



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA



MARIA LUIZA BARBOSA

BIÓPSIA LÍQUIDA E O CÂNCER BUCAL

CURITIBA
2021



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA



MARIA LUIZA BARBOSA

BIÓPSIA LÓQUIDA E O CÂNCER BUCAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Amenábar.

CURITIBA
2021

RESUMO

O câncer de boca é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, entre os anos 2020-2022, o Brasil terá uma incidência de 15.210 novos casos. De todos os tipos de cânceres existentes na cavidade oral, aproximadamente 90% são Carcinomas de Células Escamosas (CEC). A taxa de mortalidade é alta, mas quando diagnosticado em sua fase inicial, as chances de sobrevida são maiores. A inspeção visual junto com a biópsia de tecido são padrão ouro no diagnóstico de câncer bucal, porém, nos estágios iniciais, as lesões não são visíveis à olho nu. Por essa razão, a biópsia líquida está surgindo como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce de pacientes e consiste em retirar amostras de fluidos corporais para a detecção de indicadores tumorais presentes no organismo do indivíduo. Esses indicadores, quando coletados, podem mostrar uma recorrência da doença já tratada, progressão da doença ou indicar se o tratamento proposto ao paciente está dando resultado. A utilização de biópsia líquida em pacientes com câncer ainda está em debate e suas implicações clínicas podem variar dependendo de alguns fatores do indivíduo, o que torna uma prática clínica ainda questionável entre os profissionais. O objetivo dessa revisão de literatura é discorrer sobre o uso de biópsia líquida em pacientes com Câncer Bucal, suas vantagens e desvantagens em relação à biópsias convencionais, sua eficácia na detecção dos marcadores tumorais e sua relevância no diagnóstico de câncer de boca.

Palavras-chave: Câncer bucal. Biópsia líquida. Biomarcadores.

ABSTRACT

Oral cancer is the sixth most common malignant neoplasm in the world. According to the National Cancer Institute, between 2020-2022, Brazil will have an incidence of 15.210 new cases. Of all types of cancer existing in the oral cavity, nearly 90% are Squamous Cell Carcinomas (SSC). The mortality rate is high, but when diagnosed at an early stage, the chances of survival are higher. Visual inspection combined with tissue biopsy is the gold standard in diagnosing oral cancer. However, in the early stages, the injuries are not visible to the human eye. For this reason, liquid biopsy is emerging as an additional tool in the early diagnosis of patients. It consists of taking body fluids samples to detect tumor biomarkers that may be present in the body. These biomarkers, when collected, can indicate a recurrence of the disease already treated, disease progression, or whether the treatment proposed to the patient is getting results. The use of liquid biopsy in cancer patients is still under debate. Its clinical implications could vary depending on some factors of the patient, which makes a clinical practice still questionable among professionals. This literature review aims to discuss the use of liquid biopsy in patients with oral cancer, its advantages and disadvantages compared to conventional biopsies, its effectiveness in detecting tumor indicators, and its relevance in diagnosing oral cancer.

Keywords: Oral cancer. Liquid biopsy. Biomarkers.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo que mais de 90% dos casos são carcinomas de células escamosas (CEC).^{1,2} Segundo o Instituto Nacional do Câncer, entre os anos 2020-2022, o Brasil terá uma incidência de 15.210 novos casos.³ A etiologia dessa doença é multifatorial e os fatores de risco que podem aumentar as chances do aparecimento do câncer de boca são tabagismo, o uso de bebidas alcoólicas, o papiloma vírus humano (HPV), pesticidas, presença de lesões com potencial de transformação maligna (leucoplasia, eritoplasia), exposição à luz solar (somente nos casos de câncer na mucosa labial), imunidade baixa, dieta com deficiência de nutrientes, predisposição genética e a exposição à radiação.⁴ O CEC pode acometer qualquer indivíduo e em qualquer faixa etária, porém é mais prevalente em homens na quinta década de vida e essa incidência aumenta ainda mais quando há presença de algum hábito que favoreça o desenvolvimento da doença.⁵

Para que uma célula se transforme em uma célula tumoral, ela precisa passar por várias alterações. Este processo, chamado de carcinogênese, é um processo complexo que modifica o ciclo celular, incluindo a etapa de sinalização, crescimento, mobilidade, angiogênese da célula alterada e o controle do novo ciclo celular.⁴ Os principais genes afetados pelas mutações são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Eles estão presentes no genoma humano em estado fisiológico e tem como função, respectivamente, regular o crescimento e diferenciação normais e o crescimento anormal. Quando afetados, perdem a capacidade de controlar o ciclo celular e assim inicia-se o processo de surgimento do câncer.⁶

Atualmente, a inspeção visual associada à biópsia aberta de parte da lesão para o estudo histológico, é o padrão ouro no diagnóstico de câncer bucal.⁷ Porém, nos estágios iniciais, as lesões são praticamente indolores e na maioria das vezes são imperceptíveis à olho nu, o que leva à uma demora na procura por atendimento médico, dificultando a identificação da doença. O prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas (CEC) vai depender do estágio em que for diagnosticado e quando é identificado nos estágios iniciais, a taxa de cura chega a 80% de chances de pelo menos 5 anos de sobrevida do paciente.⁸ Por esse motivo, o grande desafio da ciência é encontrar métodos que facilitem e auxiliem na detecção da doença em seus estágios iniciais podendo aumentar a sobrevida do paciente a longo prazo.

A biópsia líquida veio ganhando espaço nos últimos anos e pode se tornar uma ferramenta crucial para o diagnóstico nos estágios iniciais do câncer bucal.^{2,4} Esta consiste em coletar, de forma minimamente invasiva, biomarcadores como por exemplo, células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), microRNA (miRNA), proteínas específicas e exossomos que podem ser encontradas em alguns fluidos corporais, como no sangue, na saliva, na urina e no líquido

cefalorraquidiano.^{4,9} Uma das vantagens da biópsia líquida, é que ela permite o rastreamento em tempo real da atividade tumoral, detectando a doença tanto nos estágios iniciais como nos avançados. Além de detectar a doença, os biomarcadores indicam evidências precoces de recorrência ou resistência da doença, dessa forma, podem ser utilizados para auxiliar a equipe médica na escolha terapêutica mais adequada para cada paciente.⁴

Esta revisão fornece conhecimentos gerais sobre o câncer bucal e aborda os conceitos de biópsia líquida e os biomarcadores circulantes mais pesquisados e suas potenciais aplicações clínicas no dia a dia do cirurgião-dentista e no auxílio na detecção do câncer oral e na resposta ao tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER BUCAL

O câncer bucal é uma neoplasia maligna que pode acometer a cavidade oral e o vermelhão dos lábios.¹ A cavidade oral é dividida em assoalho da boca, dois terços anteriores da língua, mucosa bucal, superfícies gengivais superiores e inferiores, palato duro, palato mole e trígono retromolar.⁴ Aproximadamente 90% das malignidades que acometem essas regiões são definidas como carcinomas de células escamosas (CEC). A etiologia dessa doença é multifatorial e está associada à alguns fatores de risco, como tabagismo, o consumo de bebidas alcoólicas, exposição à luz solar (somente nos casos de câncer no vermelhão dos lábios), infecção por sífilis, deficiência nutricional de ferro e vitamina A, papiloma vírus humano (HPV), pesticidas, imunossupressão, radiação, pré-disposição hereditária e presença de potenciais lesões orais malignas, principalmente a leucoplasia.^{1,4,10}

O câncer bucal é responsável por 400.000 novos casos a cada ano e é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo. Na última década, essa incidência aumentou significativamente, principalmente no Japão, que sozinho é responsável por 7.000 novos casos por ano, se tornando o país com a maior incidência em comparação com os Estados Unidos e outros países ocidentais.¹¹ O CEC é duas vezes mais prevalente em homens, com mortalidade de 1,7% em comparação com mulheres, que possuem mortalidade de 0,8%.² As chances de desenvolver o câncer na cavidade oral é proporcional ao aumento de idade, porém é mais prevalente em homens na quinta década de vida.^{5,10}

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), entre os anos de 2020-2022 a estimativa de novos casos no Brasil será de 11.200 casos em homens e 4.010 em mulheres. Isso corresponde à 10,70 novos casos a cada 100.000 homens, sendo o quinto mais frequente câncer nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, e o sexto mais frequente nas Regiões Sul e Norte. Já para as mulheres, o câncer oral corresponde à 3,71 novos casos a cada 100.000 mulheres e está em décimo primeiro colocado na Região Nordeste, décimo segundo na Região Norte, décimo terceiro nas Regiões Sudeste e Centro-Oeste e em décimo quarto na Região Sul.³

Quando diagnosticado precocemente, o câncer bucal apresenta um melhor prognóstico comparado aos que são diagnosticados em estágios mais avançados. As lesões iniciais do carcinoma de células escamosas geralmente são indolores ou com dor mínima, o que leva os pacientes a buscar ajuda profissional tardia.¹⁰ Apesar dos novos conhecimentos da ciência sobre o comportamento do câncer e formas de diagnósticos e terapias, a sobrevida de 5 anos de pacientes com câncer bucal é de 50%. Quando o diagnóstico é realizado em estágios iniciais, a taxa de sobrevivência é de 89%, já quando é realizado em estágios tardios, a taxa reduz para 39%.¹² Por essa razão, a necessidade do uso de novos métodos e ferramentas para o diagnóstico precoce do câncer de boca, vem se tornando cada

vez mais urgente. A biópsia líquida está surgindo como uma possível ferramenta para auxiliar nesse diagnóstico precoce.

2.2 BIÓPSIA LÍQUIDA

Atualmente, a biópsia cirúrgica de parte da lesão para estudo histológico, é considerado o procedimento padrão ouro para o diagnóstico de câncer bucal. Porém, é um procedimento invasivo, caro, demorado e muitas vezes limitado, pois faz análise de uma área limitada do tumor que é heterogêneo. Por essas razões, o enfoque em pesquisas sobre métodos diagnósticos menos invasivos e com um detalhamento em tempo real do tumor, vem ganhando espaço na comunidade científica e a biópsia líquida é uma das alternativas que vem sendo pesquisada.⁴

A biópsia líquida procura identificar alterações celulares a nível molecular em tempo real nos diferentes fluidos corporais. As células do corpo humano, em seu estado fisiológico, apresentam um mecanismo preciso de regulação de crescimento. Algumas dessas células podem sofrer mutações genéticas durante a vida e perderem esse controle, acarretando um crescimento exacerbado na produção de novas células, denominado de neoplasia. Essas mutações podem ocorrer em qualquer estágio do crescimento celular e podem ser causadas por mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação de agentes químicos, ambientais, hormonais, radioativos e virais. O acúmulo dessas mutações em ambiente celular potencializa as chances de ocorrer a transformação de uma célula normal para uma célula tumoral.⁶

A carcinogênese é um processo complexo e multifatorial e para que uma célula venha a se tornar uma célula tumoral, o organismo precisa passar por modificações em várias etapas do ciclo celular, como na sinalização, no crescimento, na motilidade, na angiogênese e no controle desse ciclo celular.⁴ A carcinogênese é composta por quatro etapas: a iniciação, onde a célula é exposta à agentes carcinógenos e sofre mutação e formação de clones celulares atípicos; a promoção, onde esses clones celulares formados na etapa anterior começam a se multiplicar. Nessa etapa, se o contato com o agente carcinógeno for suspenso, o processo da carcinogênese pode ser interrompido. A terceira etapa é denominada de progressão e a quarta de conversão maligna. Nelas, as células transformadas adquirem autonomia para se proliferar e invadir tecidos adjacentes pois perdem a coesão e ganham mobilidade.¹³ A angiogênese, processo que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, é outro recurso essencial e adquirido pelas células tumorais para o crescimento contínuo e a sobrevivência das neoplasias. Sem esses novos vasos sanguíneos, as células não iriam receber nutrientes, o que impossibilitaria um crescimento maior do que 2-3 milímetros da lesão.¹⁴

Os principais genes que podem ser afetados por essas mutações são, os genes supressores tumorais e os proto-oncogenes. Eles são encontrados no genoma em estado fisiológico e suas funções

são, respectivamente, regular o crescimento anormal, inibindo-o e regular o crescimento celular e diferenciação normais. Os genes supressores de tumor podem sofrer deleção ou mutação pontual e perder sua função, dessa forma não conseguem mais ter controle sobre o crescimento anormal das células, levando ao surgimento de tumores. Já os proto-oncogenes, quando sofrem alguma mutação, são transformados em oncogenes cujo produto ativo leva à um crescimento descontrolado das células.⁶

A biópsia líquida, então, é um procedimento minimamente invasivo que se baseia na detecção de biomarcadores, como células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), microRNA (miRNA), proteínas específicas e exossomos que estão presentes em alguns fluidos corporais, como por exemplo no sangue, na saliva, na urina, no líquido cefalorraquidiano.^{4,9} Uma das principais vantagens em relação à biópsia de tecido, é que a biópsia líquida consegue fazer um detalhamento molecular do câncer em tempo real e é um procedimento não invasivo ou minimamente invasivo, dependendo de qual fluido for utilizado para a análise.² Além disso, consegue fornecer a carga tumoral, detectando evidências precoces de recorrência ou resistência à doença, sendo assim, uma grande aliada à equipe médica na hora de decidir a conduta terapêutica para o paciente e no acompanhamento da resposta ao tratamento.⁴

Os fluidos corporais mais utilizados nas pesquisas envolvendo a biópsia líquida e diagnóstico de câncer de boca são o sangue e a saliva. A análise da saliva apresenta algumas vantagens em relação à análise do sangue, pois além de ser um fluido de fácil acesso, sua coleta é não invasiva e apresenta melhor relação custo-benefício e risco mínimo de infecção.^{11,15} Por estar em contato direto com os tecidos orais, a saliva constitui uma fonte direta de biomarcadores para a detecção do câncer de boca.¹² Apesar de suas inúmeras vantagens em relação ao sangue, alguns biomarcadores são encontrados com maior frequência na corrente sanguínea, como por exemplo CTCs e ctDNA. A seguir serão apresentados os biomarcadores mais pesquisados que estão presentes no sangue e na saliva.

2.3 BIOMARCADORES MAIS PESQUISADOS

2.3.1 Células Tumorais Circulantes (CTCs)

As células tumorais circulantes (CTCs), são células liberadas na corrente sanguínea pelo tumor primário ou por lesões metastáticas. Elas podem circular sozinhas pela corrente sanguínea ou em conjunto, os denominados clusters. Quando em conjunto, as CTCs têm maior potencial de formar uma metástase. A metástase é o resultado da disseminação de células do tumor na corrente sanguínea que circulam e atingem um novo local, formando um novo tumor. Para que as CTCs circulem na corrente sanguínea, elas devem passar por um processo complexo chamado de “cascata metastática”,

que inclui várias etapas, como a transição epitelial-mesenquimal, o intravasamento, a sobrevivência em um ambiente hostil e o extravasamento em locais distantes onde irá ocorrer a transição mesenquimal-epitelial inversa. A quantidade de CTCs que circulam no sangue geralmente é baixa (aproximadamente 1 CTC por 10^7 glóbulos brancos por mililitro de sangue em pacientes metastáticos), o que dificulta sua identificação e caracterização pois requer exames com maior sensibilidade analítica e especificidade. Apesar de sua presença ser rara na corrente sanguínea, há um grande interesse na identificação e utilidade das CTCs como um biomarcador de câncer.^{4,16}

Acredita-se que as CTCs carregam a heterogeneidade do tumor e que seus níveis aumentados na corrente sanguínea podem expressar características diagnósticas de câncer.² Alguns estudos foram realizados e dentre eles, Nichols et.al. (2012) detectou CTCs na corrente sanguínea em 6 de 15 (40%) pacientes com câncer de cabeça e pescoço e He et.al. (2013) conseguiu detectar em 3 de 9 (33,3%) pacientes com câncer de cabeça e pescoço.^{2,17,18} Segundo Buglione et.al. (2012), a quantidade de CTCs no sangue está diretamente relacionada ao estágio em que o câncer se encontra, portanto, está presente em maior quantidade na corrente sanguínea nos pacientes em estágios mais avançados.^{2,19} Outros estudos realizados por Jatana et. al. (2011) e Gröbe et. al. (2014), correlacionaram a presença de CTCs à maiores chances de recidiva loco-regional e quando presente em maiores quantidades, foi relacionada com um pior prognóstico para o paciente.^{2,20,21} Em um estudo realizado por Bettegowda et. al. (2014), não foi detectada nenhuma presença de CTCs nos cânceres de bexiga, mama e colorretal em estágio inicial, sugerindo que as CTCs provavelmente sejam biomarcadores para prognóstico do que para diagnóstico precoce de câncer.^{2,22}

O baixo número de CTCs presentes na corrente sanguínea torna a detecção desse biomarcador um desafio. Atualmente, apenas uma plataforma foi aprovada pela Food and Drug Administratio (FDA) para realizar essa detecção. Essa plataforma recebe o nome de CellSearch e funciona como um sistema semiautomático padronizado que realiza a seleção positiva de CTCs com base na expressão do marcador epitelial EpCam. A grande limitação desse sistema, é que apenas um terço das CTCs são consideradas positivas em pacientes com câncer metastático.² Para que as CTCs sejam implementadas em nível clínico, é necessário que haja um sistema extremamente sensível para detectar esse biomarcador em todos os pacientes metastáticos.⁴

2.3.2 DNA Tumoral Circulante (ctDNA)

O ctDNA origina-se principalmente de células tumorais apoptóticas ou necróticas e está presente em vários fluidos corporais, incluindo no sangue e na saliva. Ele representa uma pequena porção variável dentro de uma grande porção de cfDNA (DNA livre de células circulantes). Acredita-se que o ctDNA carrega mutações somáticas presentes no tumor primário ou secundário, e dessa

forma, a análise dessas informações genéticas ajudaria em uma melhor precisão diagnóstica.^{2,4} Por ter um tempo de meia-vida relativamente curto no sangue (aproximadamente 114 minutos), é possível realizar o acompanhamento em tempo real da evolução do câncer pela quantificação desse biomarcador. A presença quantitativa de ctDNA foi relacionada à localização do tumor primário e metástase. Maior concentração de ctDNA está ligada à presença de metástase hepática em pacientes com câncer pulmonar avançado e colorretal.²³ Existem vários métodos para a análise de ctDNA, porém o mais utilizado atualmente, tem como tecnologia principal o método PCR. Esse método apresenta alta sensibilidade para detectar mutações pontuais específicas, variações nos números de cópias, indels (inserção ou exclusão de bases no genoma) curtos e fusões gênicas. Dentre essas tecnologias estão, droplet-PCR, sistemas microfluídicos para PCR paralelo e BEAMing.⁴

Em um estudo realizado por Bettegowda et al. (2014), foi analisado ctDNA em pacientes com câncer de mama, gastroesofágico, pancreático e colorretal e descobriram que a taxa de ctDNA presente foi diretamente proporcional ao estágio em que o câncer estava, com taxas de 55% para pacientes em estágio II, 69% em estágio III e de 82% em estágio IV. Importante ressaltar que ctDNA foi encontrado em pacientes com estágios iniciais em uma taxa de 47%, o que indica que pode ser um biomarcador importante para auxiliar no diagnóstico precoce de câncer.^{2,22} Em estudo de prova de princípio feito por Wang et al. (2015), foram analisados amostras de plasma e saliva de 93 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, sendo que 20 deles estavam em estágio inicial. Essas amostras foram selecionadas para mutações somáticas e papiloma vírus humano (HPV) e foi observado que o ctDNA plasmático mostrou ser um biomarcador mais sensível do que ctDNA salivar para câncer localizado na orofaringe, hipofaringe e laringe. Já o ctDNA salivar, mostrou-se mais sensível para o câncer oral. Quando saliva e plasma foram analisados em conjunto, a taxa de sensibilidade foi de 96% independentemente da localização em que o tumor estava.^{2,24} O ctDNA pode ser utilizado para monitorar a resposta ao tratamento. Em estudo realizado por Thress et al. (2015), houve uma redução nos níveis de ctDNA em pacientes com câncer de pulmão logo após terapia com inibidor de tirosina quinase (TKI), indicando resposta precoce ao tratamento utilizado.^{2,25} Reinert et al. (2016) analisaram ctDNA para monitorar doença residual mínima (MRD) após cirurgia.^{2,26} Em estudo prospectivo realizado por Tie et al. (2016), foram analisados 230 pacientes com câncer colorretal e observaram que a sobrevida livre de recidiva em 3 anos após cirurgia foi de 90% em pacientes ctDNA-negativos e de 0% para pacientes ctDNA-positivos.^{2,27}

O ctDNA é um biomarcador que apresenta bastantes aplicações clínicas, porém ainda existem alguns desafios e problemas a serem enfrentados antes de ser utilizado em hospitais e no dia a dia clínico no auxílio ao diagnóstico precoce de câncer, monitoramento da resposta ao tratamento e de doença residual mínima (MDR) e na predição de metástases. Apesar dos níveis de ctDNA serem diretamente proporcional ao estágio e ao tamanho do tumor, a sua concentração no sangue continua

sendo baixa, o que dificulta sua detecção na corrente sanguínea. Por essa razão torna-se necessário a utilização de métodos altamente sensíveis. Outro problema a ser enfrentado é que os tumores possuem uma grande heterogeneidade e evolução e dessa forma seriam necessários ensaios multiplexadas para analisar as mutações simultaneamente. Atualmente, vários métodos para análise de níveis de ctDNA foram elaborados, porém ainda há necessidade do desenvolvimento de um método padronizado e com menor custo de análise.^{2,4,23, 28}

2.3.3 Exossomos

Os exossomos são vesículas extracelulares (EV) que possuem um diâmetro entre 40-150 nm e presença de uma membrana de bicamada lipídica.⁴ As EVs podem ser encontradas em vários fluidos corporais como no sangue, na saliva, no líquido cefalorraquidiano, na urina, na bile, no leite materno, no sêmen.²⁹ A estrutura e a carga dos exossomos estão relacionadas com a célula original e os componentes internos incluem proteínas, lipídeos, DNA, RNA e microRNAs (miRNAs).³⁰ Os exossomos possuem um importante papel em diferentes estágios do câncer e contribuem para alguns processos de progressão da doença. Os exossomos derivados de células tumorais carregam o material genético dessa célula e podem transferir esse material para outra célula receptora, alterando a expressão gênica nesse ambiente. Foi observado em um vitrostudo uma alta proliferação de células quando expostas à exossomos derivados do tumor, o que fortalece a ideia de que essa vesícula tem influência na proliferação do câncer. Eles também induzem a angiogênese, invasão tecidual e metástase. Apesar de ter grande correlação com o desenvolvimento do tumor, recentemente descobriram que pode também ser usado como um importante biomarcador para diagnóstico e prognóstico de câncer usando a biópsia líquida.²⁹

2.3.4 MicroRNAs (miRNAs)

Dentre os componentes dos exossomos, os miRNAs são os constituintes com maior relevância para o diagnóstico de câncer, pois são reguladores de oncogênese e genes supressores de tumor, além disso, os perfis de miRNA em exossomos plasmáticos estão relacionados com as células tumorais de origem.² Em estudo feito por Summerer et al. (2015), foi observado que maiores expressões de miR-142, miR-186, miR-195, miR-347b e miR-547 circulantes estão relacionados com prognóstico de câncer de cabeça e pescoço.^{2,31} Em outros estudos feitos por Lin et al. (2010) e Hsu et al. (2012), constataram níveis maiores de miR-21 e miR-24 no plasma de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.^{2,32,33} Liu et al. (2010) observou uma maior concentração no plasma de miR-31 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e que houve uma queda significativa desses biomarcadores após a ressecção do tumor.^{2,34} Em outro estudo feito por Liu et al. (2013), foram avaliados marcadores

prognósticos de câncer e constataram que o aumento nos níveis de miR-196a no plasma estava associado à uma baixa sobrevida livre de doença.^{11,35} Xu et al. (2016) examinou amostras de soros de 85 pacientes com câncer oral submetidos à quimioterapia após cirurgia e observou que níveis aumentados de miR-483-5p no plasma estão associados a uma sobrevida mais curta, tumores pouco diferenciados, estágios do câncer tardios e metástases em linfonodos. Esses achados demonstram a importância dos miRNAs circulantes para fornecer informações sobre o curso da doença nos pacientes e sobre chances de recidiva após intervenção terapêutica.^{11,36}

Os miRNAs de células circulantes também estão presentes na saliva e foram descobertos pela primeira vez por Park et al. (2009).^{2,9} Os miRNAs salivares estão envoltos por exossomos, o que os tornam resistentes à degradação por RNases. Além disso, o tempo de degradação é mais lento e gradual, contribuindo para uma maior estabilidade e facilidade na detecção desse biomarcador.² Em estudo realizado por Zlotogorski-Hurvitz et al. (2016), foram analisadas as expressões de três marcadores exossômicos, o CD9, CD81 e CD63 presentes na saliva de pacientes saudáveis e com câncer de cabeça e pescoço. Os resultados mostraram uma maior expressão de CD63 e menor de CD9 e CD81 entre os pacientes com câncer de cabeça e pescoço e saudáveis. Em análise de rastreamento feita em nanopartículas, demonstrou que há maior quantidade de partículas em pacientes com câncer de boca se comparado com indivíduos saudáveis. Analisando morfologicamente essas nanopartículas, percebeu-se que o tamanho modal médio dessas partículas é significativamente maior em pacientes com câncer oral em relação a indivíduos saudáveis.^{4,37}

Os estudos mostram a relevância dos exossomos e miRNAs como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de câncer oral. No entanto, ainda existem alguns desafios a serem enfrentados antes que essa ferramenta seja viável e possa ser utilizada no dia a dia clínico. Os mecanismos de funcionalidade dos exossomos e dos miRNAs ainda não são totalmente conhecidos pela comunidade científica, o que realça a necessidade de mais estudos nessa área para elucidar os mecanismos de biogênese e a heterogeneidade desses biomarcadores. Outro problema a ser enfrentado é a necessidade de padronização e otimização da coleta de fluidos (sangue/saliva), do isolamento e da quantificação dos exossomos e miRNAs para a obtenção de amostras mais consistentes e livres de outras vesículas extracelulares e contaminantes celulares.^{4,12,38}

2.3.5 Proteínas

Em estudo realizado por Chen et al. (2017), descobriram que 25 de 56 proteínas salivares eram diferentes em pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral e indivíduos saudáveis do grupo controle.^{15,39} Em outro estudo realizado por Krapfenbauer et al. (2014), foram identificadas 25 proteínas específicas para câncer de cabeça e pescoço e com esses resultados,

recomendaram como potenciais biomarcadores salivares para câncer bucal. Dentre essas 25 proteínas, 12 delas nunca tinham sido mencionadas anteriormente, são elas: proteínasgalectina-7, cofilina, creatina quinase, queratina tipo II, precursor de CRP, cadeia m, proteína de ligação de ácido graxo, cadeia leve de miosina 2 e 3, nucleosídeo difosfato quinase A, fosfoglicerato mutase 1, placoglobina e proteína de ligação de ácido retinóico II. Acredita-se que as proteínas de resposta da fase aguda possuem papel importante no microambiente tumoral.^{15,40} Jessie et al. (2013), detectaram a presença de HAP β , AAT α , complemento-C3 (C3), hemopexina (HPX), serotransferina, transtirretina (TTR), e fibrinogênio β (FIB β) na saliva de pacientes com carcinoma de células escamosas (CEC) e indicaram que a expressão aumentada dessas proteínas eram potenciais biomarcadores para a detecção precoce de CEC.^{15,41} A resistina (RETN) é um hormônio peptídico derivado do tecido adiposo que foi recentemente recomendado como um potencial biomarcador salivar para diagnóstico precoce e estimativa de prognóstico de CEC. Inicialmente, foi demonstrado como um hormônio endócrino e mais tarde relacionado com a diabetes mellitus tipo II, inflamação e doenças cardíacas.¹⁵ Em estudo realizado por Wu et al. (2015), descobriram que o aumento de RETN na saliva estava relacionado com estágio avançado de CEC.^{15,42} Outro estudo realizado por Metgud e Patel (2014), comprovaram que espécies reativas de oxigênio estão relacionadas na gênese e promoção do câncer oral e o aumento da expressão de albumina salivar está relacionada no aumento significativo de casos de pré-câncer oral e câncer oral, pois ela faz parte do sistema de defesa antioxidante compensatório. Esse resultado pressupõe que a albumina pode ser um importante biomarcador no diagnóstico e prognóstico de doenças orais pré-malignas e malignas.^{15,43}

A citocina mais estudada em pacientes com câncer de cabeça e pescoço é a Interleucina-6 (IL-6), ela é uma das principais interleucinas presentes no microambiente tumoral. A expressão de IL-6 na saliva é maior em pacientes mais idosos em comparação à pacientes mais jovens. Fumantes também apresentam maiores níveis de Interleucina-6 na saliva do que não fumantes.⁴⁴ Em estudo realizado por Selvam et al. (2015), descobriram que os níveis de IL-6 na saliva de pacientes com CEC são maiores do que em pacientes com lesões pré-malignas (leucoplasia). A diferença de níveis de expressão entre essas duas lesões pode indicar a progressão de uma lesão pré-maligna para maligna.^{44,45} Em estudo realizado por Sato et al. (2015), foi relatado que após 24 meses de tratamento, os níveis de IL-6 eram mais elevados em pacientes com recorrência loco-regional do que os que não tiveram recorrência, o que aponta que a IL-6 pode ser um biomarcador para diagnóstico de recorrência loco-regional.^{44,46}

3 CONCLUSÃO

A biópsia líquida surgiu da necessidade de novos métodos de coleta que fossem menos invasivos e de fácil acesso para realizar o diagnóstico precoce e monitoramento em tempo real do tumor. A análise de biomarcadores para o câncer de boca, como CTCs, ctDNA, exossomos, miRNAs e algumas proteínas representa um grande avanço para a detecção precoce do câncer, monitoramento da resposta ao tratamento, chances de recidiva e formação de metástases. As CTCs estão presente em maior quantidade na corrente sanguínea de pacientes em estágios mais avançados do câncer, portanto não é indicado como biomarcador para diagnóstico precoce e sim de prognóstico da doença. Maiores quantidades de CTCs também foram relacionadas a maiores chances de recidiva da doença. Diferentemente das CTCs, o ctDNA foi encontrado em valores significativos nos pacientes em estágios iniciais, o que indica ser um biomarcador de diagnóstico precoce. O ctDNA também mostrou resultados significativos para monitorar resposta ao tratamento, já que houve diminuição de sua concentração após a terapia. Os miRNAs são os componentes dos exossomos com maior relevância para potencial biomarcador de câncer de boca. Os níveis de miRNA foram significativamente menores após o tratamento com ressecção do tumor e o aumento de sua concentração foi relacionado com menores chances de sobrevida livre de doença, indicando seu potencial como biomarcador de monitoramento da resposta ao tratamento e de chances de recidiva da doença. Houve aumento nos níveis de algumas proteínas presentes na saliva, indicando possíveis biomarcadores de câncer de boca, entre elas estão a Interleucina-6 (IL-6), proteínas de resposta da fase aguda, 25 proteínas exclusivas de pacientes com câncer de boca, a resistina e a albumina.

Apesar de ser um assunto que vem ganhando espaço na comunidade científica, o uso da biópsia líquida para detecção do câncer de boca ainda é um assunto recente e há necessidade de mais estudos sobre os biomarcadores e suas aplicações clínicas. Outra dificuldade a ser enfrentada antes de implementar essa ferramenta no dia a dia clínico, será a padronização no processo de coleta e análise desses biomarcadores, já que ainda não existem protocolos para tal conduta.

REFERÊNCIAS

1. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884-11894.
2. Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *J Dent Res*. 2018;97(6):701-708.
3. INCA – Instituto Nacional do Câncer, 2020. Estimativa 2020 – câncer oral. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>>. Acesso em: 02 de set. de 2021.
4. Lousada-Fernandez F, Rapado-Gonzalez O, Lopez-Cedrun JL, Lopez-Lopez R, Muínelo-Romay L, Suarez-Cunqueiro MM. Liquid Biopsy in Oral Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1704.
5. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):491-508.
6. Amorim A. A Genética do Câncer. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília. Brasília, p. 42. 2002.
7. Song X, Yang X, Narayanan R, Shankar V, Ethiraj S, Wang X, Duan N, Ni YH, Hu Q, Zare RN. Oral squamous cell carcinoma diagnosed from saliva metabolic profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(28):16167-16173.
8. van der Waal I, de Bree R, Brakenhoff R, Coebergh JW. Early diagnosis in primary oral cancer: is it possible? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(3):e300-e305.
9. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5473-5477.
10. NEVILLE; et.al. Patologia oral e Maxilofacil. Tradução 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 410-423.
11. Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K, et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Sci Rep*. 2016;6:31520.
12. Rapado-González Ó, López-López R, López-Cedrún JL, Triana-Martínez G, Muínelo-Romay L, Suárez-Cunqueiro MM. Cell-Free microRNAs as Potential Oral Cancer Biomarkers: From Diagnosis to Therapy. *Cells*. 2019;8(12):1653.
13. Silva AE, Serakides R, Cassali GD. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*. 2004;34(2):625-633.
14. Hasina R, Lingen MW. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ*. 2001;65(11):1282-1290.
15. Li Q, Ouyang X, Chen J, Zhang P, Feng Y. A Review on Salivary Proteomics for Oral Cancer Screening. *Curr Issues Mol Biol*. 2020;37:47-56.
16. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*. 2017;16(1):80.

17. Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC, Basmaji J, Dhaliwal S, Chapeskie C, Todorovic B, Read N, Venkatesan V, Hammond A, et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck*. 2012;34(10):1440–1444.
18. He S, Li P, Long T, Zhang N, Fang J, Yu Z. Detection of circulating tumour cells with the CellSearch system in patients with advanced-stage head and neck cancer: preliminary results. *J Laryngol Otol*. 2013;127(8):788–793.
19. Buglione M, Grisanti S, Almici C, Mangoni M, Polli C, Consoli F, Verardi R, Costa L, Paiar F, Pasinetti N, et al. Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer*. 2012;48(16):3019–3026.
20. Jatana KR, Lang JC, Chalmers JJ. Identification of circulating tumor cells: a prognostic marker in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Future Oncol*. 2011;7(4):481–484.
21. Gröbe A, Blessmann M, Hanken H, Friedrich RE, Schon G, Wikner J, Effenberger KE, Kluwe L, Heiland M, Pantel K, et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(2):425–433.
22. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24.
23. Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol*. 2019;63(6):449-455.
24. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, James N, Rettig EM, Guo T, Pickering CR, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015; 7(293):293ra104.
25. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, Lai Z, Markovets A, Vivancos A, Kuang Y, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*. 2015; 21(6):560–562.
26. Reinert T, Scholer LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, Lamy P, Kannerup AS, Mortensen FV, Stribolt K, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*. 2016; 65(4):625–634.
27. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, Silliman N, Tacey M, Wong HL, Christie M, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016; 8(346):346ra392.
28. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*. 2019;13(1):34.
29. Müller Bark J, Kulasinghe A, Amenábar JM, Punyadeera C. Exosomes in cancer. *Adv Clin Chem*. 2021;101:1-40.
30. Faur CI, Rotaru H, Osan C, et al. Salivary exosomal microRNAs as biomarkers for head and neck cancer detection-a literature review. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2021;43(1):19.

31. Summerer I, Unger K, Braselmann H, Schuettrumpf L, Maihoefer C, Baumeister P, Kirchner T, Niyazi M, Sage E, Specht HM, et al. 2015. Circulating microRNAs as prognostic therapy biomarkers in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*. 113(1):76–82.
32. Lin SC, Liu CJ, Lin JA, Chiang WF, Hung PS, Chang KW. miR-24 upregulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol*. 2010; 46(3):204–208.
33. Hsu CM, Lin PM, Wang YM, Chen ZJ, Lin SF, Yang MY. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2012; 33(6):1933–1942.
34. Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis*. 2010; 16(4):360–364.
35. Liu CJ, Tsai, MM, Tu HF, Lui MT, Cheng HW, Lin SC. miR-196a Overexpression and miR-196a2 gene polymorphism are prognostic predictors of oral carcinomas. *Ann. Surg. Oncol*. 2013; 20:406–414.
36. Xu H, Yang Y, Zhao H., Yang X, Luo Y, Ren Y, Liu W, Li N. Serum miR-483-5p: A novel diagnostic and prognostic biomarker for patients with oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biol*. 2016; 37:447–453.
37. Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: Oral cancer patients versus healthy individuals. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2016; 142:101–110.
38. Junqueira-Neto S, Batista IA, Costa JL, Melo SA. Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytol*. 2019;63(6):479-488.
39. Chen YT, Chen HW, Wu CF, et al. Development of a Multiplexed Liquid Chromatography Multiple-Reaction-Monitoring Mass Spectrometry (LC-MRM/MS) Method for Evaluation of Salivary Proteins as Oral Cancer Biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(5):799-811.
40. Krapfenbauer K, Drucker E, Thurnher D. Identification of tumour-related proteins as potential screening markers by proteome analysis-protein profiles of human saliva as a predictive and prognostic tool. *EPMA J*. 2014;5(1):20.
41. Jessie K, Jayapalan JJ, Ong KC, et al. Aberrant proteins in the saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Electrophoresis*. 2013;34(17):2495-2502.
42. Wu CC, Chu HW, Hsu CW, Chang KP, Liu HP. Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. *Proteomics*. 2015;15(19):3394-3404.
43. Metgud R, Patel S. Serum and salivary levels of albumin as diagnostic tools for oral pre-malignancy and oral malignancy. *Biotech Histochem*. 2014;89(1):8-13.
44. Amenábar JM, Da Silva BM, Punyadeera C. Salivary protein biomarkers for head and neck cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020;20(3):305-313.

45. Panneer Selvam N, Sadaksharam J. Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2015;11(3):236-241.
46. Sato J, Ohuchi M, Wada M, et al. Differences in sequential posttreatment salivary IL-6 levels between patients with and patients without locoregional recurrences of oral squamous cell carcinoma: Part III of a cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120(6):751-60.e2.