

ELISA CANÇADO PORTO MASCARENHAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO CA 15.3 NA SALIVA E NO
SANGUE DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CORRELAÇÃO COM OS
DADOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS**

BRASÍLIA, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ELISA CANÇADO PORTO MASCARENHAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO CA 15.3 NA SALIVA E NO
SANGUE DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CORRELAÇÃO COM OS
DADOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dr^a. Eliete Neves da Silva Guerra

Brasília

2017

ELISA CANÇADO PORTO MASCARENHAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO CA 15.3 NA SALIVA E NO
SANGUE DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CORRELAÇÃO COM OS
DADOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Eliete Neves da Silva Guerra (presidente)

Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dr^a. Adriana Lofrano Alves Porto

Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dr. João Nunes de Matos Neto

Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dr^a. Ana Carolina Acevedo Poppe (suplente)

Universidade de Brasília (UNB)

*Aos pacientes oncológicos que,
Com coragem invejável,
Enfrentam essa doença;
E a seus familiares,
Que acompanham e apoiam nessa jornada.*

AGRADECIMENTO

Acima de tudo, agradeço à Deus, meu socorro bem presente. Meu renovo e refrigério.

Ao João, meu esposo, que sempre apoiou minhas atividades acadêmicas com atitudes e palavras de encorajamento e carinho. Obrigada por sua paciência e por cuidar de mim, inclusive, nos tantos momentos em que estive ausente.

À minha família, em especial aos meus pais, que me apoiaram e compreenderam o tempo extra necessário para a realização deste trabalho. À vocês devo grande parte das minhas conquistas.

Aos amigos do Laboratório de Histopatologia Bucal, em especial ao Gabriel, que sempre se prontificou a debater o trabalho. Obrigada pela generosidade e acolhimento de todos vocês.

À minha eterna preceptora de residência, colega de pós-graduação e amiga, Daniele Xavier Assad, por acreditar e confiar em mim em tantas situações da vida, do mestrado, da oncologia. Obrigada por me inspirar, confortar e animar tantas e tantas vezes.

Às queridas amigas Fernanda e Gláucia, que, com seu convívio tornaram mais leves as disciplinas.

À equipe do Cetro, que tanto colaborou desde as coletas das amostras e nunca poupou esforços para me auxiliar nesse trabalho. Esse é o jeito Cetro de ser!

Aos membros da banca, que com suas contribuições ajudaram e aprimoraram essa obra.

Aos professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde da Universidade de Brasília, por serem tão atenciosos e solícitos.

À FAPDF, pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Sabin, através do Núcleo de Apoio à Pesquisa, pela coparticipação com o processamento das amostras.

À Prof. Dr^a. Eliete, orientadora de dedicação ímpar, por me dar a oportunidade de realizar o mestrado. Sua participação trouxe uma inestimável contribuição por sua vivência prática e conceitos científicos. Pelos conhecimentos, disponibilidade, dedicação, apoio e entusiasmo transmitidos durante os últimos anos de convívio e na orientação deste trabalho.

*“Viver é acalentar sonhos e esperanças,
Fazendo da fé a nossa inspiração maior.
É buscar nas pequenas coisas,
Um grande motivo para ser feliz!”*

Mário Quintana

RESUMO

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais diagnosticada no mundo, sendo a principal causa de morte relacionada ao câncer entre as mulheres. Sua detecção precoce oferece a promessa de um tratamento menos agressivo e aumento na sobrevida. Nesse cenário, surgem os estudos com biomarcadores, sendo a saliva cada vez mais reconhecida como um excelente veículo diagnóstico, uma vez que pode ser coletada de forma simples e não invasiva. Nesse contexto, esse trabalho propõe-se a avaliar a expressão proteica do CA 15.3 na saliva e no sangue de pacientes com câncer de mama e de controles saudáveis. Assim, avaliou-se as concentrações séricas de CA 15.3 pelo ensaio de eletroquimioluminescência, quanto as concentrações salivares de CA 15.3 por ensaios de quimioluminescência e ELISA. O trabalho também correlacionou os níveis de CA 15.3 séricos e salivares com o estadiamento e com o perfil molecular do câncer de mama. A validação diagnóstica foi realizada, determinando sua sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia. Os resultados mostraram que as concentrações séricas e salivares de CA 15.3 não foram capazes de discriminar pacientes saudáveis de pacientes portadoras de câncer de mama. A associação entre os níveis séricos e salivares do CA 15.3 com o perfil molecular e com estadiamento foi negativa. Ainda, o desempenho do método de ELISA para quantificação do CA 15.3 salivar foi superior quanto à sensibilidade, VPP, VPN e acurácia comparativamente ao método de quimioluminescência. Porém, a quimioluminescência das amostras de saliva mostrou melhor desempenho quanto à especificidade em comparação ao método ELISA. Não foi observada correlação entre os níveis séricos e salivares de CA 15.3. Esse estudo confirmou a presença do CA 15.3 na saliva, podendo a mesma ser usada em estudos futuros com esse propósito. No entanto, não foi possível comprovar a utilização do biomarcador CA 15.3 na saliva para finalidade diagnóstica. Futuras investigações devem incluir maior número de pacientes e ampliação dos ensaios e biomarcadores para responder a essa pergunta, bem como, sua utilização para fins prognósticos e monitoramento de tratamento deve ser avaliada em estudos longitudinais.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama, biomarcadores, saliva, CA15.3, quimioluminescência, ELISA.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most diagnosed neoplasia in the world and the leading cause of cancer-related death in women. Its early detection offers the promise of a less aggressive treatment and increases survival's chance. In this scenario, the research with biomarkers appear and saliva is increasingly being recognized as an excellent mean of diagnosis, once it can be collected in a simple and non-invasive way. In this context, this work proposes to evaluate the protein expression of CA 15.3 in saliva and blood of patients with breast cancer and healthy controls. Therefore, CA 15.3 serum concentrations were evaluated through electrochemiluminescence assay and CA 15.3 salivary concentrations per chemiluminescence and ELISA assay. The work also correlated the serum and salivary levels of CA 15.3 with the staging and the molecular profile of the breast cancer. The diagnosis validation was made in order to determine its sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy. The results showed that the serum and salivary concentrations of CA 15.3 were not able to distinguish healthy patients from the ones with breast cancer. The association of the serum and salivary levels of CA 15.3 with the molecular profile and the staging was negative. Still, the performance of ELISA assay for quantification of salivary CA 15.3 was higher for sensitivity, PPV, NPV, and accuracy when comparing to chemiluminescence assay. However, the chemiluminescence of the saliva samples showed a better performance in terms of specificity when comparing to ELISA assay. No correlation between serum and salivary levels of CA 15.3 was observed. This study confirmed the presence of CA 15.3 in saliva and it can be used in future researches with this purpose. However, it was not possible to prove the use of the biomarker CA 15.3 in saliva for diagnosis purposes. Future investigations must include a bigger number of patients and an expansion of the tests and biomarkers in order to answer this question. As well as, their use for prognostic purposes and treatment monitoring must be evaluated in longitudinal studies.

KEYWORDS: Breast cancer, biomarkers, saliva, CA 15.3, chemiluminescence, ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da glândula mamária...	19
Figura 2 – Modelo de desenvolvimento do câncer de mama.....	20
Figura 3 – Perfis de expressão gênica do câncer de mama pela técnica de microarranjo de DNA	21
Figura 4 – Mecanismo de transporte molecular do soro para os ductos das glândulas salivares.....	25
Figura 5 – Representação esquemática da proteína MUC1.....	27
Figura 6 – Representação das etapas do ensaio por quimioluminescência...	34
Figura 7 – Representação das etapas do ensaio por ELISA.....	36
Figura 8 – Tabela de contingência para validação de testes diagnósticos.....	40
Figura 9 – Medianas do CA 15.3 sérico para os casos e controles de câncer de mama.....	46
Figura 10 – Medianas do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência para casos e controles de câncer de mama.....	47
Figura 11 – Medianas do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA para casos e controles de câncer de mama.....	48
Figura 12 – Frequência dos estadiamentos dos casos de câncer de mama.	49
Figura 13 – Distribuição do CA 15.3 sérico de acordo com o estadiamento.....	50
Figura 14 – Classificação molecular dos casos de câncer de mama.....	51
Figura 15 – Distribuição do CA 15.3 sérico de acordo com os subtipos moleculares.....	52

Figura 16 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência de acordo com o estadiamento.....	53
Figura 17 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA de acordo com o estadiamento.....	55
Figura 18 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência de acordo com os subtipos moleculares.....	56
Figura 19 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA de acordo com os subtipos moleculares.....	58
Figura 20 – Curva ROC para o CA 15.3 sérico.....	59
Figura 21 – Curva ROC para o CA 15.3 salivar pela metodologia de quimioluminescência.....	59
Figura 22 – Curva ROC para o CA 15.3 salivar pela metodologia de ELISA..	60
Figura 23 – Correlação entre o CA 15.3 salivar por quimioluminescência e o CA 15.3 sérico em pacientes com câncer de mama.....	63
Figura 24 – Correlação entre o CA 15.3 salivar por ELISA e o CA 15.3 sérico em pacientes com câncer de mama.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento TNM para o câncer de mama	37
Tabela 2 – Critérios de Saint Gallen para definição do perfil molecular do câncer de mama.....	38
Tabela 3 – Fórmulas para validação dos testes diagnósticos.....	40
Tabela 4 – Características demográficas dos grupos do estudo	43
Tabela 5 – Valores de CA 15.3 sérico e salivar para os casos e controles de câncer de mama.....	45
Tabela 6 – Validação diagnóstica para o CA 15.3 sérico.....	61
Tabela 7 – Validação diagnóstica para o CA 15.3 salivar por quimioluminescência.....	61
Tabela 8 – Validação diagnóstica para o CA 15.3 salivar por ELISA.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica

AUC – Área sobre a curva

BRCA 1 – Gene de susceptibilidade ao câncer de mama tipo 1

BRCA 2 – Gene de susceptibilidade ao câncer de mama tipo 2

c-erbB-2 – Proto-oncogene c-erbB-2

CA 15.3 – Antígeno Cancerígeno 15.3

CA 27.29 – Antígeno Cancerígeno 27.29

CACON – Centro de Alta Complexidade em Oncologia

CDI – Carcinoma ductal infiltrante

cDNA – DNA complementar

CEA – Antígeno Carcinoembrionário

CPS – Contagens por segundo

EIA – Imunoensaio enzimático

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EQL – Eletroquimioluminescência

HER2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

IMC – Índice de massa corporal

INCA – Instituto Nacional de Câncer

KDa – Kilodaltons

MUC1 – Mucina 1

NAP – Núcleo de Apoio à Pesquisa

OMS – Organização mundial da saúde

p53 – Proteína supressora tumoral

PET-CT – Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons

QL – Quimioluminescência

RE – Receptor de Estrogênio

RLU – Unidades relativas de luz

ROC – *Receiver Operating Characteristic*

RT-qPCR – Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

TNM – Sistema de estadiamento de tumores sólidos

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	18
2.2.	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA.....	18
2.3.	BIOMARCADOR TUMORAL.....	22
2.4.	SALIVA COMO VEÍCULO DIAGNÓSTICO.....	23
2.5.	CA 15.3 SÉRICO.....	25
2.6.	CA 15.3 SALIVAR.....	27
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.	MÉTODOS.....	30
4.1.	DESENHO DO ESTUDO E PARTICIPANTES.....	30
4.2.	COLETA, TRANSPORTE E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	31
4.3.	ENSAIO DE DETECÇÃO DO CA 15.3 SÉRICO POR ELETROQUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	32
4.4.	ENSAIO DE DETECÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	33
4.5.	ENSAIO DE DETECÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR POR ELISA.....	36
4.6.	CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS DE CA 15.3 SÉRICO E SALIVAR COM O PERFIL MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA E TNM.....	36
4.7.	VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA OS TESTES.....	39
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5.	RESULTADOS.....	42
5.1.	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	42
5.2.	CA 15.3 SÉRICO PELO ENSAIO DE ELETROQUIMIOLUMINESCÊNCIA E CA 15.3 SALIVAR PELOS ENSAIOS DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA E ELISA.....	44
5.3.	DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SÉRICO DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO.....	48
5.4.	DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SÉRICO DE ACORDO COM O PERFIL MOLECULAR.....	50
5.5.	DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO.....	52
5.6.	DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE ELISA DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO.....	54
5.7.	DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA DE ACORDO COM O PERFIL MOLECULAR.....	55
5.8.	DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE ELISA DE ACORDO COM O PERFIL MOLECULAR.....	57
5.9.	CURVA ROC PARA O CA 15.3 SÉRICO E SALIVAR.....	58
5.10.	VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA O CA 15.3 SÉRICO.....	60

5.11. VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA O CA 15.3 SALIVAR POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	61
5.12. VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA O CA 15.3 SALIVAR POR ELISA.....	62
5.13. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO CA 15.3 SÉRICO E SALIVAR EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.....	62
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO I. PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	83
ANEXO II. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	94
ANEXO III. QUESTIONÁRIO.....	98

1 INTRODUÇÃO

Globalmente, o câncer de mama é a segunda neoplasia mais diagnosticada, correspondendo a mais de um milhão de casos por ano (1), sendo, também, a principal causa de morte relacionada aos tumores malignos em mulheres (2). As taxas de incidência são maiores na América do Norte, Austrália e Nova Zelândia, e menores na Ásia e África Subsaariana (2). Essas diferenças geodemográficas provavelmente estão relacionadas a mudanças sociais resultantes da industrialização, como, por exemplo, consumo de gordura, peso corporal, menarca precoce e padrões reprodutivos, como menor número de gestações e idade mais avançada na primeira gravidez (3). Nos Estados Unidos, o câncer de mama representa 230.000 casos de câncer por ano e é responsável por mais de 40.000 mortes (2). A taxa de mortalidade vem reduzindo desde a década de 70 (4). Este declínio se deve, pelo menos em parte, à melhoria do rastreamento e da terapia adjuvante (5). Dados mostram que, no Brasil, as taxas de incidência e mortalidade variam de acordo com a região geográfica, verificando-se maiores taxas de incidência e menores de mortalidade nas regiões sul e sudeste. Enquanto que menores taxas de incidência e maiores de mortalidade são observadas nas regiões norte e nordeste. Estas disparidades refletem, possivelmente, as diferenças na qualidade do sistema de saúde, como o limitado acesso à triagem e tratamento (6).

A detecção precoce do câncer de mama pode oferecer um tratamento menos agressivo (cirurgias menores, menos radiação ou quimioterapia) e aumento na sobrevida. O rastreamento convencional, com exame físico e mamografia, tem sensibilidade e especificidade menores que o desejável (7). Atualmente, o rastreamento com mamografia é considerado o padrão de referência para a detecção do câncer de mama. No entanto, a sensibilidade desse teste varia entre 54% e 77%, dependendo do tipo de procedimento mamográfico (7). Assim, mulheres que anualmente apresentam mamografias supostamente normais podem ser portadoras de neoplasia de mama. Taxas falso-positivas na triagem do câncer de mama também configuram uma limitação notável, causando biópsias desnecessárias, aumento do custo e apreensão do paciente (8). Um obstáculo relevante para o reconhecimento precoce do câncer de mama é o desenvolvimento de métodos que, com precisão, sejam capazes de identificar indivíduos potencialmente acometidos pela doença (9). Avanços na detecção precoce do

câncer de mama são essenciais para o tratamento bem sucedido do paciente (10). Para confirmar o diagnóstico de câncer de mama, biópsias da mama como biópsia por agulha ou mamotomia são seguidas por análises histopatológicas e imuno-histoquímicas, embora já tenham sido relatadas limitações destes métodos (11). O procedimento para biópsia é invasivo e associado, em alguns casos, à morbidade para o paciente. A complexidade relativa, o baixo acesso e os altos custos do padrão de referência com a mamografia, empregada para diagnosticar a grande maioria dos casos de câncer de mama, tem incitado a pesquisa de métodos diagnósticos alternativos para aprimorar a detecção precoce (11).

Avanços tecnológicos têm beneficiado a pesquisa de biomarcadores e a saliva é cada vez mais reconhecida como um excelente veículo diagnóstico, uma vez que pode ser coletada de forma simples e não invasiva. Na última década desenvolveu-se um interesse crescente no uso da saliva como um teste auxiliar que melhora as abordagens médicas convencionais para avaliação de doenças sistêmicas (12-14). Um ensaio sensível que utilize espécimes clínicos coletados de forma não invasiva, e que identifique com precisão e rapidez biomarcadores, seria ideal para a triagem e detecção do câncer de mama (15). Como meio de diagnóstico, a saliva tem várias vantagens quando comparada ao sangue. Sua coleta é relativamente simples, segura e não invasiva. Além disso, a saliva pode ser coletada repetidamente sem desconforto para o paciente (16). Uma vez que a saliva constitui fração filtrada do sangue, refletindo assim as condições fisiológicas do corpo, os biomarcadores analisados em amostras salivares podem ser usados para monitorar o estado clínico e prever doenças sistêmicas (17-19).

Tradicionalmente, a monitorização da eficácia do tratamento do câncer de mama se dá através do tripé: avaliação clínica com anamnese e exame físico; realização de exames de imagem; e a dosagem de marcadores tumorais séricos (20). Marcadores tumorais são definidos como alterações celulares, bioquímicas, moleculares ou genéticas detectadas em um processo normal, anormal ou simplesmente biológico que pode ser reconhecido ou monitorado e mensurável em meios biológicos, como em tecidos, células ou fluidos (21). Diversos segmentos na área da medicina, principalmente no âmbito da oncologia, têm incorporado às suas diretrizes de práticas clínicas, as recomendações para a avaliação de biomarcadores visando melhores decisões terapêuticas e melhores resultados clínicos.

No monitoramento do câncer de mama, o Antígeno Cancerígeno 15.3 (CA

15.3) é o marcador amplamente utilizado. Trata-se de uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais glandulares que pode ser detectada no sangue, sendo este, o meio biológico bem estabelecido, até o momento, para acompanhamento dos níveis deste biomarcador (22-26).

Nesse contexto, esse trabalho foi desenvolvido para avaliar a expressão proteica do CA 15.3 na saliva e no sangue de pacientes com câncer de mama e de controles saudáveis, correlacionar tais achados com dados clínicos e histológicos, comparar as concentrações do CA 15.3 em mulheres com e sem câncer de mama, correlacionar os níveis séricos e salivares deste marcador, de forma a avaliar sua capacidade diagnóstica e analisar o desempenho diagnóstico dos métodos de quimioluminescência e ELISA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

À medida que os processos de transição demográfica e epidemiológica desenvolvem-se, as neoplasias malignas vêm se tornando rapidamente uma das principais causas de morbidade e mortalidade na população mundial (27).

Excluindo-se neoplasias de pele não-melanoma, a neoplasia de mama é o tipo de câncer mais comum e o maior causador de morte por câncer entre as mulheres no mundo e no Brasil. O câncer de mama responde por cerca de 28% dos casos novos a cada ano, com um risco estimado de 50 casos para cada 100.000 mulheres no Brasil (28). Segundo estimativa de 2016 do Instituto Nacional de Câncer (INCA), 57.960 novos casos foram diagnosticados, com 14.388 mortes (29). Nos Estados Unidos, 1 em cada 8 mulheres desenvolverá câncer de mama ao longo da vida (30). Sua incidência tem aumentado constantemente nas últimas décadas, mas sua mortalidade está em declínio, sugerindo um benefício da combinação entre detecção precoce e tratamento mais eficaz (31).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, causada por interações de fatores de risco herdados e ambientais, que levam ao acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas (3). A etiologia da vasta maioria dos casos de câncer de mama é desconhecida. No entanto, vários fatores de risco têm sido estabelecidos, e incluem: sexo feminino, aumento da idade do paciente, história familiar de câncer de mama, menarca precoce, menopausa tardia, idade avançada na primeira gestação, terapia estrogênica, exposição prévia a radioterapia torácica, doença proliferativa benigna da mama, aumento da densidade mamária na mamografia e dieta rica em gordura, além da presença de mutações nos genes *BRCA1/2* (32, 33). Mutações deletérias nos genes *BRCA 1* e *BRCA 2* são responsáveis pela maioria dos cânceres de mama hereditários, implicadas em cerca de 40% destes casos (34).

2.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA

A glândula mamária (Figura 1) contém dois subtipos distintos de células epiteliais: basal (mioepitelial) e luminal, que podem ser facilmente distinguidas pelo

padrão de expressão de certas citoqueratinas. A transformação deliberada destas células é o gatilho que deflagra a oncogênese epitelial por meio de um complexo processo de múltiplos passos em que fatores genéticos, ambientais e dietéticos, em conjunto, são capazes de alterar as vias críticas reguladoras do crescimento celular resultando em proliferação descontrolada, que é uma característica da carcinogênese (35).

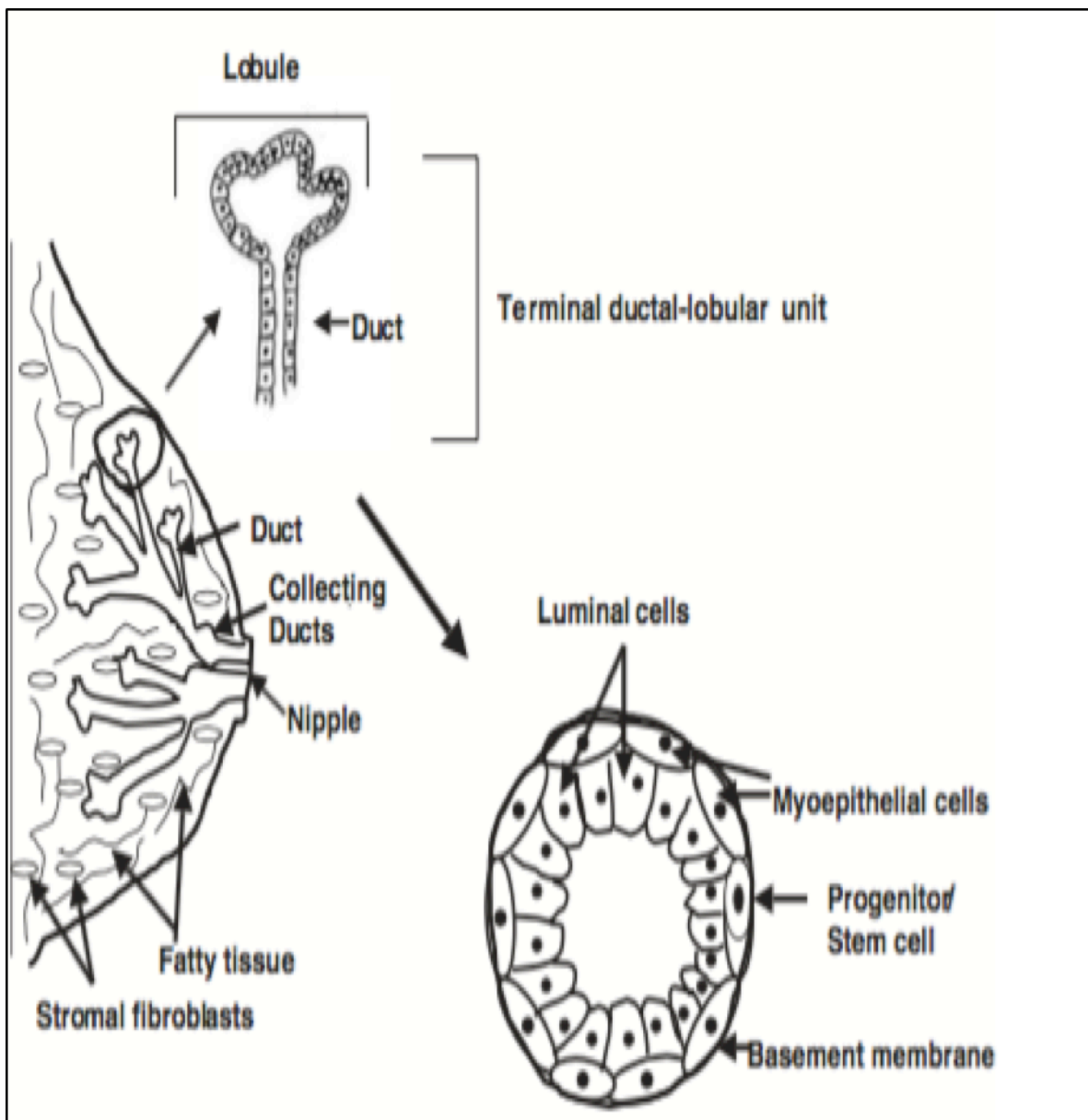


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da glândula mamária. Retirada de Goberdhan et al. (36)

A grande maioria são carcinomas que se originam de células que revestem os ductos formadores de leite da glândula mamária (Figura 2) (37). No entanto, 3% a 15% de todos os casos parecem se originar do epitélio do tipo basal, e representam um grupo mais agressivo de tumores (38).

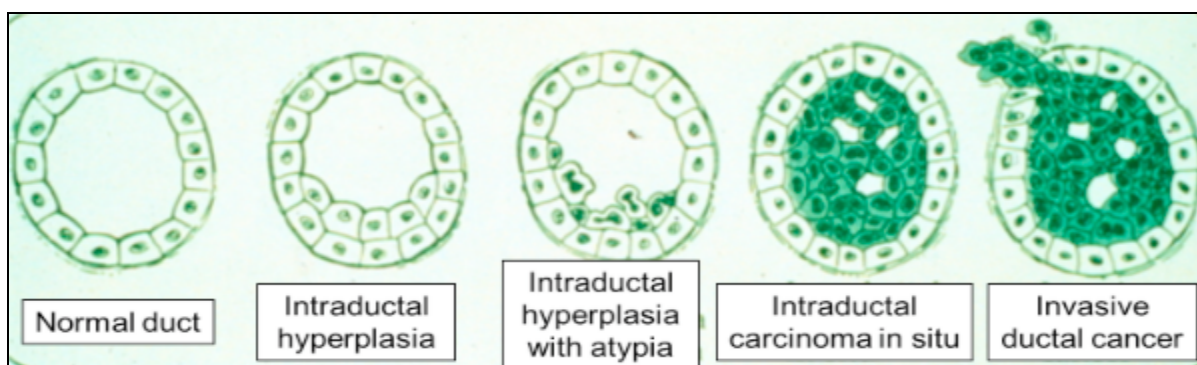


Figura 2 - Modelo de desenvolvimento do câncer de mama. Adaptada de Mayo Foundation For Medical Education And Research (39)

Em 2000, Perou et al. (40) demonstraram que o câncer de mama poderia ser classificado em grupos moleculares distintos, baseados na expressão gênica (Figura 3). Nesse estudo pioneiro, diferentes tipos de tecidos de tumores de mama foram avaliados pela técnica de microarranjo de DNA complementar (cDNA) para 496 genes intrínsecos (genes com expressão peculiar em diferentes tumores). A partir desta análise de microarranjos foi observado que os tumores com superexpressão de genes relacionados ao receptor de estrogênio (RE) apresentavam padrões de expressão gênica totalmente diferentes daqueles tumores que não expressavam genes relacionados ao RE. Os tumores RE positivos apresentavam padrão de expressão similar às células epiteliais luminais normais do sistema ducto-acinar da glândula mamária e, por isso, foram denominados como tumores luminais. Os carcinomas que não apresentavam expressão de genes relacionados ao RE foram divididos em dois grupos bem caracterizados: grupo com superexpressão da proteína transmembrana HER2 (grupo HER2) e grupo representado por tumores que expressavam genes encontrados nas células mioepiteliais/basais dos ductos mamários normais (grupo basal-símile). Em estudo posterior, do mesmo grupo de pesquisadores (41), demonstrou-se que o grupo Luminal poderia ser dividido em dois subtipos: Luminal A e Luminal B, levando-se em conta o grau de expressão dos

REs e o índice de proliferação celular (42). Convencionou-se, então, que os cânceres de mama abrangem pelo menos quatro subtipos de tumor biologicamente diferentes, os quais apresentam características imuno-histoquímicas e prognósticos distintos: Luminal A, Luminal B, HER2 e Basal-símile (Tripló negativo). Mais tarde, o subtipo Luminal B foi subdividido em dois grupos baseados na superexpressão da proteína HER2: Luminal B HER2 positivo e Luminal B HER2 negativo.

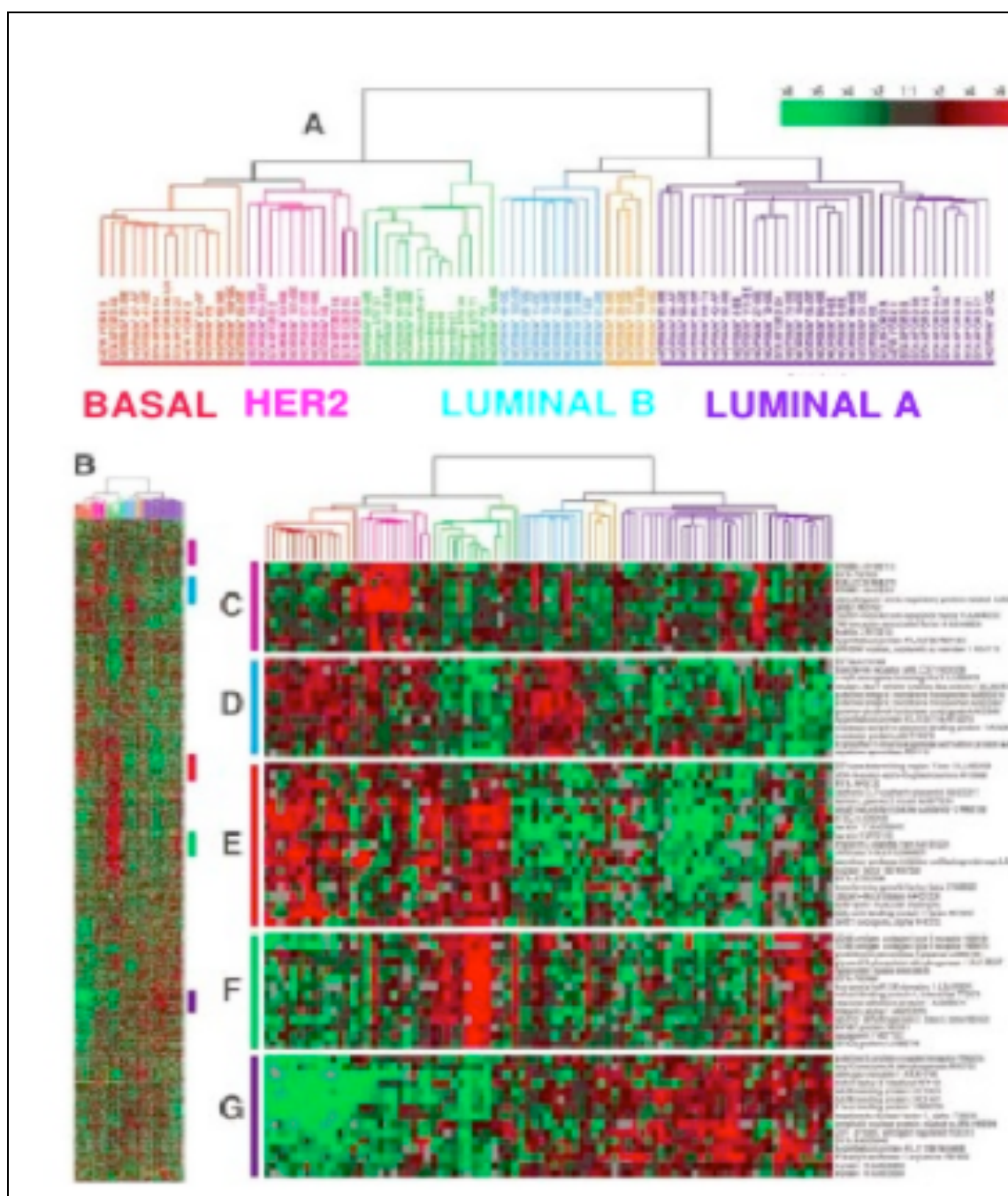


Figura 3 - Perfis de expressão gênica do câncer de mama pela técnica de microarranjo de DNA. Retirada e adaptada de Perou et al. (40)

2.3 BIOMARCADOR TUMORAL

Um marcador tumoral (MT) é qualquer material biológico fornecido pela célula do câncer que pode ser detectado e utilizado como indicador do *status* do tumor ou indicador de resultados no contexto de intervenções terapêuticas (43). Podem corresponder a genes, proteínas ou fragmentos de proteínas, incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas ou hormônios. São categorizados em classes, que incluem, marcadores de diagnóstico, de triagem e de prognóstico. Um marcador de diagnóstico é usado em pessoas com sinais ou sintomas para ajudar a avaliar se o indivíduo tem uma condição. Um marcador de triagem ou rastreio é utilizado em pessoas assintomáticas, para detectar uma doença ou condição numa fase precoce. Um marcador prognóstico é usado em indivíduos diagnosticados com uma condição, para prever resultados subsequentes, como recorrência ou progressão da doença (15, 44). Nesse sentido, os MT têm auxiliado a clínica em diversas situações, tais como triagem em casos específicos, como em grupos de alto risco, associado a exames complementares; diagnóstico diferencial de doenças; avaliação de prognóstico; monitorização de tratamento: avaliação da resposta terapêutica, detecção precoce de recidiva (45). Além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento (14, 46). Os MT conhecidos até hoje não são sensíveis o suficiente para serem usados em triagem populacional ou para o estabelecimento de diagnóstico primário de câncer.

Existem cinco etapas distintas para conceituar o desenvolvimento de um biomarcador tumoral, que são: Fase 1 - estudos pré-clínicos exploratórios com o objetivo de identificar biomarcadores potenciais. Fase 2 - Desenvolvimento de testes capazes de identificar/quantificar o biomarcador (genes/proteínas) em amostras clínicas, testando sua especificidade e reprodutibilidade interlaboratorial. Fase 3 - Estudo retrospectivo longitudinal, a fim de avaliar a capacidade de correlação. Fase 4 - Estudos prospectivos de rastreio. Fase 5 - Estudos de controle, com o objetivo de avaliar impacto clínico (47, 48).

Um biomarcador ideal deve ter algumas características críticas, como presença obrigatória em todos os pacientes afetados, ou seja, alta sensibilidade e especificidade, reversibilidade após o tratamento adequado e detectabilidade antes que os pacientes desenvolvam manifestações clínicas óbvias da doença, além de poderem ser identificados e medidos por um ou mais ensaios ou testes (49). Os

biomarcadores ideais devem refletir não só a gravidade da doença, mas também fornecer informações sobre a história cumulativa da doença, permitindo simultaneamente um valor de corte (*cutoff*) com mínima sobreposição entre estados normais e de doença (50).

Apesar de anos de pesquisa e centenas de relatos sobre marcadores tumorais em oncologia, o número de marcadores que emergiram como clinicamente úteis é pequeno (51, 52). Muitas vezes, estudos preliminares descreveram determinados marcadores como promissores, mas pesquisas subsequentes sobre o mesmo marcador ou sobre marcadores relacionados produzem conclusões inconsistentes. Para evitar essa discrepância, diretrizes foram desenvolvidas para nortear as pesquisas no campo dos biomarcadores, com o objetivo de incentivar relatos transparentes e completos, de forma que informações relevantes estejam disponíveis para o julgamento dos pesquisadores quanto à utilidade dos dados e a compreensão do contexto em que as conclusões se aplicam (53).

2.4 SALIVA COMO VEÍCULO DIAGNÓSTICO

A saliva é um fluido biológico importante que desempenha várias funções, incluindo lubrificação para a fala, digestão de alimentos e proteção contra microorganismos. A saliva é produzida por glândulas salivares maiores e menores e é composta por 99% de água e minerais, muco, eletrólitos, ácidos nucleicos e proteínas, como enzimas, inibidores enzimáticos, fatores de crescimento, imunoglobulinas e outras glicoproteínas (54). A saliva é uma fração filtrada do sangue, refletindo condições fisiológicas do corpo. Portanto, poderia ser usada para monitorar estados clínicos e prever doenças sistêmicas. Adicionalmente, muitas das características dos fluidos corporais, como sangue e urina, são aplicáveis à saliva incluindo variações diurnas e a presença de diversos analitos diagnósticos (55).

Os estudos que avaliam o uso da saliva como um meio diagnóstico têm aumentado exponencialmente durante os últimos 10 anos e sua utilização como teste clínico tem se tornado um método promissor para o diagnóstico de várias doenças (56). A investigação de biomarcadores salivares desenvolveu-se além das doenças orais (57-59) para doenças sistêmicas (59-61), ampliando o potencial de detecção de diversas enfermidades (12, 19, 62-64). A pesquisa e a tecnologia translacionais baseadas em saliva estão agora em uma fase madura e podem ter

utilidade para a detecção do câncer de mama (64), uma vez que, um ensaio sensível que identifique prontamente biomarcadores usando espécimes clínicos coletados de forma não invasiva, seria ideal para a detecção e rastreamento dessa doença (65).

A saliva, como matriz analítica, apresenta superioridade em comparação ao sangue e urina. Primeiro, sua coleta não é invasiva, o que significa que é conveniente, segura e indolor para os pacientes. Consequentemente, pode ser usada em situações clinicamente difíceis, como em crianças, pacientes portadores de deficiência e ansiosos, onde a coleta de sangue pode ser um ato difícil de se realizar (66). Além de reduzir o risco de lesão percutânea e infecção relacionadas à coleta de sangue, evita as condições embaraçosas na coleta de urina. Por fim, não é necessário equipe com treinamento profissional, o que torna econômica e apropriada sua coleta em grande escala (67).

Os constituintes da saliva são intimamente relacionados aos do sangue. Apesar de algumas substâncias serem produzidas pelas glândulas salivares, os demais produtos químicos avaliados na saliva apresentam a propriedade de se manifestar no sangue e na saliva. Uma fina camada de células epiteliais que separam os ductos salivares da circulação sistêmica, permite a transferência de substâncias para a saliva por meio de diversos mecanismos, incluindo ultrafiltração, difusão através da membrana celular, difusão passiva através de um gradiente de concentração e transporte ativo, tanto por via intercelular ou intracelular (68,69). Além disso, as glândulas salivares são altamente vascularizadas, permitindo, também, a troca de constituintes presentes no sangue (68). Conforme ilustra a Figura 4, observa-se a proximidade de uma glândula salivar ao sistema vascular.

Uma série de marcadores tumorais estão presentes na saliva (69-72) e, no contexto do câncer de mama, uma diversidade de biomarcadores foi avaliada em uma revisão sistemática publicada por nosso grupo (73). Estes biomarcadores podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos, imunohistoquímicos, por genômica (74, 75), proteômica (56, 65), transcriptômica (15) e metabolômica, um método emergente e promissor (76, 77). Os métodos de diagnóstico utilizando saliva, particularmente os fundamentados em tecnologias metabolômicas, oferecem uma estratégia clínica capaz de caracterizar a associação entre análises salivares e uma determinada doença (17). Apesar dos resultados favoráveis, é necessária investigação adicional nesta área para que a saliva possa ser efetivamente implementada na prática clínica como fluido diagnóstico.

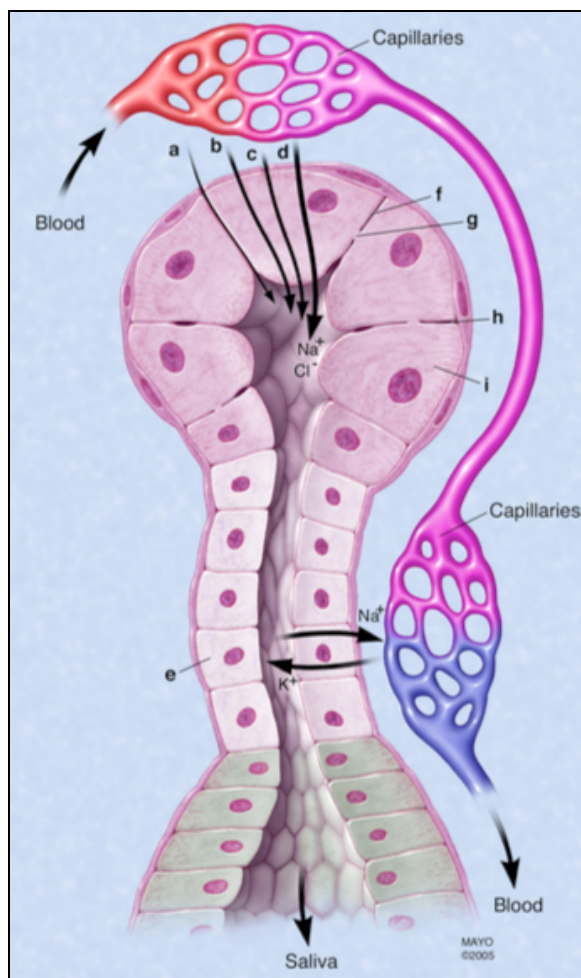


Figura 4 – Mecanismo de transporte molecular do soro para os ductos das glândulas salivares.

Retirada e adaptada de Haeckel et al. (70)

2.5 CA 15.3 SÉRICO

O Antígeno Cancerígeno 15.3 é uma glicoproteína de 300-400 Kilodaltons (KDa) produzida pelas células epiteliais glandulares (78, 79). Os níveis séricos de CA 15.3 detectam formas solúveis de MUC1, uma glicoproteína transmembrana aberrantemente superexpressa em cânceres de mama (80, 81). A proteína MUC1 é uma molécula transmembrana glicosilada larga contendo três grandes domínios: uma vasta região extracelular, uma membrana de expansão sequencial e um domínio citoplasmático (82) (Figura 5). Apesar da função fisiológica do MUC1 não ser clara, esta glicoproteína tem sido implicada na adesão celular, invasão linfática e metástase (83). O primeiro ensaio para identificação do CA 15.3 no sangue foi

executado a partir de um radioimunoensaio em 1985, sendo baseado em dois anticorpos monoclonais: DF3 (84) e 115D8 (22, 85). Atualmente, os ensaios mais utilizados para detectar CA 15.3 sérico são imunoenaios enzimáticos baseados nos métodos de quimioluminescência/eletroquimioluminescência e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), com sanduíche com 115D8 (utilizado como anticorpo de captura) e DF3 (como um anticorpo de detecção). O valor de corte para o nível sérico de CA 15.3 é definido entre 25 e 40 U/mL, conforme variações laboratoriais (86).

O CA 15.3 é considerado o marcador tumoral, por excelência, do câncer de mama, pois é o mais sensível e específico (87, 88). Embora muitas moléculas tenham sido investigadas como supostos marcadores para o câncer de mama, apenas algumas apresentaram sensibilidade e especificidade suficientes para serem úteis clinicamente. Estudos indicam que a elevação do CA 15.3 varia de acordo com o estadiamento da doença, sendo de 9% no estágio I, 19% no estágio II, 38% no estágio III, e de 75% no estágio IV (89). Da mesma forma, a sensibilidade varia de acordo com a massa tumoral e o estadiamento clínico, sendo de 88% a 96% na doença disseminada (90). Na fase inicial, apenas 23% dos casos apresentam aumento deste marcador (91). Portanto, devido à sua baixa sensibilidade e relativamente baixa especificidade para detecção de câncer de mama inicial, a dosagem de CA 15.3 não é recomendada para rastreio, diagnóstico ou para avaliação de nódulo mamário suspeito (22). A grande utilização do CA 15.3 é para o diagnóstico precoce de recidiva, precedendo os sinais clínicos em até 13 meses (22). Em relação ao prognóstico, pacientes com valores pré-operatórios maiores que 40 U/mL têm uma probabilidade de 77% de recidiva em 5 anos (92). Apenas 1,3% da população sadia tem CA 15.3 elevado (93). Valores alterados podem ocorrer no câncer de pâncreas, pulmão, fígado, ovário e colo do útero, ou, mais raramente, em doenças benignas da mama, hepatopatias, lúpus eritematoso sistêmico, tuberculose e sarcoidose (85).

Nos anos 2000 e 2007, as Diretrizes de Prática Clínica da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) indicaram que havia evidência insuficiente para recomendar a dosagem do Antígeno Carcinoembrionário (CEA), CA 15.3 ou Antígeno Cancerígeno 27.29 (CA 27.29) para rastreamento e diagnóstico do câncer de mama (94). Em 2015, a ASCO endossou que os biomarcadores tumorais séricos CEA, CA 15.3 e CA 27.29 podem ser usados como avaliações complementares para

colaborar nas decisões relacionadas ao tratamento do câncer de mama metastático (95). Nenhuma menção ainda foi feita por este painel sobre o uso de biomarcadores salivares.

Em resumo, os níveis séricos de CA 15.3 oferecem um método sensível e específico razoável de monitorização do curso clínico de pacientes portadores de câncer de mama com doença metastática, sendo um marcador já difundido no seguimento dos pacientes com câncer de mama, mas cujo valor diagnóstico ainda é incerto. Se os níveis de CA 15.3 estão elevados, alterações posteriores destes níveis se correlacionam de forma fidedigna ao curso clínico da doença (95).

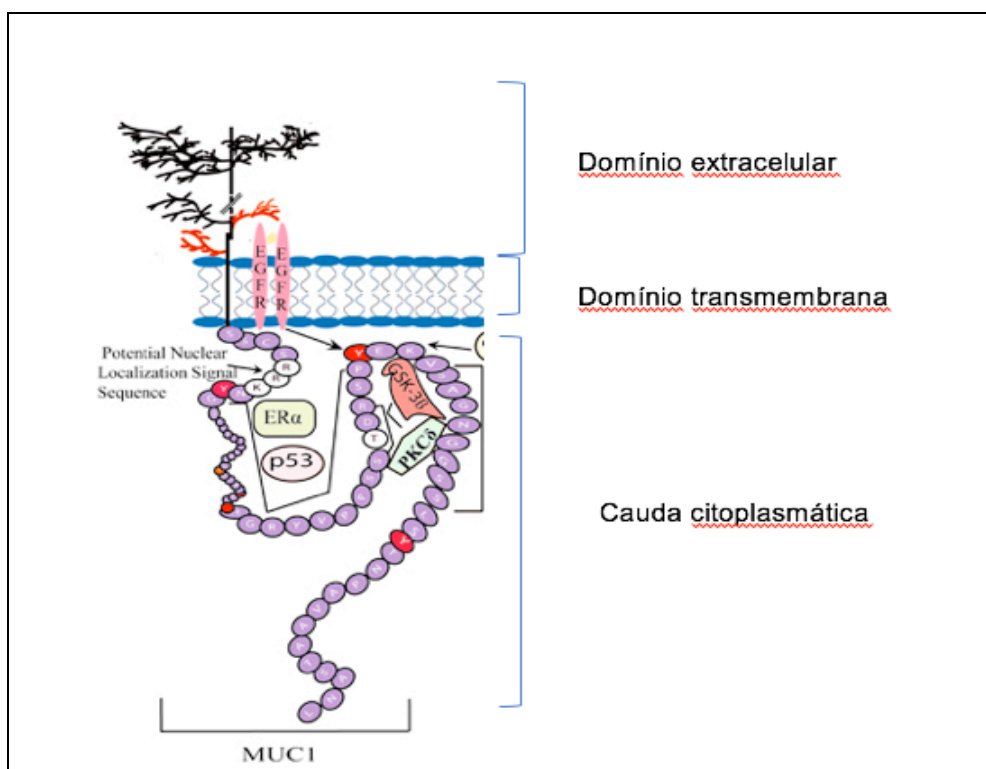


Figura 5 – Representação esquemática da proteína MUC1. Retirada e adaptada de Bafna et al. (85)

2.6 CA 15.3 SALIVAR

A presença do CA 15.3 na saliva foi preliminarmente descrita no início dos anos 2000, em mulheres diagnosticadas com câncer de mama (69). Naquela ocasião, havia uma escassez de informações sobre antígenos específicos de câncer na saliva. O estudo que avaliou a presença do CA 15.3 na saliva e permitiu a

primeira observação de níveis elevados entre as mulheres com câncer de mama foi conduzido por Streckfus (69). Amostras de saliva de quinze mulheres com diagnóstico de câncer de mama e de doze mulheres saudáveis foram avaliadas. Os resultados indicaram que os níveis salivares de CA 15.3 e c-erbB-2 nas pacientes com câncer foram significativamente maiores que os níveis dos controles saudáveis. Os resultados sugeriram que esses marcadores podem ter potencial para uso na detecção inicial e/ou rastreio do câncer de mama. Além de destacar a capacidade da saliva como um fluido diagnóstico complementar (71).

Desde então, diversas pesquisas foram conduzidas com a finalidade de validar a utilidade clínica e o potencial diagnóstico do CA 15.3 na saliva de pacientes com câncer de mama (23, 69, 96-100). No entanto, métodos diagnósticos suficientemente sensíveis e reprodutíveis com base na saliva ainda não estão disponíveis para a detecção desse marcador, o que dificulta uma padronização dos ensaios (101).

Nos estudos conduzidos até o momento, diversas técnicas foram empregadas na avaliação do CA 15.3 salivar, a mais frequente consiste em imunoenaios enzimáticos (EIA), dentre eles, o ELISA (102). Os princípios e procedimentos da técnica EIA são basicamente semelhantes aos da técnica de radioimunoensaio, já comentada previamente como a primeira técnica utilizada para detecção do CA 15.3 sérico (22, 84, 85). O que as difere é o fato de que os imunoenaios enzimáticos utilizam enzimas em vez de isótopos radioativos. Os imunoenaios enzimáticos apresentam várias vantagens em relação aos radioimunológicos: maior estabilidade dos reagentes; maior especificidade, devido ao uso de antígenos marcados com enzimas; produzem ensaios homogêneos e o fato de o perigo das radiações estar ausente (103).

Pelo fato de a saliva ter fácil acesso, se torna um fluido atraente para exames, especialmente em pacientes portadores de câncer, os quais se submetem de forma rotineira e sistemática a exames invasivos, com vários inconvenientes.

Frente à literatura apresentada, justifica-se o estudo de biomarcadores salivares como testes complementares às estratégias convencionais de diagnóstico e monitoramento do tratamento do câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão proteica do CA 15.3 na saliva e no sangue de pacientes com câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Quantificar as concentrações salivares do marcador tumoral CA 15.3 de pacientes com câncer de mama pelos métodos de quimioluminescência e ELISA;
- 2) Avaliar a associação entre a expressão do CA 15.3 sérico e salivar com os dados clínicos e histológicos;
- 3) Comparar o desempenho diagnóstico dos métodos de quimioluminescência e ELISA para a detecção do CA 15.3 na saliva;
- 4) Avaliar a capacidade diagnóstica, determinando a sensibilidade e especificidade, do CA 15.3 sérico e salivar em separar as pacientes doentes das não doentes;
- 5) Comparar as concentrações do CA 15.3 sérico e salivar em mulheres com e sem câncer de mama;
- 6) Correlacionar os níveis séricos e salivares do CA 15.3 em mulheres portadoras de câncer de mama.

4 MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E PARTICIPANTES

Este estudo transversal de diagnóstico, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – número do parecer 1.767.139 (ANEXO I), teve a coleta de amostras iniciada em novembro de 2016 e finalizada em maio de 2017. Termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO II) e um questionário de dados clínicos e epidemiológicos (ANEXO III) foram aplicados a todas as participantes que concordaram ser doadoras de saliva e sangue. Foram coletadas 26 amostras de saliva e sangue de pacientes portadoras de câncer de mama e 28 amostras de saliva e sangue de mulheres saudáveis, sendo que todas as participantes foram recrutadas por conveniência, após procurarem os seguintes serviços de Oncologia: Clínica Cettro Centro de Câncer de Brasília, localizada no SMHN Q2 bloco A, 12º andar, Asa norte; Hospital Sírio Libanês – Unidade Brasília, localizado no SGAS 613 conjunto E bloco B, L2 sul, Asa sul; Ambulatório de Mastologia do Hospital de Base do Distrito Federal, localizado no SMHS, Área Especial, Quadra 101, Asa sul; e do Centro de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) do Hospital Universitário de Brasília, localizado na SGAN 604/605 L2 Norte, Asa norte.

O grupo do estudo (n=26) incluiu mulheres com comprovação histopatológica do diagnóstico de câncer de mama, com idade superior a 18 anos, estágio I a III, sem tratamento anterior, candidatas à quimioterapia neoadjuvante ou à abordagem cirúrgica da mama e estágio IV candidatas a hormonioterapia ou quimioterapia paliativa (média de idade 48 anos, variando de 30 a 77 anos). O estadiamento foi realizado com os seguintes exames de imagem: radiografia ou tomografia computadorizada de tórax, ultrassonografia ou tomografia computadorizada de abdome, cintilografia óssea ou tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT), a depender do protocolo do centro de origem. As seguintes informações foram coletadas das pacientes do grupo do estudo: idade, peso, altura, *status* menopausal, laudo do exame histopatológico e imuno-histoquímico, estadiamento clínico, resultados dos exames radiológicos de estadiamento, tratamento quimioterápico ou hormonioterápico proposto.

O grupo controle incluiu 28 mulheres sem o diagnóstico de câncer de mama.

As mulheres do grupo controle foram avaliadas por um médico através de anamnese, exame físico e exames de imagem conforme idade. Mulheres com idade igual ou inferior a 35 anos realizaram ultrassonografia das mamas e/ou ressonância magnética, enquanto as mulheres com idade superior a 35 anos, realizaram mamografia mais ou menos ultrassonografia ou ressonância magnética das mamas, sendo que todos os exames estavam sem alterações. A média de idade do grupo controle foi 37 anos, variando de 21 a 74 anos.

Foram excluídas as mulheres com diagnóstico prévio de qualquer tipo de neoplasia, exceto neoplasias de pele não melanoma, mulheres com alterações benignas da mama e mulheres portadoras de HIV, alterações da função renal, insuficiência cardíaca congestiva, infecção ativa e hepatite.

Os grupos foram pareados conforme idade, *status* menopausal, tempo entre a menopausa e o momento da coleta e uso de contraceptivo. A determinação do *status* menopausal foi feita através de entrevista com as participantes. A definição exata de menopausa varia na literatura. Adotou-se, no presente estudo, um conceito mais conservador: *Status* pré-menopausa foi definido como mulher portadora de ciclos menstruais normais, com fluxo normal e sem períodos de amenorreia. *Status* pós-menopausa foi definido como ausência de ciclos menstruais por 12 meses consecutivos em mulheres com mais de 52 anos, ou, se idade inferior ou igual a 52 anos, pelo menos 3 anos de amenorreia, ou, mulheres com idade maior ou igual a 56 anos submetidas a histerectomia (sem ooforectomia), ou, em caso de dúvida, evidência hormonal de insuficiência ovariana (estradiol < 20pg/mL e FSH > 20 mUI/mL) (104). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado para cada participante ($IMC = \text{peso} / [\text{altura}]^2$).

4.2 COLETA, TRANSPORTE E PREPARO DAS AMOSTRAS

Amostras de sangue venoso e de saliva foram coletados no mesmo dia de cada participante do grupo do estudo previamente ao início do tratamento. Amostras de sangue venoso e de saliva também foram coletadas no mesmo dia das participantes do grupo controle. Todas as participantes abstiveram-se de comer, beber, fumar e realizar procedimentos de higiene oral por pelo menos 1 hora antes da coleta de saliva. Para a coleta da saliva, um cotonete de algodão (Salivette®,

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Oberbergischer Kreis, Alemanha) foi inserido na boca das participantes, que foram instruídas a mastigá-lo por um período de 2 minutos. O cotonete contendo a saliva foi devolvido ao flaconete e então acondicionado em um isopor com placas de gelo reciclável. O material foi transportado em até 4 horas para o laboratório para processamento. A amostra de saliva foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm a temperatura de 8°C. Depois de centrifugada, a amostra foi transferida para um *eppendorf* limpo (o qual foi identificado) e congelada a -80°C até seu processamento. As amostras de saliva foram descongeladas em temperatura ambiente para a realização das análises de CA 15.3 por quimioluminescência e por ELISA no Laboratório Interdisciplinar de Biociências da Faculdade de Medicina e no Laboratório de Histopatologia Bucal da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção e foram coletadas em tubos de soro com gel separador. O sangue foi centrifugado a 3500-5000 rpm por 5 minutos e o volume total obtido foi separado em 2 *eppendorfs* e congelado -20°C até análise das amostras. As análises do CA 15-3 sérico foram realizadas no Laboratório Sabin, pela técnica de eletroquimioluminescência (EQL), usando o equipamento COBAS® 8000 Roche, financiadas pelas seguradoras de saúde das pacientes ou subsidiadas pelo próprio Sabin, através do Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP). Todas as coletas foram realizadas no mesmo dia da coleta da saliva.

Para garantir o sigilo das pacientes, as amostras coletadas e seus frascos foram codificados por números.

4.3 ENSAIO DE DETECÇÃO DO CA 15.3 SÉRICO POR ELETROQUIMIOLUMINESCÊNCIA

Após a coleta das amostras, estas foram incubadas até a retração do coágulo e centrifugadas. Em seguida, foi realizada uma inspeção para detectar a presença de fibrina, hemólise, lipemia e, caso a amostra estivesse adequada, prosseguia-se com a análise. Os reagentes foram fornecidos pela Roche. O teste do CA 15.3 sérico teve como referência normal valores menores que 25 U/mL.

O ensaio, realizado pela técnica de sanduíche, teve duração total de 18 minutos:

- 1ª incubação: 20 µL de amostra foram automaticamente pré-diluídos a 1:10 com Diluent Universal. O antígeno (em 20 µL de amostra pré-diluída), um anticorpo monoclonal biotilado específico anti-CA 15.3 e um anticorpo monoclonal específico anti-CA 15.3 marcado com um complexo de ruténio reagem entre si e formam um complexo sanduíche.

- 2ª incubação: Após a adição das micropartículas revestidas de estreptavidina, o complexo formado liga-se à fase sólida pela interação da biotina e da estreptavidina.

- A mistura da reação foi aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas foram fixadas magneticamente à superfície do eletrodo. Os elementos não ligados foram então removidos com ProCell/ProCell M. A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

- Os resultados foram determinados com base numa curva de calibração gerada especificamente pelo analisador, através de uma calibração de 2-pontos, e numa curva principal incluída no código de barras do reagente.

4.4 ENSAIO DE DETECÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Um dos métodos empregados para a avaliação salivar do CA 15.3 foi o imunensaio de quimioluminescência em sanduíche utilizando o kit de reagentes BR-MA 15.3 para uso no equipamento IMMULITE 1000® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Erlangen, Alemanha). Antes de iniciar a execução do ensaio, foi realizado um teste de água para verificação da descontaminação do equipamento com a finalidade de prepará-lo para o início das dosagens das amostras. Essa verificação de descontaminação é de suma importância, pois exclui interferências externas inerentes ao instrumento. Os resultados foram analisados em Contagens Por Segundo (CPS), onde o resultado válido deveria ser entre 4.500 e 9.000 CPS. O

resultado obtido foi de 7.343 CPS, permitindo, portanto, a realização da dosagem do CA 15.3 nas amostras em estudo.

Neste ensaio foram utilizados dois anticorpos monoclonais altamente específicos, o 115D8, anticorpo de captura, responsável pela união da fase sólida (partículas magnéticas) com o conjugado; e o DF3, anticorpo detector, ou conjugado, é marcado por um derivado do isoluminol. Durante a primeira incubação, o antígeno presente na amostra (CA 15.3) ligou-se ao anticorpo monoclonal de fase sólida. Em seguida, uma primeira lavagem eliminou o material não ligado. Durante a segunda incubação, o conjugado reagiu com o CA 15.3, que se encontrava ligado à fase sólida. O material não ligado foi removido mediante um ciclo de lavagem, e então, a concentração de CA 15.3 foi determinada por uma reação de quimioluminescência. O sinal luminoso foi medido por um fotomultiplicador, em unidades relativas de luz (RLU), sendo proporcional à quantidade de CA 15.3 presente na amostra, e os resultados foram expressos em U/mL. Como não há descrição de *cutoff* de CA 15.3 salivar pela técnica de quimioluminescência, uma curva ROC foi feita para definir os valores de sensibilidade e especificidade. Uma representação dos passos da técnica de quimioluminescência está ilustrada na Figura 6.

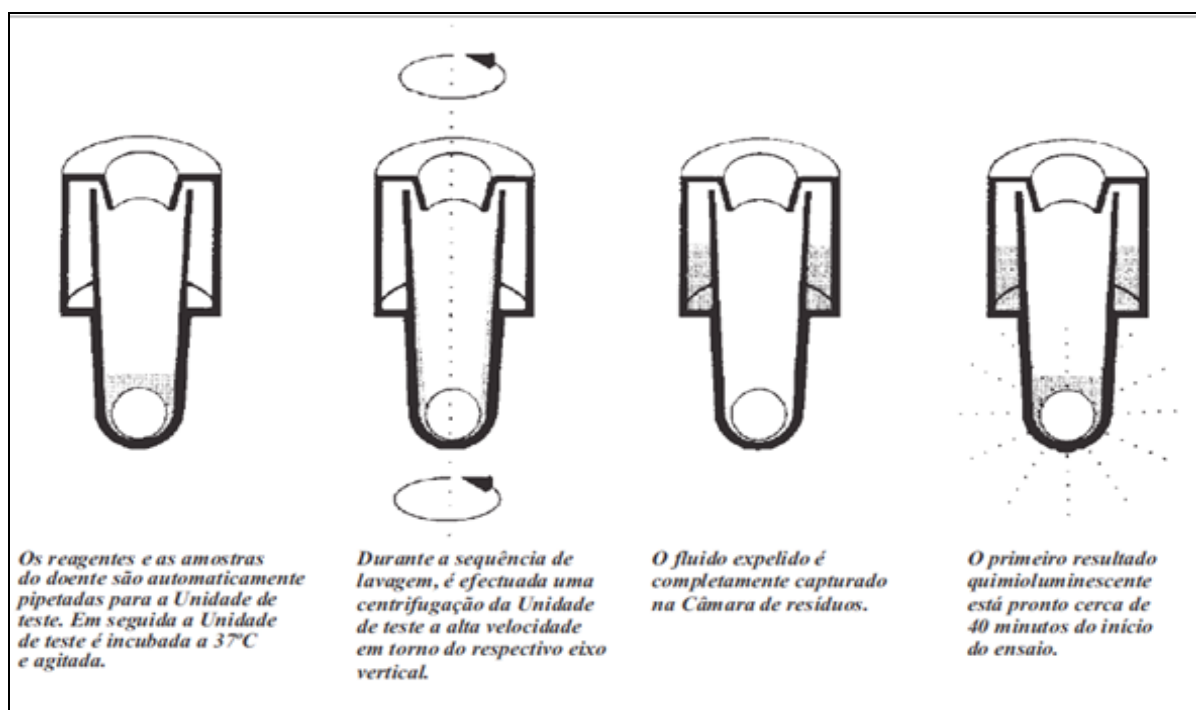


Figura 6 – Representação das etapas do ensaio por quimioluminescência, extraída do kit do fabricante (105)

4.5 ENSAIO DE DETECÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR POR ELISA

ELISA é uma metodologia amplamente utilizada em laboratórios clínicos e de pesquisa para detecção qualitativa e/ou quantitativa de antígenos ou anticorpos em diversos meios como saliva, soro, plasma e urina. O ensaio envolve anticorpos, antígeno e anticorpo de captura (106). O anticorpo de captura é anexado a uma superfície sólida e serve para ligar o biomarcador de proteínas à superfície. Em seguida, há uma reação entre o antígeno contido na amostra e o anticorpo de detecção contido na placa, formando o complexo antígeno-anticorpo (107). É um método especialmente eficaz quando um grande número de amostras deve ser analisado. Além disso, não precisa de radioisótopos ou de um aparelho de contagem de radiação. O objetivo do ensaio é a quantificação ou verificação da presença de um antígeno ou anticorpo. O ELISA pode determinar os níveis de proteínas e, portanto, tem potencial para acelerar a validação de biomarcadores proteicos na saliva para uso clínico. Atualmente, existem muitos estudos direcionados para a utilização da saliva a fim de diagnosticar várias patologias, sendo o teste por ELISA o mais aplicado (108-113).

As reações de ELISA foram realizadas utilizando o kit de reagentes CA 15.3 AccuBind™ (Lake Forest, Califórnia, Estados Unidos da América) para uso no equipamento BEST 2000® (Biokit, Barcelona, Espanha), conforme descrito abaixo:

- Todos os equipamentos foram calibrados previamente: pipetas, leitoras, lavadoras e demais instrumentos automatizados usados neste ensaio
- Todos os reagentes foram colocados em temperatura ambiente (18°C a 25°C)
- 25 µL de amostra de saliva foi pipetada em cada poço designado
- 100 µL de anticorpo biotilado foi adicionado em cada poço
- A microplaca foi suavemente agitada por 20 a 30 segundos para misturar e cobrir o conteúdo
- O conteúdo foi incubado por 60 minutos em temperatura ambiente
- O conteúdo da microplaca foi descartado por aspiração
- 350 µL de tampão de lavagem foi adicionado
- 100 µL do reagente de enzima CA 15.3 foi adicionado em cada poço
- O conteúdo foi coberto e incubado por 60 minutos em temperatura ambiente
- O conteúdo da microplaca foi descartado por aspiração

- 350 μ L do tampão de lavagem foi adicionado e em seguida aspirado. Esse procedimento foi repetido por duas vezes adicionais, por um total de três lavagens
- 100 μ L de reagente de substrato foi adicionado em todos os poços
- O conteúdo foi incubado por 20 minutos em temperatura ambiente
- 50 μ L da solução de parada foi adicionado em cada poço e misturado suavemente por 15 segundos
- A absorbância foi lida em cada poço a 450nm (usando um comprimento de onda de referência de 620-630nm para minimizar imperfeições do poço) em um leitor de microplacas. Os resultados foram lidos dentro de até 30 minutos da adição da solução de parada
- Para o cálculo dos resultados uma curva padrão-logarítmica foi obtida pela plotagem ponto-a-ponto dos valores medidos dos 6 calibradores pelas unidades correspondentes (linear/log). As análises foram realizadas em duplicatas, por isso foi calculada a média dos dois valores obtidos. Os resultados foram expressos em U/mL.

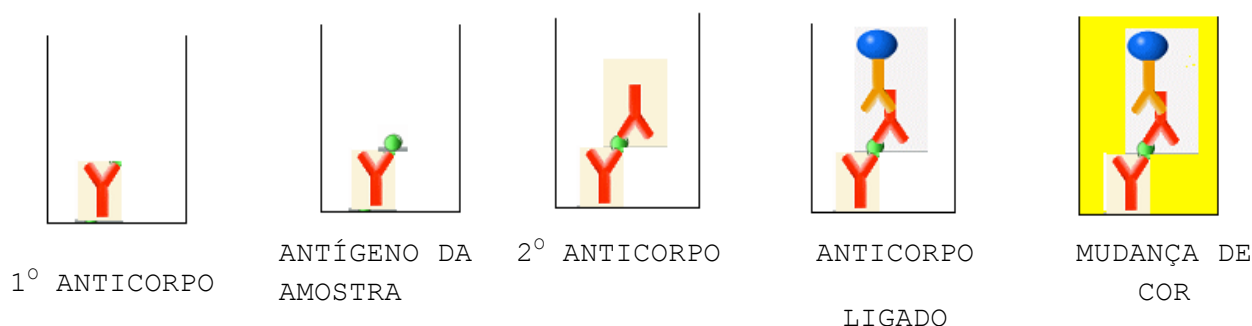


Figura 7 – Representação das etapas do ensaio por ELISA, retirada e adaptada de British Society for Immunology (105)

4.6 CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS DE CA 15.3 SÉRICO E SALIVAR COM O PERFIL MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA E TNM

Com a finalidade de verificar se as pacientes com diferentes estadiamentos e perfis moleculares do câncer de mama apresentam diferença no valor de CA 15.3 sérico e salivar, as pacientes foram inicialmente classificadas de acordo com o estadiamento do tumor e perfil molecular.

Para determinar o estadiamento TNM dos casos de câncer de mama, foi utilizado o sistema TNM conforme a 7^a edição do AJCC (Tabela 2) (114). Em seguida, a mediana dos níveis de CA 15.3 sérico e salivar, detectados por eletroquimioluminescência, quimiluminescência e ELISA, foi determinada e esses valores foram comparados, utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A classificação do perfil molecular dos casos de câncer de mama utilizando os dados de imuno-histoquímica foi feita conforme definições do consenso de Saint Gallen (Tabela 2) (115).

Tabela 1 – Estadiamento TNM para o câncer de mama (114)

TNM câncer de mama	AJCC 7th Edition
Tx	O tumor principal não pode ser avaliado.
T0	Nenhum sinal de tumor foi detectado.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	O tumor tem até 20 mm de diâmetro.
T1mi	O tumor tem menos de 1 mm
T1a	Tumor entre 1 e 5 mm
T1b	Tumor entre 5 e 10 mm
T1c	Tumor entre 10 e 20 mm
T2	Tumor entre 20 e 50 mm
T3	Tumor maior que 50 mm
T4	Tumor de qualquer tamanho que invade parede torácica e/ou pele (ulceração ou nódulo cutâneo)
T4d	Carcinoma inflamatório

Linfonodos	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Nenhum sinal de metástase linfonodal foi detectado.
N1	Metástase em linfonodos axilares móveis ipsilaterais (nível I e II).
N2	Metástase em linfonodos ipsilaterais nível I ou II, clinicamente fixos. Ou metástase isolada em linfonodos de cadeia mamária interna ipsilateral.
N2a	Metástase em linfonodos ipsilaterais nível I ou II, clinicamente fixos.
N2b	Metástase isolada em linfonodos de cadeia mamária interna ipsilateral, na ausência de metástase axilar.
N3	
N3a	Metástase em linfonodos ipsilaterais infraclaviculares (nível III axilar)
N3b	Metástase em linfonodos de cadeia mamária interna ipsilateral, com evidência de metástase axilar nível I e II.
N3c	Metástase para linfonodo supraclavicular ipsilateral.

Metástases	
M0	Nenhum sinal de metástase clinicamente detectável.
M1	Metástases a distância clinicamente detectadas ou histologicamente demonstradas se maiores que 0.2mm.

TNM câncer de mama	Grupos Prognósticos de Estágios
Estágio 0	Tis, N0, M0.
Estágio IA	T1, N0, M0.
Estágio IB	T0 ou T1, N1mi, M0.
Estágio IIA	T0 ou T1, N1 (mas, não N1M1), M0; T2, N0, M0.
Estágio IIB	T2, N1, M0; T3, N0, M0.
Estágio IIIA	T0 a T2, N2, M0; T3, N1 ou N2, M0.
Estágio IIIB	T4, N0 a N2, M0.
Estágio IIIC	Qualquer T, N3, M0.
Estágio IV	Qualquer T, qualquer N, M1.

Tabela 2 – Critérios de Saint Gallen para definição do perfil molecular do câncer de mama (115)

Subtipo molecular	Critérios patológicos e imuno-histoquímicos
Luminal A	Presença de todas as características: Receptor de estrogênio e progesterona positivos HER2 negativo Ki 67 < 20%

Luminal B HER2 negativo	Receptor de estrogênio positivo HER2 negativo Pelo menos uma das seguintes características: Ki 67 \geq 20% Receptor de progesterona negativo ou baixo
Luminal B HER2 positivo	Receptor de estrogênio positivo HER2 superexpresso ou amplificado Qualquer valor de Ki67 ou de Receptor de progesterona
HER2 superexpresso	HER2 superexpresso ou amplificado Receptor de estrogênio e progesterona negativos
Basal	Receptor de estrogênio e progesterona negativos HER2 negativo

4.7 VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA OS TESTES

Com os resultados dos testes de quimioluminescência e ELISA, realizados com as amostras de saliva, a validação diagnóstica dos mesmos foi realizada. Tendo como base a tabela de contingência (Figura 8), foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. A sensibilidade é definida como a capacidade que o teste diagnóstico apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos em um grupo de indivíduos com a doença, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. A especificidade é definida como a capacidade que o teste diagnóstico tem de detectar os verdadeiros negativos em um grupo de pessoas sem a doença, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios. O VPP é a proporção de doentes entre os positivos pelo teste. O VPN é a proporção de sadios (e sem a doença) entre os negativos do teste. A acurácia refere-se ao grau em que o teste é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido. As fórmulas para os cálculos encontram-se na Tabela 3 (116).

		Doença (padrão-ouro)		
		Presente	Ausente	
Teste	Positivo	Verdadeiro positivo a	Falso-positivo b	a + b
	Negativo	Falso-negativo c	Verdadeiro negativo d	c + d
		a + c	b + d	N(a+b+c+d)

Figura 8 – Tabela de contingência para validação de testes diagnósticos

Tabela 3 – Fórmulas para validação dos testes diagnósticos

Sensibilidade	$a/(a+c)$
Especificidade	$d/(b+d)$
Valor Preditivo Positivo	$a/(a+b)$
Valor Preditivo Negativo	$d/(c+d)$
Acurácia	$(a+d)/N$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação dos dados demográficos das pacientes, usamos os seguintes testes estatísticos:

- Idade: Teste t de Student.
- Tabagismo, doenças sistêmicas, uso de medicações, *status* menopausal e uso de anticoncepcional: Teste de Fisher.
- IMC e número de filhos: teste Qui-quadrado.

Para a comparação dos valores dos biomarcadores séricos e salivares (medianas) entre os casos e controles, usamos o teste de Mann-Whitney.

Para distribuição dos marcadores séricos x TNM e perfil molecular, usamos o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

Para avaliar a capacidade diagnóstica, foi construída uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para classificar a sensibilidade, especificidade e as respectivas áreas sobre a curva (AUC) com intervalo de confiança de 95%. Os valores de *cutoff* ótimos, sensibilidade e especificidade para o diagnóstico foram calculados no ponto onde a soma da sensibilidade e especificidade foram maiores.

Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPadPrism versão 5.0. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

O grupo do estudo consistiu em 26 mulheres que foram recrutadas por conveniência, após procurarem os serviços de oncologia citados previamente, para receber tratamento no período de outubro de 2016 a maio de 2017. Foram coletados dados clínicos, demográficos e amostras de saliva e sangue de 26 pacientes com câncer de mama pré-tratamento, e de 28 mulheres saudáveis, que constituíram o grupo controle. As amostras de saliva de pacientes portadoras de câncer de mama pré-tratamento foram denominadas SMA (S=saliva, MA=mama) listadas de 1 a 26 e as do grupo controle SCA (S=saliva, CA=controle) enumeradas sequencialmente de 1 a 28.

Os dados demográficos e suplementares obtidos pelo questionário estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Características demográficas dos grupos do estudo

Características	Controles	Casos de câncer	p
n	28	26	
Idade (média +/- DP)	37,64 +/- 13,57	48,23 +/- 11,51	0,0033 *
Tabagismo			
Sim	1	4	0,1842
Não	27	22	
Doença sistêmica			0,7789
Sim	9	9	
Não	19	17	
Uso de medicações			0,4251
Sim	14	10	
Não	14	16	
Status menopausal			0,0331 *
Pré-menopausa	24	15	
Pós-menopausa	4	11	
IMC			0,1216
<25	21	13	
25-30	6	9	
>30	1	4	
Número de gestações			0,2542
0	16	9	
1	4	9	
2	4	5	
>2	4	3	
Uso de anticoncepcional			0,4033
Sim	19	14	
Não	9	12	

5.2 CA 15.3 SÉRICO PELO ENSAIO DE ELETROQUIMIOLUMINESCÊNCIA E CA 15.3 SALIVAR PELOS ENSAIOS DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA E ELISA

A Tabela 5 evidencia os resultados obtidos dos experimentos de eletroquimioluminescência para determinar o CA 15.3 sérico e quimioluminescência e ELISA na saliva para determinar o marcador CA 15.3 nesse fluido. O teste do CA 15.3 sérico tem como referência normal no Laboratório Sabin valores menores que 25 U/mL. Não temos o padrão definido previamente para normalidade do CA 15.3 na saliva pelas técnicas de quimioluminescência e ELISA. Usamos o programa GraphPrisma para as análises estatísticas. Após a construção da curva ROC, atribuímos um limiar de 2,24 U/mL para o CA 15.3 salivar quantificado pelo ensaio de quimioluminescência, com sensibilidade definida de 34,62% e a especificidade de 60,71%. Para o ensaio de ELISA, aplicamos o *cutoff* de 0,746 U/mL, com sensibilidade definida de 61,54% e especificidade de 57,14%.

Tabela 5 – Valores de CA15.3 sérico e salivar para os casos (SMA) e controles (SCA) de câncer de mama. Os valores destacados em vermelho encontram-se acima do valor normal de referência de 25 U/mL para o CA15.3 sérico. Considerou-se o *cutoff* de 2,24 U/mL para o CA15.3 salivar por quimioluminescência e de 0,746 U/mL para o CA 15.3 salivar por ELISA. N/A=Não Avaliado.

Amostras Câncer de mama	CA15.3 sérico U/mL	CA15.3 saliva por Quimiolum U/mL	CA 15.3 saliva por ELISA U/mL	Amostras Controle	CA15.3 sérico U/mL	CA15.3 saliva por Quimiolum U/mL	CA 15.3 saliva por ELISA U/mL
SMA1	39,5	1,12	0,852	SCA1	20,9	1,51	0,710
SMA2	351,1	23,8	3,196	SCA2	18,6	4,29	0,766
SMA3	15,3	9,5	0,752	SCA3	17,9	4,69	1,272
SMA4	65	2,13	0,934	SCA4	22,5	<1,0	0,623
SMA5	11,1	1,78	0,772	SCA5	14	4,0	1,207
SMA6	20,2	1,09	0,721	SCA6	8,6	<1,0	0,444
SMA7	8,5	<1,0	0,496	SCA7	7,5	<1,0	0,474
SMA8	17	<1,0	0,705	SCA8	4,7	1,42	0,704
SMA9	12,9	2,71	0,947	SCA9	14,7	<1,0	0,624
SMA10	24,5	<1,0	0,814	SCA10	23,8	<1,0	0,719
SMA11	210	1,13	0,716	SCA11	16,5	<1,0	0,730
SMA12	16,1	<1,0	1,002	SCA12	11,5	2,43	0,632
SMA13	19	<1,0	0,420	SAC13	14,2	<1,0	0,531
SMA14	16,2	<1,0	0,701	SCA14	16,2	<1,0	0,650
SMA15	N/A	6,86	0,978	SCA15	20,3	<1,0	0,754
SMA16	N/A	1,4	0,854	SCA16	4,5	2,05	1,049
SMA17	9,1	4,59	0,931	SCA17	23,4	5,52	1,059
SMA18	328,8	1,27	0,750	SCA18	14,5	<1,0	0,733
SMA19	18,3	2,38	0,947	SCA19	14,9	15,3	1,918
SMA20	1.766	10,2	2,445	SCA20	14,71	8,05	0,714
SMA21	9	<1,0	0,739	SCA21	19,5	1,32	0,652
SMA22	62,4	<1,0	0,733	SCA22	27	2,83	0,794
SMA23	N/A	<1,0	0,564	SCA23	22,8	3,31	0,988
SMA24	11,3	6,51	1,403	SCA24	7,3	<1,0	0,714
SMA25	30,1	1,51	0,704	SCA25	7,5	13,4	1,241
SMA26	19,8	2,35	0,700	SCA26	21,6	27,5	9,825
XXXX	----	----	----	SCA27	19,92	<1,0	0,865
XXXX	----	----	----	SCA28	10,8	<1,0	0,740

A mediana do CA 15.3 sérico para o grupo dos casos de câncer de mama foi de 19 U/mL, sendo o valor máximo de 1.766 U/mL e o menor valor de 8,5 U/mL. A mediana do CA 15.3 sérico do grupo controle foi de 15,55 U/mL. O valor máximo foi de 27 U/mL e o menor valor de 4,5 U/mL. Apesar da mediana ser maior nos casos de câncer de mama, não houve diferença estatística entre os grupos, $p=0,0584$ (Figura 9).

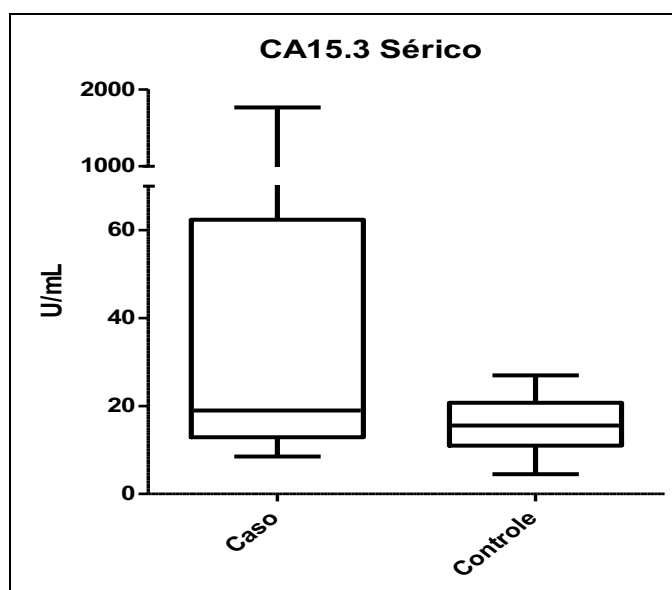


Figura 9 – Medianas do CA15.3 sérico para casos e controles de câncer de mama. $p=0,0584$ vs controle. Análise estatística pelo teste de Mann-Whitney.

A mediana do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência para o grupo dos casos de mama foi de 1,335 U/mL, sendo o valor máximo de 23,8 U/mL e o menor valor < 1 U/mL. Pela mesma técnica, a mediana do CA 15.3 salivar do grupo controle foi de 1,370 U/mL. O valor máximo foi de 27,5 U/mL e o menor valor foi $< 1,0$ U/mL. Não houve diferença estatística entre os grupos, $p=0,893$ (Figura 10).

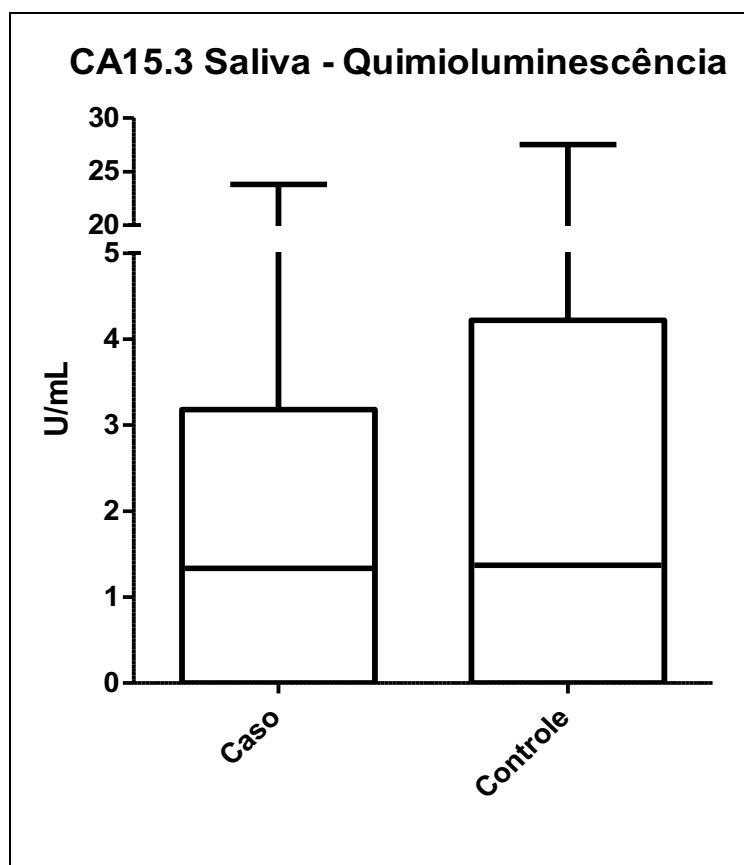


Figura 10 – Medianas do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência para casos e controles de câncer de mama. $p=0,893$ vs controle. Análise estatística pelo teste de Mann-Whitney

A mediana do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA para o grupo dos casos de mama foi de 0,762 U/mL, sendo o valor máximo de 3,196 U/mL e o menor valor de 0,42 U/mL. A mediana do CA 15.3 salivar por esse ensaio para o grupo controle foi de 0,731 U/mL, sendo o valor máximo de 9,825 U/ml e o valor mínimo de 0,444 U/mL. Não houve diferença estatística entre os grupos, $p=0,4725$ (Figura 11).

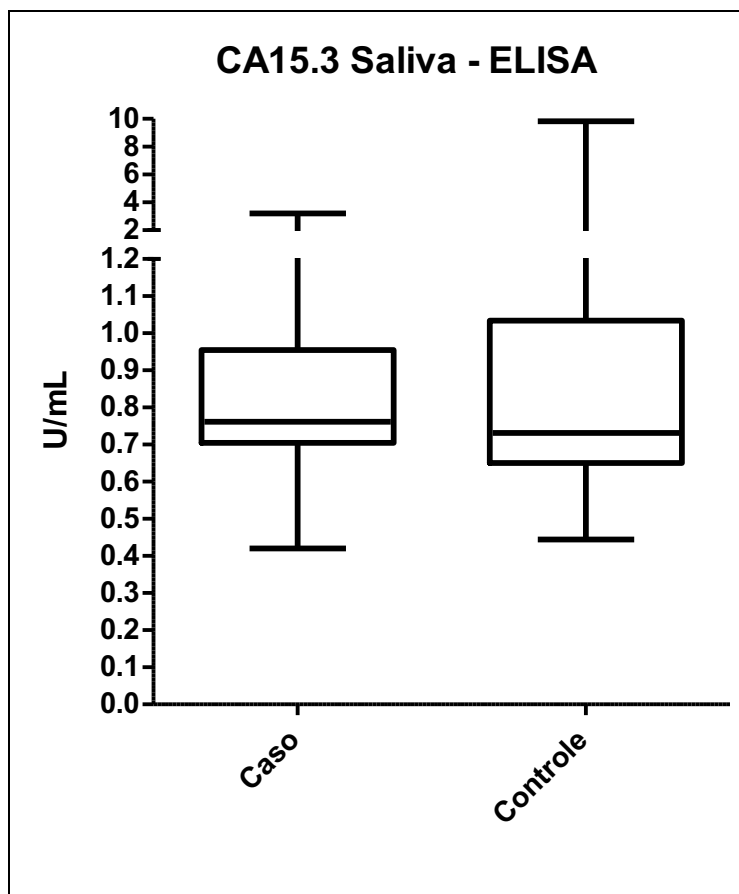


Figura 11 – Medianas do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA para casos e controles de câncer de mama. $p=0,4725$ vs controle. Análise estatística pelo teste de Mann-Whitney

5.3 DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SÉRICO DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO

O maior grupo de pacientes era composto por tumores no estadio IIA (39% dos casos = 10 pacientes). O segundo estadiamento mais comum, foi o estadio IV, correspondendo a 23% dos casos. Das 6 pacientes com doença metastática, 5 apresentavam acometimento ósseo. Os demais sítios metastáticos eram pulmão, fígado e linfonodo não regional. Não houve informação quanto ao TNM de uma paciente. A Figura 12 ilustra a distribuição do estadiamento dos casos de câncer de mama avaliados.

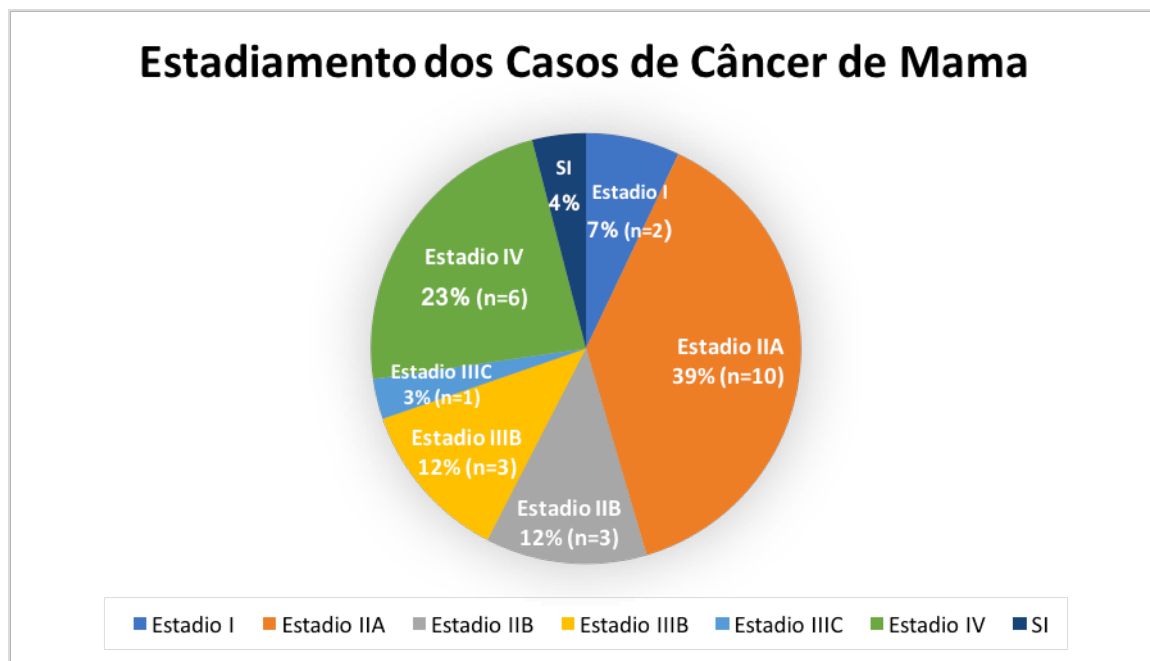


Figura 12 – Frequência dos estadiamentos dos casos de câncer de mama. SI: sem informação

Nas pacientes estágio IIA (39% dos casos = 10 pacientes), os valores de CA 15.3 sérico obtidos variaram entre 9 U/mL e 39,5 U/mL, sendo a mediana de 15,3 U/mL. Nesse grupo de estadiamento, apenas uma paciente apresentou valor de CA 15.3 sérico acima da faixa normal. Nas pacientes estágio clínico IV (23% dos casos = 6 pacientes), os valores de CA 15.3 sérico obtidos variaram entre 30,1 U/mL e 1.766 U/mL, sendo a mediana de 269,4 U/mL. Nesse grupo, nenhuma paciente apresentou valor de CA 15.3 sérico dentro da faixa normal. Para as pacientes no estágio IIIB (12% dos casos = 3 pacientes), os valores de CA 15.3 sérico obtidos variaram entre 19 U/mL e 62,4 U/mL, sendo a mediana de 40,7 U/mL. Nas pacientes estágio IIB (12% dos casos = 3 pacientes), os valores de CA 15.3 sérico obtidos variaram entre 9,1 U/ml e 19,8 U/mL, sendo a mediana de 16,1 U/mL. Nesse grupo, nenhum valor de CA 15.3 sérico ultrapassou a faixa da normalidade. A Figura 13 ilustra a distribuição dos valores de CA 15.3 séricos de acordo com o estadiamento. Foi observado que somente houve diferença estatística significativa entre os níveis de CA 15.3 dos pacientes nos estágios IIA e IV, pelo teste de Kruskal-Wallis. No entanto, o pós-teste de Dunn não mostrou significância estatística.

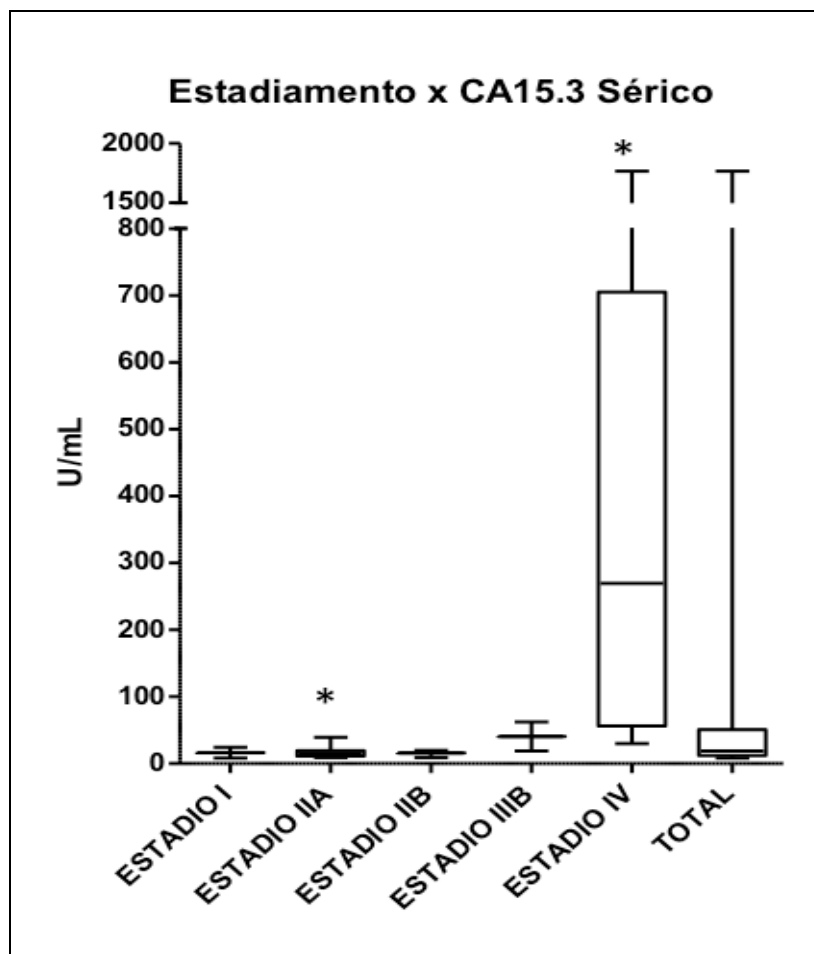


Figura 13 – Distribuição do CA 15.3 sérico de acordo com o estadiamento, mostrando diferença estatística entre os níveis de CA 15.3 sérico dos pacientes nos estágios IIA* e IV*, por meio da análise com o teste Kruskal-Wallis ($p=0,0141$), com pós-teste de Dunn negativo

5.4 DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SÉRICO DE ACORDO COM O PERFIL MOLECULAR

A classificação dos casos de mama de acordo com os subtipos moleculares foi realizada pelas características histopatológicas e imuno-histoquímicas (Figura 14). A maioria, 30% das pacientes, era do grupo Luminal B HER2 negativo, seguido pelo grupo Luminal A e HER2 superexpresso, ambos correspondendo a 19% dos casos. Doze por cento das pacientes constituíam o grupo Luminal B HER2 positivo e outras 12% o grupo Triplo Negativo. Não tivemos acesso à informação quanto ao perfil molecular de duas pacientes, o equivalente a 8% dos casos.

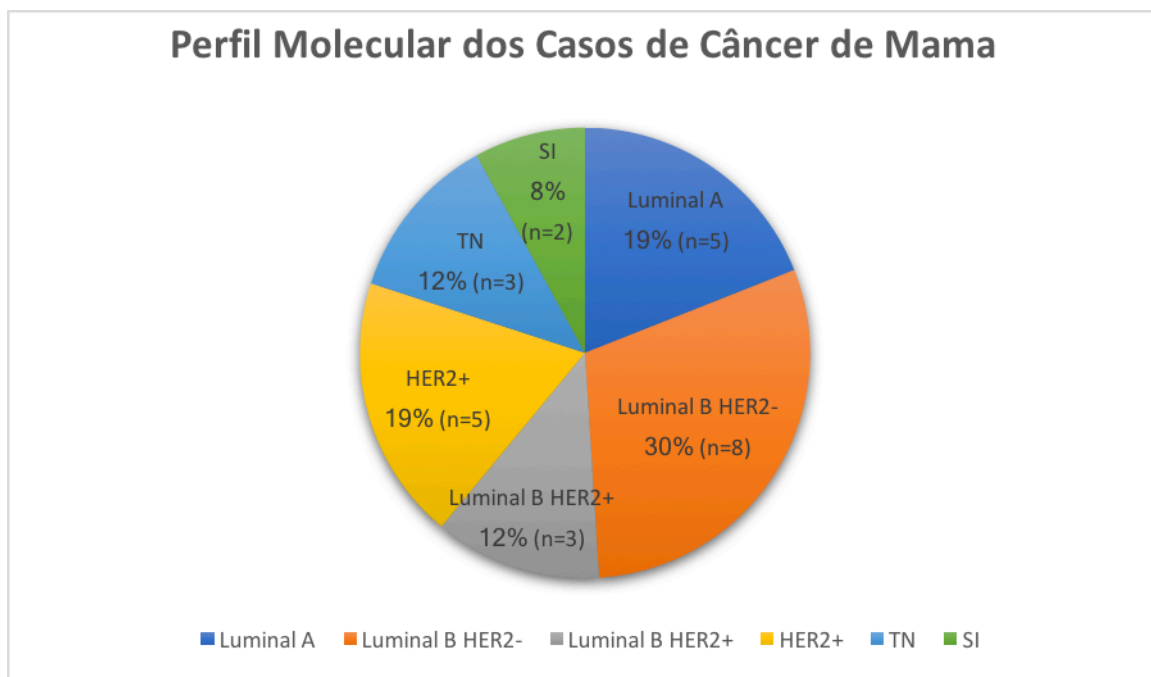


Figura 14 – Classificação molecular dos casos de câncer de mama. SI: sem informação.

Para as pacientes com câncer de mama tipo Luminal A (19% dos casos = 5 pacientes), os valores do CA 15.3 sérico obtidos variaram entre 8,5 U/mL e 39,5 U/mL, sendo a mediana de 19 U/mL. No grupo Luminal A, uma paciente apresentou CA 15.3 sérico acima da faixa normal. Para o subtipo Luminal B HER2 positivo (12% dos casos = 3 pacientes), os valores de CA 15.3 sérico variaram entre 210 U/mL e 351,1 U/mL, sendo a mediana de 280,55 U/mL. Neste grupo, duas pacientes apresentaram valores de CA 15.3 acima da faixa normal e não conseguimos acesso ao resultado do exame da terceira componente do grupo. No grupo HER2 superexpresso (19% dos casos = 5 pacientes), os valores de CA 15.3 variaram de 9,1 U/mL a 30,1 U/mL, sendo a mediana de 18,3 U/mL. Nesse grupo, somente uma paciente apresentou CA 15.3 sérico acima da faixa normal. No grupo de subtipo molecular Luminal B HER2 negativo (30% dos casos = 8 pacientes), os valores do CA 15.3 sérico obtidos variaram entre 11,1 U/mL e 1.766 U/mL, sendo a mediana de 17 U/mL. Nesse grupo, 3 pacientes apresentaram CA 15.3 sérico acima da faixa normal. No grupo Triplo negativo (12% dos casos = 3 pacientes), os valores de CA 15.3 séricos variaram entre 9 U/mL e 24,5 U/mL, sendo a mediana de 12,07 U/mL. Nesse grupo, nenhuma paciente apresentou CA 15.3 acima da faixa normal. A Figura 15 ilustra a distribuição dos valores de CA 15.3 de acordo com os subtipos

moleculares. Não houve diferença estatística entre os valores de CA 15.3 séricos e os subtipos moleculares, pelo teste de Kruskal-Wallis.

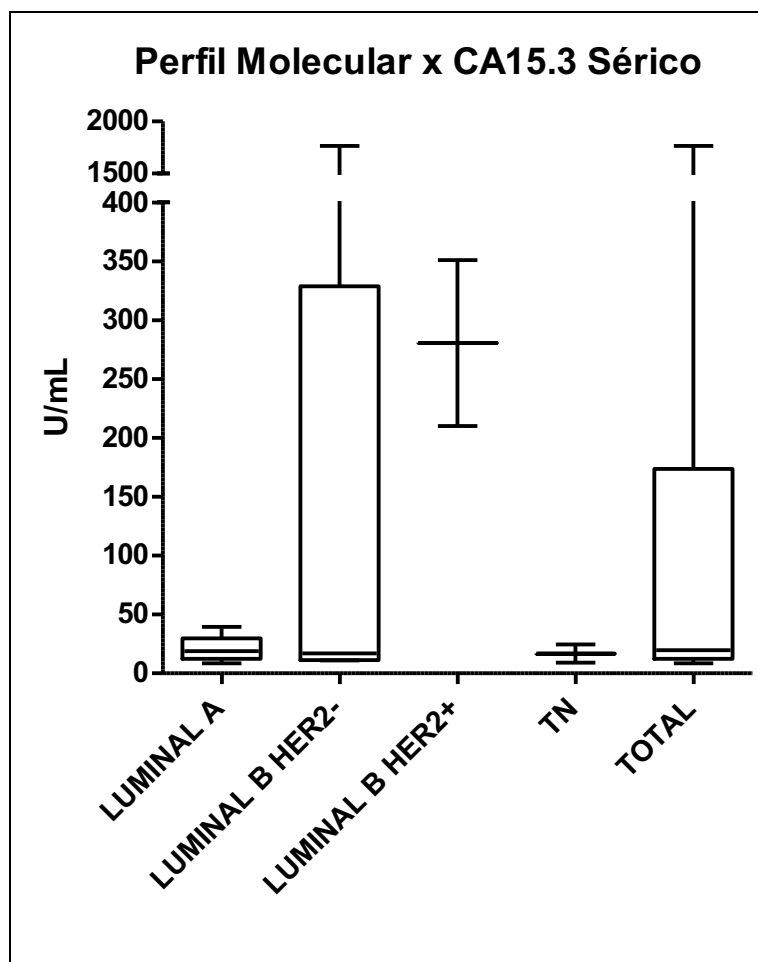


Figura 15 – Distribuição do CA 15.3 sérico de acordo com os subtipos moleculares, mostrando ausência de diferença estatística entre os grupos. Análise pelo teste Kruskal-Wallis ($p=0,4259$)

5.5 DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO

Nas pacientes estágio I (7% dos casos = 2 pacientes), os valores obtidos de CA 15.3 salivar pela técnica de quimioluminescência foram inferiores a 1,0 U/mL, não mensuráveis, portanto, pelo aparelho. Nas pacientes estágio IIA (39% dos casos

= 10 pacientes), os valores de CA 15.3 obtidos variaram entre < 1,0 U/mL a 9,5 U/mL, sendo a mediana de 2,54 U/mL. Das 10 pacientes pertencentes a esse grupo de estadiamento, 5 apresentaram valores de CA 15.3 salivar acima do *cutoff* definido previamente. Nas pacientes estágio clínico IIB (12% dos casos = 3 pacientes), os valores obtidos de CA 15.3 variaram de < 1,0 U/mL a 4,59 U/mL, sendo a mediana 2,35 U/mL. No grupo de pacientes pertencentes ao estágio III (15% dos casos = 4 pacientes), todas apresentaram valores de CA 15.3 inferiores ao limiar estabelecido. No grupo de pacientes com estágio clínico IV (23% dos casos = 6 pacientes), os valores de CA 15.3 obtidos variaram entre 1,13 U/mL e 23,8 U/mL, sendo a mediana de 1,82 U/mL. Nesse grupo, 3 pacientes apresentaram valores de CA 15.3 dentro da faixa normal. A Figura 16 ilustra a distribuição dos valores de CA 15.3 salivar por quimioluminescência de acordo com o estadiamento. Não houve diferença estatística entre os valores de CA 15.3 relacionados ao estadiamento, pelo teste de Kruskal-Wallis.

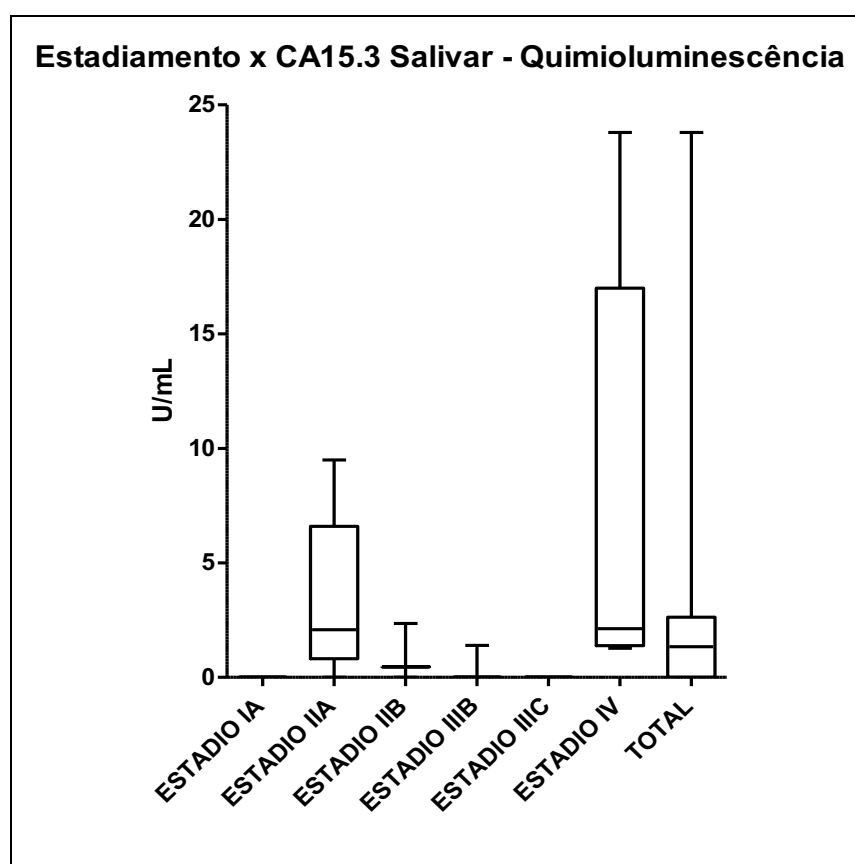


Figura 16 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência de acordo com o estadiamento, mostrando ausência de diferença estatística entre os grupos, analisados pelo teste Kruskal-Wallis (p=0,1270)

5.6 DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE ELISA DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO

Nas pacientes estágio I (7% dos casos = 2 pacientes), os valores obtidos de CA 15.3 salivar pela técnica de ELISA foram de 0,496 U/mL e 0,814 U/mL. Nas pacientes estágio IIA (38% dos casos = 10 pacientes), os valores de CA 15.3 obtidos variaram entre 0,705 U/mL a 1,403 U/mL, sendo a mediana de 0,812 U/mL. Das 10 pacientes pertencentes a esse grupo de estadiamento, 7 apresentaram valores de CA 15.3 salivar por essa metodologia acima do *cutoff* definido previamente. Nas pacientes estágio clínico IIB (12% dos casos = 3 pacientes), os valores obtidos de CA 15.3 variaram de 0,700 U/mL a 1,003 U/mL, sendo a mediana 0,931 U/mL. No grupo de pacientes pertencentes ao estágio III (15% dos casos = 4 pacientes), apenas uma apresentou valor de CA 15.3 superior ao limiar estabelecido. No grupo de pacientes com estágio clínico IV (23% dos casos = 6 pacientes), os valores de CA 15.3 obtidos variaram entre 0,704 U/mL e 3,196 U/mL, sendo a mediana de 0,842 U/mL. Nesse grupo, 4 pacientes apresentaram valores de CA 15.3 acima da faixa normal. A Figura 17 ilustra a distribuição dos valores de CA 15.3 salivar por ELISA de acordo com o estadiamento. Não houve diferença estatística entre os valores de CA 15.3 relacionados ao estadiamento, pelo teste de Kruskal-Wallis.

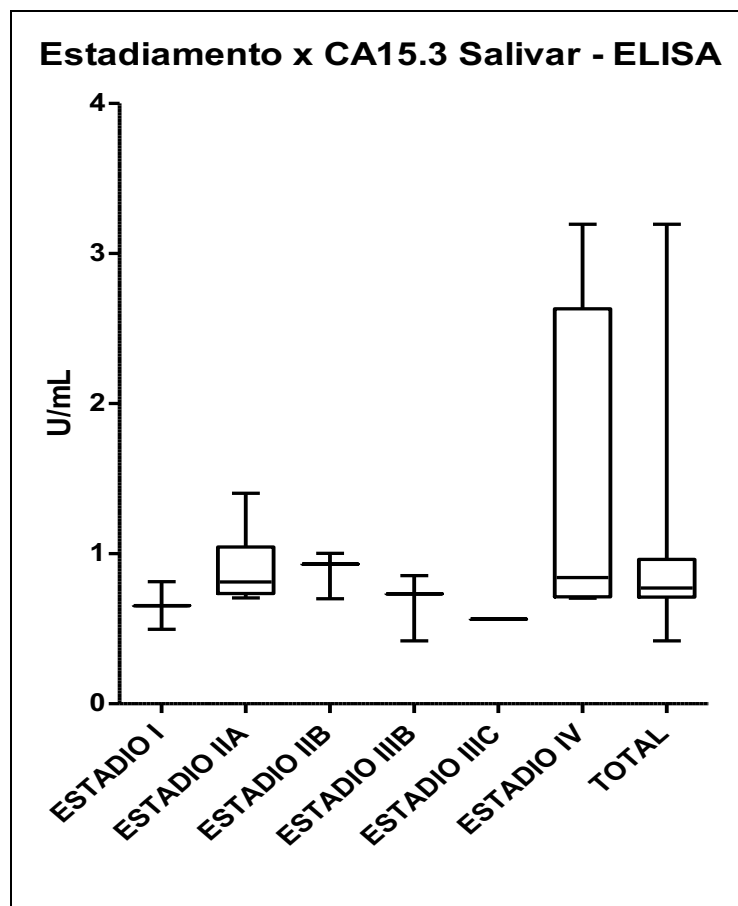


Figura 17 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA de acordo com o estadiamento, mostrando ausência de diferença estatística entre os grupos, analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($p=0,5428$)

5.7 DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA DE ACORDO COM O PERFIL MOLECULAR

Para as pacientes com câncer de mama tipo Luminal A (19% dos casos = 5 pacientes), todos os valores do CA 15.3 obtidos foram inferiores ao *cutoff* estabelecido. Para o subtipo Luminal B HER2 positivo (12% dos casos = 3 pacientes), os valores de CA 15.3 salivar variaram entre 1,13 U/mL e 23,8 U/mL, sendo a mediana de 1,4 U/mL. Neste grupo, apenas uma paciente apresentou valor de CA 15.3 acima da faixa normal. No grupo HER2 superexpresso (19% dos casos = 5 pacientes), os valores de CA 15.3 variaram de 1,51 U/mL a 4,59 U/mL, sendo a mediana de 2,38 U/mL. Nesse grupo, 4 pacientes apresentaram CA 15.3 salivar

acima da faixa normal. No grupo de subtipo molecular Luminal B HER2 negativo (30% dos casos = 8 pacientes), os valores do CA 15.3 obtidos variaram entre < 1 U/mL e 10,2 U/mL, sendo a mediana de 4,325 U/mL. Nesse grupo, 4 pacientes apresentaram CA 15.3 salivar acima da faixa normal. No grupo Triplo negativo (12% dos casos = 3 pacientes), todos os valores de CA 15.3 foram inferiores a 1,0 U/mL. A Figura 18 ilustra a distribuição dos valores de CA 15.3 pela técnica de quimioluminescência de acordo com os subtipos moleculares. Houve diferença estatística entre os valores de CA 15.3 salivar e os subtipos moleculares pelo teste de Kruskal-Wallis. No entanto, o pós-teste de Dunn não corroborou os achados.

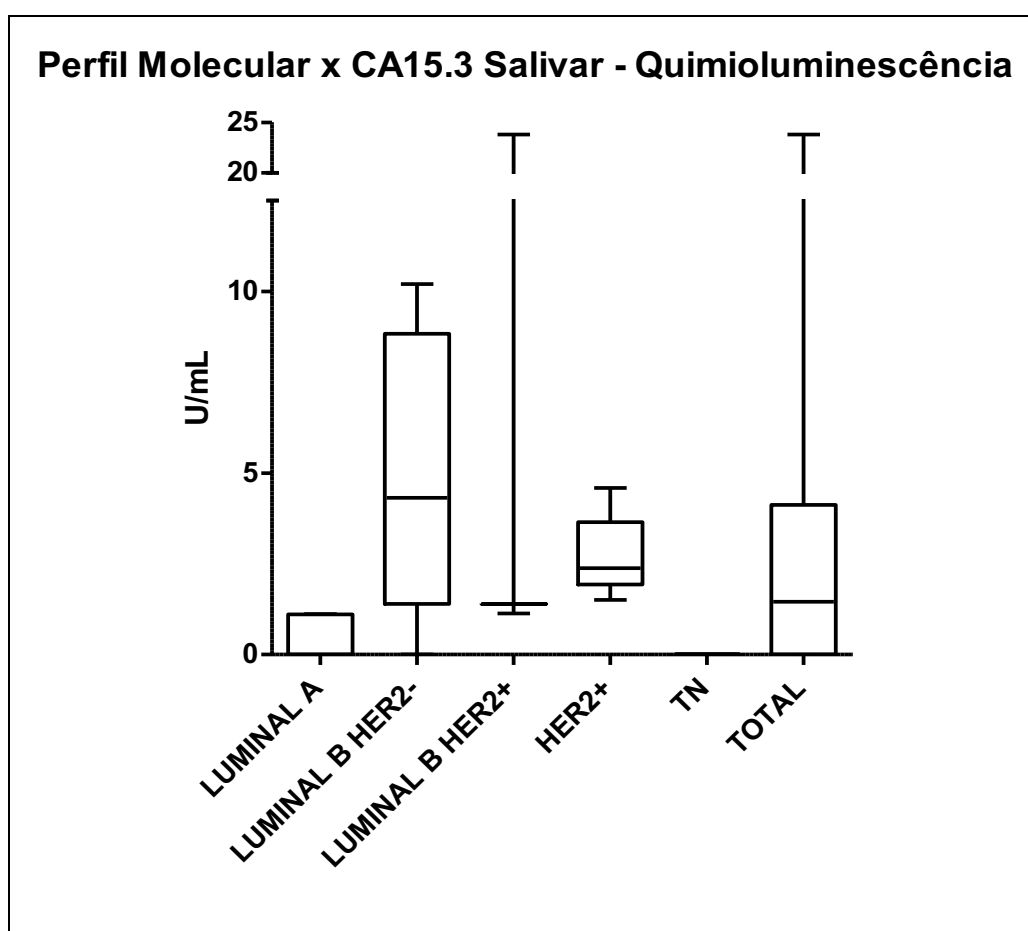


Figura 18 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência de acordo com os subtipos moleculares, mostrando ausência de diferença estatística entre os grupos, analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($p=0,0165$) e pós-teste de Dunn

5.8 DISTRIBUIÇÃO DO CA 15.3 SALIVAR PELO ENSAIO DE ELISA DE ACORDO COM O PERFIL MOLECULAR

Para as pacientes com câncer de mama tipo Luminal A (19% dos casos = 5 pacientes), os valores do CA 15.3 salivar obtidos variaram entre 0,420 U/mL e 1,002 U/mL, sendo a mediana de 0,721 U/mL. No grupo Luminal A, duas pacientes apresentaram CA 15.3 salivar acima da faixa normal. Para o subtipo Luminal B HER2 positivo (12% dos casos = 3 pacientes), os valores de CA 15.3 variaram entre 0,716 U/mL e 3,196 U/mL, sendo a mediana de 0,854 U/mL. Neste grupo, duas pacientes apresentaram valor de CA 15.3 acima da faixa normal. No grupo HER2 superexpresso (19% dos casos = 5 pacientes), os valores de CA 15.3 variaram de 0,700 U/mL a 1,249 U/mL, sendo a mediana de 0,931 U/mL. Nesse grupo, três pacientes apresentaram CA 15.3 acima da faixa normal. No grupo de subtipo molecular Luminal B HER2 negativo (30% dos casos = 8 pacientes), os valores do CA 15.3 obtidos variaram entre 0,705 U/mL e 2,445 U/mL, sendo a mediana de 0,853 U/mL. Nesse grupo, 7 pacientes apresentaram CA 15.3 salivar acima da faixa normal. No grupo Triplo negativo (12% dos casos = 3 pacientes), os valores de CA 15.3 variaram entre 0,564 U/mL e 0,814 U/mL, sendo a mediana de 0,739 U/mL. Nesse grupo, uma paciente apresentou CA 15.3 acima da faixa normal. A Figura 19 ilustra a distribuição dos valores de CA 15.3 de acordo com os subtipos moleculares. Não houve diferença estatística entre os valores de CA 15.3 salivares e os subtipos moleculares, pelo teste de Kruskal-Wallis.

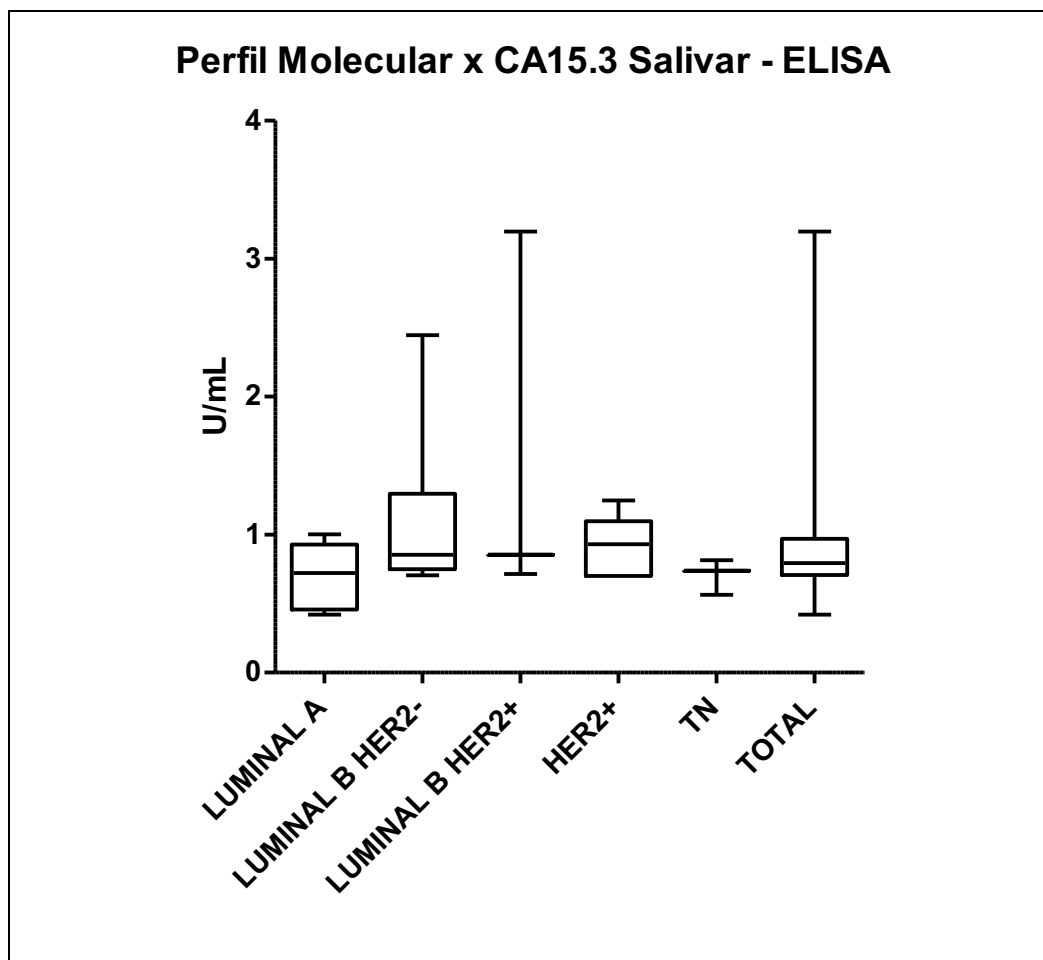


Figura 19 – Distribuição do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA de acordo com os subtipos moleculares, mostrando ausência de diferença estatística entre os grupos, analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($p=0,5728$)

5.9 CURVA ROC PARA O CA 15.3 SÉRICO E SALIVAR

A partir da curva ROC estabelecida para o CA 15.3 sérico, definimos o ponto de corte para normalidade do exame em 25,75 U/mL. Esse valor foi escolhido por se aproximar do valor estabelecido pelo Laboratório Sabin, que realizou os exames por eletroquimioluminescência nas amostras dos grupos do estudo (*cutoff* de 25 U/mL).

Para esse valor, a sensibilidade definida foi de 33,33% (15,63% a 55,32% com IC 95%) e a especificidade de 96,43% (81,65% a 99,91% com IC 95%). Para essa curva ROC, a AUC foi de 0,6406 com valor de $p=0,08287$, conforme mostra a Figura 20.

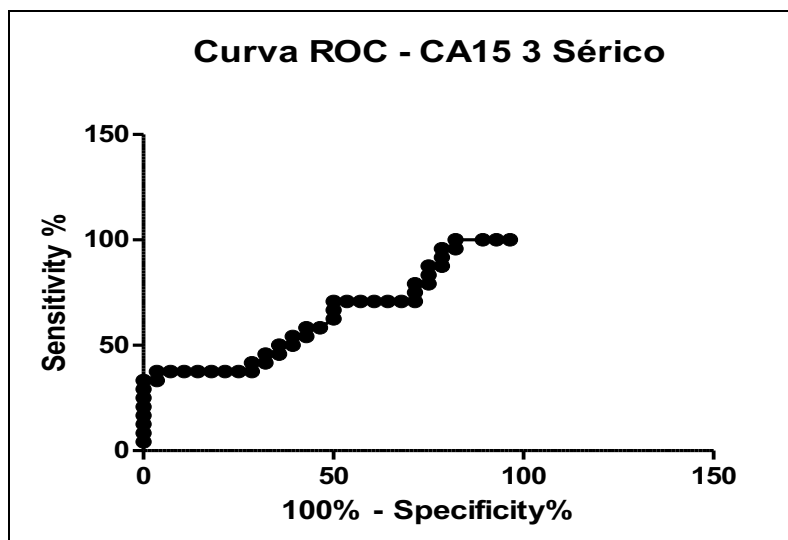


Figura 20 – Curva ROC para o CA15.3 sérico (sensibilidade = 33,33%; especificidade = 96,43%; AUC = 0,6406)

A partir da curva ROC estabelecida para o CA 15.3 salivar quantificado pelo método de quimioluminescência, definimos o ponto de corte para normalidade do exame em 2,24 U/mL. Para esse valor, a sensibilidade definida foi de 34,62% (17,21% a 55,67% com IC 95%) e a especificidade de 60,71% (40,58% a 78,5% com IC 95%). Adotamos esse valor para sensibilidade por se aproximar da sensibilidade do exame do CA 15.3 sérico do Laboratório Sabin. Para essa curva ROC, a AUC foi de 0,5110 com valor $p=0,8899$, conforme mostra a Figura 21.

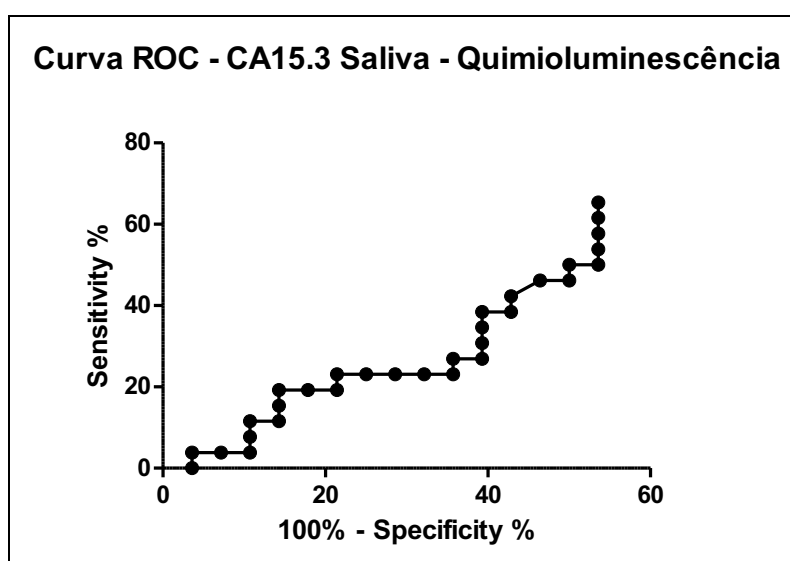


Figura 21 – Curva ROC para o CA15.3 salivar pela metodologia de quimioluminescência (sensibilidade = 34,62%; especificidade = 60,71%; AUC = 0,5110)

A partir da curva ROC estabelecida para o CA 15.3 salivar quantificado pelo método de ELISA, definimos o ponto de corte para normalidade do exame em 0,746 U/mL. Para esse valor, a sensibilidade definida foi de 61,54% (40,57% a 79,77% com IC 95%) e a especificidade de 57,14% (37,18% a 75,54% com IC 95%). Assumimos esse valor para sensibilidade pelo fato de ser o ponto onde a soma da sensibilidade e especificidade foram maiores, e que produziu o maior valor de AUC (117-119). Para essa curva ROC, a AUC foi de 0,5591 com valor $p=0,4567$, conforme mostra a Figura 21.

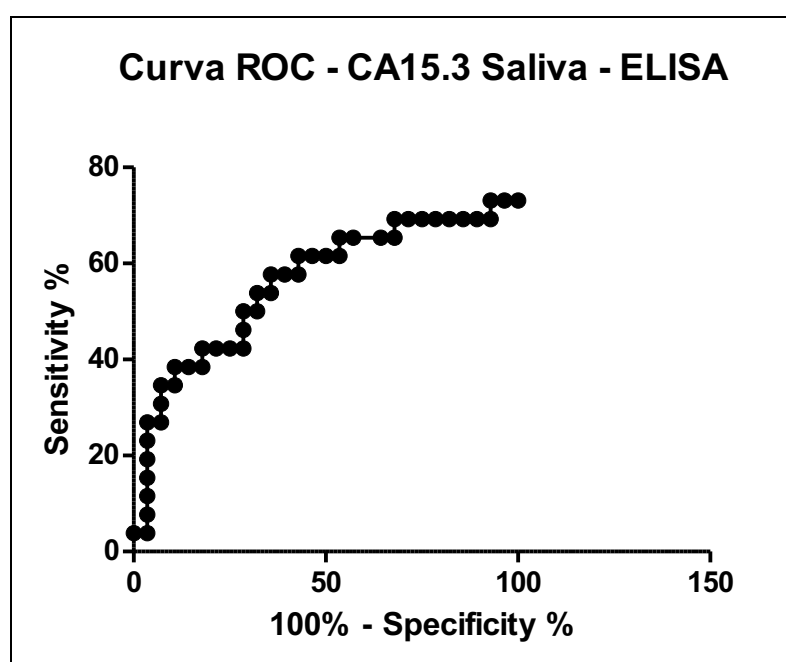


Figura 22 – Curva ROC para o CA15.3 salivar pela metodologia de ELISA (sensibilidade = 61,54%; especificidade = 57,14%; AUC = 0,5591)

5.10 VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA O CA 15.3 SÉRICO

Abaixo, os cálculos de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia para o teste do CA 15.3 sérico entre as pacientes com câncer de mama e as participantes do grupo controle. A Tabela 6 apresenta a distribuição dos resultados.

Tabela 6 – Validação diagnóstica para o CA15.3 sérico

	Pacientes com câncer de mama	Mulheres saudáveis	Total
CA15.3 elevado	8 (a)	1 (b)	9 (a+b)
CA15.3 normal	18 (c)	27 (d)	45 (c+d)
Total	26 (a+c)	28 (b+d)	54 (a+b+c+d)

A sensibilidade encontrada foi de 30,76%, a especificidade de 96,42%, o VPP foi de 88,88%, o VPN foi de 60% e a acurácia de 64,81%.

5.11 VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA O CA 15.3 SALIVAR POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Abaixo os cálculos de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia para o teste do CA 15.3 salivar pelo ensaio de quimioluminescência entre as pacientes com câncer de mama e as participantes do grupo controle. A Tabela 7 exibe a distribuição dos resultados. Usou-se o *cutoff* de 2,24 U/mL para o limite normal do exame pelos valores obtidos na curva ROC.

Tabela 7 – Validação diagnóstica para o CA15.3 salivar por quimioluminescência

	Pacientes com câncer de mama	Mulheres saudáveis	Total
CA15.3 elevado	9 (a)	11 (b)	20 (a+b)
CA15.3 normal	17 (c)	17 (d)	34 (c+d)
Total	26 (a+c)	28 (b+d)	54 (a+b+c+d)

A sensibilidade encontrada foi de 34,61%, a especificidade de 60,71%, o VPP foi de 45%, o VPN foi de 48,57% e a acurácia de 48,14%.

5.12 VALIDAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA O CA 15.3 SALIVAR POR ELISA

Abaixo os cálculos de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, prevalência e acurácia para o teste do CA 15.3 salivar pelo ensaio de ELISA entre as pacientes com câncer de mama e as participantes do grupo controle. A Tabela 8 exibe a distribuição dos resultados. Usou-se o *cutoff* de 0,746 U/mL para o limite normal do exame pelos valores obtidos na curva ROC.

Tabela 8 – Validação diagnóstica para o CA15.3 salivar por ELISA

	Pacientes com câncer de mama	Mulheres saudáveis	Total
CA15.3 elevado	15 (a)	12 (b)	27 (a+b)
CA15.3 normal	11 (c)	16 (d)	27 (c+d)
Total	26 (a+c)	28 (b+d)	54 (a+b+c+d)

A sensibilidade encontrada foi de 57,69%, a especificidade de 57,14%, o VPP foi de 55,55%, o VPN foi de 59,25% e a acurácia de 57,40%.

5.13 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO CA 15.3 SÉRICO E SALIVAR EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre as concentrações séricas e salivares de CA 15.3. Observou-se que o coeficiente de correlação foi fraco e sem significância estatística entre as concentrações de CA 15.3 salivares pela técnica de quimioluminescência e as concentrações séricas do CA 15.3 ($r=0,1630$, $p=0,4574$).

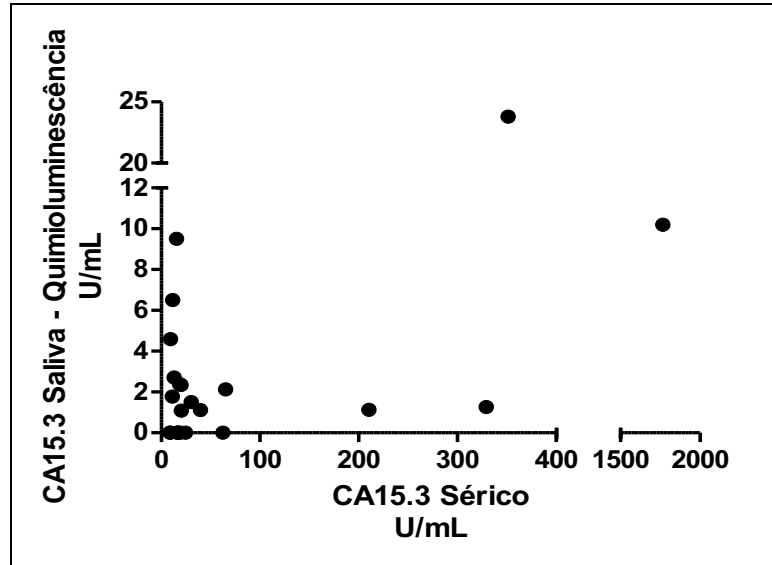


Figura 23 – Correlação entre o CA 15.3 salivar por quimioluminescência e o CA 15.3 sérico em pacientes com câncer de mama. Análise estatística pela correlação de Spearman, $r=0,1630$, $p=0,4574$

Quanto à análise do coeficiente de correlação das concentrações de CA 15.3 salivar pela técnica de ELISA e as concentrações séricas, constatou-se que o coeficiente de correlação foi negativo e sem significância estatística ($r=-0,01383$, $p=0,95$).

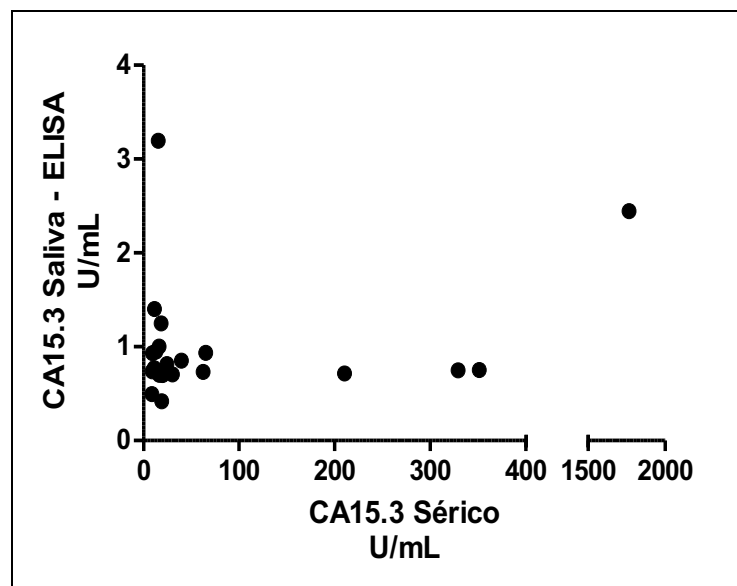


Figura 24 – Correlação entre o CA 15.3 salivar por ELISA e o CA 15.3 sérico em pacientes com câncer de mama. Análise estatística pela correlação de Spearman, $r=-0,01383$, $p=0,95$

6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a expressão da proteína CA 15.3 na saliva e no sangue de pacientes com câncer de mama como potencial estratégia complementar para diagnóstico, predição de progressão de doença e monitoramento da eficácia do tratamento. O padrão de referência para rastreamento e diagnóstico do câncer de mama, que consiste em mamografia e biópsia da mama, implica em limitações significativas que consistem em alto custo e morbidade. Por isso, precisa-se desenvolver novos procedimentos menos inconvenientes que garantam uma técnica segura e que possa ser aplicada em todas as fases do câncer de mama: rastreamento, diagnóstico, tratamento e monitoramento para predição de metástases (120, 121). Esta necessidade ainda não atendida de encontrar um biomarcador ideal para o câncer de mama pode explicar o grande número de estudos que têm contemplado esse tema desde a década de 90.

O diagnóstico clínico de uma doença usando saliva, especialmente o câncer, provavelmente requer a análise de um perfil de combinação de biomarcadores para atingir um nível aceitável de especificidade e sensibilidade, uma vez que não existe um único mecanismo, via ou molécula responsável pela carcinogênese (122). Nos últimos 50 anos o ritmo da pesquisa salivar se acelerou com o advento de novas técnicas que iluminaram as propriedades bioquímicas e físico-químicas da saliva (123). Claramente não há consenso quanto aos marcadores tumorais que possuem o melhor valor diagnóstico, qual o tipo de biomarcador mais sensível e específico (proteínas, ácidos nucleicos, metabólitos), bem como o melhor método de detecção a ser utilizado.

CA 15.3 é uma grande proteína transmembrana frequentemente superexpressa e aberrantemente glicosilada no câncer de mama e que parece desempenhar um papel na adesão celular (124). Ele é o marcador sérico mais utilizado para detectar a recorrência do câncer de mama e para monitorar o tratamento de pacientes com doença avançada, uma vez que sua expressão aumenta na maioria dos casos (125). Foi demonstrado que os níveis circulantes de CA 15.3 correlacionam-se com o tamanho do tumor, refletindo o estágio da doença (126, 127). Atualmente, a eletroquimioluminescência é a técnica mais utilizada para o processamento do CA 15.3 sérico, pois apresenta alta sensibilidade e seletividade como ferramenta analítica. Já a avaliação salivar do CA 15.3 é mais comumente

realizada, no âmbito da pesquisa clínica, pela técnica de ELISA. No presente trabalho, empregamos a técnica de quimioluminescência para detecção do CA 15.3 na saliva, teste inédito e não descrito na literatura, até o momento, com esse intuito. A fim de comparar o desempenho da técnica de quimioluminescência na saliva para quantificação do CA 15.3 com o ensaio considerado padrão, o ELISA, executamos também essa técnica. Não há kits de CA 15.3 salivar comercialmente disponíveis, o que limita a avaliação de desempenho do método de detecção designado. No campo da pesquisa clínica, os ensaios em amostras de saliva são realizados com kits séricos.

Avaliando as características demográficas da população deste estudo, percebeu-se que as pacientes recrutadas exibem um equilíbrio nos diversos perfis analisados, no que tange às comorbidades, uso de medicações, tabagismo, número de filhos. Observou-se ainda um desbalanço entre os grupos no que se refere à idade e *status* menopausal. As pacientes com câncer de mama apresentaram idade superior e mais casos de pós-menopausa, com significância estatística. Esse achado está alinhado com a literatura, uma vez que a maioria dos diagnósticos de câncer de mama se dá a partir dos 40 anos, em especial em mulheres na pós-menopausa (128).

Quanto ao desempenho do CA 15.3 sérico entre os grupos de pacientes com câncer e participantes saudáveis, notamos que a prevalência de exames alterados foi maior no grupo dos casos de câncer de mama, compatível com os dados da literatura (98). No presente estudo, mais pacientes acometidas por câncer de mama elevam o CA 15.3 sérico em relação às pacientes saudáveis (8 *versus* 1 paciente), com uma mediana de concentração sérica também superior para o grupo de pacientes com câncer (19 U/mL câncer *versus* 15,55 U/mL controle), no entanto, não houve diferença estatística entre os dois grupos. Dentre as 8 pacientes portadoras de câncer de mama que elevaram os níveis de CA 15.3 sérico, 6 pertenciam ao estágio clínico IV, uma ao IIIB e uma ao IIA.

No que se refere às concentrações salivares de CA 15.3 pela técnica de quimioluminescência, 11 pacientes do grupo controle e 9 pacientes portadoras de câncer de mama apresentaram resultados acima do limiar estabelecido, com uma mediana de concentração salivar discretamente superior no grupo controle (1,370 U/mL controle *versus* 1,335 U/mL câncer), sem significância estatística. Diante disso, constatamos a baixa sensibilidade da metodologia de quimioluminescência

para a quantificação do CA 15.3 salivar. O método não foi capaz de discernir os casos dos controles e detectou mais CA 15.3 elevados nos controles. Como não há descrição de estudos prévios quanto à realização do ensaio de quimioluminescência para determinação do CA 15.3 salivar, não podemos fazer um paralelo desse achado com a literatura.

Quanto à avaliação do CA 15.3 na saliva pelo método ELISA, 15 pacientes do grupo caso e 12 participantes saudáveis apresentaram níveis elevados de CA 15.3, com uma mediana de concentração sérica maior no grupo das pacientes doentes (0,762 U/ml câncer versus 0,731 U/mL controle), sem diferença estatística. Agha-Hosseini et al. avaliaram a associação entre níveis séricos e salivares de CA 15.3 e compararam 26 mulheres com câncer de mama e 35 mulheres saudáveis. Empregando a metodologia imunoensaio enzimático nas amostras séricas e salivares, os autores verificaram que os níveis de CA 15.3 no sangue e na saliva foram significativamente maiores nas pacientes com câncer, com uma correlação positiva significativa entre as concentrações do CA 15.3 no soro e na saliva, sugerindo o uso potencial do CA 15.3 salivar na detecção inicial do câncer de mama (98). Assim como o estudo de Agha-Hosseini et al., Colomer et al. (92), Streckfus et al. (69, 97), Azeez et al. (129), Irfan et al. (130) e Atoum et al. (131) encontraram resultados semelhantes, com diferença significativa entre o CA 15.3 sérico e/ou salivar de pacientes com câncer de mama e os controles saudáveis.

Laid et al. (99), assim como no presente estudo, e em desacordo com os resultados supracitados, relataram que não houve diferença significativa entre as concentrações séricas e salivares de CA 15.3 de pacientes portadoras de câncer de mama e pacientes saudáveis. Embora a correlação entre as concentrações salivares e séricas de CA 15.3 tenha sido positiva e estatisticamente significativa no estudo de Laid et al. (99). As razões que poderiam explicar essas diferentes conclusões poderiam ser: diferenças metodológicas, uso de diferentes kits e reagentes, tamanho da amostra, ensaios não padronizados ou sem reprodutibilidade e análises estatísticas equivocadas. É fato que o CA 15.3 expressa-se na saliva, todavia, não conseguimos demonstrar, no presente estudo, que as técnicas de quimioluminescência ou ELISA são capazes de discernir os casos dos controles.

Estudos prévios relacionam os níveis de CA 15.3 sérico e salivar com o estadiamento do câncer de mama (126, 127, 131, 132), o que não foi observado no presente trabalho. Houve recrutamento de 23% de pacientes com câncer de mama

metastático (estágio IV). Essa porcentagem na amostra é maior que a descrita nos estudos epidemiológicos, em que pese a amostra reduzida. De acordo com a literatura, a prevalência de casos de câncer de mama metastático no momento do diagnóstico gira em torno de 3% (89, 133). Houve maior número absoluto de pacientes no estágio IV com níveis de CA 15.3 sérico acima da faixa normal, compatível com a literatura (89, 90). No entanto, não foi possível estabelecer a correlação entre os níveis do CA 15.3 sérico com o estágio do tumor de forma estatisticamente significativa. Da mesma forma, os valores de CA 15.3 salivar não demonstraram relação com o estadiamento da doença. Isso se deve, provavelmente, à desproporção dos componentes em cada grupo por estadiamento. Das 13 participantes do grupo de estágio II, 9 apresentavam níveis de CA 15.3 salivar pelo método de ELISA acima do *cutoff* determinado. O fato de haver maior número de integrantes no grupo de estágio II, pode explicar a mediana superior verificada nesse grupo de estadiamento, comparativamente ao grupo do estágio III, que era composto somente por 4 pacientes. Assim, esperava-se valores de CA 15.3 superiores no estágio III, considerando o estágio mais avançado e maior carga de volume tumoral. Por outro lado, em valores absolutos, os maiores níveis de CA 15.3 encontrados, tanto pela técnica de ELISA quanto pela quimioluminescência, pertenciam às pacientes com estágio IV da doença, compatível com o exposto anteriormente.

No que diz respeito ao perfil molecular, houve maior recrutamento de tumores luminais nesse estudo, correspondendo a 61% dos casos, como observado na literatura, uma vez que esse subtipo molecular corresponde a 65% dos casos de câncer de mama (134, 135). Quanto à avaliação do CA 15.3 sérico em relação ao subtipo molecular, observamos, no presente estudo, que o marcador apresentou uma tendência de ser mais elevado nos subtipos luminais. Não se observou altas titulações do CA 15.3 no subtipo Triplo negativo, sem diferença estatisticamente significativa entre os subtipos moleculares ($p=0,4259$). Tais achados estão em conformidade com a literatura (136, 137). Geng et al. (138), relataram que os níveis séricos de CA 15.3 são estatisticamente associados ao subtipo molecular ($p<0,001$), e que subtipos luminais exibem maior porcentagem de CA 15.3 elevado comparados aos subtipos não-luminais (138-140). A razão para essa diferença não está bem elucidada, mas uma explicação possível se deve ao fato de o CA 15.3 ser derivado do extravasamento proteolítico do domínio extracelular da glicoproteína MUC1.

Assim, os tumores de mama luminais apresentam maior expressão dos genes *MUC1*, sendo relatada a relação entre expressão de *MUC1* e de RE (131, 141). No nosso estudo a elevação nos níveis de CA 15.3 de acordo com o perfil molecular se deu da seguinte forma: 20% dos casos Luminal A apresentavam CA 15.3 sérico acima da faixa normal; 37,5% dos casos Luminal B HER2 negativo; 66% dos casos Luminal B HER2 positivo; 20% dos casos HER2 superexpresso e nenhum caso entre os Triplo negativo apresentou elevação do biomarcador. Porém, não foi observada, no presente estudo, correlação entre o CA 15.3 salivar pelas técnicas de quimioluminescência e ELISA de acordo com o perfil molecular. Cabe ressaltar que, curiosamente, das 10 pacientes com tumores Luminal B HER2 negativo, 9 apresentavam níveis elevados de CA 15.3 salivar pela metodologia de ELISA. O maior valor absoluto foi observado no subgrupo Luminal B HER2 positivo, tanto por quimioluminescência quanto por ELISA. Nenhum exame alterado por quimioluminescência foi observado no grupo Triplo negativo, em que pese o baixo recrutamento de pacientes com tumores com esse subtipo molecular na amostra.

Com um desenho semelhante ao do presente trabalho, o estudo de Streckfus et al. mostrou que os níveis de CA 15.3 salivares foram capazes de detectar 65% dos casos malignos (70). Esse valor está em consonância com a concentração relatada por Bigler et al., cujos resultados evidenciaram sensibilidade de 62% para identificar casos malignos (96). No presente estudo, a sensibilidade do ensaio de ELISA para detecção dos casos de câncer foi de 57%. Esses dois estudos demonstraram que a saliva e sangue de pacientes portadoras de câncer de mama, exibem níveis elevados de CA 15.3, bem como de outros biomarcadores, como c-erbB-2 e p53, sugerindo que há uma comunicação entre os níveis séricos e salivares.

Yan et al., descreveram a sobreposição de proteínas entre a saliva e o plasma, e catalogaram a presença de 597 proteínas que coexistem nesses dois fluidos (142). Várias fontes podem contribuir para a identificação de tal sobreposição: escape de plasma para a saliva através de rotas intra e extracelulares, incluindo a saída do fluido gengival crevicular; plasma e saliva podem compartilhar proteínas essenciais, necessárias para manter suas funções fisiológicas como fluidos corporais; proteínas derivadas de debris celulares podem estar em contato próximo com qualquer fluido.

No presente estudo, a curva ROC estabelecida para o CA 15.3 sérico exibiu melhor acurácia que as curvas ROC estabelecidas para o CA 15.3 salivar. Bigler et al. demonstraram AUC de 0,62 para o CA 15.3 salivar pela metodologia de ELISA, com limiar de exame normal de 5U/mL, superior que a AUC definida no presente estudo (96). Streckfus et al. apontaram AUC de 0,705 para o CA 15.3 salivar e AUC de 0,622 para o CA 15.3 sérico, ambos quantificados pela técnica de ELISA (70). Para o CA 15.3 sérico, foram observados valores de AUC variáveis, maiores e menores dos que os que encontramos com *cutoff* de 25 U/mL, como AUC de 0,61 (143) e AUC de 0,8056 (132).

Em relação à validação diagnóstica do CA 15.3 sérico, os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN se assemelham aos descritos por Lawicki et al., com a diferença que a amostra do estudo de Lawicki foi superior ao do nosso estudo, com 100 pacientes com câncer de mama e 100 controles (132). No nosso estudo, destaca-se que o exame sérico apresentou baixa sensibilidade, mostrando não ser um exame adequado para rastreamento populacional. Porém, apresentou excelente especificidade, demonstrando ser um exame conveniente para diferenciar as pacientes saudáveis das doentes. Das 3 técnicas empregadas para a quantificação do CA 15.3, a que apresentou maior sensibilidade, ou seja, a capacidade de diagnosticar corretamente os doentes, foi a técnica de ELISA, dosando o CA 15.3 na saliva (EQL no sangue: sensibilidade 30,76%; QL na saliva: sensibilidade 34,61%; ELISA: na saliva sensibilidade 57,69%). Com relação à validação diagnóstica do CA 15.3 salivar, não há estudos descritos na literatura que tenham realizado tal análise, sendo assim, comparamos o desempenho dos testes de ELISA e quimioluminescência entre si. A técnica de ELISA para determinação do CA 15.3 na saliva mostrou-se superior quanto à sensibilidade, acurácia, VPP e VPN, enquanto a quimioluminescência confirmou especificidade superior.

Por fim, averiguou-se a correlação entre os níveis séricos e salivares de CA 15.3. Não foi observada correlação com significância estatística entre o CA 15.3 sérico e o CA 15.3 salivar pelas duas técnicas empregadas. Trabalhos previamente publicados são discordantes quanto a esse achado. Agha-Hosseini et al. reportaram que havia correlação positiva e significativa entre as concentrações de CA 15.3 sérico e salivar (98). Da mesma forma, Laid et al., relataram a correlação entre as concentrações salivares e séricas de CA 15.3 tenha sido positiva e estatisticamente significativa (99). Contudo, em análise pormenorizada desse último estudo,

verificamos que a análise estatística realizada não foi adequada, uma vez que os autores usaram o teste de correlação de Pearson numa amostra onde os grupos não têm distribuição normal. O teste apropriado nesse contexto seria o teste de correlação de Spearman, por ser um teste não paramétrico (144).

Importante frisar que as pacientes com câncer de mama que apresentaram níveis de CA 15.3 sérico aumentado não foram as mesmas que apresentaram níveis salivares de CA 15.3 elevados. Apenas em 2 pacientes (SMA 002 e SMA 020) as 3 técnicas foram concordantes entre si. É curioso relatar um efeito observado no presente estudo. Três participantes saudáveis, parentes de primeiro grau entre si, apresentaram os maiores níveis salivares de CA 15.3, tanto por quimioluminescência quanto por ELISA. Níveis estes, superiores aos das pacientes portadoras de câncer de mama. Emerge a suspeita, ainda não esclarecida, se há um componente constitucional na expressão do CA 15.3 na saliva.

Os dados encontrados nesse estudo confirmam a possibilidade de usar a saliva como fluido diagnóstico e confirmam a expressão do CA 15.3 na saliva de pacientes com e sem câncer de mama. No entanto, o tamanho das amostras e o fato de os valores de CA 15.3 salivares obtidos por meio de diferentes ensaios não poderem ser utilizados de forma intercambiável limitam a utilização da dosagem desse biomarcador na saliva para finalidade diagnóstica e de monitoramento da doença. Futuras investigações devem incluir maior número de pacientes e ampliação dos ensaios utilizados, de forma a determinar qual o mais adequado. Uma estratégia para superar a deficiência da análise de um biomarcador isolado, é tentar definir um painel de biomarcadores, a fim de aumentar a sensibilidade e especificidade para a detecção da doença (145).

O presente estudo terá continuidade, com uma fase prospectiva, em que serão avaliadas as mudanças séricas e salivares do CA 15.3 após o tratamento sistêmico. Além disso, será feita uma análise de correlação do proteoma salivar e transcriptoma, através da análise da expressão gênica do CA 15.3 com transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR).

O objetivo dos estudos, a longo prazo, é desenvolver uma ferramenta não invasiva baseada na saliva para a detecção precoce do câncer de mama. Imaginamos um contexto clínico no qual um teste salivar possa permitir aos clínicos detectar câncer de mama mais cedo (identificando pacientes que justifiquem um

acompanhamento mais próximo e imagens adicionais) e reduzir o número de biópsias desnecessárias.

Como perspectivas, há que se ressaltar o projeto de um dispositivo de biossensor destinado à triagem e ao diagnóstico precoce do câncer de mama através da saliva. O projeto consiste em um biossensor em formato de chip que mapeia marcadores salivares, dentre eles autoanticorpos, capazes de detectar o câncer de mama em fase pré-clínica, ou seja, antes mesmo de o tumor se formar e ser identificado por exames de triagem convencionais, como a mamografia (146, 147). Um biossensor, como dispositivo de diagnóstico, constata mudanças na resposta biológica de pacientes e as converte em sinais detectáveis e mensuráveis. Como vantagens, o sistema do chip é portátil e pode ser levado com facilidade para cidades do interior, onde o acesso a testes e tratamento do câncer é difícil. Outra característica do dispositivo é que ele não emite radiação (148-150).

Com instrumentos avançados e o desenvolvimento de técnicas analíticas refinadas, as tecnologias proteômicas são amplamente utilizadas como abordagens úteis e poderosas e oferecem enormes oportunidades para aplicações clínicas relacionadas a biomarcadores salivares. Nesse cenário a espectrometria de massa tem se tornado parte central como tecnologia proteômica.

Em resumo, no momento, não esperamos que a pesquisa de marcadores tumorais em fluidos substitua os métodos padrão de *screening* e diagnóstico com exame físico, mamografia e biópsia. No entanto, podemos vislumbrar um possível cenário em que um novo teste salivar possa aumentar a capacidade de detectar o câncer de mama precocemente, quando ainda é curável com os tratamentos existentes. Os estudos têm mostrado que a pesquisa de biomarcadores na saliva pode revelar-se tão útil quanto a pesquisa de biomarcadores no sangue.

7 CONCLUSÃO

Frente aos objetivos propostos concluiu-se que:

- O biomarcador CA 15.3 está expresso na saliva de pacientes com e sem câncer de mama, constatando que a saliva pode ser um meio para pesquisa de marcadores tumorais;

- As concentrações séricas e salivares de CA 15.3 pelas técnicas de eletroquimioluminescência, quimioluminescência e ELISA não foram capazes de discriminar pacientes sadias de pacientes portadoras de câncer de mama;

- Não houve associação entre os níveis séricos e salivares do CA 15.3 com os dados clínicos e histológicos;

- O desempenho do método de ELISA para quantificação do CA 15.3 salivar foi superior quanto à sensibilidade, VPP, VPN e acurácia comparativamente ao método de quimioluminescência. Sendo que a quimioluminescência mostrou melhor desempenho quanto à especificidade;

- Não foi observada correlação entre os níveis de CA 15.3 sérico e CA 15.3 salivar pelas duas técnicas empregadas.

REFERÊNCIAS

1. IARC. Most frequent cancers: both sexes 2012. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2012.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(1):7-30.
3. Byler S, Goldgar S, Heerboth S, Leary M, Housman G, Moulton K, et al. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer research*. 2014;34(3):1071-7.
4. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(6):dju048.
5. Steven A. Narod JI, Anthony B. Miller. Why have breast cancer mortality rates declined? *Journal of Cancer Policy*. 2015;5:8-17.
6. Gonzaga CM, Freitas-Junior R, Curado MP, Sousa AL, Souza-Neto JA, Souza MR. Temporal trends in female breast cancer mortality in Brazil and correlations with social inequalities: ecological time-series study. *BMC public health*. 2015;15:96.
7. Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, Carter WB, Bhargavan M, Lewis RS, et al. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology*. 2004;233(3):830-49.
8. Drukteinis JS, Mooney BP, Flowers CI, Gatenby RA. Beyond mammography: new frontiers in breast cancer screening. *The American journal of medicine*. 2013;126(6):472-9.
9. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, et al. The case for early detection. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(4):243-52.
10. Arellano M, Jiang J, Zhou X, Zhang L, Ye H, Wong DT, et al. Current advances in identification of cancer biomarkers in saliva. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2009;1:296-303.
11. Zhang YJ, Wei L, Li J, Zheng YQ, Li XR. Status quo and development trend of breast biopsy technology. *Gland surgery*. 2013;2(1):15-24.
12. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral diseases*. 2002;8(2):69-76.
13. Streckfus C, Bigler L. The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study. *Advances in dental research*. 2005;18(1):17-24.
14. Baum BJ, Yates JR, 3rd, Srivastava S, Wong DT, Melvin JE. Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Advances in dental research*. 2011;23(4):360-8.
15. Zhang L, Xiao H, Karlan S, Zhou H, Gross J, Elashoff D, et al. Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PloS one*. 2010;5(12):e15573.
16. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1990;19(3):119-25.
17. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*. 2010;6(1):78-95.

18. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *Journal (Canadian Dental Association)*. 2002;68(3):170-4.
19. Bigler LR, Streckfus CF, Dubinsky WP. Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity. *Clinics in laboratory medicine*. 2009;29(1):71-85.
20. Graham LJ, Shupe MP, Schneble EJ, Flynt FL, Clemenshaw MN, Kirkpatrick AD, et al. Current approaches and challenges in monitoring treatment responses in breast cancer. *Journal of Cancer*. 2014;5(1):58-68.
21. Wagner PD, Verma M, Srivastava S. Challenges for biomarkers in cancer detection. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1022:9-16.
22. Kallioniemi OP, Oksa H, Aaran RK, Hietanen T, Lehtinen M, Koivula T. Serum CA 15-3 assay in the diagnosis and follow-up of breast cancer. *British journal of cancer*. 1988;58(2):213-5.
23. Safi F, Kohler I, Rottinger E, Beger H. The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. A comparative study with carcinoembryonic antigen. *Cancer*. 1991;68(3):574-82.
24. Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clinical chemistry*. 2006;52(3):345-51.
25. Ali HQ, Mahdi NK, Al-Jowher MH. The value of CA15-3 in diagnosis, prognosis and treatment response in women with breast cancer. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2013;63(9):1138-41.
26. Fejzic H, Mujagic S, Azabagic S, Burina M. Tumor marker CA 15-3 in breast cancer patients. *Acta medica academica*. 2015;44(1):39-46.
27. Cancer Disparities [Internet]. National Cancer Institute. 2016 [cited March 5, 2017]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
28. INCA. Estimativa 2016: Instituto Nacional de Câncer, 2016: Instituto Nacional do Câncer; 2016 [Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>].
29. INCA. Atlas de Mortalidade Brasil: Ministério da Saúde; 2016: Instituto Nacional de Câncer; 2016 [Available from: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>].
30. BREASTCANCER.ORG. U.S. Breast Cancer Statistics Ardmore, USA2017 [Available from: http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics].
31. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(17):1784-92.
32. Ahlgren M, Melbye M, Wohlfahrt J, Sorensen TI. Growth patterns and the risk of breast cancer in women. *The New England journal of medicine*. 2004;351(16):1619-26.
33. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2001;344(4):276-85.
34. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010;12(5):245-59.
35. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer research*. 1984;44(10):4217-23.
36. Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast cancer research : BCR*. 2005;7(4):171-9.
37. Taylor-Papadimitriou J, Berdichevsky F, D'Souza B, Burchell J. Human models of breast cancer. *Cancer surveys*. 1993;16:59-78.

38. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 1998;433(2):119-29.
39. Clinic M. How breast cancer develops [Available from: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/atypical-hyperplasia/multimedia/how-cancer-develops/img-20006271>].
40. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
41. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74.
42. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418-23.
43. Passiglia F, Bronte G, Castiglia M, Listi A, Calo V, Toia F, et al. Prognostic and predictive biomarkers for targeted therapy in NSCLC: for whom the bell tolls? *Expert opinion on biological therapy*. 2015;15(11):1553-66.
44. Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(9):2020-7.
45. Kachroo N, Gnanapragasam VJ. The role of treatment modality on the utility of predictive tissue biomarkers in clinical prostate cancer: a systematic review. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013;139(1):1-24.
46. Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Computational and structural biotechnology journal*. 2016;14:211-22.
47. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(14):1054-61.
48. Baker SG, Kramer BS, McIntosh M, Patterson BH, Shyr Y, Skates S. Evaluating markers for the early detection of cancer: overview of study designs and methods. *Clinical trials (London, England)*. 2006;3(1):43-56.
49. Guerra EN, Acevedo AC, Leite AF, Gozal D, Chardin H, De Luca Canto G. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral oncology*. 2015;51(9):805-18.
50. Wong TK. The search on an ideal disease marker for childhood obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*. 2011;34(2):133-4.
51. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Jr., Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(20):1456-66.
52. Schilsky RL, Taube SE. Tumor markers as clinical cancer tests--are we there yet? *Seminars in oncology*. 2002;29(3):211-2.
53. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK): explanation and elaboration. *BMC Medicine*. 2012;10:51.
54. de Almeida Pdel V, Gregio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The journal of contemporary dental practice*. 2008;9(3):72-80.

55. Dawes C. Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated human submandibular saliva. *The Journal of physiology*. 1975;244(2):535-48.
56. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *Omics : a journal of integrative biology*. 2011;15(6):353-61.
57. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(19):6246-52.
58. Hu S, Wang J, Meijer J, leong S, Xie Y, Yu T, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(11):3588-600.
59. Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(24):8442-50.
60. Streckfus CF, Bigler LR, Zwick M. The use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva: a feasibility study. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2006;35(5):292-300.
61. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(3):949-57.e1-7.
62. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2002;13(2):197-212.
63. Zhang L, Xiao H, Wong DT. Salivary biomarkers for clinical applications. *Molecular diagnosis & therapy*. 2009;13(4):245-59.
64. Gao K, Zhou H, Zhang L, Lee JW, Zhou Q, Hu S, et al. Systemic disease-induced salivary biomarker profiles in mouse models of melanoma and non-small cell lung cancer. *PloS one*. 2009;4(6):e5875.
65. Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;415:261-5.
66. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic science international*. 2005;150(2-3):119-31.
67. Liu J, Duan Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral oncology*. 2012;48(7):569-77.
68. Haeckel R, Hanecke P. Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*. 1996;34(3):171-91.
69. Streckfus C, Bigler L, Tucci M, Thigpen JT. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer investigation*. 2000;18(2):101-9.
70. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Thigpen JT. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(6):2363-70.

71. Chen DX, Schwartz PE, Li FQ. Saliva and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. *Obstetrics and gynecology*. 1990;75(4):701-4.
72. Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR, et al. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *American journal of surgery*. 1994;168(5):429-32.
73. Porto-Mascarenhas EC, Assad DX, Chardin H, Gozal D, De Luca Canto G, Acevedo AC, et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;110:62-73.
74. Martens JW, Margossian AL, Schmitt M, Foekens J, Harbeck N. DNA methylation as a biomarker in breast cancer. *Future oncology (London, England)*. 2009;5(8):1245-56.
75. Melnikov AA, Scholtens DM, Wiley EL, Khan SA, Levenson VV. Array-based multiplex analysis of DNA methylation in breast cancer tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2008;10(1):93-101.
76. Patel S, Ahmed S. Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;107:63-74.
77. Kwon H, Oh S, Jin X, An YJ, Park S. Cancer metabolomics in basic science perspective. *Archives of pharmacal research*. 2015;38(3):372-80.
78. M S. Specialized techniques of cancer management and diagnosis. DeVita V, Hellman SJR, Rosenberg S *Cancer: Principles & practice of oncology*. Philadelphia 1993. p. 531-42.
79. Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM, Plunkett T, Graham R, Correa I, Miles D, et al. MUC1 and the immunobiology of cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2002;7(2):209-21.
80. Schroeder JA, Masri AA, Adriance MC, Tessier JC, Kotlarczyk KL, Thompson MC, et al. MUC1 overexpression results in mammary gland tumorigenesis and prolonged alveolar differentiation. *Oncogene*. 2004;23(34):5739-47.
81. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(12):874-85.
82. Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(20):2893-904.
83. Duffy MJ. Biochemical markers in breast cancer: which ones are clinically useful? *Clinical biochemistry*. 2001;34(5):347-52.
84. Hayes DF, Sekine H, Ohno T, Abe M, Keefe K, Kufe DW. Use of a murine monoclonal antibody for detection of circulating plasma DF3 antigen levels in breast cancer patients. *The Journal of clinical investigation*. 1985;75(5):1671-8.
85. Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. *Cancer treatment reviews*. 2000;26(2):91-102.
86. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(23-24):1869-74.
87. Fujino N, Haga Y, Sakamoto K, Egami H, Kimura M, Nishimura R, et al. Clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA15-3 antigen associated with human mammary carcinomas: comparison with carcinoembryonic antigen. *Japanese journal of clinical oncology*. 1986;16(4):335-46.
88. Hayes DF, Zurawski VR, Jr., Kufe DW. Comparison of circulating CA15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *Journal of clinical*

oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1986;4(10):1542-50.

89. Emens LA, Davidson NE. The follow-up of breast cancer. *Seminars in oncology*. 2003;30(3):338-48.

90. Geraghty JG, Coveney EC, Sherry F, O'Higgins NJ, Duffy MJ. CA 15-3 in patients with locoregional and metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 1992;70(12):2831-4.

91. Hayes DF TC, Kufe DW. Clinical applications of CA 15.3. In: Sell S, editor. *Serological cancer markers*1992. p. 281-307.

92. Colomer R, Ruibal A, Genolla J, Rubio D, Del Campo JM, Bodi R, et al. Circulating CA 15-3 levels in the postsurgical follow-up of breast cancer patients and in non-malignant diseases. *Breast cancer research and treatment*. 1989;13(2):123-33.

93. Touitou Y, Bogdan A. Tumor markers in non-malignant diseases. *European journal of cancer & clinical oncology*. 1988;24(7):1083-91.

94. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(6):1865-78.

95. Van Poznak C, Somerfield MR, Bast RC, Cristofanilli M, Goetz MP, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(24):2695-704.

96. Bigler LR, Streckfus CF, Copeland L, Burns R, Dai X, Kuhn M, et al. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2002;31(7):421-31.

97. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Pfeifer M, Rose A, Thigpen JT. CA 15-3 and c-erbB-2 presence in the saliva of women. *Clinical oral investigations*. 1999;3(3):138-43.

98. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Rahimi A. Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2009;14(10):e521-4.

99. Laidi F, Bouziane A, Lakhdar A, Khabouze S, Amrani M, Rhrab B, et al. Significant correlation between salivary and serum Ca 15-3 in healthy women and breast cancer patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(11):4659-62.

100. McIntyre R, Bigler L, Dellinger T, Pfeifer M, Mannery T, Streckfus C. Oral contraceptive usage and the expression of CA 15-3 and c-erbB-2 in the saliva of healthy women. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1999;88(6):687-90.

101. Rapado-Gonzalez O, Majem B, Muinelo-Romay L, Lopez-Lopez R, Suarez-Cunqueiro MM. Cancer Salivary Biomarkers for Tumours Distant to the Oral Cavity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(9).

102. Wang Q, Yu Q, Lin Q, Duan Y. Emerging salivary biomarkers by mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;438:214-21.

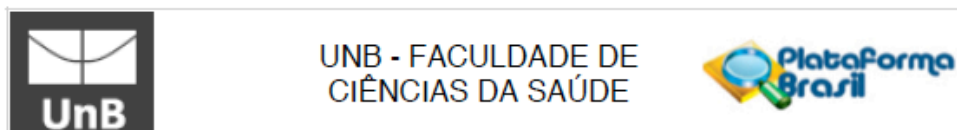
103. Wang WS, Lin JK, Lin TC, Chiou TJ, Liu JH, Yen CC, et al. EIA versus RIA in detecting carcinoembryonic antigen level of patients with metastatic colorectal cancer. *Hepato-gastroenterology*. 2004;51(55):136-41.
104. Castiglione-Gertsch M, O'Neill A, Price KN, Goldhirsch A, Coates AS, Colleoni M, et al. Adjuvant chemotherapy followed by goserelin versus either modality alone for premenopausal lymph node-negative breast cancer: a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(24):1833-46.
105. Diagnostics SH. [Weg page]. 2017 [Available from: <https://www.healthcare.siemens.com.br/immunoassay/immulite-1000-chemiluminescent-technology>].
106. immunology BSf. British Society for immunology. 2017.
107. Crowther JR. ELISA. Theory and practice. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 1995;42:1-218.
108. Lin J, Zhao H, Shen J, Jiao F. Salivary Cortisol Levels Predict Therapeutic Response to a Sleep-Promoting Method in Children with Postural Tachycardia Syndrome. *The Journal of pediatrics*. 2017.
109. Li YW, Sifrim D, Xie C, Chen M, Xiao YL. Relationship Between Salivary Pepsin Concentration and Esophageal Mucosal Integrity in Patients With Gastroesophageal Reflux Disease. *Journal of neurogastroenterology and motility*. 2017;23(4):517-25.
110. Nylund KM, Ruokonen H, Sorsa T, Heikkinen AM, Meurman JH, Ortiz F, et al. Association of the Salivary Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells/ its Ligand Peptidoglycan Recognition Protein 1 Axis With Oral Inflammation in Kidney Disease. *Journal of periodontology*. 2017:1-17.
111. Kilic N, Dagli N, Aydin S, Erman F, Bek Y, Akin O, et al. Saliva/serum ghrelin, obestatin and homocysteine levels in patients with ischaemic heart disease. *Cardiovascular journal of Africa*. 2017;28(3):159-64.
112. Laidi F, Bouziane A, Errachid A, Zaoui F. Usefulness of Salivary and Serum Auto-antibodies Against Tumor Biomarkers HER2 and MUC1 in Breast Cancer Screening. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2016;17(1):335-9.
113. Balan JJ, Rao RS, Premalatha BR, Patil S. Analysis of tumor marker CA 125 in saliva of normal and oral squamous cell carcinoma patients: a comparative study. *The journal of contemporary dental practice*. 2012;13(5):671-5.
114. AJCC. Cancer Staging Manual 2017 [10/30/2017]. Available from: <https://cancerstaging.org/Pages/default.aspx>.
115. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*. 2013;24(9):2206-23.
116. Guimarães M. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1985:117-20.
117. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
118. Payne RC, Allard JW, Anderson-Mausser L, Humphreys JD, Tenney DY, Morris DL. Automated assay for HER-2/neu in serum. *Clinical chemistry*. 2000;46(2):175-82.
119. Thompson ML, Zucchini W. On the statistical analysis of ROC curves. *Statistics in medicine*. 1989;8(10):1277-90.

120. Maric P, Ozretic P, Levanat S, Oreskovic S, Antunac K, Beketic-Oreskovic L. Tumor markers in breast cancer--evaluation of their clinical usefulness. *Collegium antropologicum*. 2011;35(1):241-7.
121. Porika M, Malotu N, Veldandi UK, Yadala N, Abbagani S. Evaluation of tumor markers in southern Indian breast cancer patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2010;11(1):157-9.
122. Glazer CA, Chang SS, Ha PK, Califano JA. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. *Oral oncology*. 2009;45(4-5):440-6.
123. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral biology*. 2007;52(12):1114-35.
124. Duffy MJ, Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. *The International journal of biological markers*. 2000;15(4):330-3.
125. Clinton SR, Beason KL, Bryant S, Johnson JT, Jackson M, Wilson C, et al. A comparative study of four serological tumor markers for the detection of breast cancer. *Biomedical sciences instrumentation*. 2003;39:408-14.
126. Toth B, Nieuwland R, Liebhardt S, Ditsch N, Steinig K, Stieber P, et al. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers. *Anticancer research*. 2008;28(2a):1107-12.
127. Nicolini A, Carpi A, Ferrari P, Rossi G. Immunotherapy prolongs the serum CEA-TPA-CA15.3 lead time at the metastatic progression in endocrine-dependent breast cancer patients: a retrospective longitudinal study. *Cancer letters*. 2008;263(1):122-9.
128. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ (Clinical research ed)*. 2000;321(7261):624-8.
129. Azeez BA MA. Salivary tumor marker CA 15-3 and selected elements in relation to oral health to oral health status among a group of breast cancer women. *J Bagh College Dentistry*. 2015;27(3):124-9.
130. Lal N IS. Role of Biomarkers ALCAM and CA-15-3 in the Diagnosis of Breast Cancer: A Case-Control Study. *International Journal of Contemporary Medical Research*. 2017;4(8):1807-10.
131. Atoum M, Nimer N, Abdeldayem S, Nasr H. Relationships among serum CA15-3 tumor marker, TNM staging, and estrogen and progesterone receptor expression in benign and malignant breast lesions. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(3):857-60.
132. Lawicki S, Bedkowska GE, Szmikowski M. VEGF, M-CSF and CA 15-3 as a new tumor marker panel in breast malignancies: a multivariate analysis with ROC curve. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 2013;31(3):98-105.
133. Malmgren JA, Mayer M, Atwood MK, Kaplan HG. Differential presentation and survival of de novo and recurrent metastatic breast cancer over time: 1990-2010. *Breast cancer research and treatment*. 2017.
134. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(24):6100-10.

135. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015;26 Suppl 5:v8-30.
136. Kos T, Aksoy S, Sendur MA, Arik Z, Civelek B, Kandemir N, et al. Variations in tumor marker levels in metastatic breast cancer patients according to tumor subtypes. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2013;18(3):608-13.
137. Yerushalmi R, Tyldesley S, Kennecke H, Speers C, Woods R, Knight B, et al. Tumor markers in metastatic breast cancer subtypes: frequency of elevation and correlation with outcome. *Annals of Oncology*. 2012;23(2):338-45.
138. Geng B, Liang MM, Ye XB, Zhao WY. Association of CA 15-3 and CEA with clinicopathological parameters in patients with metastatic breast cancer. *Molecular and clinical oncology*. 2015;3(1):232-6.
139. Pedersen AC, Sorensen PD, Jacobsen EH, Madsen JS, Brandslund I. Sensitivity of CA 15-3, CEA and serum HER2 in the early detection of recurrence of breast cancer. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2013;51(7):1511-9.
140. Tampellini M, Berruti A, Gorzegno G, Bitossi R, Bottini A, Durando A, et al. Independent factors predict supranormal CA 15-3 serum levels in advanced breast cancer patients at first disease relapse. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2001;22(6):367-73.
141. Park S, Ahn HK, Park LC, Hwang DW, Ji JH, Maeng CH, et al. Implications of different CA 15-3 levels according to breast cancer subtype at initial diagnosis of recurrent or metastatic breast cancer. *Oncology*. 2012;82(3):180-7.
142. Yan W, Apweiler R, Balgley BM, Boontheung P, Bundy JL, Cargile BJ, et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clinical applications*. 2009;3(1):116-34.
143. Gion M, Mione R, Leon AE, Dittadi R. Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. *Clinical chemistry*. 1999;45(5):630-7.
144. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi*. 2012;24(3):69-71.
145. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert review of proteomics*. 2007;4(4):531-8.
146. Arif S, Qudsia S, Urooj S, Chaudry N, Arshad A, Andleeb S. Blueprint of quartz crystal microbalance biosensor for early detection of breast cancer through salivary autoantibodies against ATP6AP1. *Biosensors & bioelectronics*. 2015;65:62-70.
147. Liang YH, Chang CC, Chen CC, Chu-Su Y, Lin CW. Development of an Au/ZnO thin film surface plasmon resonance-based biosensor immunoassay for the detection of carbohydrate antigen 15-3 in human saliva. *Clinical biochemistry*. 2012;45(18):1689-93.
148. Choi S, Chae J. Reusable biosensors via in situ electrochemical surface regeneration in microfluidic applications. *Biosensors & bioelectronics*. 2009;25(2):527-31.
149. Wang J. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*. 2008;108(2):814-25.
150. Bohunicky B, Mousa SA. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, science and applications*. 2010;4:1-10.

ANEXOS

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores salivares como método diagnóstico do câncer

Pesquisador: Daniele Xavier Assad

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 57449716.5.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE BRASILIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.767.139

Apresentação do Projeto:

e valiosa, uma vez que contém abundância de proteínas, muitas das quais podem ser usadas para a detecção de doenças. Os biomarcadores surgiram como ferramentas de importância crítica para detectar doenças nos seus vários estágios clínicos, aumentando a precisão para caracterizar o nível da doença em um diagnóstico ou prognóstico. Um biomarcador tumoral é uma molécula cuja mudança reflete o estado de uma malignidade subjacente. Ele pode ser identificado e medido por um ou mais testes ou ensaios. Nesse estudo clínico faremos a análise da expressão na saliva de biomarcadores proteicos de pacientes com câncer de mama, câncer do colo do útero e câncer de cabeça e pescoço antes e após o tratamento. Compararemos também o desempenho diagnóstico dos testes ELISA e qPCR. para detecção de proteínas salivares. Selecionaremos 20 pacientes portadores de câncer de mama, 20 pacientes portadores de câncer do colo do útero, 20 pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço com diagnóstico histopatológico confirmado por biópsia, atendidos no Hospital Sírio Libanês, Clínica Cettro e Hospital Universitário de Brasília. Também serão coletadas amostras de 60 participantes saudáveis para formar o grupo controle. A hipótese da pesquisa é que a expressão dos biomarcadores na saliva de paciente com câncer de mama, câncer do colo do útero e câncer de cabeça e pescoço pode ter relevância diagnóstica e sofrer influência do tratamento."

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** ceptsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



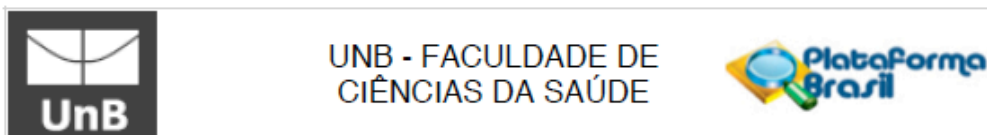
Continuação do Parecer: 1.767.139

Metodologia:

- "A coleta da saliva será realizada após o diagnóstico histopatológico de neoplasia de mama, cancer do colo do útero e câncer de cabeça e pescoço, além dos controles saudáveis. Os participantes serão instruídos a não comer, beber, fumar ou realizar procedimentos de higiene oral por pelo menos 1 hora antes da coleta de saliva. Para a coleta, um cotonete de algodão (Salivette®, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Oberbergischer Kreis, Alemanha) será inserido na boca dos participantes por um período de 5 minutos. A amostra de saliva será centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm a 4°C. Posteriormente, a saliva será transferida para um tubo e diluída (1:1) numa solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0,4mM de NaCl e 10mM de NaPO₄) contendo inibidores de protease (0,01 mM de EDTA; 0,01 mg/mL de aprotinina A) e 0,05% de Tween-20. A solução será homogeneizada e congelada a -80°C até o momento das análises.";
- "As reações de ELISA (Ensaio imunoenzimático) serão realizadas utilizando os Kits TGF-B1 (DY240, DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e IL-10 (DY2117BE, DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as especificações do fabricante...";
- "PCR array: Utilizando placas customizadas (SABioscience), serão avaliados a expressão de genes relacionados ao diagnóstico do câncer de mama e do câncer de cabeça e pescoço, além de 3 genes de referência para normalização das reações. A reação será realizada com o sistema ABI StepOnePlus (SABioscience), utilizando o SYBR® Green qPCR Mastermix (SABioscience), seguindo as recomendações do fabricante.";
- Critério de Inclusão: "Participantes portadores de câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama e câncer do colo do útero que colem a saliva antes do início do tratamento sistêmico ou radioterápico e que colem a saliva após o fim do tratamento sistêmico ou radioterápico.";
- Critério de Exclusão: "Participantes portadores de câncer de mama, colo do útero e cabeça e pescoço que farão apenas tratamento cirúrgico; • Participantes portadores de câncer de mama, colo do útero e cabeça e pescoço e participantes do grupo controle que apresentarem sinais de morbidade, problemas de saúde como doença autoimune, HIV, alterações da função renal, insuficiência cardíaca congestiva, infecção ativa e hepatite.";

Hipótese: "A expressão dos biomarcadores na saliva de paciente com câncer de mama, câncer do colo do útero e câncer de cabeça e pescoço pode ter relevância diagnóstica e sofrer influência do tratamento.".

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: ceptsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.767.139

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: "Desenvolver ferramentas eficientes e inovadoras utilizando a saliva como método diagnóstico para o Câncer."

Objetivo Secundário: "- Normalizar as amostras: um estudo preliminar será realizado para analisar a variabilidade das amostras de acordo com o método de amostragem e conservação salivar; - Quantificar os marcadores salivares de câncer de mama, do colo do útero e de cabeça e pescoço;- Comparar o desempenho diagnóstico dos testes de referência (ELISA, qPCR) para a detecção de marcadores de proteínas salivares. - Comparar a expressão dos biomarcadores na saliva dos pacientes portadores de câncer de mama, câncer do colo do útero e câncer de cabeça e pescoço antes e após o tratamento."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

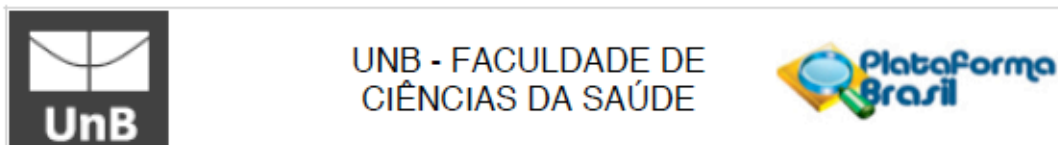
Riscos: "Os riscos de participar da pesquisa são muito pequenos. Pode haver desconforto local ou ânsia de vômito decorrentes do contato do algodão com a boca e para minimizar os riscos, o senhor(a) será orientado(a) a não ingerir alimentos ou líquidos uma hora antes da coleta da saliva. Caso ocorra qualquer tipo de reação, a equipe médica do hospital sempre dará assistência, para que esses riscos sejam evitados ou diminuídos. Se você aceitar participar da pesquisa, estará contribuindo para a avaliação de novas formas de diagnóstico do câncer. Outro risco do estudo é o de gerar angústia aos participantes quanto ao resultado da análise de sua saliva. Para reduzir esse risco em qualquer momento, o (a) participante poderá ter acesso aos resultados e eles poderão ser publicados em eventos e revistas científicas sempre mantendo o sigilo da sua participação. Essas estratégias reduzem a possibilidade de danos às diversas dimensões da pessoa humana (moral, psicológica, social ou espiritual)."

Benefícios: "A pesquisa não oferece benefícios diretos e imediatos aos participantes, mas como benefícios futuros, espera-se que a pesquisa permita avaliar uma nova técnica diagnóstica não invasiva para os tumores malignos de mama, colo do útero e cabeça e pescoço, tendo em vista que o diagnóstico dessas doenças atualmente é feito por procedimentos invasivos de biópsia com envio do material para análise histopatológica."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores responderam adequadamente à solicitação deste CEP, conforme elencado no

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.767.139

último ponto do parecer - número 1.698.527, emitido em 26 de agosto de 2016 (Considerações finais a critério do CEP), enviando carta resposta, com as devidas informações e apontamentos necessários para a análise do projeto.

Não foram observados óbices éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos que compõem o processo:

1. Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720272.pdf", postado em 30/06/2016;
2. Folha de rosto: "folhaderosto.pdf", postado em 30/06/2016. Documento devidamente redigido e assinado;
3. Projeto Detalhado / Brochura Investigador: "projetocep.docx", postado em 28/06/2016. Documento contendo o projeto detalhado do estudo;
4. Outros: "cetroaceite.pdf", postado em 22/06/2016. Documento devidamente redigido, assinado por uma das instituições coparticipantes;
5. Outros: "cacon.pdf", postado em 21/06/2016. Documento devidamente redigido, assinado por uma das instituições coparticipantes;
6. Outros: "encaminhamentoaocep.pdf", postado em 20/06/2016. Documento devidamente redigido e assinado.
7. Declaração de pesquisadores: "compromissopesquisador.pdf", postado em 16/06/2016. Documento devidamente redigido e assinado;
8. Outros: "encaminhamentoaoCEP.docx", postado em 16/06/2016. Documento devidamente redigido, não assinado;
9. Outros: "CACON.docx", postado em 16/06/2016. Documento devidamente redigido, não assinado;
10. Outros: "cetro.docx", postado em 16/06/2016. Documento devidamente redigido, não assinado;
11. Declaração de pesquisador: "compromisso.docx"; postado em 16/06/2016. Documento devidamente redigido, não assinado;
12. Outros: "siriolibanes.doc", postado em 16/06/2016. Documento devidamente redigido, não assinado;
13. Outros: "termosirio.pdf", postado em 16/06/2016. Documento devidamente redigido e

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.767.139

assinado;

14. Outros: "adrianacastelo.pdf", postado em 16/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
15. Outros: "tatianastrava.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
16. Outros: "perola.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
17. Outros: "eliete.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
18. Outros: "gabriel.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
19. Outros: "yanna.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
20. Outros: "anacarolina.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
21. Outros: "elisa.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
22. Outros: "danielaxavierassad.pdf", postado em 31/06/2016. Currículo Lates de pesquisador do projeto;
23. TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência: "TCLE.docx", postado em 31/06/2016. Considerações sobre o documento serão realizadas em seção posterior;
24. Orçamento: "Orçamento.docx", postado em 30/05/2016. Documento contendo planilha orçamentária detalhada;
25. Cronograma: "CRONOGRAMA.docx", postado em 30/05/2016. Documento contendo cronograma detalhado.

Documentos incluídos ao processo após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016:

1. Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720272.pdf", postado em 02/08/2016;
2. TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência: "TCLE.docx", postado em 02/06/2016. Considerações sobre o documento serão realizadas em seção posterior;
3. Outros: "cartarespostaocep.pdf", postada em 02/08/2016. Documento contendo carta resposta ao parecer consubstanciado emitido em 23/07/2016;
4. Projeto Detalhado / Brochura Investigador: "projetocep.docx", postado em 02/06/2016. Documento contendo o projeto detalhado do estudo.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.767.139

Documentos incluídos ao processo após parecer consubstanciado nº 1.698.527, emitido em 26 de agosto de 2016:

1. Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720272.pdf", postado em 19/09/2016;
2. Outros: "cartarespostaaoccep.pdf", postada em 19/09/2016. Documento contendo carta resposta ao parecer consubstanciado emitido em 26/08/2016;
3. Outros: "cartarespostaaopospendenciasCEP.docx", postada em 19/09/2016. Documento contendo carta resposta ao parecer consubstanciado emitido em 26/08/2016;
4. Projeto Detalhado / Brochura Investigador: "projetocep.docx", postado em 19/09/2016. Documento contendo o projeto detalhado do estudo;
5. TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência: "TCLE.docx", postado em 19/09/2016. Considerações sobre o documento serão realizadas em seção posterior.

Recomendações:

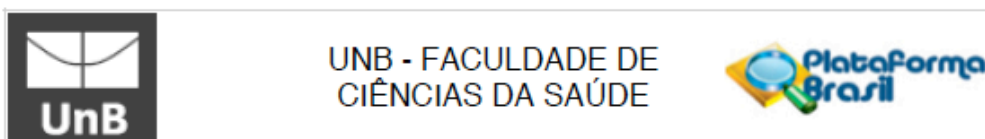
Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1) Os autores definiram como critérios de inclusão: "Participantes portadores de câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama e câncer do colo do útero que colem a saliva antes do início do tratamento sistêmico ou radioterápico e que colem a saliva após o fim do tratamento sistêmico ou radioterápico; - Estar de acordo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.". A assinatura do Termo de consentimento não deve ser considerada critério de inclusão. Solicita-se revisão desta seção; Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta reposta dos pesquisadores: PENDÊNCIA ATENDIDA. O critério de inclusão foi adequado.

2) Os autores definiram como riscos do projeto: "Os riscos aos participantes do projeto são mínimos, pois será feito apenas coleta da saliva. Nesse sentido, o método de coleta pode levar a desconforto local ou náusea decorrentes do contato do cotonete com a mucosa bucal.". Considerando-se que, segundo a Resolução CNS 466/2012, item V, "Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados". E ainda, em seu item II.22, que risco da pesquisa é a "possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente". Solicita-se apresentar

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: ceptsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.767.139

análise de riscos e as formas de minimização dos mesmos. Tal revisão deve ser realizada nos projetos detalhado e na plataforma Brasil e no TCLE.

Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta resposta dos pesquisadores:

PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Os autores realizaram modificações, no entanto, estas ainda contemplam somente riscos físicos da participação do indivíduo no estudo. Os pesquisadores são encorajados a discutir também as dimensões "psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano", e as formas de minimização destes riscos, conforme normas vigentes do país, elencadas no parecer anterior.

Análise após parecer nº 1.698.527, emitido em 26 de agosto de 2016, e carta resposta dos pesquisadores:

PENDÊNCIA ATENDIDA: os autores informam sobre outros "riscos", que não somente os físicos. As modificações foram satisfatórias, permitindo a aprovação do projeto.

3) Solicita-se esclarecer a forma de financiamento da Fundação Universidade de Brasília. Se for por meio de Edital, favor incluir o número do mesmo.

Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta resposta dos pesquisadores:

PENDÊNCIA ATENDIDA. Informação solicitada foi adicionada ao projeto.

4) Quanto ao TCLE:

a. Solicita-se adequar a linguagem ao perfil dos participantes: linguagem clara, sem termos técnicos;

Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta resposta dos pesquisadores:

PENDÊNCIA ATENDIDA. A linguagem se encontra mais adequada ao público estudado.

b. Solicita-se acrescentar tempo da pesquisa e de cada fase;

Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta resposta dos pesquisadores:

PENDÊNCIA ATENDIDA. A informação foi acrescentada.

c. Solicita-se revisão dos riscos e formas de minimizá-los;

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.767.139

Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta resposta dos pesquisadores:
PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. A análise de riscos ainda se encontra insatisfatória (favor levar em consideração item 2 das Conclusões deste parecer).

Análise após parecer nº 1.698.527, emitido em 26 de agosto de 2016, e carta resposta dos pesquisadores:
PENDÊNCIA ATENDIDA: os autores informam sobre outros "riscos", que não somente os físicos. As modificações foram satisfatórias, permitindo a aprovação do projeto.

d. Solicita-se acrescentar informação sobre indenização de acordo com o item "11.7 - indenização – cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa ao participante da pesquisa", sendo "11.6 – dano associado ou decorrente da pesquisa - agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou a coletividade, decorrente da pesquisa", conforme Resolução CNS 466/2012.;

Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta resposta dos pesquisadores:
PENDÊNCIA ATENDIDA. A informação foi acrescentada.

e. Solicita-se correção de erros de digitação.

Análise após parecer nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016, e carta resposta dos pesquisadores:
PENDÊNCIA ATENDIDA. Documento foi revisto e adequado. Conclusão da análise das respostas às pendências do parecer consubstanciado nº 1.645.876, emitido em 23/07/2016.

Conclusão: Todas as pendências foram atendidas. Não há óbices éticos para a realização deste projeto. Protocolo de pesquisa está em conformidade com a Resolução CNS 466/2012 e Complementares.

Considerações Finais a critério do CEP:

A realização das atividades do projeto está condicionada à aprovação pelos CEPs responsáveis das instituições co-participantes.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** ceptsunb@gmail.com



UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 1.767.189

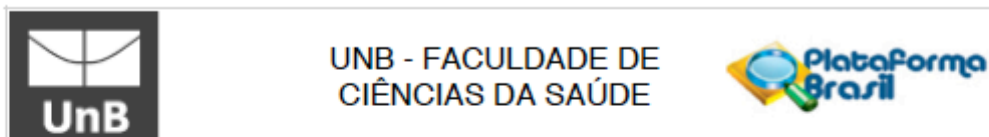
De acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720272.pdf	19/09/2016 19:01:53		Aceito
Outros	cartarespostacep.pdf	19/09/2016 19:00:39	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	cartarespostaaoapospendedenciasCEP.docx	19/09/2016 19:00:15	Daniele Xavier Assad	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocep.docx	19/09/2016 18:41:12	Daniele Xavier Assad	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/09/2016 18:40:53	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	cartarespostaaocep.pdf	02/08/2016 20:53:44	Daniele Xavier Assad	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/06/2016 11:58:54	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	cetroaceite.pdf	22/06/2016 15:40:21	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	cacon.pdf	21/06/2016 15:13:59	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	encaminhamentoaocep.pdf	20/06/2016 15:34:02	Daniele Xavier Assad	Aceito
Declaração de Pesquisadores	comprimissopesquisador.pdf	16/06/2016 16:25:20	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	encaminhamentoaoCEP.docx	16/06/2016 15:14:49	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	CACON.docx	16/06/2016 15:12:49	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	cetro.docx	16/06/2016 15:11:37	Daniele Xavier Assad	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromisso.docx	16/06/2016 15:10:24	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	siriolibanes.doc	16/06/2016 15:07:28	Daniele Xavier Assad	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cep@sunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.767.139

Outros	termosirio.pdf	16/06/2016 15:04:37	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	adrianacastelo.pdf	16/06/2016 11:53:56	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	tatianastrava.pdf	31/05/2016 22:06:23	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	perola.pdf	31/05/2016 22:05:47	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	eliete.pdf	31/05/2016 22:05:23	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	gabriel.pdf	31/05/2016 22:03:28	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	yanna.pdf	31/05/2016 22:02:41	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	anacarolina.pdf	31/05/2016 22:01:20	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	elisa.pdf	31/05/2016 22:00:19	Daniele Xavier Assad	Aceito
Outros	danielexavierassad.pdf	31/05/2016 21:59:24	Daniele Xavier Assad	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	30/05/2016 20:56:16	Daniele Xavier Assad	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	30/05/2016 20:54:27	Daniele Xavier Assad	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASÍLIA, 08 de Outubro de 2016

Assinado por:
Keila Elizabeth Fontana
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 E-mail: ceptsunb@gmail.com

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE



Universidade de Brasília

Pós-Graduação em Ciências da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **“Biomarcadores salivares como método diagnóstico do câncer”**. A saliva contém proteínas que podem ser usadas para o diagnóstico de doenças. Queremos avaliar se as proteínas da saliva podem servir para diagnosticar o câncer e sua participação é muito importante. Abaixo, estão algumas informações sobre a pesquisa:

- O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).
- A sua participação se dará por meio de fornecimento de amostra da sua saliva para o estudo das proteínas salivares. A coleta da saliva será com um algodão específico que será mastigado por 2 minutos e depois armazenado. A coleta será realizada no hospital onde o senhor(a) realizará o tratamento da doença. Serão realizadas duas coletas da saliva: uma antes do início do tratamento e outra após o término de todos os tratamentos, em horários que serão agendados e combinados previamente com o pesquisador. A saliva coletada será armazenada

em tubos que serão identificados por números, dessa forma será garantida sua privacidade e sigilo.

- Todos os cuidados necessários para diminuir os riscos dos participantes serão observados no presente estudo, garantindo, dessa forma, a manutenção de sua dignidade e privacidade, como a realização de procedimentos não invasivos que são mais confortáveis, sendo que os benefícios possíveis do estudo explicam os benefícios de fazer os testes.
- Os riscos de participar da pesquisa são muito pequenos. Pode haver desconforto local ou ânsia de vômito decorrentes do contato do algodão com a boca e para minimizar os riscos, o senhor(a) será orientado(a) a não ingerir alimentos ou líquidos uma hora antes da coleta da saliva. Caso ocorra qualquer tipo de reação, a equipe médica do hospital sempre dará assistência, para que esses riscos sejam evitados ou diminuídos. Se você aceitar participar da pesquisa, estará contribuindo para a avaliação de novas formas de diagnóstico do câncer.
- Outro risco do estudo é o de gerar angústia aos participantes quanto ao resultado da análise de sua saliva. Para reduzir esse risco em qualquer momento, o (a) participante poderá ter acesso aos resultados e eles poderão ser publicados em eventos e revistas científicas sempre mantendo o sigilo da sua participação
- Essas estratégias reduzem a possibilidade de danos às diversas dimensões da pessoa humana (moral, psicológica, social ou espiritual).
- O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a), retirando o consentimento de utilização e armazenamento de sua saliva e pedindo a destruição e descarte do material. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.
- Caso o(a) senhor(a) tenha gastos diretamente relacionados à pesquisa, como alimentação, transporte e exames, estas despesas serão pagas pelo pesquisador responsável. Se for necessária a presença de acompanhante, as despesas dele relacionadas à pesquisa também serão pagas pelo pesquisador.
- Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, você poderá ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

- Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados em eventos e revistas científicas, mas não divulgaremos seu nome ou qualquer outra informação que permita identificá-lo.
- Durante a realização dos experimentos, a saliva será armazenada e será utilizada somente para esta pesquisa e ficará sob a guarda do pesquisador pelo tempo de duração da pesquisa, e após sua conclusão, esta será descartada. A pesquisa envolverá 2 fases. A primeira fase envolve a coleta das amostras de salivas dos(as) participantes e essa fase tem duração de um (1) ano. A segunda fase envolve a análise das proteínas da saliva dos (as) participantes e terá duração de dois (2) anos.
- Caso surjam dúvidas em relação à pesquisa, o senhor(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Daniele Xavier Assad, pelo telefone 61 981014950 (inclusive ligação a cobrar) ou por email (dxassad@gmail.com) ou com a pesquisadora assistente, Elisa Cançado Porto Mascarenhas, pelo telefone 61 98123234 (inclusive ligação a cobrar) ou por email (elisaporto@gmail.com).
- Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

_____ Rubrica do participante

_____ Rubrica do pesquisador

- Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor(a).

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável

Nome e assinatura

Brasília, ____ de _____ de _____.

_____ Rubrica do participante

ANEXO III**QUESTIONÁRIO****Universidade de Brasília****Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

Pesquisa: "Biomarcadores salivares como método de pesquisa do câncer

1. Nome completo:
2. Telefone
3. Data de nascimento: ___/___/____
4. Local da coleta: ___ Sírio Libanês ___ Cettro ___ HUB ___ HBDF
5. Número registro prontuário:
6. Idade:
7. Peso:
8. Altura:
9. Comorbidades:
10. Uso de medicações, quais:
11. Status menopausal: Pré-menopausa: _____ Pós-menopausa: _____
12. Número de filhos:
13. Duração da menopausa:
14. Usou anticoncepcional? _____ Por quanto tempo? _____
15. Fuma ou já fumou? _____ Por quanto tempo? _____
16. Numero de cigarros /dia
17. Estádio da doença: T N M
18. Numero de sítios metastáticos:
19. Locais das metástases:

20. Nível CA15.3 sérico inicial – somente para portadoras de CA mama:

21. Esquema de QT:

22. Número de ciclos previstos:

23. Número de ciclos realizados:

24. Esquema de hormonioterapia:

25. Número de meses realizado:

26. Exames realizados para estadiamento: (marcar com um X)

27. Raio x tórax: _____

28. Tomografia tórax: _____

29. Ultrassonografia de abdome: _____

30. Tomografia de abdome: _____

31. Cintilografia óssea: _____

32. PET-CT: _____

33. Perfil histopatológico:

34. Subtipo histológico:

35. Grau nuclear

36. Perfil IHQ:

37. RE:

38. RP:

39. Ki67:

40. HER2: