

UNIVERSIDADE DE UBERABA

LARISSA GABRIELA NEVES CORTIÇO

LARYSSA SOUTO LOPES

**ESTUDO DO USO DE DIFERENTES TIPOS DE BIOMARCADORES NO
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

UBERABA-MG

2017

LARISSA GABRIELA NEVES CORTIÇO

LARYSSA SOUTO LOPES

**ESTUDO DO USO DE DIFERENTES TIPOS DE BIOMARCADORES NO
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade de Uberaba como parte da conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Odontologia do segundo semestre de 2017.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo.

UBERABA-MG

2017

C818e Cortiço, Larissa Gabriela Neves.
Estudo do uso de diferentes tipos de biomarcadores no diagnóstico do câncer oral / Larissa Gabriela Neves Cortiço, Laryssa Souto Lopes. – Uberaba, 2017.
20 f.

Trabalho de Conclusão de Curso -- Universidade de Uberaba.
Curso de Odontologia, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo.

1. Boca – Câncer. 2. Biomarcadores. 3. Diagnóstico. 4. Prognóstico. 5. Terapêutica. I. Lopes, Laryssa Souto. II. Araújo, Marcelo Sivieri de. III. Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia. IV. Título.

CDD 616.99431

Ficha elaborada pela bibliotecária Tatiane da Silva Viana CRB6-3171

LARISSA GABRIELA NEVES CORTIÇO

LARYSSA SOUTO LOPES

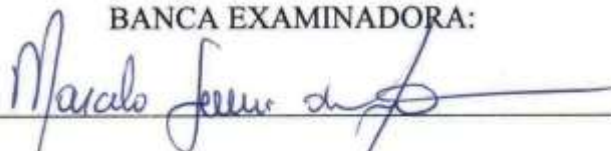
**ESTUDO DO USO DE DIFERENTES TIPOS DE BIOMARCADORES NO
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade de Uberaba
como parte da conclusão da disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso II do curso
de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sivieri de
Araújo.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo - Orientador

Universidade de Uberaba



Christiano Marinho Correia
Cirurgião Dentista - UFGO - F.O.D. - F.O.C.
CRO-MG/30957

Prof. Dr. Christiano Marinho Correia

Universidade de Uberaba

Uberaba- MG

2017

**ESTUDO DO USO DE DIFERENTES TIPOS DE BIOMARCADORES NO
DIAGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

**STUDY OF THE USE OF DIFFERENT TYPES OF BIOMARKERS IN ORAL
CANCER DIAGNOSIS**

Larissa Gabriela Neves CORTIÇO¹

Laryssa Souto LOPES¹

Marcelo Sivieri de ARAÚJO²

1- Acadêmicos do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba.

2- Professor do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Odontologia – Universidade de Uberaba.

Endereço para correspondência:

Rua Francisco Pucci, 265 Bairro Olinda

Uberaba – MG CEP: 38055-410

E-mail: laryssa08@live.com

RESUMO

Biomarcadores são moléculas biológicas encontradas no sangue, soro, plasma, saliva, fezes e urina e são classificados como genômicos, proteômicos e metabolômicos. Variadas condições cancerígenas ou não, podem causar aumento ou diminuição destes biomarcadores, e na atualidade estes, tem demonstrado grande relevância no tratamento e prognóstico do câncer. O presente trabalho teve como objetivo, realizar uma revisão de literatura no período de 2007 e 2017, sobre o diagnóstico, prognóstico e resposta

terapêutica do câncer oral por meio dos biomarcadores. Conclui-se que, a análise de biomarcadores por meio de fluidos corporais ou excreções pode gerar resultados que demonstrem se há ou não alterações na formação e crescimento das células neoplásicas, mas ainda se torna necessário que outras pesquisas sejam realizadas para confirmar a eficácia da utilização de biomarcadores, na tentativa de promover resultados mais precisos e definitivos.

Palavras-chave: Biomarcadores. Câncer Oral. Diagnóstico. Prognóstico. Terapêutica.

ABSTRACT

Biomarkers are biological molecules found in blood, serum, plasma, saliva, feces and urine and are classified as genomic, proteomic and metabolomic. Several carcinogenic or non-carcinogenic substances may cause an increase or decrease of these biomarkers, nowadays, these have shown great relevance in the treatment and prognosis of cancer. The objective of the present study was to carry out a literature review in the period 2007 to 2017 on the diagnosis, prognosis and therapeutic response of oral cancer through biomarkers. It is concluded that the analysis of biomarkers by means of body fluids or excretions can generate results that demonstrate whether or not there are changes in the formation and growth of neoplastic cells, but further research is needed to confirm the efficacy of the use of biomarkers in an attempt to promote more accurate and definitive results.

Keys-words: Biomarkers. Oral Cancer. Diagnosis. Prognosis. Therapeutic.

INTRODUÇÃO

Os biomarcadores (BMs) podem ser definidos como uma ferramenta de apoio diagnóstico utilizados em várias doenças, ou como alterações genéticas, bioquímicas, moleculares e celulares que podem ser medidas estejam estas normais ou alteradas. Para

monitorar essas possíveis alterações, contamos com a utilização de fluídos corporais ou excreções do paciente.

O uso de BMs pode determinar o diagnóstico precoce do câncer oral auxiliando na estratégia de risco-redução, além, de mudanças de hábitos e profilaxia na prevenção do câncer oral.

Um biomarcador (BM) deve ser estável, não podendo ser modificado durante o armazenamento, por isso é essencial que este seja imutável. Para o câncer, o ideal é que exista um indicador exclusivo de malignidade e este deve distinguir exatamente as características malignas e benignas.

O presente trabalho, teve como objetivo, realizar uma revisão de literatura no período de 2007 a 2017, sobre os achados científicos referentes a importância da aplicação dos BMs na prática clínica de pacientes com câncer oral, do diagnóstico precoce e estadiamento da doença ao prognóstico e resultados das respostas terapêuticas.

MATERIAL E METÓDO

Foi verificada a incidência de artigos sobre o tema: estudo do uso de diferentes tipos de BMs no diagnóstico, prognóstico e terapêutica do câncer oral, publicados em inglês e português, entre 2007 e 2017 em revistas indexadas, que totalizaram 1.465 artigos. Da base de dados PUBMED, foram encontrados 1.219 artigos e selecionados 29 artigos, no LILACS foram encontrados 147 e selecionados 4 artigos. Para esta seleção foram utilizados como descritores os termos: Biological Markers (Marcadores Biológicos), Biochemical Markers (Marcadores Bioquímicos), Clinical Markers (Marcadores Clínicos), Immunological Markers (Marcadores Imunológicos), Serum Markers (Marcadores de Soro), Replacement Markers (Marcadores Substitutos), Serial

Markers (Marcadores Séricos), Viral Markers (Marcadores Virais), Tumor Biomarkers (Biomarcadores de Tumor), Markers of Carcinogenesis (Marcadores de Carcinogênese), que totalizaram ao final 33 artigos.

Para a classificação quanto ao tema estudado, realizou-se uma leitura inicial, que originou categorias temáticas, nas quais os resumos foram alocados em uma leitura posterior. O mesmo ocorreu na análise dos aspectos metodológicos. Após isso, foi feita uma análise dos temas de todos os resumos classificados em cada categoria, a fim de se obter um panorama detalhado da produção científica nacional e internacional sobre os aspectos dos diferentes tipos de BMs do Câncer Oral e como eles podem influenciar no diagnóstico, prognóstico e na resposta terapêutica.

REVISÃO DE LITERATURA

O câncer oral está entre as neoplasias que mais acometem homens e mulheres no Brasil, ficando entre os 10 tipos de cânceres mais comuns¹. O seu diagnóstico é considerado um grande desafio, pois é realizado tardiamente acarretando medidas terapêuticas mais invasivas, com consequências socialmente consideráveis. Apesar do avanço significativo na terapia e na investigação da doença, a taxa de sobrevivência dos indivíduos ainda é baixa².

O câncer pode ser estimulado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas promovendo o desequilíbrio homeostático entre a proliferação e a morte celular³. Eventos moleculares que ocorrem no estágio inicial do câncer ou nas lesões precursoras são mais propensos a ter uma influência direta na ocorrência e progressão, do que aqueles que se acumulam posteriormente ao desenvolvimento⁴.

Tumores malignos além de alterarem o microambiente ao seu redor favorecendo seu crescimento, possuem a capacidade de causar alterações sistêmicas que podem ser detectadas nos fluídos biológicos por meio de diferentes métodos⁵.

Na maioria dos casos, o câncer só pode ser diagnosticado por uma biópsia e marcadores tumorais (MT) podem ser utilizados para ajudar a diagnosticar a sua origem em casos iniciais e avançados⁶.

O diagnóstico precoce do câncer é útil para a elaboração de estratégias para reduzir o risco do paciente, incentivar mudanças no estilo de vida, suspensão de hábitos como fumar e ingerir bebidas alcoólicas, aumentando a taxa de sobrevivência⁷.

Os BMs podem ser definidos como uma ferramenta de apoio diagnóstico utilizados em várias doenças. Os marcadores biológicos (MBs) são utilizados principalmente no tratamento do câncer. Esses permitem avaliar resultados relativos ao estado da doença contribuindo para a efetividade do tratamento de cada tipo de neoplasia⁸.

MBs representam um papel de extrema importância, pois, permitem distinguir se há ou não presença de alguma doença⁹. Em geral, qualquer entidade derivada biologicamente ou processos que conduzam ao diagnóstico do câncer, desde o prognóstico, triagem e avaliação de risco ou no estágio de pós-diagnóstico, podem ser considerados candidatos potenciais como BMs¹⁰.

BMs podem ser úteis no manejo clínico de pacientes, especialmente no diagnóstico, estadiamento, avaliação da resposta ao tratamento, detecção de recidivas e prognóstico e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas¹¹. Podendo ainda,

estimar o risco para o câncer, distinguir entre benigno e maligno, rastrear tumores primários e monitorar o status da doença¹².

Os MBs estão presentes no sangue, soro, plasma, saliva, fezes e urina. As alterações presentes nesses fluídos corporais e excreções são indicativos da formação e crescimento de células neoplásicas⁷.

Métodos para identificação de BMs podem ser não invasivos, minimamente invasivos ou invasivos¹³. A saliva é um método não invasivo de diagnóstico, o qual possui efetividade quando comparada ao método invasivo, como a coleta de sangue, oferecendo um risco reduzido de infecção, e a obtenção de amostras facilmente em determinadas circunstâncias¹⁴⁻¹⁵.

Os BMs podem ser classificados como: genômicos, proteômicos ou metabolômicos⁹. Os genômicos compreendem o DNA, mt.DNA, RNA, mRNA e miRNA, os proteômicos englobam as proteínas, os peptídeos e os anticorpos e os denominados metabolômicos, incluem os lipídeos, carboidratos, enzimas e metabólitos⁷.

BMs genômicos como a Integrina $\alpha 3$ e a Integrina $\beta 4$, estão sendo utilizados para estimar o risco regional para o câncer oral e no prognóstico e no risco de metástase à distância¹⁶.

BMs proteômicos, como o Gene ácido de lactase tipo 2, vem sendo utilizado para o diagnóstico diferencial do carcinoma de células escamosas (CCE)¹⁷. Já o BM salivar L-fenilalanina faz a triagem do CCE, acompanhando sua evolução e colaborando com o diagnóstico precoce¹⁸. MT angiogênicos do fator de diferenciação CD34 atuam como uma ferramenta de previsão para recorrência do CCE¹⁶.

Alguns fatores de crescimento presentes no endotélio vascular, células B linfoma-2, claudina 4, proteína sim-associada 1 (YAP1), proto-oncogenes MET e receptor de tirosina-quinase, tem sido usados como um novo grupo de BMs que monitoram a resposta terapêutica do CCE¹⁹.

Os ácidos nucleicos (DNA/RNA) são instrumentos importantes para o reconhecimento de mutações, confirmação do diagnóstico, determinação do prognóstico e no monitoramento do status da doença²⁰.

Os micro-RNAs (miRNAs), os quais são constituídos de uma subclasse de pequenos Ácidos Ribonucleicos (RNAs) não codificantes com cadeias de 18 a 25 nucleotídeos de extensão, participam na regulação da expressão gênica através da sua ligação e afinidade a mRNAs (RNAs mensageiros) específicos²¹.

Os miRNAs intervêm não só em processos fisiológicos, mas na carcinogênese, através de mecanismos de regulação da tradução de oncogênese e genes supressores tumorais, com importante papel nos processos de proliferação celular, diferenciação e regulação da apoptose²¹.

Os miRNAs devem ser encarados como oncogêneses quando a sua expressão estiver manifestamente aumentada num dado tumor e sempre que este aumento se traduza num aceleração/progressão do processo carcinogênico²².

Polimorfismo do gene p53/p73, CCND1, Mouse Double Minute 2 (MDM2) e Harvey Ras (H Ras) estão relacionados com ciclo celular, apoptose e risco de câncer²³.

Misra et al.²⁴ estudaram o polimorfismo nos genes p53, p73 e MDM2 e analisando o risco de desenvolvimento do câncer oral. Os resultados sugeriram que a

presença de pelo menos um alelo aumentava o risco de leucoplasia e desenvolvimento do câncer oral associado ao tabaco.

A Ciclina 1 (CCND1) tem um papel fundamental na determinação da resposta e prognóstico da quimioterapia²⁵. A proteína GRP78 foi pesquisada em Huang et al.²⁶, que constataram que a diminuição de sua expressão foi significativamente relacionada com o prognóstico do tecido neoplásico.

MBs preditivos ou marcadores de resposta podem ser utilizados exclusivamente para avaliar o efeito da administração de um medicamento específico na célula, permitindo selecionar um conjunto de agentes quimioterápicos que funcionem melhor para combater as células cancerígenas, auxiliando em seu tratamento²⁷.

Um BM ideal para o câncer limita os falsos positivos e produz resultados seguros e pertinentes, além de, ser um indicador exclusivo de malignidade e criar uma diferenciação exata entre os fatores malignos e não malignos²⁸.

O BM deve ser estável, não podendo ser modificado durante o armazenamento, por isso, é essencial que este seja imutável e os fatores do cotidiano do paciente como a dieta, não devem interferir nos resultados¹⁵.

Segundo Almeida¹¹, a presença de BMs e/ou mudanças nas suas concentrações estão relacionadas à oncogênese e ao crescimento de células neoplásicas. Estes são marcadores da presença de câncer e podem ser produzidas pela lesão ou pelo organismo em resposta à presença de tumores.

Alguns MTs ajudam a avaliar a agressividade do câncer, ou o qual está sendo a resposta a medicamentos usados para o tratamento do câncer⁶.

De acordo com Nagpal et al.⁶ um dos usos mais importantes para MTs é monitorar pacientes que já realizaram a terapia para o câncer. Se o nível de MT inicialmente elevado diminui com o tratamento, indica que o tratamento está funcionando e está tendo um efeito positivo. Já se o nível do marcador aumentar, o tratamento provavelmente não está funcionando e a mudança de tratamento deve ser realizada.

Embora MTs sejam imperfeitos como testes de triagem para detecção de cânceres ocultos, uma vez que um tumor específico foi encontrado usando um BM, ele pode ser uma maneira de monitorar o sucesso (ou falha) no tratamento⁶.

Alguns fatores podem acarretar possíveis falhas em relação aos BMs tais como: a diversidade clonal, a instabilidade genômica nos tecidos, a natureza dos tecidos ou a identificação errada da molécula metastática²⁹.

Devido ao papel crítico que desempenham os BM em todas as fases da doença, estes devem ser submetidos a uma rigorosa validação clínica, pré-analítica e analítica³⁰⁻³¹.

A validação clínica deve ser estabelecida antes de um BM ser usado na clínica. A validade pré-analítica refere-se ao manuseamento da amostra que será testada utilizando um novo ensaio. Já a validade analítica refere-se à avaliação dos aspectos técnicos dos BMs, que precisam atender a critérios específicos³⁰⁻³¹.

Alguns BMs ainda estão restritos quanto ao seu uso devido aos desafios referentes à sua validação clínica para detecção, diagnóstico e monitoramento precoce da doença, com a finalidade de melhorar a sobrevivência a longo prazo dos pacientes³².

Os BMs apresentam algumas desvantagens, tais como: 1) as concentrações de marcadores obtidos a partir de tecidos com pequenas lesões de câncer em estágio inicial

são muito baixas, dificultando na sua identificação; 2) as proteínas podem variar entre indivíduos e células sob diferentes estímulos ou diferentes estados da doença; 3) células normais bem como células cancerígenas, podem produzir mais MTs; 4) BMs nem sempre estarão presentes no estágio inicial do câncer oral e mesmo em níveis altos eles não são específicos o suficiente ainda para confirmar a presença de câncer oral^{33,6}.

Espera-se que no futuro, os BMs possam ser identificados com maior precisão, para que auxiliem no tratamento do câncer oral, prevenindo a recorrência, metástases e promovendo prognósticos melhores, aumentando assim a taxa de sobrevivência de pacientes, além de serem indicadores exclusivos de malignidade, excluindo as chances de falso-positivo na detecção do câncer oral e promovendo resultados mais fiéis e válidos²⁸.

DISCUSSÃO

Nesta revisão de literatura, ficou claro que os BMs não são utilizados exclusivamente para diagnosticar o câncer, no entanto, eles podem ajudar a determinar sua origem, facilitar o diagnóstico e verificar se a doença já está em estágio avançado⁶.

Outro fato relevante encontrado neste trabalho de revisão, foi o fato de que, o uso de BMs no diagnóstico precoce do câncer oral é de extrema importância para que abordagens menos invasivas possam ser priorizadas, melhorando a qualidade de vida do paciente².

No que se se refere à definição de BMs a presente revisão, foi unânime em afirmar que estes podem ser usados desde o diagnóstico até o prognóstico, ou ainda na triagem e avaliação de risco e estágio nos pós diagnóstico do câncer¹⁰.

Em relação aos tumores malignos como CCE a literatura consultada mostra que, o microambiente tumoral favorece o seu crescimento e provoca alterações a nível sistêmico. Estas alterações podem ser detectadas através dos fluidos biológicos coletados por meio de métodos não invasivos, minimamente invasivos ou invasivos, se tornando BMs, que servirão como indicador de doença confiável, limitando os falsos-positivos e produzindo resultados válidos e confiáveis^{28,5}.

A literatura consultada destaca a saliva como um método para obtenção de BMs não invasivo para diagnóstico, com efetividade comprovada, e com risco reduzido de infecção, quando comparada como o sangue¹⁴⁻¹⁵.

Em relação ao monitoramento de pacientes que realizam terapia contra o câncer oral observou-se que, o uso dos BMs pode ser eficaz para constatar se o tratamento empregado está tendo efeito satisfatório, facilitando a escolha rápida de uma nova modalidade de terapêutica, se necessário⁶.

Alguns estudos demonstraram a existência de problemas na identificação dos BMs. Estes ocorrem devido às concentrações muito baixas de marcadores obtidos a partir de tecidos com pequenas lesões de câncer em estágio inicial³³. Apesar de serem em alguns casos imperfeitos na detecção do câncer, o BM pode ser utilizado para monitorar o sucesso ou falha do tratamento⁶.

A detecção de ácidos nucleicos como o DNA e RNA, podem ajudar na confirmação do diagnóstico, determinação o prognóstico e monitorar o status da doença²⁰. Na presente revisão, os miRNAs tiveram destaque, pois estes intervêm não só em processos fisiológicos, mas também em processos patológicos como a carcinogênese²¹.

Neste sentido, os BMs usados na prática devem ser estáveis e imutáveis para que eles não se modifiquem quando armazenados¹⁵. Na presente revisão ficou nítida que, pesquisas sobre BMs se tornam cada dia mais avançadas, porém, poucos MTs desenvolvidos para testar o câncer em pessoas sem sintomas foram considerados de grande valia na detecção precoce do câncer oral⁶.

Na presente revisão de literatura, os BMs estudados, tem aplicabilidade no diagnóstico, prognóstico e na determinação da terapia contra o câncer. No entanto, seu uso rotineiro continua a ser um grande desafio nos dias de hoje, apesar dos vários estudos já realizados²⁸.

CONCLUSÃO

De acordo com a literatura pertinente consultada e os objetivos traçados neste trabalho, pode-se concluir que:

- A eficácia referente ao uso dos BMs no câncer é uma realidade nos dias atuais, porém, ainda há necessidade de estudos mais elaborados para que a técnica seja mais confiável quanto ao seu uso rotineiro.
- Exames como a biópsia, ainda são necessários para a finalização do diagnóstico do câncer, mas observamos que muitos trabalhos indicam o uso de BMs para auxiliar o diagnóstico, de forma menos invasiva e de custo mais acessível.
- Em relação ao uso de BMs nas respostas terapêuticas ao câncer, observamos poucos relatos sobre o uso confiável nesta etapa importante do combate ao câncer.
- A saliva corresponde ao método mais eficaz para obtenção dos BMs, devido ao menor risco de infecção, quando comparada a coleta de sangue.

- Muito ainda precisa ser pesquisado e elucidado quanto ao uso de BMs no câncer, em especial o CCE oral, pois, os BMs podem ter níveis elevados em condições não cancerígenas, e níveis baixos em condições cancerígenas, o que dificulta ainda a sua aplicabilidade clínica com segurança.

REFERÊNCIAS

1. Freire JCP, Nóbrega MTC, Freire SCP, Ribeiro ED. Incidência de neoplasias malignas orais nas Regiões Brasileiras. REFACS [Internet]. 2017 [citado em 2017 Out 24]; 5 (1): 141-145. Disponível em: <http://seer.uftm.edu.br/revistaeletronica/index.php/refacs/article/viewFile/1993/2036>.
2. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8: 11884-11894.
3. Vadas M, Xia P, McCaughan G, Gamble J. The role of sphingosine kinase 1 in Cancer: Oncogene or non-oncogene addiction?. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1781 (9): 442-7.
4. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol*. 2007; 1: 26-41.
5. Alves G, Delmonico L. O presente e o futuro dos marcadores circulantes de câncer. *Revista HUPE*. 2015; 14 (1): 66-72.
6. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi MA. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg*. 2016; Jan-Jun; 7 (1): 17-20.
7. Santosh AB, Jones T, Harvey J. A review on Oral Cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. *J Can Res Ther*. 2016; 12: 486-92.

8. Pedraz CG. Os biomarcadores são ferramentas úteis para o diagnóstico clínico. DICYT [Internet]. 2011 [citado em 2017 Jun 01]; 1: 201. Disponível em: <<http://www.dicyt.com/noticia/os-biomarcadores-sao-ferramentas-uteis-para-o-diagnostico-clinico>>.
9. Nass SJ, Moses HL. Cancer Biomarkers: The Promises and Challenges of Improving Detection and Treatment. 1st ed. Washington, DC: The National Academic Press. 2007; 29-32.
10. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008; 452: 548-552.
11. Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VHC, Cardoso AAA. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Rev Bras de Cancerol*. 2007; 53 (3): 305-316.
12. Yoon AJ, Shen J, Santella RM, Zegarelli DJ, Chen R, Weinstein IB. Activated checkpoint kinase 2 expression and risk for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16: 2768-72.
13. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol*. 2012; 6: 140-6.
14. Zhong LP, Zhang CP, Zheng JW, Li J, Chen WT, Zhang ZY. Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Arch Oral Biol*. 2007; 52 (11): 1079-87.
15. Liu J, Duan Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol*. 2012; 48 (7): 569-77.
16. Nagata M, Noman AA, Suzuki K, Kurita H, Ohnishi M, Ohyama T, et al. ITGA3 and ITGB4 expression biomarkers estimate the risks of locoregional and hematogenous dissemination of oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2013; 13: 410.

17. Shinmura K, Igarashi H, Kato H, Kawanishi Y, Inoue Y, Nakamura S, et al. CLCA2 as a novel immunohistochemical marker for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *Dis Markers*. 2014; 2014: 619273.
18. Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Sci Rep*. 2014; 4: 6802.
19. Akervall J, Nandalur S, Zhang J, Qian CN, Goldstein N, Gyllerup P, et al. A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. 2014; 50: 570-8.
20. Ma Y, Wang X, Jin H. Methylated DNA and microRNA in body fluids as biomarkers for cancer detection. *Int J Mol Sci*. 2013; 14: 10307-31.
21. Barh D, Carpi A, Verma M, Gunduz M. *Cancer Biomarkers: Minimal and Noninvasive Early Diagnosis and Prognosis*. 1^a Ed. EUA: Taylor & Francis Group; 2013.
22. Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni NN, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2009; 18 (24): 4818-4829.
23. Bag A, Jyala NS, Bag N. Indian studies on genetic polymorphisms and cancer risk. *Indian J Cancer*. 2012; 49: 144-62.
24. Misra C, Majumder M, Bajaj S, Ghosh S, Roy B, Roychoudhury S. Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 loci modulate the risk of tobacco associated leukoplakia and oral cancer. *Mol Carcinog*. 2009; 48: 790-800
25. Feng Z, Guo W, Zhang C, Xu Q, Zhang P, Sun J, et al. CCND1 as a Predictive Biomarker of Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*. 2011; 6 (10): 26399.

26. Huang WC, Chan SH, Jang TH, Chang JW, Ko YC, Yen TC, et al. miRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2014; 74: 751-64.
27. Roses RE, Paulson EC, Sharma A, Schueller JE, Nisenbaum H, Weinstein S, et al. HER-2/neu overexpression as a predictor for the transition from in situ to invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.* 2009; 18: 1386-1389.
28. Brooks JD. Translational genomics: The challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res.* 2012; 22: 183-7.
29. Bach PB, Jett JR, Pastorino U, Tockman MS, Swensen SJ, Begg CB. Computed tomography screening and lung cancer outcomes. *JAMA.* 2007; 297: 953-61.
30. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol* 2012; 6: 140-6.
31. Moore HM, Kelly AB, Jewell SD, McShane LM, Clark DP, Greenspan R, et al. Biospecimen reporting for improved study quality (BRISQ). *Cancer Cytopathol.* 2011; 119: 92-101.
32. Verma M, Kumar D. Application of mitochondrial genome information in cancer epidemiology. *Clin Chim Acta.* 2007; 383 (1-2): 41-50.
33. Garg A, Ahmed S, Sinha A, Singh HP. Tumor markers - Its advantages and limitations in diagnosis of oral cancer. *Univ J Dent Sci.* 2015; 1: 42-45.