glicólise aeróbia, produzindo grandes quantidades de lactato, mesmo na presença de oxigénio, o que requer uma atividade aumentada da LDH.

O aumento da atividade da LDH nos tecidos cancerígenos orais pode refletir uma proliferação celular aumentada e um metabolismo alterado, características da progressão tumoral. Esta hiperatividade enzimática pode potencialmente traduzir-se em níveis elevados de LDH na saliva dos pacientes com cancro oral, oferecendo assim uma oportunidade para a sua utilização como biomarcador salivar. Além disso, a estabilidade relativa da LDH em amostras biológicas pode torná-la um marcador robusto para testes de rastreio. A deteção de níveis elevados de LDH na saliva pode potencialmente servir como indicador precoce da presença de um cancro oral (Iglesias-Velázquez et al., 2020).

### **Fator de Crescimento Fibroblástico básico**

O fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), também conhecido como FGF-2, é uma proteína multifuncional pertencente à família dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF). Esta família de proteínas participa em vários processos biológicos, como a proliferação celular, diferenciação, angiogénese e cicatrização de feridas. O bFGF está particularmente envolvido na regulação do crescimento e reparação dos tecidos, incluindo os tecidos epiteliais e conjuntivos. No contexto do cancro oral, o

bFGF é reconhecido pelo seu papel na tumorigenese e progressão tumoral, especialmente pela sua capacidade de estimular a angiogénese, que é a formação de novos vasos sanguíneos, permitindo assim que os tumores cresçam e metastizem.

Estudos demonstraram que os níveis de bFGF são significativamente aumentados na saliva de pacientes com cancro oral em comparação com indivíduos saudáveis. Este foi o caso de um estudo de Gorugantula et al. (2012) sobre a utilização potencial do fator de crescimento bFGF como biomarcador salivar para a deteção do cancro oral, particularmente em pacientes com líquen plano oral (OLP) e em pacientes em remissão de um OSCC. O estudo comparou os níveis de bFGF salivar entre 5 grupos: pacientes com OSCC recém-diagnosticado, pacientes em remissão de OSCC, pacientes com OLP ativo, pacientes com OLP inativo e controles saudáveis. Os resultados mostraram que os níveis de bFGF salivar eram significativamente mais elevados em pacientes com OSCC recém-diagnosticado em comparação com pacientes em remissão de OSCC, pacientes com OLP ativo e controles saudáveis.

Este aumento pode ser atribuído à ativação das vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral, onde o bFGF desempenha um papel chave ao promover a angiogénese e a proliferação das células tumorais. Além disso, o bFGF pode interagir com outros fatores de crescimento e citocinas para criar um microambiente tumoral favorável ao crescimento e invasão tumoral. Os níveis de bFGF na saliva podem, assim, refletir a atividade tumoral e fornecer indicações valiosas sobre a presença e agressividade do cancro oral (Gorugantula & al. 2012).

### **Metaloproteinases**

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco, envolvidas na degradação da matriz extracelular. Elas desempenham um papel crucial em muitos processos fisiológicos, como a remodelação tecidual, cicatrização de feridas e morfogénese. No entanto, no contexto do cancro, as MMPs são frequentemente desviadas pelas células tumorais para facilitar a progressão da doença. No cancro oral, as MMPs, nomeadamente MMP-2 e MMP-9, são particularmente sobre-expressas e associadas a uma degradação aumentada da matriz extracelular, favorecendo assim a invasão tumoral e a formação de metástases. Estas enzimas facilitam a disseminação das células cancerígenas ao degradar as barreiras de

colagénio e outros componentes da matriz extracelular, abrindo caminho para a invasão dos tecidos adjacentes e para a circulação no sistema sanguíneo.

A correlação entre os níveis elevados de MMPs e a progressão do cancro oral está bem documentada na literatura científica (Thomas et al., 1999). Estudos mostraram que a expressão anormal de MMPs é frequentemente causada por alterações genéticas e epigenéticas, bem como pela ativação de vias de sinalização oncogénicas, como a via Ras/MAPK e a via PI3K/AKT. Além disso, as MMPs podem ser ativadas por fatores de crescimento, citocinas e interações célula-matriz, criando um microambiente propício ao crescimento tumoral e invasão. Esta sobre-expressão das MMPs está frequentemente associada a um prognóstico desfavorável em pacientes com cancro oral, sublinhando o seu papel chave na agressividade tumoral.

Estudos demonstraram que os níveis de MMPs, nomeadamente MMP-2 e MMP-9, estão significativamente elevados na saliva de pacientes com cancro oral em comparação com os indivíduos saudáveis (Monea & Pop, 2022). Esta elevação reflete diretamente a atividade proteolítica aumentada nos tecidos tumorais e pode fornecer informações valiosas sobre a presença e progressão da doença.

### **Ki-67**

Ki-67 é uma proteína nuclear amplamente utilizada como marcador de proliferação celular devido à sua expressão em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas ausente na fase de repouso (G0). No contexto do cancro oral, é frequentemente observada uma sobre-expressão de Ki-67, indicando uma proliferação celular aumentada e uma progressão tumoral agressiva.

Estudos demonstraram que a expressão de Ki-67 nas lesões pré-cancerosas, como a fibrose submucosa oral, também é mais elevada do que nos tecidos normais, mas inferior à observada nos OSCC (Chandrashekar et al., 2017). Esta diferença de expressão permite distinguir os estádios da doença e prever a sua evolução para um estado maligno. Além disso, a correlação entre a expressão de Ki-67 e os estádios clínicos e histológicos do OSCC sublinha o seu potencial como biomarcador para avaliar a gravidade e o prognóstico do cancro oral (Sankari et al., 2015).

### **Ciclina D1**

A ciclina D1 (CCND1) é uma proteína reguladora essencial do ciclo celular, desempenhando um papel crucial na transição da fase G1 para a fase S (Mahdey, 2010). Ela forma um complexo com as cinases dependentes de ciclinas (CDK4 e CDK6), fosforilando assim a proteína do retinoblastoma (Rb) e libertando os fatores de transcrição E2F necessários para a progressão do ciclo celular. A expressão e a atividade da ciclina D1 são estritamente reguladas em células normais. No entanto, alterações nesta regulação podem levar a uma proliferação celular descontrolada, uma característica comum das células cancerígenas. No contexto do cancro oral, a sobre-expressão da ciclina D1 é frequentemente observada e está associada à progressão tumoral e a um prognóstico desfavorável. Esta sobre-expressão da ciclina D1 nas células cancerígenas orais deve-se a várias alterações genéticas e epigenéticas, como a amplificação do gene CCND1, mutações ativadoras, ou uma desregulação das vias de sinalização a montante, como a via de sinalização de Ras/MAPK. Estas alterações conduzem a uma proliferação celular excessiva, à evasão dos pontos de controlo do ciclo celular e à resistência à apoptose, favorecendo assim o crescimento tumoral e a metastização.

Um estudo de Shpitzer et al. (2009) analisou 8 biomarcadores salivares em 19 pacientes com cancro da língua, comparados a um grupo de controlo. A CCND1 foi um dos biomarcadores estudados, e os resultados mostraram um aumento significativo dos seus níveis na saliva dos pacientes com cancro. Mais especificamente, os níveis de CCND1 aumentaram 87% nos pacientes com cancro em comparação com os controlos saudáveis ( $p=0.000006$ ). A CCND1 mostrou uma sensibilidade e especificidade de 100% cada uma para a deteção do cancro oral, o que a torna um dos biomarcadores mais promissores do estudo. O aumento da CCND1 salivar foi uma das alterações mais significativas entre todos os biomarcadores estudados, e os autores sugerem que estas mudanças nos níveis de CCND1 salivar poderiam ser utilizadas como ferramenta de diagnóstico para o cancro oral.

#### **2.2.2.3.3 Outros marcadores**

No contexto do cancro oral, os biomarcadores proteicos são os mais estudados. No entanto, alguns investigadores concentraram-se em marcadores não proteicos, como os

marcadores genómicos, os Compostos Carbonílicos ou a concentração salivar de várias bactérias.

### ***Capnocytophaga gingivalis, Prevotella melaninogenica e Streptococcus mitis***

Entre as bactérias estudadas, encontram-se *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus mitis*. Num estudo de Mager et al. (2005), a concentração salivar de 40 bactérias conhecidas por fazerem parte do microbioma oral foi medida em pacientes com cancro oral e em indivíduos saudáveis, comparando-se depois os resultados entre os dois grupos. Para estas 3 bactérias, a concentração salivar era significativamente mais elevada nos pacientes com cancro oral do que nos indivíduos saudáveis. Estes resultados sugerem que estas bactérias poderiam ser úteis para o diagnóstico do cancro oral.

### **Mutação do gene p53**

Uma das mutações genéticas mais comuns e mais estudadas no contexto do cancro oral é a mutação do gene p53, que resulta na produção de uma proteína P53 alterada. Em condições normais, a principal função desta proteína é bloquear o ciclo celular na fase G1 para permitir a reparação do ADN em caso de danos. A P53 também intervém na apoptose das células cujos danos ao nível do ADN são demasiado graves para serem reparados, impedindo assim a divisão de células danificadas que poderiam potencialmente tornar-se cancerígenas. O problema é que, quando ocorre uma mutação no gene p53, as proteínas produzidas não desempenham corretamente a sua função (Poornima et al., 2005).

Assim, um estudo de Liao et al. (2000) sugere que a presença na saliva de ADN portador de certas mutações do gene P53 poderia servir como biomarcador para o cancro oral. De facto, estas mutações foram encontradas na maioria dos participantes do estudo que sofriam de cancro oral, enquanto os indivíduos saudáveis raramente as apresentavam.

### **Compostos Carbonílicos**

Os compostos carbonílicos, que incluem, entre outros, os aldeídos e as cetonas,

participam em diversos processos biológicos e patológicos. Como produtos intermediários do metabolismo celular e do stress oxidativo, os carbonilos são indicadores significativos da peroxidação lipídica, um processo frequentemente associado a danos celulares. No contexto do cancro oral, os níveis de compostos carbonílicos na saliva podem refletir o estado oxidativo da cavidade oral e a presença de processos patológicos relacionados com a malignidade. Estudos demonstraram que o stress oxidativo é um fator chave na carcinogénese, e os compostos carbonílicos, como marcadores do stress oxidativo, são particularmente relevantes (Sridharan, 2022).

Pesquisas recentes mostraram que os níveis de compostos carbonílicos estão significativamente elevados na saliva de pacientes com cancro oral em comparação com indivíduos saudáveis. Este aumento pode ser atribuído a uma produção acrescida de radicais livres e a uma peroxidação lipídica mais elevada nas células tumorais. As células cancerígenas, devido ao seu metabolismo anormal e proliferação rápida, geram quantidades excessivas de espécies reativas de oxigénio, levando a danos oxidativos nos lípidos, proteínas e ADN. Os produtos destas reações, como os compostos carbonílicos, podem ser detetados na saliva, refletindo assim o estado patológico subjacente.

Tabel 1. Principais biomarcadores de cancro oral

Tipo de biomarcador	Nome	Variações na saliva de pacientes com cancro oral	Referência
Biomarcadores não Orgânicos	Calcio	A concentração salivar aumenta em 59%	Shpitzer & al. (2007)
	Sodio	Concentração salivar de 27,29 {mmol/L} em média, em comparação com 20 {mmol/L} em indivíduos saudáveis	Dziewulska & al. (2013)
	Potassio	Vários estudos mostram uma redução da concentração salivar	Ghosh & al. (2018)
	IL-6	Concentração salivar média de 132,88 (pg/ml) em comparação com 9,68 (pg/ml) em indivíduos saudáveis	Selvam & Sadaksharam. (2015)
	IL-8	Concentração salivar de 720 (pg/ml) em comparação com 250 (pg/ml) em indivíduos saudáveis	Katakura & al. (2007)

Tipo de biomarcador	Nome	Variações na saliva de pacientes com cancro oral	Referência
Biomarcadores Proteicos	IL-1 $\beta$	Concentração salivar de 293 (pg/ml) em comparação com 169 (pg/ml) em indivíduos saudáveis	Chiamulera & al. (2020)
	IL-10	Concentração salivar de 4,4 (pg/ml) em comparação com 1,7 (pg/ml) em indivíduos saudáveis	Chiamulera & al. (2021)
	TNF- $\alpha$	Vários estudos mostram um aumento da concentração salivar	Sahibzada & al. (2017)
	Osteopontina	Concentração salivar de 39,23 (ng/ml) em comparação com 35,1 (ng/ml) em indivíduos saudáveis	Katakura & al. (2007)
	SolCD44	Concentração salivar de 48,53 (ng/ml) em comparação com 17,76 (ng/ml) em indivíduos saudáveis	Syedmajidi & al. (2018)
	Staterina	Vários estudos mostram uma redução da concentração salivar	Amado & al. (2010)
	Lactato Desidrogenase	Concentração salivar de 592,09 (pg/ml) em comparação com 86,12 (pg/ml) em indivíduos saudáveis	Iglesias-Velázquez & al. (2020)
	bFGF	Concentração salivar de 9,9 (pg/ml) em comparação com 4,6 (pg/ml) em indivíduos saudáveis	Gorugantula & al. (2012)
	Metaloproteinases	A concentração salivar aumenta 6,8 a 14,3 vezes em comparação com indivíduos saudáveis	Monea & Pop. (2022)
	Ki-67	Aumento da expressão na saliva	Chandrashekar & al. (2017)
	CCND1	Os níveis salivares de CCND1 são 87% mais elevados do que em doentes saudáveis	Shpitzer & al. (2009)
Bactérias	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ,	Concentração de 3,24 x 10 <sup>5</sup> / ml de saliva em comparação com 0,25 x 10 <sup>5</sup> /ml para indivíduos saudáveis	Mager & al. (2005)
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	Concentração de 5,62 x 10 <sup>5</sup> / ml de saliva em comparação com 0,63 x 10 <sup>5</sup> /ml para indivíduos saudáveis	Mager & al. (2005)
	<i>Streptococcus mitis</i>	Concentração de 1,62 x 10 <sup>5</sup> / ml de saliva em comparação com 0,31 x 10 <sup>5</sup> /ml para indivíduos saudáveis	Mager & al. (2005)

<b>Tipo de biomarcador</b>	<b>Nome</b>	<b>Variações na saliva de pacientes com cancro oral</b>	<b>Referência</b>
Mutação genética	p53	Foi encontrada uma mutação do gene p53 no ADN obtido da saliva em 62,5% dos doentes.	Liao & al. (2000)

## **2.3. Perspetivas Futuras**

### **2.3.1. Potencial Clínico dos Biomarcadores Salivares**

#### **2.3.1.1. Vantagens em Relação aos Métodos Convencionais**

Os biomarcadores salivares oferecem várias vantagens significativas em relação aos métodos de diagnóstico convencionais para o cancro oral. Em primeiro lugar, a recolha de saliva é um procedimento não invasivo, indolor e sem riscos, ao contrário das biópsias, que podem ser dolorosas e comportar riscos de hemorragia ou infeção (Mercadante et al., 2012). Esta facilidade de recolha permite uma melhor aceitação por parte dos pacientes e a possibilidade de realizar testes de rastreio mais frequentes.

A saliva é também facilmente acessível e pode ser recolhida em grandes quantidades sem desconforto para o paciente. Isto permite realizar análises repetidas, se necessário, sem causar dor ou stress, o que é particularmente útil para o acompanhamento da evolução da doença ou da eficácia dos tratamentos (Liu & Duan, 2012). E sendo a recolha de saliva não invasiva, não requer agulhas ou equipamento complexo. Este método é particularmente benéfico para pacientes que sentem ansiedade em relação às colheitas de sangue, como crianças ou pessoas idosas.

Além disso, como a saliva está em contacto direto com as lesões orais, ela contém potencialmente uma concentração mais elevada de biomarcadores específicos do cancro oral do que outros fluidos corporais como o sangue (Khurshid et al., 2018).

A utilização de biomarcadores salivares poderia permitir uma deteção mais precoce do cancro oral do que os métodos convencionais (Kaur et al., 2018). De facto, alguns

biomarcadores podem ser detetados antes do aparecimento de sinais clínicos visíveis, oferecendo assim a possibilidade de um diagnóstico numa fase mais precoce da doença. Isto é crucial para melhorar o prognóstico e as hipóteses de sobrevivência dos pacientes. Testes baseados em biomarcadores salivares teriam o potencial de ser mais rápidos e menos dispendiosos do que os métodos convencionais, como a imagiologia ou a biópsia. Isto poderia permitir um rastreio em larga escala, especialmente em regiões onde o acesso a cuidados especializados é limitado. Além disso, a possibilidade de desenvolver testes rápidos e portáteis baseados nestes biomarcadores poderia facilitar a sua utilização em contextos de cuidados primários ou até mesmo em casa.

Por fim, a análise dos biomarcadores salivares poderia fornecer informações mais precisas sobre o tipo e o estágio do cancro, bem como sobre a sua potencial agressividade. Isto poderia ajudar os clínicos a tomar decisões de tratamento mais informadas e personalizadas para cada paciente (Cristaldi et al., 2019).

### **2.3.1.2. Integração Possível na Prática Dentária Diária**

A integração do diagnóstico baseado em biomarcadores salivares na prática clínica diária dos dentistas representaria um verdadeiro avanço no tratamento do cancro oral. Os dentistas, muitas vezes na linha da frente na identificação de anomalias orais, consideram-se insuficientemente formados para diagnosticar com precisão lesões potencialmente malignas. A adoção de testes salivares simplificaria consideravelmente o processo de rastreio, sendo não só fáceis de realizar e económicos, mas também não invasivos, o que incentivaria a sua utilização regular, tal como já acontece com outras doenças (Schaaf et al., 2021). Com estes testes, os dentistas poderiam realizar um rastreio em massa em pacientes com lesões suspeitas, permitindo assim uma rápida referência a um oncologista para tratamento especializado.

Esta abordagem poderia transformar a prática dentária numa plataforma eficaz de deteção precoce, melhorando assim as taxas de sobrevivência e reduzindo os custos dos tratamentos tardios. Além disso, a integração dos biomarcadores salivares nos cuidados dentários abriria caminho para políticas de saúde pública inovadoras. Poderiam ser organizadas campanhas de rastreio em larga escala, direcionadas especificamente a populações de risco, como fumadores, consumidores de álcool ou pessoas com

antecedentes de lesões orais. A eficácia de tais campanhas foi demonstrada no caso de outros cancros. Por exemplo, os dados recentes mostram que o teste de rastreio do cancro colorretal, realizado de dois em dois anos em pessoas com mais de 50 anos, reduz a mortalidade da doença entre 15% e 25% (Hewitson et al., 2008). Da mesma forma, a mamografia, utilizada regularmente para o rastreio do cancro da mama em mulheres entre os 50 e 69 anos, permite diminuir a mortalidade associada a esta doença entre 14% e 32% (Warner, 2011).

Inspirando-se nestes modelos, a integração dos biomarcadores salivares na prática clínica dentária poderia não só melhorar a deteção precoce do cancro oral, mas também instaurar uma cultura de prevenção ativa. Os dentistas tornar-se-iam atores-chave na luta contra o cancro oral, contribuindo para iniciativas de saúde pública que visam reduzir a incidência e a mortalidade desta doença. Assim, a implementação deste diagnóstico nos cuidados dentários diários representaria um avanço significativo, colocando os cuidados de saúde bucal no centro das estratégias de deteção precoce e prevenção do cancro.

## **2.3.2. Desafios e Limitações**

### **2.3.2.1 Obstáculos Potenciais à Implementação**

A implementação do uso de biomarcadores salivares para o diagnóstico do cancro oral enfrenta vários obstáculos significativos. Em primeiro lugar, o custo das pesquisas necessárias para identificar e validar esses biomarcadores é considerável. Os estudos longitudinais em grande escala e os ensaios clínicos, indispensáveis para garantir a sensibilidade e especificidade dos testes, representam um investimento financeiro elevado (Martin et al., 2017). Além disso, obter um teste com uma especificidade elevada é um desafio científico complexo, pois exige a discriminação precisa entre indivíduos com cancro oral e aqueles com outras condições bucais ou sistémicas, assim como determinar todos os fatores que podem modificar a concentração salivar de um biomarcador, como a idade, o sexo, os hábitos de consumo, etc.

Uma vez desenvolvidos esses testes, o custo de sua implementação em grande escala representa outro problema, especialmente para os governos. A implementação dessas medidas de saúde pública implica despesas com equipamentos, formação de pessoal e gestão logística, o que pode ser proibitivo, especialmente em países em desenvolvimento (World Health Organization, 2020).

Além disso, a desigualdade no acesso aos testes entre diferentes sistemas de saúde é também preocupante. Por exemplo, em França, onde o sistema de saúde é amplamente financiado pelo Estado, a integração de testes de biomarcadores salivares poderia ser mais viável em comparação com os Estados Unidos, onde os custos dos cuidados de saúde são frequentemente suportados pelos pacientes e seguradoras privadas (Gawron et al., 2020). Esta disparidade é ainda mais acentuada nos países em desenvolvimento, onde os recursos para financiar tais políticas de saúde pública são limitados. Como explicado anteriormente, esses países podem não ter as infraestruturas necessárias para implementar esses testes, exacerbando as desigualdades em saúde.

Outro obstáculo é a falta de adesão dos dentistas a esses novos protocolos. Os profissionais de saúde bucodentária podem representar um entrave à implementação de novos métodos de diagnóstico devido à falta de atualização regular dos seus conhecimentos (Feres et al., 2022) e às mudanças nas suas práticas clínicas estabelecidas que isso implicaria (Spallek et al., 2010). Além disso, motivar os pacientes a participarem no rastreio continua a ser um desafio. Muitos pacientes podem não perceber a importância desses testes ou temer resultados positivos (Ramos et al., 2011), o que reduz a participação e a eficácia dos programas de rastreio, especialmente porque os grupos de risco são frequentemente os mais difíceis de convencer a fazer o rastreio.

Por fim, embora o uso de biomarcadores salivares seja promissor para o rastreio do cancro oral, a questão de saber se isso realmente permitirá um diagnóstico precoce permanece em aberto. Os biomarcadores devem ser suficientemente sensíveis para detetar a doença numa fase muito precoce, antes que os sintomas clínicos apareçam. Sem essa sensibilidade, o rastreio pode não melhorar significativamente as taxas de sobrevivência, pois os cancros ainda poderiam ser detetados em estádios avançados. Para que os biomarcadores salivares se tornem uma metodologia confiável de diagnóstico precoce, são necessárias avanços tecnológicos e validações rigorosas.

### **2.3.2.2 Necessidades de Investigação**

Os autores são unânimes sobre o assunto: é essencial continuar e desenvolver a investigação sobre os biomarcadores. E isso por várias razões:

Em primeiro lugar, no estado atual, é impossível afirmar que se pode usar este ou aquele biomarcador para diagnosticar o cancro oral. Alguns parecem ter um forte potencial, mas mais estudos devem ser realizados para confirmar os resultados já obtidos (Adeoye et al., 2020).

Além disso, é necessário provar a existência de biomarcadores suficientemente específicos para o cancro oral para permitir o diagnóstico. De facto, estudos realizados sobre a ligação entre certos marcadores e outras doenças mostram uma alteração da saliva semelhante à observada no cancro oral, nomeadamente em relação aos fatores inflamatórios. Este é o caso, por exemplo, da proteína IL-6 e da periodontite (Isola et al., 2021).

Outro problema importante é a diversidade dos protocolos de estudo, que torna difícil comparar os resultados e tirar conclusões sólidas (Santosh et al., 2016). De facto, embora pareçam surgir padrões com concentrações de marcadores que aumentam ou diminuem na presença de cancro oral, os valores encontrados entre estudos para um mesmo marcador são muito diferentes. É, portanto, impossível, por enquanto, obter valores de referência sobre os quais se basear para a criação de um teste salivar.

Apesar disso, a empresa Viome desenvolveu um primeiro teste salivar supostamente capaz de permitir a deteção precoce do cancro oral e da garganta. Segundo um estudo de Banavar et al. (2023), financiado pela Viome, o teste teria uma especificidade de 95% e uma taxa de sensibilidade de 90%. No entanto, aparentemente, não existem outros estudos que validem estes dados, e a FDA ainda não aprovou ou autorizou este teste.

Assim, embora os primeiros resultados sejam promissores, existe uma clara falta de literatura sobre o assunto, bem como a ausência de um protocolo de recolha e análise padronizado, que permita comparar os resultados de diferentes estudos de forma coerente e rigorosa (Santosh et al., 2016). Em suma, para avançar neste domínio, é imperativo determinar um conjunto de biomarcadores sobre os quais se concentrar a

investigação e harmonizar as metodologias para validar os dados e estabelecer conclusões mais fiáveis.



### **3. Conclusão**

Para concluir, a utilização de biomarcadores salivares surge como uma via promissora para permitir o diagnóstico precoce do cancro oral. A saliva, sendo um fluido biológico de fácil acesso e em contacto direto com as lesões orais, oferece um potencial único para a deteção de marcadores específicos do cancro oral. As investigações realizadas até agora identificaram vários biomarcadores salivares promissores, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e metabolitos. Estes marcadores poderiam permitir o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápidos, não invasivos e potencialmente mais sensíveis do que os métodos convencionais. Contudo, apesar destes avanços encorajadores, ainda persistem desafios: a padronização dos métodos de recolha e análise da saliva, a validação em larga escala dos biomarcadores identificados, e a integração destes testes na prática clínica diária continuam a ser obstáculos a superar. Para o futuro, é necessário continuar as investigações para refinar a sensibilidade e a especificidade dos biomarcadores salivares, desenvolver dispositivos de diagnóstico portáteis e de baixo custo, e realizar estudos clínicos em grande escala para validar a sua eficácia em diferentes populações. Assim, embora tenham sido realizados progressos significativos, a utilização de biomarcadores salivares para o diagnóstico precoce do cancro oral ainda requer esforços contínuos de investigação e desenvolvimento. No entanto, esta abordagem inovadora oferece um potencial considerável para melhorar a deteção precoce do cancro oral e, assim, contribuir para a redução da mortalidade associada a esta doença.



## 4. Bibliografia

- Abati, S., Bramati, C., Bondi, S., Lissoni, A., & Trimarchi, M. (2020). Oral Cancer and Precancer : A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249160>
- Alim, L. F., Keane, C., & Souza-Fonseca-Guimaraes, F. (2024). Molecular mechanisms of tumour necrosis factor signalling via TNF receptor 1 and TNF receptor 2 in the tumour microenvironment. *Current Opinion in Immunology*, 86, 102409. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102409>
- Amado, F., Lobo, M. J. C., Domingues, P., Duarte, J. A., & Vitorino, R. (2010). Salivary peptidomics. *Expert Review of Proteomics*, 7(5), 709–721. <https://doi.org/10.1586/epr.10.48>
- Azevedo, L. R., De Lima, A. A. S., Machado, M. Â. N., Grégio, A. M. T., & De Almeida, P. D. V. (2008). Saliva Composition and Functions : A Comprehensive Review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 72–80. <https://doi.org/10.5005/jcdp-9-3-72>
- Banavar, G., Ogundijo, O., Julian, C., Toma, R., Camacho, F., Torres, P. J., Hu, L., Chandra, T., Piscitello, A., Kenny, L., Vasani, S., Batstone, M., Dimitrova, N., Vuyisich, M., Amar, S., & Punyadeera, C. (2023). Detecting salivary host and microbiome RNA signature for aiding diagnosis of oral and throat cancer. *Oral Oncology*, 145, 106480. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2023.106480>
- Bennett, J. H., Thomas, G., Evans, A. W., & Speight, P. M. (2000). Osteosarcoma of the jaws : A 30-year retrospective review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 90(3), 323–333. <https://doi.org/10.1067/moe.2000.108274>
- Bisen, P., Khan, Z., & Bundela, S. (2013). *Human papillomavirus Oral cancer Premalignant lesions Squamous cell carcinoma Tobacco consumption 2.1 INTRODUCTION* (p. 49–69).

- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Chiamulera, M. M. A., Zancan, C. B., Remor, A. P., Cordeiro, M. F., Gleber-Netto, F. O., & Baptistella, A. R. (2021). Salivary cytokines as biomarkers of oral cancer : A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 21(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07932-3>
- Cristaldi, M., Mauceri, R., Di Fede, O., Giuliana, G., Campisi, G., & Panzarella, V. (2019). Salivary Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis and Follow-Up : Current Status and Perspectives. *Frontiers in Physiology*, 10, 1476. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01476>
- Dehoux, M. (2012). Évaluation d'un biomarqueur : Caractéristiques biochimiques. In Y.-É. Claessens & P. Ray (Éds.), *Les biomarqueurs en médecine d'urgence : Des données biologiques au lit du malade* (p. 43–51). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0297-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0297-8_6)
- de Waal Malefyt, R., Hans, Y., Roncarolo, M.-G., Spits, H., & de Vries, J. E. (1992). Interleukin-10. *Current Opinion in Immunology*, 4(3), 314–320. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(92\)90082-P](https://doi.org/10.1016/0952-7915(92)90082-P)
- dos Santos, E. S., Ramos, J. C., Roza, A. L. O. C., Mariz, B. A. L. A., & Paes Leme, A. F. (2022). The role of osteopontin in oral cancer : A brief review with emphasis on clinical applications. *Oral Diseases*, 28(2), 326–335. <https://doi.org/10.1111/odi.13716>
- Duerr, J. S. (2006). Immunohistochemistry. In *WormBook : The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*. WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19743/>
- Dziewulska, A., Janiszewska-Olszowska, J., Bachanek, T., & Grocholewicz, K. (2013). Salivary mineral composition in patients with oral cancer. *Magnesium Research*, 26(3), 120–124. <https://doi.org/10.1684/mrh.2013.0346>
- Feller, L., & Lemmer, J. (2012). *Oral Squamous Cell Carcinoma : Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment*. 2012. <https://doi.org/10.4236/jct.2012.34037>

- Feres, M. F. N., Albuini, M. L., de Araújo Castro Santos, R. P., de Almeida-Junior, L. A., Flores-Mir, C., & Roscoe, M. G. (2022). Dentists' awareness and knowledge of evidence-based dentistry principles, methods and practices : A systematic review. *Evidence-Based Dentistry*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41432-022-0821-2>
- Ferrer, R., & Artigas, A. (2011). Physiologic Parameters as Biomarkers : What Can We Learn from Physiologic Variables and Variation? *Critical Care Clinics*, 27(2), 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2010.12.008>
- Ford, P. J., & Farah, C. S. (2013). Early detection and diagnosis of oral cancer : Strategies for improvement. *Journal of Cancer Policy*, 1(1), e2–e7. <https://doi.org/10.1016/j.jcpo.2013.04.002>
- Franco, E. L., Kowalski, L. P., Oliveira, B. V., Curado, M. P., Pereira, R. N., Silva, M. E., Fava, A. S., & Torloni, H. (1989). Risk factors for oral cancer in Brazil : A case-control study. *International Journal of Cancer*, 43(6), 992–1000. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910430607>
- Gawron, A. J., Staub, J., & Bielefeldt, K. (2021). Impact of Health Insurance, Poverty, and Comorbidities on Colorectal Cancer Screening : Insights from the Medical Expenditure Panel Survey. *Digestive Diseases and Sciences*, 66(1), 70–77. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06541-7>
- Ghosh, S., Singh, P., Nambiar, S., Haragannavar, V., Augustine Mds, D., Sv, S., & Rao, R. (2018). Role of salivary biomarkers in the diagnosis of oral cancer : Mini review. *Journal of Medicine, Radiology, Pathology and Surgery*, 5, 7–10. <https://doi.org/10.15713/ins.jmrps.129>
- Gómez, I., Warnakulasuriya, S., Varela-Centelles, P., López-Jornet, P., Suárez-Cunqueiro, M., Diz-Dios, P., & Seoane, J. (2010). Is early diagnosis of oral cancer a feasible objective? Who is to blame for diagnostic delay? *Oral Diseases*, 16(4), 333–342. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01642.x>
- Gorsky, M., Littner, M. M., Sukman, Y., & Begleiter, A. (1994). The prevalence of oral cancer in relation to the ethnic origin of Israeli Jews. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 78(3), 408–411. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(94\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0030-4220(94)90077-9)

- Gorugantula, L. M., Rees, T., Plemons, J., Chen, H.-S., & Cheng, Y.-S. L. (2012). Salivary basic fibroblast growth factor in patients with oral squamous cell carcinoma or oral lichen planus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *114*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.03.013>
- Gupta, N., Gupta, R., Acharya, A. K., Patthi, B., Goud, V., Reddy, S., Garg, A., & Singla, A. (2016). Changing Trends in oral cancer—A global scenario. *Nepal Journal of Epidemiology*, *6*(4), 613–619. <https://doi.org/10.3126/nje.v6i4.17255>
- Gupta, P., & Ray, C. (2004). Epidemiology of Betel Quid Usage. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, *33*(4 Suppl), 31S–36S. <https://doi.org/10.47102/annals-acadmedsg.V33N4p31S>
- Handschel, J., Naujoks, C., Depprich, R. A., Kübler, N. R., Kröpil, P., Kuhlemann, J., Jansen, T. M., Boeck, I., & Sproll, K. C. (2012). CT-scan is a valuable tool to detect mandibular involvement in oral cancer patients. *Oral Oncology*, *48*(4), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.11.009>
- Hébert, C. A., & Baker, J. B. (1993). Interleukin-8 : A Review. *Cancer Investigation*. <https://doi.org/10.3109/07357909309046949>
- Hewitson, P., Glasziou, P., Watson, E., Towler, B., & Irwig, L. (2008). Cochrane Systematic Review of Colorectal Cancer Screening Using the Fecal Occult Blood Test (Hemoccult) : An Update. *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, *103*(6), 1541.
- Hicks, M. J., & Flaitz, C. M. (2000). Oral mucosal melanoma : Epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology*, *36*(2), 152–169. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(99\)00085-8](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(99)00085-8)
- Hofman, L. F. (2001). Human Saliva as a Diagnostic Specimen. *The Journal of Nutrition*, *131*(5), 1621S–1625S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1621S>
- Huang, B., Lang, X., & Li, X. (2022). The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers. *Frontiers in Oncology*, *12*, 1023177. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1023177>

- Idris, A., Ghazali, N. B., & Koh, D. (2015). Interleukin 1 $\beta$ —A Potential Salivary Biomarker for Cancer Progression? *Biomarkers in Cancer*, 7, BIC.S25375. <https://doi.org/10.4137/BIC.S25375>
- Iglesias-Velázquez, Ó., López-Pintor, R. M., González-Serrano, J., Casañas, E., Torres, J., & Hernández, G. (2022). Salivary LDH in oral cancer and potentially malignant disorders : A systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases*, 28(1), 44–56. <https://doi.org/10.1111/odi.13630>
- Interleukin-8 : A Review : Cancer Investigation : Vol 11, No 6.* (s. d.). Consulté 13 août 2024, à l'adresse <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07357909309046949>
- Isola, G., Lo Giudice, A., Polizzi, A., Alibrandi, A., Murabito, P., & Indelicato, F. (2021). Identification of the different salivary Interleukin-6 profiles in patients with periodontitis : A cross-sectional study. *Archives of Oral Biology*, 122, 104997. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104997>
- Jarczak, D., & Nierhaus, A. (2022). Cytokine Storm—Definition, Causes, and Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms231911740>
- Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology.* (s. d.). Consulté 15 août 2024, à l'adresse [https://journals.lww.com/aomr/abstract/2005/17040/The\\_Role\\_of\\_P53\\_in\\_Oral\\_Cancer\\_\\_\\_A\\_Review.4.aspx](https://journals.lww.com/aomr/abstract/2005/17040/The_Role_of_P53_in_Oral_Cancer___A_Review.4.aspx)
- Katakura, A., Kamiyama, I., Takano, N., Shibahara, T., Muramatsu, T., Ishihara, K., Takagi, R., & Shouno, T. (2007). Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy Subjects. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 48(4), 199–203. <https://doi.org/10.2209/tdcpublishation.48.199>
- Kaur, J., Jacobs, R., Huang, Y., Salvo, N., & Politis, C. (2018). Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening : A review. *Clinical Oral Investigations*, 22(2), 633–640. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2337-x>
- Khurshid, Z., Zafar, M. S., Khan, R. S., Najeeb, S., Slowey, P. D., & Rehman, I. U. (2018). Chapter Two—Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. In G. S.

Makowski (Éd.), *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 86, p. 23–70). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.05.002>

Ko, Y.-C., Huang, Y.-L., Lee, C.-H., Chen, M.-J., Lin, L.-M., & Tsai, C.-C. (1995). Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 24(10), 450–453. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1995.tb01132.x>

Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 5(10), 588–599. <https://doi.org/10.1038/ncponc1187>

*La PCR en temps réel : Principes et applications.* (s. d.).

Lee, C.-H., Chang, J. S.-M., Syu, S.-H., Wong, T.-S., Chan, J. Y.-W., Tang, Y.-C., Yang, Z.-P., Yang, W.-C., Chen, C.-T., Lu, S.-C., Tang, P.-H., Yang, T.-C., Chu, P.-Y., Hsiao, J.-R., & Liu, K.-J. (2015). IL-1 $\beta$  Promotes Malignant Transformation and Tumor Aggressiveness in Oral Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 230(4), 875–884. <https://doi.org/10.1002/jcp.24816>

Liao, P. H., Chang, Y. C., Huang, M. F., Tai, K. W., & Chou, M. Y. (2000). Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, 36(3), 272–276. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(00\)00005-1](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(00)00005-1)

Lin, W.-J., Jiang, R.-S., Wu, S.-H., Chen, F.-J., & Liu, S.-A. (2011). Smoking, Alcohol, and Betel Quid and Oral Cancer : A Prospective Cohort Study. *Journal of Oncology*, 2011(1), 525976. <https://doi.org/10.1155/2011/525976>

Liu, J., & Duan, Y. (2012). Saliva : A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*, 48(7), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.01.021>

Liu, P., Wang, Y., Li, X., Liu, Z., Sun, Y., Liu, H., Shao, Z., Jiang, E., Zhou, X., & Shang, Z. (2023). Enhanced lipid biosynthesis in OSCC cancer associated fibroblasts contributes to tumor progression : Role of IL8/AKT/p-ACLY axis. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3376754/v1>

- Mager, D. L., Haffajee, A. D., Devlin, P. M., Norris, C. M., Posner, M. R., & Goodson, J. M. (2005). The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer : A descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *Journal of Translational Medicine*, 3, 27. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-27>
- McLeod, N. M. H., Saeed, N. R., & Ali, E. A. (2005). Oral cancer : Delays in referral and diagnosis persist. *British Dental Journal*, 198(11), 681–684. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4812381>
- Mercadante, V., Paderni, C., & Campisi, G. (2012). Novel non-invasive Adjunctive Techniques for Early Oral Cancer Diagnosis and Oral Lesions Examination. *Current Pharmaceutical Design*, 18(34), 5442–5451. <https://doi.org/10.2174/138161212803307626>
- Monea, M., & Pop, A. M. (2022). The Use of Salivary Levels of Matrix Metalloproteinases as an Adjuvant Method in the Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma : A Narrative Literature Review. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/cimb44120430>
- Murgod, V., Angadi, P., Hallikerimath, S., Kale, A., & Hebbal, M. (2011). Attitudes of general dental practitioners towards biopsy procedures. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 3, e418–e423. <https://doi.org/10.4317/jced.3.e418>
- Muscat, J. E., Richie, J. P., Thompson, S., & Wynder, E. L. (1996). Gender differences in smoking and risk for oral cancer. *Cancer Research*, 56(22), 5192–5197.
- Nicod, L. P. (1993). Cytokines. 1. Overview. *Thorax*, 48(6), 660–667.
- Panneer Selvam, N., & Sadaksharam, J. (2015). Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 11(3), 236–241. <https://doi.org/10.1111/ajco.12330>
- Paré, A., & Joly, A. (2017). Cancers de la cavité buccale : Facteurs de risque et prise en charge. *La Presse Médicale*, 46(3), 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.004>

- Petti, S., & Scully, C. (2005). Oral cancer : The association between nation-based alcohol-drinking profiles and oral cancer mortality. *Oral Oncology*, *41*(8), 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.04.004>
- Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J., & Indrak, K. (2009). SALIVA AS A DIAGNOSTIC MEDIUM. *Biomedical Papers*, *153*(2), 103–110. <https://doi.org/10.5507/bp.2009.017>
- Poornima, C., Agnihotri, P. G., Rajan, S. Y., Padmavathi, B. N., & Guruprasad, R. (2005). The Role of P53 in Oral Cancer—A Review. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, *17*(4), 153.
- Pöschl, G., & Seitz, H. K. (2004). ALCOHOL AND CANCER. *Alcohol and Alcoholism*, *39*(3), 155–165. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh057>
- Ptolemy, A. S., & Rifai, N. (2010). What is a biomarker? Research investments and lack of clinical integration necessitate a review of biomarker terminology and validation schema. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *70*(sup242), 6–14. <https://doi.org/10.3109/00365513.2010.493354>
- Ramos, M., Llagostera, M., Esteva, M., Cabeza, E., Cantero, X., Segarra, M., Martín-Rabadán, M., Artigues, G., Torrent, M., Taltavull, J. M., Vanrell, J. M., Marzo, M., & Llobera, J. (2011). Knowledge and attitudes of primary healthcare patients regarding population-based screening for colorectal cancer. *BMC Cancer*, *11*(1), 408. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-408>
- Sahibzada, H. A., Khurshid, Z., Khan, R. S., Naseem, M., Siddique, K. M., Mali, M., & Zafar, M. S. (2017). Salivary IL-8, IL-6 and TNF- $\alpha$  as Potential Diagnostic Biomarkers for Oral Cancer. *Diagnostics*, *7*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7020021>
- Saka-Herrán, C., Jané-Salas, E., Mari-Roig, A., Estrugo-Devesa, A., & López-López, J. (2021). Time-to-Treatment in Oral Cancer : Causes and Implications for Survival. *Cancers*, *13*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cancers13061321>

- Santosh, A. B. R., Jones, T., & Harvey, J. (2016). A review on oral cancer biomarkers : Understanding the past and learning from the present. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(2), 486. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.176414>
- Sarode, S. C., Sarode, G. S., & Sharma, N. (2023). Outdoor air pollution and oral cancer : Critical viewpoints and future prospects. *Future Oncology*, 19(6), 409–411. <https://doi.org/10.2217/fon-2022-0986>
- Scully, C., Bagan, J. V., Hopper, C., & Epstein, J. B. (2008). Oral cancer : Current and future diagnostic techniques. *American Journal of Dentistry*, 21(4).
- Sex Differences in Risk Factors for Oral and Pharyngeal Cancer among Puerto Rican Adults—PMC*. (s. d.). Consulté 7 août 2024, à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8341047/>
- Seyedmajidi, S., Seyedmajidi, M., Foroughi, R., Zahedpasha, A., Saravi, Z. Z., Pourbagher, R., Bijani, A., Motallebnejad, M., Shabestani, A. M., & Mostafazadeh, A. (2018). Comparison of Salivary and Serum Soluble CD44 Levels between Patients with Oral SCC and Healthy Controls. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 19(11), 3059–3063. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3059>
- Shadid, R. M., Abu Ali, M. A., & Kujan, O. (2022). Knowledge, attitudes, and practices of oral cancer prevention among dental students and interns : An online cross-sectional questionnaire in Palestine. *BMC Oral Health*, 22, 381. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02415-8>
- Shah, F. D., Begum, R., Vajaria, B. N., Patel, K. R., Patel, J. B., Shukla, S. N., & Patel, P. S. (2011). A Review on Salivary Genomics and Proteomics Biomarkers in Oral Cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(4), 326–334. <https://doi.org/10.1007/s12291-011-0149-8>
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : The basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 77(7), C98–C101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>

- Shpitzer, T., Bahar, G., Feinmesser, R., & Nagler, R. M. (2007). A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *133*(9), 613–617. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0207-z>
- Shpitzer, T., Hamzany, Y., Bahar, G., Feinmesser, R., Savulescu, D., Borovoi, I., Gavish, M., & Nagler, R. M. (2009). Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *British Journal of Cancer*, *101*(7), 1194–1198. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605290>
- Simonin, J., Salquebre, G., Cirimele, V., & Kintz, P. (2007). Criblage de 4 classes de stupéfiants dans la salive par LC-MS/MS. *Annales de Toxicologie Analytique*, *19*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1051/ata:2007019>
- Song, M., & Kellum, J. A. (2005). Interleukin-6. *Critical Care Medicine*, *33*(12), S463. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186784.62662.A1>
- Spallek, H., Song, M., Polk, D. E., Bekhuis, T., Frantsve-Hawley, J., & Aravamudhan, K. (2010). Barriers to Implementing Evidence-Based Clinical Guidelines : A Survey of Early Adopters. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, *10*(4), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2010.05.013>
- Spiro, R. H., & Lim, D. T. H. (2003). Malignant Tumors of Salivary Glands. In T. J. Saclarides, K. W. Millikan, & C. V. Godellas (Éds.), *Surgical Oncology : An Algorithmic Approach* (p. 62–71). Springer. [https://doi.org/10.1007/0-387-21701-0\\_9](https://doi.org/10.1007/0-387-21701-0_9)
- Sridharan, G. (2022). Salivary Oxidative Stress Biomarkers in Oral Potentially Malignant Disorders and Squamous Cell Carcinoma. In S. Chakraborti, B. K. Ray, & S. Roychoudhury (Éds.), *Handbook of Oxidative Stress in Cancer : Mechanistic Aspects* (p. 373–381). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-9411-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-981-15-9411-3_30)
- Thierry, A. R., & Tanos, R. (2018). La biopsie liquide—Une voie possible pour le dépistage du cancer. *médecine/sciences*, *34*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018208>
- Thomas, G., Lewis, M., & Speight, P. (1999). Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncology*, *35*(3), 227–233. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(99)00004-4)

- Vairaktaris, E., Yapijakis, C., Serefoglou, Z., Derka, S., Vassiliou, S., Nkenke, E., Vylliotis, A., Spyridonidou, S., Neukam, F. W., Schlegel, K. A., & Patsouris, E. (2008). The Interleukin-10 (-1082A/G) Polymorphism is Strongly Associated with Increased Risk for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research*, 28(1A), 309–314.
- Vander Schaaf, N. A., Fund, A. J., Munnich, B. V., Zastrow, A. L., Fund, E. E., Senti, T. L., Lynn, A. F., Kane, J. J., Love, J. L., Long, G. J., Troendle, N. J., & Sharda, D. R. (2021). Routine, Cost-Effective SARS-CoV-2 Surveillance Testing Using Pooled Saliva Limits Viral Spread on a Residential College Campus. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e01089-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01089-21>
- Wade, J., Smith, H., Hankins, M., & Llewellyn, C. (2010). Conducting oral examinations for cancer in general practice : What are the barriers? *Family Practice*, 27(1), 77–84. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmp064>
- Wang, H., Luo, Q., Feng, X., Zhang, R., Li, J., & Chen, F. (2018). NLRP3 promotes tumor growth and metastasis in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 18(1), 500. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4403-9>
- Wang, X., Kaczor-Urbanowicz, K. E., & Wong, D. T. W. (2016). Salivary biomarkers in cancer detection. *Medical Oncology*, 34(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0863-4>
- Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 45(4), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>
- Warner, E. (2011). Breast-Cancer Screening. *New England Journal of Medicine*, 365(11), 1025–1032. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1101540>
- Weibel, L. (2003). Recommandations méthodologiques préalables à l'utilisation du cortisol salivaire comme marqueur biologique de stress. *Presse Medicale*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Recommandations-m%C3%A9thodologiques-pr%C3%A9alables-%C3%A0-du-de-Weibel/1001c5048a429785a9246d3ee7902c5eb0f46c21>
- Wong, D. T. (2006). Towards a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer. : ‘Oral fluid (saliva), which is the mirror of the body, is a perfect medium to be

explored for health and disease surveillance.’ *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 6(3), 267–272. <https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.267>

Yan, L., Chen, F., He, B., Liu, F., Liu, F., Huang, J., Wu, J., Lin, L., Qiu, Y., & Cai, L. (2017). A novel environmental exposure index and its interaction with familial susceptibility on oral cancer in non-smokers and non-drinkers : A case–control study. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 274(4), 1945–1950. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4427-1>

Zhang, X., & Hwang, Y. S. (2019). Cancer–associated fibroblast stimulates cancer cell invasion in an interleukin–1 receptor (IL–1R)–dependent manner. *Oncology Letters*, 18(5), 4645–4650. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10784>

Zhao, M., Rosenbaum, E., Carvalho, A. L., Koch, W., Jiang, W., Sidransky, D., & Califano, J. (2005). Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 117(4), 605–610. <https://doi.org/10.1002/ijc.21216>