

EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE MEDICIÓN EN MUESTRAS DE SALIVA PARA LA DETECCIÓN DE CÁNCER ORAL EN PACIENTES CON PREDISPOSICIÓN

* Acosta P, López N, Macana O, Sierra H, Solano J.

** Balen G.

**Diana Parra D.

Área: Ciencias Básicas
Modalidad: Oral
Categoría: Pregrado

RESÚMEN

Objetivo: Identificar la evolución de las diversas técnicas de medición en muestras de saliva que permitan detectar aumento de los niveles de citoquinas (IL 6) (IL 8) como posible indicador de cáncer oral en pacientes con predisposición (fumadores y alcohólicos).

Materiales y métodos: Se desarrolló una revisión de literatura científica, incluyendo publicaciones indexadas de tipo analítico y experimental, sobre las técnicas de medición en saliva para detectar cáncer oral. Bases de datos como EBSCO, PUBMED, SCIELO y GOOGLE Académico, fueron consultadas obteniendo 100 artículos, de los cuales 51 de ellos fueron identificados, clasificados y analizados de forma sistemática, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión designados para el desarrollo de la investigación.

Resultados: La literatura consultada evidencia que las tasas de mortalidad y la incidencia del cáncer oral van en aumento tanto en Colombia como en el mundo; que esta patología está relacionada con diversos factores de riesgo entre los cuales el tabaco y alcohol son de enorme impacto; que la saliva es un fluido corporal que permite el diagnóstico precoz del cáncer oral, utilizándola como medio conservador, no invasivo y efectivo, de fácil recolección, y que brinda biomarcadores como, IL1 α , IL6 y IL8 en los casos de carcinoma de células escamosas orales; y, que ha habido una evolución significativa de las técnicas de medición durante la última década de esos biomarcadores, con lo cual sería posible detectar en forma temprana esta patología.

Discusión-Conclusiones: Once son las técnicas de detección en saliva de estos biomarcadores, que se vienen utilizando como resultado de la evolución de las tecnologías de detección del CO en ese fluido, pero las de mejores perspectivas y resultados son biomarcadores de fluido oral para la detección de cáncer oral a través de espectrometría de masa, sensores electroquímicos para la detección de biomarcadores Múltiples, inmunoesferas multiplexadas, los cuales miden la eficacia de varios analitos, y los, sensores ópticos de proteínas para detectar marcadores de cáncer en la saliva. Los datos acumulados en la revisión permiten prever que la evolución de técnicas de detección y biomarcadores modifican el campo del diagnóstico de cáncer oral y ahora se vienen empleando nuevas herramientas altamente sensibles que permitirán a los profesionales de la salud y a los propios pacientes supervisar su saliva para diagnóstico, pronóstico predicciones relacionados con el cáncer oral.

Palabras claves: Saliva, cáncer oral, biomarcadores, consumo de alcohol, consumo de tabaco, prevención de cáncer oral, técnicas de detección de cáncer oral, interleuquina IL8 - IL6, CBA: Cytometric Bead Array, y cáncer oral de células escamosas.

ABSTRACT

Objective: Identify the evolution of various measurement techniques in saliva samples to detect increased levels of cytokines (IL-6) (IL-8) as a possible indicator of oral cancer in patients with predisposition (smokers and alcoholics)

Materials and methods: a review of scientific literature, including indexed publications of analytical and experimental type on measurement techniques in saliva to detect oral cancer using : databases such as EBSCO, PUBMED, SCIELO and GOOGLE Academic were consulted getting 100 articles, of which 51 of them were identified, classified and analysed in a systemic manner, taking into account the inclusion and exclusion criteria designated for the development of research.

Results: The consulted literature evidences that mortality rates and the incidence of oral cancer are on the rise both in Colombia and in the world; this pathology is related to various risk factors including smoking and alcohol are of enormous impact; saliva is a body fluid that allows the early diagnosis of oral cancer, using it as a conservative, non-invasive and effective, easy collection mean, and provides biomarkers as TNF α , IL1 α , IL6 and IL8 in cases of oral squamous cell carcinoma; and that there has been a significant evolution of the measurement techniques during the last decade of these biomarkers, with which it would be possible to detect this pathology in its early stage.

Discussion-conclusions: eleven are the techniques of detection in saliva of these biomarkers, which are being used as a result of the evolution of the technologies of detection of CO in that fluid, but the best prospects and results are biomarkers for oral fluid for the detection of oral cancer by mass spectrometry, electrochemical sensors for the detection of multiple biomarkers, multiplexed, inmunoesferas which measure the effectiveness of several analytes, and proteins, optical sensors to detect markers of cancer in saliva. Collectively these accumulated data are predicted to alter the field of oral cancer diagnosis by employing highly sensitive new tools which will enable both medical professionals and the patients themselves to monitor their saliva for diagnosis and prognosis prediction, related to oral cancer.

Keywords: Saliva, oral cancer, biomarkers, consumption of alcohol, tobacco use, prevention of oral cancer, oral cancer detection, interleukin IL8 - IL6, CBA: Cytometric Bead Array, and oral squamous cell cancer

* Estudiantes IX semestre de UNICOC

** Asesor científico. Odontóloga, Especialista en Patología Oral y Medios Diagnósticos, Especialista en Gerencia en Instituciones Prestadoras de Salud.

*** Asesor metodológico. Odontóloga. Especialista en Epidemiología

INTRODUCCION

En la actualidad no hay un método o técnica sencilla que arroje diagnósticos de cáncer oral en estadios iniciales y aunque se ha avanzado en la prevención, aun las tasas de mortalidad y la incidencia van en aumento tanto en Colombia como en el mundo; siendo necesario un método diagnóstico para la detección temprana donde el tratamiento sea mucho más conservador y efectivo puesto que en estas etapas la ausencia de signos de alerta es nula. Es por esta razón que se hace imperativo un medio de diagnóstico precoz, que sea de fácil recolección y que brinde algún tipo de indicador o biomarcador en un fluido corporal. ⁽¹⁾

El cáncer oral es el cáncer localizado en la cavidad bucal y la orofaringe. Puede describirse generalmente como un crecimiento y una propagación descontrolada de células anormales, dentro de la cavidad oral o el mentón. Es una neoplasia maligna originada por la hiperplasia de las células convirtiéndolo en uno de los más difíciles de detectar en etapas tempranas, en especial el carcinoma oral de células escamosas (COCE); lo cual se debe probablemente a la ausencia de rasgos característicos de la enfermedad en estadios iniciales, reduciendo la posibilidad de que el paciente asista a la consulta, y en los pocos casos en los que se presentan signos y síntomas de forma precoz, la neoplasia es más agresiva y metastásica. ⁽¹⁾

Hay retardos en el diagnóstico y tratamiento, este es un problema originado por varias razones: ineficacia de los centros de salud, ausencia de oferta de servicios integrales, tiempo de atención muy limitado, falta de exámenes completos, diagnósticos tardíos; demoras pos consultas odontológicas del análisis clínico, requerimientos de remisiones a niveles más especializados. Como resultado en la mayoría de los casos, una vez se logra la atención, la enfermedad llega a etapas más avanzadas dando como resultado la necesidad de un tratamiento más agresivo, prolongado y radical, comprometiendo la calidad de vida del paciente ⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

Por otra parte los factores predisponentes para la aparición del cáncer oral, son múltiples, y entre ellos se encuentra el alcohol debido a uno de sus componentes, el etanol, ya que se ha descrito que este elemento y sus derivados como el acetaldehído han mostrado efectos adversos en animales, por ello las altas concentraciones tendrían efectos sobre la mucosa oral siendo así clasificado como elemento carcinógeno para los seres humanos. ⁽⁶⁾

Epidemiológicamente se ha descrito que el alto consumo de alcohol combinado con el consumo de tabaco potencializan el riesgo de desarrollar cáncer oral; es por esto que es difícil presumir que el etanol es el determinante principal para la progresión de esta patología. ⁽⁶⁾⁽⁷⁾

En la revisión adelantada se encontró que la saliva ha demostrado ser útil en la vigilancia de diversas patologías que por una u otra razón, componentes no habituales de esta llegan a la saliva, sea intra celular o extra celularmente (difusión pasiva, transporte activo, ultrafiltración) dando aviso de que se ha alterado el equilibrio en el cuerpo humano, se han evidenciado en el flujo salivar diversas sustancias farmacológicas, hormonales, virus, bacterias entre otras, se ha usado para detectar VIH, Hepatitis, VPH entre otros ⁽²⁾⁽²⁷⁾.

Se estableció que uno de los aspectos más importantes y de interés para el diagnóstico precoz del COCE, es la presencia de niveles alterados de biomarcadores en las muestras de saliva, ya que se logra presumir la aparición a futuro de la enfermedad sin que se haya manifestado sistémica o localmente, y sin lugar a duda esto permitirá que se logre desviar su curso. Los biomarcadores en la actualidad son utilizados como medios diagnósticos avanzados para la detección de diversas patologías las cuales tienen evidencia que producen cambios a nivel sistémico en sangre como lo son el sida y cáncer, etc. estos se utilizan de una manera biomolecular teniendo en si la capacidad de detección de ciertas proteínas que pueden formar un vínculo biológico con la patología que se investiga y/o sospecha debido a su alta sensibilidad. ⁽⁸⁾

Los biomarcadores encontrados en saliva, y quizá los más relevantes, son las interluquinas, ya que en diversos estudios las mencionan como posible indicador de cáncer oral, lo que podría llegar a ser una gran herramienta de diagnóstico temprano de este tipo de patologías, hecho que sería de mucha utilidad en la práctica odontológica. ⁽⁹⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

Las interluquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, las citoquinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación celular ante una invasión microbiana. Las citoquinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. ⁽¹¹⁾

Debido a estudios recientes, analizados en la literatura, basados en la medición de citoquinas se han desarrollado múltiples formas y técnicas para dicho procedimiento, estas técnicas permiten la medición no solo de las citoquinas sino también la medición del ARN mensajero de las células; una de estas técnicas y quizá la más usada por los investigadores es la de ELISA; esta técnica provee buenos resultados aunque para muchos es costosa y requiere de la repetición del procedimiento las veces que sea necesario para poder llegar a los resultados finales, ya que solo permite la medición de un analito a la vez. ⁽¹²⁾ Pero en las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas de medición de las concentraciones salivales de TNF α , IL1 α , IL6 y IL8 en carcinoma de células escamosas orales ⁽¹³⁾, como lo son: biomarcadores de fluido oral para la detección de cáncer oral a través de espectrometría de masa ⁽¹⁴⁾, sensores electroquímicos para la detección de biomarcadores Múltiples ⁽¹⁵⁾, inmunoesferas multiplexadas, el cual mide la eficacia de varios analitos ⁽¹²⁾, sensores ópticos de proteínas para detectar marcadores de cáncer en la Saliva ⁽¹⁶⁾

En general estas técnicas usadas en la última década, arrojan buenos resultados y tienen como característica seguir

formulaciones como las de CBA (Cytokine Bead Array) la cual ha sido utilizada en diferentes investigaciones para medir las citoquinas IL-8, IL 1- β , IL-6, IL-10, TNF. IL-12p70. ⁽¹⁷⁾ "Los ensayos de CBA proveen un método de captura de un analito soluble o un conjunto de analitos con partículas de tamaño conocido y fluorescencia, haciendo posible la detención de estos analitos a través de la citometría de flujo" ⁽¹⁷⁾.

El objetivo de la presente investigación es identificar la evolución de las diversas técnicas de medición en muestras de saliva que permitan detectar aumento de los niveles de citoquinas (IL 6) (IL 8) como posible indicador de cáncer oral en pacientes con predisposición (fumadores y alcohólicos).

MATERIALES Y METODOS

En el desarrollo de la investigación se seleccionó como tipo de estudio la revisión de la literatura.

El procedimiento que se llevó a cabo, inició con la búsqueda en bases de datos tales como: EBSCO, PUBMED, GOOGLE Académico y SCIELO, y en la hemeroteca de la Pontificia Universidad Javeriana; empleando como descriptores: Saliva, cáncer oral, biomarcadores, consumo de alcohol, consumo de tabaco, prevención de cáncer oral, sensor for oral cancer detection, interleuquina IL8 - IL6, CBA: Cytometric Bead Array, y cáncer oral de células escamosas

Se obtuvo un total de 100 artículos; de los cuales fueron escogidos 51, teniendo en cuenta como criterios de inclusión artículos publicados durante el período 2000-2011; artículos que incluyeran estudios analíticos y experimentales que utilizaran técnicas de detección objeto de la revisión; artículos sin discriminación de raza, edad, género; artículos referentes a factores predisponentes como alcohol y cigarrillo; y, artículos referentes a cáncer, cáncer oral y cáncer cabeza y cuello, haciendo énfasis en estudios relacionados con las técnicas para la detección de técnicas de medición en muestras de saliva que permitieran detectar aumento de los niveles de citoquinas (IL 6) (IL 8) como posible indicador de cáncer oral en pacientes con predisposición. Excluyendo

artículos científicos relacionados con técnicas no salivales para detección del cáncer oral, revisiones de la literatura. De los 51 artículos incluidos en el estudio 13 se encontraron en la base de datos PUBMED, 9 en SCIELO, 12 en EBSCO, 11 en GOOGLE Académico y 6 en la hemeroteca de Pontificia Universidad Javeriana. De los 49 artículos excluidos del estudio 12 se encontraron en la base de datos PUBMED, 8 en SCIELO, 18 en EBSCO, y 11 en GOOGLE Académico.

RESULTADOS

De acuerdo con la revisión de los 51 artículos incluidos y clasificados en temas de la investigación, se analizaron 20 artículos que correspondieron al tema saliva como medio para la detección del CO; 18 al tema cáncer oral; 7 al tema factores alcohol y tabaco como predisponentes al cáncer oral; 2 al tema de interleukinas, y 4 al tema de técnicas de detección de cáncer oral por medio de fluidos salivales.

De los 18 artículos científicos revisados referentes al cáncer oral, un 40% de estos tratan sobre la actual preocupación en la prevalencia y aumento del cáncer oral en el mundo en general, pero especialmente en Estados Unidos, Francia y Colombia; y sobre todo en el sector de los jóvenes de la población, preponiendo educación de los profesionales de la salud respecto de la detección temprana de esta patología, la búsqueda de la eliminación de barreras para su atención y detección, y el establecimiento de predictores que permitan detectar en forma temprana la aparición de esta patología. Otro 40% de los artículos tratan sobre análisis y experimentos de nuevos biomarcadores especialmente de aquellos presentes en la saliva que pueden implementarse en forma masiva dadas sus características económicas, conservadoras, y no invasivas para detección temprana, así como la necesidad de mejoras en la tecnologías de detección y tratamientos desde los puntos de vista biológicos y moleculares. Un artículo interesante analiza el papel de micronutrientes como posibles generadores de cáncer oral y establece cuales pueden afectar a los consumidores aumentando el riesgo de adquirir la patología.

A nivel mundial se ha reportado un incremento en la incidencia del cáncer donde anatómicamente clasificándola el Cáncer de orofaringe fue el más frecuente (28%), seguido por el cáncer de cavidad oral (25%) donde el pico de frecuencia se observó en edades de 55-59 años.⁽²⁰⁾

Se estableció una comparación con bases de datos de años pasados relacionando el número de pacientes con carcinoma escamocelular oral en lengua(SCCOT) encontrándose que estos casos en los adultos jóvenes aumentó drásticamente durante el período de 1948 a 1945 al menos un 10% de todos los casos y a mediados de la década del 1990 en 15% a 25% de todos los casos. Se encontró un aumento constante del número total de los casos de SCCOT, de aproximadamente 300 en 1973 a más de 500 en 1992 comparando la base de datos durante este periodo. También se desprende de este análisis que se produjo un aumento en el porcentaje de casos de SCCOT en adultos jóvenes, entre el 3% en 1973 a casi 6% en 1993 donde (58%) de los pacientes eran hombres y (42%) eran mujeres. Los pacientes tenían edades comprendidas entre 19 a 39 años y la edad media fue de 31,3 años y 32.5 años respectivamente. Importante renombrar que 59% de los pacientes eran no fumadores y el 45% no consumían alcohol.⁽²¹⁾

Dos aspectos importantes sobre este tema, son: uno relacionado con Colombia, y otro sobre los resultados relacionados con lesiones precancerosas que pueden eventualmente generar cáncer oral. En el caso del primero, en Colombia, En los últimos años y debido a los factores de riesgo ya mencionados, el cáncer oral ha incrementado su incidencia en Colombia, presentando en el año 2000, 465 casos nuevos⁽²²⁾. Esta cifra aumento en el año 2008 en 528 casos, aunque no es un aumento tan significativo, se puede ver que este cáncer está atacando progresivamente a la población, representando una tasa de 1.2 casos por cada 100.000 habitantes siendo el género de mayor prevalencia los hombre con un 59,4% encontrándose en edades comprendidas de 65 años en adelante .La tasa de mortalidad por cáncer oral en el género masculino fue 1.4, y en el género femenino fue de 1.0 por cada 100.000

habitantes. Los departamentos de Antioquia, Atlántico y Santander presentaron las tasas de mortalidad más elevadas. Los principales órganos del cuerpo donde se presentó la enfermedad fueron lengua, faringe y glándula parótida, que representan la mitad de los diagnósticos realizados.⁽²³⁾

La revisión de artículos sobre el papel que cumple la saliva en la detección de cáncer oral y los biomarcadores para este efecto, incluyó un total de 20 artículos, y el de las interleuquinas, otros dos. Esta revisión mostró que la saliva puede ser útil en la vigilancia de diversas patologías gracias a los avances en biotecnología es posible identificar firmas de tumores, como los oncogenes y los supresores de tumores, las alteraciones genéticas en los fluidos corporales que drenan de los órganos afectados por el tumor⁽²⁴⁾, diversas sustancias farmacológicas, hormonales, virus, bacterias entre otras, se ha usado para detectar VIH, Hepatitis, VPH entre otros, lo cual se ve expresada como una clara alteración en la composición normal de la saliva interpretándose como aviso de que se ha alterado el equilibrio en el cuerpo humano.^{(13) (25)}

La presencia de drogas, en la saliva se ha utilizado para monitorear los niveles del compuesto activo; en barbitúricos, benzodiazepinas, ciclosporinas entre otros, la presencia de tiocianato como indicador de fumador activo o pasivo. Drogas alucinógenas como opiáceos entre otras pueden detectarse en la saliva.⁽²⁶⁾

En enfermedades malignas como carcinomas o sarcomas se ha encontrado innumerables biomarcadores, tenemos el c-erB-2 en saliva en mujeres con cáncer de seno y el CA125 para cáncer de ovario para la neoplasias de cabeza y cuello tenemos innumerables proteínas, enzimas, mRNA que se han encontrado en saliva como la presencia de la proteína p53, Cyfra 21-1, TPS, y CA125 como indicador de cáncer oral, o las citoquinas IL6, IL8, TNF alfa y IL1 beta que en estudios como e del Mahnaz S, y cols donde se encontró que la IL-6 presentaba un aumento estadísticamente significativo en relación a las otras 2 citoquinas examinada TNFy IL1 alfa con valor de $p < 0.05$ ⁽¹²⁾ en un estudio similar Akira K y cols evidenciaron

una elevación en los niveles tanto de la IL 1 Beta como de la IL6, y una elevación no estadísticamente significativa de la osteopontina y de la IL8⁽²⁷⁾ todos estos estudios han evidenciado el aumento en pacientes con COCE frente a los pacientes sanos, mostrándose como un posible biomarcador o indicador que ayude al diagnóstico de lesiones en etapas tempranas de cáncer oral.⁽²⁸⁾

Uno de los biomarcadores encontrados en saliva y quizá el más relevante son las interleuquinas, ya que en diversos estudios las mencionan como posible indicador de cáncer oral, lo que podría llegar a ser una gran herramienta de diagnóstico temprano de este tipo de patologías, hecho que sería de mucha utilidad en la práctica odontológica.⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾

Acerca de la predisposición al Cáncer oral de los pacientes que consumen tabaco y alcohol, se revisaron 7 artículos que incluyeron modelos de meta análisis para establecer la evidencia de la incidencia del alcohol y el tabaco sobre el cáncer oral, el aumento de los factores de riesgo en las personas menores de 40 años y en las mujeres por el aumento del consumo de estos productos, y las explicaciones sobre las causas por las cuales el alcohol y el tabaco aumentan el riesgo de contraer cáncer oral. Los artículos destacan en un 100% que la interacción de tabaco y alcohol aumenta significativamente el riesgo de cáncer digestivo y que la interacción entre fumar y el consumo de alcohol parece ser responsable de una cantidad significativa de la enfermedad.^{(21) (15)}

Se ha reconocido el consumo de alcohol y cigarrillo como dos de los factores más representativos científicamente en el carcinoma oral y faríngeo que se encuentra con mayor frecuencia en el sexo femenino, esta relación entre estos dos factores es muy importante ya que el etanol que es uno de los componentes encontrados en el alcohol que aumenta la permeabilidad del tejido permitiendo que los componentes cancerígenos del tabaco penetren y aumenten el riesgo de carcinoma en la cavidad oral.⁽¹⁶⁾

El resultado de la revisión bibliográfica en cuanto al consumo de bebidas alcohólicas indica que el Cáncer oral se encuentra asociado desde un punto de vista epidemiológico con un riesgo aumentado de desarrollar cáncer del tracto gastrointestinal superior: que la realización de estudios que establezcan esa asociación resulta complicada, debido tanto a la confluencia de varios factores de riesgo en una misma persona, por ejemplo alcohol y tabaco, como a la falta de datos que puedan ser comprobables por el clínico. Indican que por ello no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo patogénico responsable de este aumento de riesgo, ya que el etanol *per se* no ha demostrado ser carcinógeno. Se han propuesto distintas hipótesis que tratan de explicar como el etanol, ya sea por vía local o sistémica puede actuar como factor de riesgo en el desarrollo de un cáncer oral. Este trabajo supone una revisión de la situación actual de los potenciales mecanismos patogénicos, dividiéndolos en alternativas de efectos locales, sistémicos, y cinérgicos. Dentro de los primeros se hace especial referencia a la alteración de la permeabilidad de la mucosa oral, a la acción del acetaldehído y al papel de los retinoides. (15)(16)(38)

La revisión de las técnicas de medición en muestras de saliva para la detección de cáncer oral en pacientes con predisposición permitió establecer que existen diversas técnicas basadas en la medición de citoquinas, entre las cuales se destacan: CBA, espectrometría de masas, sensor electroquímico y sensor óptico.

En la técnica CBA los niveles medios de IL-1 β fueron 1013,5 \pm 1221,1 pg ml⁻¹ en sujetos COCE (n = 20) y 376,3 \pm 576,3 pg ml⁻¹ en los sujetos control (n = 20). El análisis ROC resultó en un valor ROC de 0,74 con una sensibilidad de 80% y una especificidad del 65%, respectivamente. Los niveles medios de IL-8 fueron 2834,9 \pm 3385,6 pg ml⁻¹ en sujetos COCE (n = 20) y 947,3 \pm 2036,8 pg ml⁻¹ en los sujetos control (n = 20). El análisis ROC reveló un valor ROC de 0,81 con una sensibilidad de 75% y una especificidad de 80%, respectivamente. (12)

También se midió la saliva de IL-8 y los niveles de IL-1 β en los mismos pacientes con

COCE y el control de los sujetos por ELISA. Los niveles medios de IL-8 mediante el ensayo de ELISA fueron 3347,7 \pm 2929 (COCE, n = 40) y 759,4 \pm 563 pg ml⁻¹ (control, n = 42). El análisis ROC indica un valor de 0,82 y una sensibilidad y una especificidad del 87,5% y 64,3%, respectivamente. Los niveles medios de IL-1 β fueron 591,5 \pm 618,7 pg ml⁻¹ (COCE, n = 36) y 79,6 \pm 57,8 pg ml⁻¹ (control, n = 42). El análisis ROC indica un valor ROC de 0,84 y una sensibilidad y especificidad del 63,9% y 100%, respectivamente. (12)

El P-valor entre la periodontitis y el grupo control se determinaron como 0,098. (12)

En la espectrometría de masas al realizar el análisis ROC de los datos de validación, el 20 de COCE y 20 sujetos de control, el valor de ROC para tiorredoxina se determinó que era 0,71, y la especificidad y la sensibilidad se determinó que el 70,8% y 70,8%, respectivamente, con una probabilidad de corte del 50,1%. (14)

En el sensor electroquímico Mostró una diferencia significativa para los dos componentes: el IL-8 mRNA (W = 810, p = 6,637 10⁻⁹) y la proteína IL-8 (W = 820, p = 1,863 10⁻⁹), que se calcula utilizando el signo de Wilcoxon-rank test. Entre los 2 grupos de sujetos, no hubo diferencias significativas en función de la edad media: oral carcinoma de células escamosas (COCE) de los pacientes, de 46 años F 12,8; sujetos normales, 44,9 años (11,9 F test de Wilcoxon, P > 0,8), el género (p = 1), la historia de mascar (P > 0,08); antecedentes de tabaquismo (P > 0,27), o la historia de consumo de alcohol (P > 0,06). (15)

Usando el sensor óptico, los medios fueron 439 UA (desviación estándar = 125 UA) y 320 UA (desviación estándar = 105 UA) para el cáncer y el grupo control respectivamente. El análisis de la prueba t confirma que el cáncer oral y de los grupos de control son estadísticamente significativas, utilizando el sensor óptico con la proteína p < 0,05 (p = 0,007 reales). Los medios de ambos grupos se calcularon utilizando los valores de concentración convertidos, en base a una curva estándar. Los valores de concentración extrapolados son linealmente relacionada con los valores de densidad óptica (señal de

salida) desde el ensayo ELISA. El cáncer de implicar el uso de ELISA fue 1.252 pg / ml (desviación estándar = 456 pg / ml) y la media de control fue de 577 pg / GML (desviación estándar = 355 pg / ml). El análisis t-test también confirmó que el cáncer oral y el grupo control fueron estadísticamente diferentes mediante ELISA ($p = 1e-5$).⁽¹⁶⁾

La curva de ROC demostró que no demostró ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,33$) (Hanley y McNeil, 1983). Empleando el AUC como un indicador de la capacidad de predicción, se puede concluir que el sensor óptico y ELISA tienen prestaciones similares a las pruebas de diagnóstico.⁽¹⁶⁾

DISCUSIÓN

En lo que toca a la predisposición al Cáncer oral de los pacientes que consumen tabaco y alcohol, la revisión destaca que la etiología del cáncer oral, como en la mayoría de las neoplasias malignas, está ligada a una serie de factores que al actuar en conjunto desencadenan su aparición; las predisposiciones genéticas asociadas al consumo frecuente de tabaco y alcohol aumentan significativamente el riesgo de cáncer; en nuestra sociedad el tabaquismo y el alcoholismo son actividades cotidianas y se pueden identificar consumidores de todas las edades, pero sin duda son los fumadores con un historial de consumo más prolongado quienes a pesar de la ausencia de signos patognomónicos de la enfermedad presentan mayor probabilidad de desarrollar cáncer oral.⁽²³⁾

En cuanto al papel de la saliva respecto a medio diagnóstico tiene muy poco tiempo de implementación, 20 años aproximadamente y ha mostrado ser una gran herramienta para la detección y el diagnóstico de cáncer y mostrando una alta sensibilidad y alta especificidad. Además, tiene la proyección para usarlo como herramienta ya que es lo suficientemente barato y no invasivo lo que permitiría una aplicabilidad generalizada, pero algo en lo que coinciden varios autores es la necesidad de realizar más estudios con poblaciones más numerosas, y delimitar el número de biomarcadores a usar determinado exactamente de donde proviene

y el porqué se expresan en enfermedades como el COCE por el momento el diagnóstico definitivo de COCE se basa claramente en una biopsia.^{(13) (24) (32) (33)}

Los biomarcadores que operan para este efecto, se evidenció que las interleuquinas son importantes biomarcadores de la saliva. Son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, las citoquinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación celular ante una invasión microbiana. Las citoquinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica.⁽³⁴⁾

Estas proteínas desempeñan un papel importante en el sistema inmune, son responsables, entre muchas otras funciones, del crecimiento celular, diferenciación, reparación y activación celular. El mecanismo de toxicidad para estas moléculas, consiste de una rápida permeabilización de la membrana celular del invasor. Otras proteínas importantes, son los anticuerpos naturales, los cuales evitan la propagación de infecciones por vía sanguínea. Los factores del complemento desempeñan un papel clave.⁽³⁵⁾

La interleuquina 6 (IL-6- interferon Beta "), es una proteína de bajo peso molecular soluble, localizada en el cromosoma 7 p15-21 que es producida por diferentes tipos de células del sistema inmunitario (fagocitos, células T, macrófagos) células endoteliales, fibroblastos y células del tejido adiposo entre otros. Es una citoquina pro inflamatoria multifuncional, mediadora en el crecimiento diferenciación y reparación celular, inflamación, inmunidad, y se ha asociado al desarrollo de patologías cancerosas.⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾

La IL-8 se produce en muchas células, tales como queratinocitos, células epiteliales, sinoviocitos y hepatocitos, por nombrar algunos. Entre los leucocitos de sangre periférica, los monocitos y los neutrofilos más que los linfocitos son las fuentes celulares mayoritarias de IL-8. La IL-8 ejerce muchas

actividades biológicas in vitro e in vivo. La IL-8 es bien conocida por su actividad quimiotáctica y su capacidad para producir la desgranulación de los neutrófilos humanos. En neutrófilos tratados con IL-8, se detecta rápidamente un cambio de forma. También se observa la liberación de la proteína de unión a la vitamina B12 de gránulos específicos. La IL-8 también causa la desgranulación de las partículas azules y liberación de elastasa y otras hidrolasas, tal desgranulación se acompaña del aumento de una variedad de moléculas de adhesión en la membrana celular. La desgranulación también resulta en un aumento en la expresión del receptor del complemento tipo I (CRI) y III (CR3). La IL-8 es también un factor quimio táctico para los eosinófilos y para los linfocitos humanos, en concreto las células T.⁽⁵⁾

En cuanto a las técnicas de medición en muestras de saliva para la detección de cáncer oral en pacientes con predisposición, éstas permiten la medición no solo de las citoquinas sino también la medición del ARN mensajero de las células⁽¹⁵⁾; una de estas técnicas y quizá la más usada por los investigadores fue la de ELISA, que es una técnica estándar para cuantificar la cantidad de proteína en una solución. Las proteínas objeto de la investigación son inmovilizados en una superficie y etiquetadas con una enzima que puede producir continuamente un producto coloreado que se acumula en la solución de detección. Al realizar un seguimiento de la vía de información, se encuentra que la señal se origina en el volumen de la muestra de fluido, se mueve a la superficie y devuelve al volumen para finalmente ser detectado. Aunque la señal es amplificada por una reacción enzimática, el método para tomar mediciones de absorbencia luminosa (opacidad fluido) es un principio relativamente insensible frente a los métodos de fluorescencia óptica.⁽¹⁶⁾

La técnica ELISA provee buenos resultados aunque para muchos es costosa y requiere de la repetición del procedimiento las veces que sea necesario para poder llegar a los resultados finales, ya que solo permite la medición de un analito a la vez⁽¹⁾. Pero, como se mencionó, en las últimas décadas se han desarrollado en adición a la prueba ELISA diez nuevas técnicas de medición. Cuatro se

consideran importantes en esta revisión ya que permiten las concentraciones salivales de IL1 α , IL6 y IL8 en carcinoma de células escamosas orales^{(12) (14) (15) (16)}, como lo son: los biomarcadores de fluido oral para la detección de cáncer oral a través de espectrometría de masa⁽³⁾, los sensores electroquímicos para la detección de biomarcadores Múltiples⁽⁴⁾, las inmunoesferas multiplexadas, las cuales miden la eficacia de varios analitos⁽¹⁾, y los sensores ópticos de proteínas para detectar marcadores de cáncer en la Saliva.⁽⁹⁾

CONCLUSIONES

La capacidad de control de cáncer oral y orofaringe depende de dos pilares: prevención y diagnóstico precoz.

Respecto a la predisposición al Cáncer oral de los pacientes que consumen tabaco y alcohol, la mayor parte de los autores coinciden en afirmar que la asociación del consumo de alcohol y tabaco aumenta el riesgo de desarrollo del cáncer oral en una cuantía mayor que lo que supondría la suma de sus efectos. Este cáncer se presenta con más frecuencia en hombres que en mujeres, debido al alto consumo de alcohol combinado con cigarrillo, en la actualidad se ha comprobado la forma en que el alcohol y sus derivados actúa sobre la cavidad oral en el desarrollo del cáncer; en recientes investigaciones se han descrito diferentes teorías que analizan la forma tanto local como sistémica en que el etanol actúa sobre la mucosa oral, convirtiéndose en un factor de riesgo importante en la aparición de dicha patología.^{(1) (2)}

Aunque el tabaquismo y el alcoholismo no son los únicos factores predisponentes para la aparición de cáncer oral, son los más determinantes debido, al consumo conjunto (Alcohol-cigarrillo) y a que sus componentes generan un grado elevado de adicción lo que incrementa no solo la frecuencia sino el tiempo de consumo.⁽²⁾

En cuanto al papel de la saliva en la detección de cáncer oral y los biomarcadores que se utilizan para este efecto, uno de los aspectos más importantes y de interés para el diagnóstico precoz del COCE, es la presencia de niveles alterados de

biomarcadores en las muestras de saliva, ya que se logra presumir la aparición a futuro de la enfermedad sin que se haya manifestado sistémica o localmente, y sin lugar a duda esto permitirá que se logre desviar su curso.^{(8) (9)}

Los biomarcadores en la actualidad son utilizados como medios diagnósticos avanzados para la detección de diversas patologías las cuales tienen evidencia que producen cambios a nivel sistémico en sangre como lo son el sida y cáncer, etc. estos se utilizan de una manera biomolecular teniendo en si la capacidad de detección de ciertas proteínas que pueden formar un vínculo biológico con la patología que se investiga y/o sospecha debido a su alta sensibilidad.⁽⁸⁾

En la actualidad se utilizan diferentes técnicas para el diagnóstico temprano del cáncer de células escamosas; estas técnicas son de fácil uso y aplicación para el odontólogo ya que deben ser realizadas por medio de muestras salivales. Las cuales consisten en citometrias de flujo que se usan como métodos para la cuantificación de analitos.⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁵⁾

Los biomarcadores de la saliva analizados muestran algunas limitaciones para su uso en diagnóstico clínico. Sin embargo, salivales IL-8 e IL6 mostraron normalización, especificidad, comodidad y buena sensibilidad. Frente al proceso inmunitario, las interleuquinas son el principal medio de comunicación intracelular, estas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria y para regular la magnitud de la respuesta inmune, y se inducen cuando los patógenos entran en contacto con los fagocitos; IL6 estimula la síntesis de fibrinógeno ante los diversos estímulos inflamatorios, también estimula la diferenciación de las células B a células productoras de anticuerpos y de otras proteínas como la α 1-antitripsina y la PCR, sin embargo cuando el estímulo para la producción de las citoquinas, se presenta en grandes cantidades esta puede entrar al torrente sanguíneo y junto con otras citoquinas, funcionar como pirógenos endógenos, inducen a un estado febril, contribuyen también a una gama de procesos fisiológicos y fisiopatológicos aumentando la secreción del factor de

transcripción AP-2 el cual es un potente regulador del ciclo celular que activa los oncogenes Ras y cerB2, también inactiva el gen supresor de tumores mediante el apoyo a hipermetilación resultando en la supresión de la apoptosis celular y el crecimiento incontrolado.⁽³⁶⁾

En el desarrollo de patologías cancerosas se ha evidenciado que en el suero y en la saliva hay un aumento en sus niveles lo que llevaría inferir que, es posible que esta influya de cierta forma en el crecimiento celular, puesto que es promotora de la angiogenesis la invasión y la interrupción de la neoplasia puesto que son citotóxicas inhibiendo la progresión o causando necrosis, el origen exacto de la IL6 en los procesos cancerosos no es claro pero se ha evidenciado que pueden tener origen o en las células tumorales, o por el estromas de los macrófagos allí presentes, sin embargo los niveles de IL6 serian predictores de un mal pronóstico de cáncer oral.⁽³⁴⁾

Sobre las técnicas de medición en muestras de saliva para la detección de cáncer oral en pacientes con predisposición, se concluye que en general estas técnicas usadas en la última década, arrojan buenos resultados y tienen como característica seguir formulaciones como las de CBA (Cytokine Bead Array) la cual ha sido utilizada en diferentes investigaciones para medir las citoquinas IL-8, IL 1- β , IL-6, IL-10, TNF. IL-12p70.⁽¹²⁾

"Los ensayos de CBA proveen un método de captura de un analito soluble o un conjunto de analitos con partículas de tamaño conocido y fluorescencia, haciendo posible la detención de estos analitos a través de la citometria de flujo"⁽¹²⁾

A diferencia de la prueba de ELISA estas técnicas permiten la medición de varios analitos en una sola muestra, su característica más relevante es la mezcla de diferentes analitos de varios tamaños que hacen de este medio el mejor existente en el momento para el desarrollo de este tipo de investigaciones, igualmente aportan permite obtener los datos desde una cantidad mínima de muestras, la comparación con estudios anteriores, existentes del mismo tipo, y además estas técnicas facilitan la "evaluación

más rápida de muestras múltiples en una sola plataforma". En conclusión se puede decir que estas nuevas tecnologías además de ser innovadoras proporcionan la realización de investigaciones en donde es posible hacer las mediciones de ciertas citoquinas para llegar a los resultados deseados a través de un grupo de múltiples analitos en muestras pequeñas.^{(12) (14) (15) (16)}

RECOMENDACIONES

Se requieren campañas educativas en el nivel local, y nacional para educar al público acerca de los factores de riesgo y síntomas de signos tempranos asociados con esta enfermedad. Los individuos también deben ser alentados a solicitar exámenes orales profesionales regulares por un dentista o médico. Los profesionales de la salud deben ser alentados a realizar exámenes de cáncer oral como parte de su régimen de cuidado del paciente y para estar bien informados de signos tempranos de cáncer oral.

Como el cáncer oral sigue siendo una enfermedad mortal, validación clínica a gran escala es necesaria ya que estos dos marcadores pueden desempeñar un papel rutinario de detección de cáncer oral.

En lo que toca a las técnicas de medición en muestras de saliva para la detección de cáncer oral en pacientes con predisposición, las técnicas que permiten el uso de la saliva como alternativa para el diagnóstico o como elemento para monitorizar la evolución de determinadas enfermedades o la dosificación de determinados medicamentos, es una vía prometedora. Se considera que los profesionales de la salud oral pueden aumentar su capacidad para el diagnóstico mediante la obtención y aprendizaje de test de uso sencillo, como los que utilizan el medio salival que tiene ventajas en accesibilidad y la ausencia de métodos cruentos para obtener la muestra y que ofrecen que la saliva sea un valioso instrumento diagnóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kan L, Hyung L, Chang J; Body Fluid Biomarkers for Early Detection of Head

and Neck Squamous Cell Carcinomas; *ANTICANCER RESEARCH* 31: 1161-1168 2011.

2. Cognetty D, Weber R, Lai S; Head and neck cancer; American Cancer Society, septiembre 2008.
3. McLeod N, Saeed N, Ali E; Oral cancer: Delays in referral and diagnosis persist; *BRITISH DENTAL JOURNAL VOLUME 198 NO. 11 JUNE 11 2005*.
4. Buelvas A; cáncer oral: el papel del odontólogo en la detección temprana y control; *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 2009.
5. Anna G Z, Geoge K, Petros K, Amanta P, John K, Nikolaos K, et al. Oral squamous cancer early detection and the role of alcohol smoking. *Head and neck oncology*.2011
6. Elena F R, M^a Ángeles C P, Rocío C L, Germán E G, Luis M L. Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: relación con el cáncer oral. *Oral Medicine and Pathology*. 2003.
7. Abdoul H M, Madhurima D, Debanshu B, Abdolreza S J, Teamur A. Relationship between selected socio-demographic factors and cancer of 56 oral cavity – a case report study. *Libertas academica. Cancer informatics* 2010;9 163-168.
8. Shen H, Jianghua W, Jiska M, Sonya L, Yongming X, Tianwei Y; Salivary Proteomic and Genomic Biomarkers for Primary Sjögren's Syndrome; *American College of Rheumatology Vol. 56, No. 11, November 2007*.
9. Hu S, Arellano M, Boonthung P; Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery; *Clin Cancer Res* 2008;14:6246-6252, 2008.
10. Bigler L, Streckfus C, Dubinsky W; Salivary Biomarkers for the Detection of Malignant Tumors That are Remote from the Oral Cavity; *Clin Lab Med* 29 2009.

11. Hernández M, Alavarado A; Interleucinas e inmunidad innata; *Rev Biomed* 12:272-280; 2001.
12. ME Arellano-Garcia, S Hu, J Wang, B Henson, H Zhou, D Chia; Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva; NIH public access; *Oral Dis.* 2008 November ; 14(8): 705–712.
13. Mahnaz Saheb Jamee, Mohammad Eslami, Fazele Atarbashi Moghadam, Abdolfattah Sarafnejad ; Salivary concentration of TNF α , IL1 α , IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 May1;13(5):E292-5.
14. Shen Hu, Tianwei Yu, Yongming Xie, Yanan Yang, Yang Li, Xiaofeng Zhou, Et Al. Discovery Of Oral Fluid Biomarkers For Human Oral Cancer By Mass Spectrometry. *Cancer Genomics & Proteomics* 2007 4: 55-64.
15. Fang Wei, Prabhudas Patel, Wei Liao, et al; Electrochemical Sensor for Multiplex Biomarkers Detection; *Clin Cancer Res* 2009;15:4446-4452. Published online June 9, 2009.
16. Winny Tan, Leyla Sabet, Yang Li, Tianwei Yu, Perry R. Klokkevold, David T. Wong , and Chih-Ming Ho; Optical Protein Sensor for Detecting Cancer Markers in Saliva *Biosens Bioelectron.* 15; 24(2), 2008 October.
17. Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit. Instruction manual. Becton, Dickinson and Company BD Biosciences.
18. Ocho F, Montoya L; Mortalidad por cáncer en Colombia en el año 2000: cuando aumentar no es mejorar; revista CES medicina volumen 17 No 1 enero-julio 2003.
19. López J; Mortalidad en Colombia por cáncer oral en el 2008; revista CES salud pública, volumen 2 No 2 julio-diciembre 2011.
20. Lacau St Guily et al. Head and neck cancers in France: an analysis of the hospital medical information system (PMSI) database *Head & Neck Oncology* 2010, 2:22
21. JEFFREY N. MYERS, MD, PhD, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: Increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* Volume 122 Number 1
22. Ocho F, Montoya L; Mortalidad por cáncer en Colombia en el año 2000: cuando aumentar no es mejorar; revista CES medicina volumen 17 No 1 enero-julio 2003.
23. López J; Mortalidad en Colombia por cáncer oral en el 2008; revista CES salud pública, volumen 2 No 2 julio-diciembre 2011.
24. Yang Li, Maie A. R. St. John, Xiaofeng Zhou St Detection Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer; *Clin Cancer Res* 2004;10:8442-8450.
25. Gandini S, Botteri E, Boniol M, Lowenfels M, Maisonneuve M; Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis; *Int. J. Cancer*: 122, 155–164 (2008).
26. Marcos M, Pastor I, Gonzalez R; Laso F; Common polymorphisms in interleukin genes (IL4, IL6, IL8 and IL12) are not associated with alcoholic liver disease or alcoholism in Spanish men; Elsevier 2008.
27. Akira K, Isao K, Nobuo T, Takahiko S, Takashi M, Kazuki I, Ryo T, Takehiro S Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy Subjects; *bull Tokyo Dent coll* (2007) 48(4): 199-203

28. Beauchemin M, Jordan R; Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck; J Clin Pathol 2006;59:445-453 2003.
29. Shen H, Jianghua W, Jiska M, Sonya L, Yongming X, Tianwei Y; Salivary Proteomic and Genomic Biomarkers
30. Primary Sjögren's Syndrome; American College of Rheumatology Vol. 56, No. 11, November 2007.
31. Hu S, Arellano M, Boontheung P; Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery; Clin Cancer Res 2008;14:6246-6252, 2008.
32. Gideon B, Raphael F, Thomas S, Aaron P, Rafael M. Nagler; Salivary Analysis in Oral Cancer Patients 2006 American Cancer Society DOI 10.1002/cncr.22386
33. Maie A. R., Yang Li, Paul D Chih-Ming Ho, Carlo M, Wenyuan Shi, Fengxia Qi, Benjamin Wu, Uttam S, Richard J, Lawrence W, No-Hee Park, Honghu Liu, Elliot A, David T. Interleukin 6 and Interleukin 8 as Potential Biomarkers for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma; Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004;130:929-935