



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia**

ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE QUIMIOQUINAS EN SALIVA DE PACIENTES CON CÁNCER ORAL

POR NICOLÁS ALONSO PÉREZ BASTÍAS

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesora Guía

Dra. Estefanía Andrea Nova Lamperti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Noviembre, 2021

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



TABLA DE CONTENIDOS

Índice de Figuras	4
Índice de Tablas.....	5
Resumen	6
Abstract	8
1.Introducción	10
1.1 <i>Cáncer oral en Chile y el mundo</i>	10
1.2 <i>Mortalidad cáncer oral</i>	12
1.3 <i>Método diagnóstico de cáncer oral: Gold standard</i>	13
1.4 <i>Biomarcadores en cáncer oral</i>	14
1.5 <i>Citoquinas y Quimioquinas como biomarcadores en cáncer oral</i>	17
1.6.- <i>Métodos de detección de quimioquinas en saliva</i>	20
1.6.1 <i>Métodos inmunológicos</i>	21
1.6.2 <i>Métodos de análisis proteómico</i>	31
1.6.3 <i>Métodos moleculares</i>	34
2. Problema y pregunta de investigación.....	39
3. Objetivos.....	40
3.1 <i>Objetivo general</i>	40
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	40
4. Materiales y Métodos.....	41
5. Resultados	43
5.1. <i>Identificar los protocolos de toma de muestra y procesamiento de saliva para la detección de quimioquinas como potenciales biomarcadores de cáncer oral en saliva</i>	43
5.2. <i>Evaluar las características de los métodos inmunológicos, moleculares y proteicos que permiten la cuantificación de quimioquinas como potenciales biomarcadores de cáncer oral en saliva</i>	50
5.3. <i>Comparación de los métodos que permiten la cuantificación de quimioquinas en saliva</i>	54
6. Discusión.....	56
7. Conclusiones.....	59
8. Referencias.....	61

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURA 1. Esquema representativo de la técnica ELISA	24
FIGURA 2. Esquema representativo de la técnica de citometría de flujo.....	27
FIGURA 3. Esquema representativo de técnica multiplex.....	30
FIGURA 4. Esquema representativo de técnica de espectrometría de masa	33
FIGURA 5. Esquema representativo de técnica RT-qPCR	38
FIGURA 6. Esquema de metodología selección artículos científicos para protocolos de toma de muestra en saliva.	44
FIGURA 7. Esquema de metodología selección artículos científicos para métodos de cuantificación de quimioquinas reportados en la literatura.	51



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. Toma y procesamiento de muestra de estudios reportados por búsqueda de palabras claves.	45
TABLA II. Resumen toma y procesamiento de muestra según método.	47
TABLA III. Dispositivos para toma de muestra de saliva	48
TABLA IV. Comparación de los métodos de detección para quimioquinas reportados en estudios de búsqueda.....	52
TABLA V. Kit comerciales de cuantificación y protocolos reportados	53
TABLA VI. Comparación de métodos de cuantificación.	54
TABLA VII. Ventajas y desventajas de métodos de cuantificación.....	55



RESUMEN

El cáncer oral es un tumor maligno que comprende a todos los tejidos de la cavidad bucal, siendo más frecuente el carcinoma de células escamosas (OSCC). La elevada mortalidad del cáncer de boca se debe a que es un cáncer multifactorial que se diagnostica en etapas tardías por lo que es necesario de nuevas alternativas que subsanen esta y otras falencias de los métodos actuales de detección. Es por esto que la opción de biomarcadores relacionados con la detección temprana de cáncer adquiere gran relevancia como herramienta diagnóstica, más aún cuando la matriz de trabajo es la saliva dando un enfoque menos invasivo a comparación con las actuales tomas de muestra para diagnóstico de cáncer oral. En este contexto, el aumento de niveles de proteínas como las quimioquinas ha sido relacionado con el inicio y avance del OSCC, sin embargo, su uso como biomarcadores de esta patología no ha sido demostrado, ni tampoco la metodología requerida para evaluar su potencial rol como biomarcador temprano. Por consiguiente, el objetivo de este estudio es analizar los métodos inmunológicos, moleculares y proteómicos que permitan cuantificar quimioquinas en saliva como potenciales biomarcadores temprano de cáncer oral. Primero se realizó una búsqueda para identificar estudios que hayan medido quimioquinas en saliva de pacientes con cáncer oral y se analizaron los protocolos de toma de muestra y procesamiento de saliva para la

detección de quimioquinas. Además, se analizaron dispositivos comerciales patentados para la toma de muestra de saliva. Luego se evaluaron los potenciales métodos de detección y cuantificación de quimioquinas según su principio y en base a sus limitaciones técnicas y costos. Finalmente, se realizó una comparación entre las distintas técnicas analizadas para evaluar las principales ventajas y desventajas. Los resultados del presente estudio lograron definir e identificar a los métodos inmunológicos como la mejor alternativa para la medición de quimioquinas en saliva. Además, los resultados destacan la presencia de la IL-8 como la principal quimioquina reportada hasta la fecha en muestras de saliva de pacientes con cáncer oral.

Key words: Cáncer Oral, Quimioquina, Saliva, Biomarcador.



ABSTRACT

Oral cancer is a malignant tumor that involves all tissues of the oral cavity, being squamous cell carcinoma (OSCC) the most frequent. The high mortality of oral cancer is due to the fact that it is a multifactorial cancer that is diagnosed in late stages, so new alternatives are needed to remedy this and other shortcomings of current detection methods. This is why the option of biomarkers related to the early detection of cancer acquires great relevance as a diagnostic tool, even more so when the working matrix is saliva, providing a less invasive approach compared to current sampling for oral cancer diagnosis. In this context, increased levels of proteins such as chemokines have been related to the onset and progression of OSCC, however, their use as biomarkers of this pathology has not been demonstrated, nor has the methodology required to evaluate their potential role as an early biomarker. Therefore, the aim of this study is to analyze immunological, molecular and proteomic methods to quantify chemokines in saliva as potential early biomarkers of oral cancer. First, a search was conducted to identify studies that have measured chemokines in saliva from patients with oral cancer, and saliva sampling and processing protocols for the detection of chemokines were analyzed. In addition, proprietary commercial devices for saliva sampling were analyzed. Then, potential chemokine detection and quantification methods were evaluated according to their principle and based on their technical limitations and costs. Finally, a comparison between the different techniques analyzed was performed to evaluate the main

advantages and disadvantages. The results of the present study were able to define and identify immunological methods as the best alternative for the measurement of chemokines in saliva. In addition, the results highlight the presence of IL-8 as the main chemokine reported to date in saliva samples from patients with oral cancer.

Key words: Oral Cancer, Chemokine, Saliva, Biomarker.



1.INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer oral en Chile y el mundo

El cáncer se puede describir como el proceso de crecimiento y diseminación sin control de células malignas causando un aumento en el volumen de un tejido en particular (OMS, 2018). Esta patología es la segunda causante de muerte a nivel mundial y debido a que su incidencia va en aumento, se intentan buscar diferentes maneras de detectar esta enfermedad en etapas tempranas.

El cáncer oral corresponde al aumento descontrolado de la proliferación celular en tejidos de la cavidad oral, siendo los más frecuentes la lengua, encías, paladar, labios y garganta (Choi *et al.*, 2008). Este tipo de cáncer tiene una de las prevalencias más altas a nivel mundial, donde el carcinoma oral de las células escamosas (OSCC) representa el tipo de neoplasia maligna más frecuente, abarcando 9 de cada 10 casos.

Si bien no se tiene clara la causa del cáncer oral, existen algunas conductas de riesgo que aumentan las probabilidades de sufrir una mutación del material genético, fenómeno que podría eventualmente traducirse en un crecimiento celular

anómalo denominado neoplasia, que en el peor de los casos podría ser diagnosticada como maligna (Siegel *et al.*, 2020). Dentro de estas conductas de riesgo debemos destacar dos principales: el consumo de tabaco y el consumo de alcohol. Las exposiciones repetidas al humo del cigarro pueden causar lesiones neoplásicas a nivel de la mucosa, efecto que se ve potenciado al ser combinado con el consumo de alcohol dado que se genera un efecto sinérgico sobre las lesiones del tracto aero-digestivo. (Xu *et al.*, 2014). En efecto, fumar o mascar tabaco aumenta 7 veces la posibilidad de padecer cáncer oral, beber alcohol 25 veces, mientras que combinar el fumar cigarrillo y beber alcohol podría aumentar el riesgo en 100 veces. Otra conducta que también ha sido asociada a un aumento de las lesiones en los tejidos blandos de la boca, es la costumbre de masticar nuez de Betel, la que a su vez combinada con el tabaco presentan un efecto sinérgico que podría incluso desencadenar leucoplasias. La nuez de Betel es sumamente consumida en Asia, por lo que no es de sorprender que sea el continente con más incidencia de cáncer oral, representando el 64.2% del total de casos diagnosticados el año 2020 (Globocan, 2020).

En lo que respecta a América del sur, durante el año 2020 fueron reportados 14.191 nuevos casos de los 377.713 casos reportados a nivel mundial. El porcentaje de incidencia y mortalidad cada 100.000 habitantes de este cáncer a nivel mundial corresponde a 2% y 1.8% respectivamente, mientras que en Chile estos índices indicaron 0.58% para incidencia y 0.45% para mortalidad. Los casos de América del sur están ligados a múltiples causantes, principalmente al elevado consumo de tabaco, alcohol, carnes rojas y al escaso consumo de frutas (Xu *et al.*, 2014). Otros

factores de riesgo son una mala higiene dental, estar en constante contacto con sustancias químicas nocivas (Asbestos, pesticidas o radiación UV) y presentar infecciones virales por virus papiloma humano (codifica oncoproteínas que destruyen genes supresores de tumores) (Kumar *et. al.*, 2016).

1.2 Mortalidad cáncer oral

La incidencia del cáncer oral es considerada menor en comparación con otros tipos de cáncer más comunes como el cáncer de mama, próstata, estómago y otros. Sin embargo, es uno de los que poseen peor pronóstico ya que el 50% de los pacientes tendrán un pronóstico de vida de no más de 5 años, mientras que el otro 50% se verán afectados con un gran deterioro de sus condiciones de vida, pues se vuelve imposible para ellos cumplir con necesidades básicas como alimentarse y/o beber agua por sí solos. (Ramirez *et al.*, 2015).

Existe una relación directa entre la mortalidad del cáncer oral y la edad de los pacientes. Para aquellos con edades por sobre los 45 años, la tasa de mortalidad incrementa 11 veces en hombres y 9 veces en mujeres. Para pacientes por sobre los 75 años, ambos sexos aumentan la mortalidad en más de 100 veces. Las diferencias de mortalidad observadas entre hombres y mujeres han sido relacionadas a la diferencia en consumo de tabaco y alcohol. Los hombres tienden

a iniciar los hábitos de consumo a una edad más temprana que las mujeres, diferencia que a partir de los 45 años de edad va disminuyendo (Candia *et al.*, 2018). La elevada tasa de mortalidad puede ser asociada a los actuales métodos de detección que, si bien logran diagnosticar esta patología con precisión, lo hacen en etapas de la enfermedad muy avanzadas, cuando en la mayoría de los casos ya existe metástasis. En esta etapa del cáncer los tratamientos anticancerígenos se vuelven ineficaces, y ya sólo se puede optar por cuidados paliativos que se encargan de prevenir y aliviar el sufrimiento de los pacientes para así intentar brindarles una mejor calidad de vida (Mücke *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que en Chile esta patología no forma parte del GES ni tampoco cuenta con un programa específico dentro del programa nacional de cáncer. Lo anterior reduce significativamente las posibilidades que tienen los pacientes a acceder a un diagnóstico oportuno, así como a un tratamiento accesible económicamente y de buena calidad.

1.3 Método diagnóstico de cáncer oral: Gold standard

Actualmente existen diferentes métodos destinados al diagnóstico de la patología en cuestión como lo son la historia clínica sumado a una exhaustiva exploración intra y extraoral, biopsia con cepillo o iluminación fluorescente del tejido (Barvany *et al.*, 2008). Si bien los métodos mencionados permiten diagnosticar inequívocamente cáncer oral, lo hacen en etapa tardía (metástasis) sirviendo sólo para corroborar si

la lesión observada corresponde o no a una neoplasia maligna. Además, la poca preocupación de la población por esta patología que limita los diagnósticos oportunos (Nagao *et. al.*, 2020).

A lo anterior se le suma que estos exámenes deben ser efectuados por personal altamente capacitado que sepa realizar la técnica de tinción fluorescente (y posterior visualización), o extraer la muestra. Dada la alta complejidad, así como el alto costo que tienen estos exámenes, los pacientes se ven en gran dificultad para realizarlos de manera periódica a modo de control (Antón *et al.*, 2015).

1.4 Biomarcadores en cáncer oral



A raíz de lo expuesto anteriormente, nace la necesidad de buscar nuevas metodologías de diagnóstico para lograr detectar de manera oportuna y temprana una posible lesión cancerosa en la cavidad bucal. Una alternativa muy prometedora y que resuena ampliamente en el campo del diagnóstico, es la detección prematura de moléculas que sean indicativas de algún proceso fisiológico o patológico, moléculas bautizadas como “biomarcadores” (Puntmann *et al.*, 2009). Los biomarcadores patológicos son moléculas que se caracterizan por cambiar sus niveles de expresión frente a un proceso y/o estímulo específico en un lugar y momento específico.

Para que un biomarcador tenga un potencial uso en diagnóstico de enfermedades, debe cumplir con ciertos requisitos: presentar una elevada especificidad para una patología en particular, sensible, predictivo para la progresión de la enfermedad, económico, de fácil cuantificación, estable a cualquier hora del día y debe utilizar muestras de fácil obtención (saliva, orina, sangre) (Martin-Ventura *et al.*, 2009).

Asimismo, un biomarcador debe establecer criterios patológicos como fisiológicos, logrando estabilidad frente a estímulos ambientales y permitiendo diferenciar entre un estado frente al otro.

En el caso del cáncer oral la matriz ideal para poder evaluar la presencia o ausencia de algún biomarcador es la saliva, principalmente por estar en constante contacto con el tejido epitelial afectado. En contraste con los métodos de diagnósticos convencionales para el cáncer oral, la obtención de muestra de saliva puede considerarse muy poco invasiva y gracias a que diariamente se secreta una gran cantidad de muestra resulta bastante sencillo extraer un volumen suficiente de muestra (Li *et al.*, 2004).

Sin embargo, a pesar exhibir varias ventajas, la saliva no es un fluido estéril como otros fluidos biológicos usualmente utilizados. Presenta una gran variedad de microorganismos comensales y proteasas que modifican su composición, obligando a mantener la muestra bajo ciertas condiciones una vez extraída (mantener en hielo, agregar inhibidores de proteasas). Además, la saliva puede contener distintos interferentes que podrían afectar la medición de los parámetros de interés, como por ejemplo la presencia de sangre y su alto contenido en transferrina que logra

incrementar los niveles de testosterona salival (Chiappin *et al.*,2007). La ingesta de comidas con elevada acidez también puede actuar como interferente sobre posteriores ensayos de carácter inmunológicos, por lo que los análisis idealmente deberían realizarse en ayunas y con un aseo dental previo (Salimetrics, 2011).

Respecto al cáncer oral, se han postulado varios posibles biomarcadores de OSCC, cada uno de ellos enfocados en diferentes grupos de moléculas o células.

Dentro de ellos podemos destacar 4 tipos:

-Transcriptómicos: Relacionado con la expresión de genes y con ARNm que varía en pacientes con OSCC. Se han observado aumento en múltiples grupos de quimioquinas y citoquinas como IL-8 e IL-1 β , que además demuestran ser altamente sensibles y específicas (Rai *et. al.*, 2018).

-Microbiómicos: Fundamentados en la influencia de algunas especies de bacterias que favorecerían el desarrollo de un cáncer oral. Los géneros más prevalentes dentro del OSCC son *Streptococcus*, *Gemella*, *Rothia*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*. (Pulshalkar *et al.*, 2012).

-Metilómicos: Centrados en la metilación de los genes de tejidos y saliva que predicen la generación de OSCC. Según el grado de metilación será posible establecer un diagnóstico de mayor o menos riesgo para cáncer oral (Viet *et al.*, 2008).

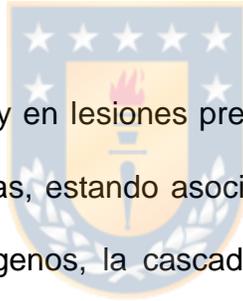
- **Metabolómicos:** Relacionados a los niveles de analitos presentes en saliva y cómo a partir de estos niveles son afectados pacientes con cáncer oral y pacientes sanos. Múltiples metabolitos como pirrolina y valina, se han descrito que varían sus niveles en pacientes sanos y con OSCC (Xia *et al.*, 2013).

De estos grupos, son los biomarcadores de grupos transcriptómicos aquellos que presentan una mayor cantidad de evidencia relacionada al diagnóstico temprano de cáncer oral y actualmente se presentan como la mejor alternativa de biomarcadores temprano de cáncer oral.

1.5 Citoquinas y Quimioquinas como biomarcadores en cáncer oral

Las citoquinas y quimioquinas representan un importante grupo de biomarcadores para el diagnóstico temprano de cáncer oral, clasificándolos dentro del grupo de los biomarcadores transcriptómicos. Estas moléculas corresponden a señales intercelulares que indican el inicio o término de un proceso inmunológico. Dentro de esta categoría destacan numerosas citoquinas tales como IL-1 α , TNF- α , IL-6 y VEGF- α . Si bien la producción de estas moléculas aumenta frente a un proceso de crecimiento tumoral, presentan múltiples falencias desde el punto de vista de especificidad. El aumento de las citoquinas no es exclusivo de neoplasias orales, sino más bien de cualquier proceso de inflamación y/o proliferación excesiva de algún tejido. Se ha descrito anteriormente que los niveles de estas citoquinas encontrados en pacientes con OSCC no son significativamente diferentes a aquellos encontrados en pacientes sanos (Korostoff *et al.*, 2011).

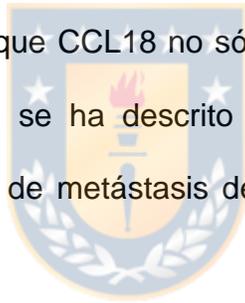
Las quimioquinas, por otra parte, corresponden a proteínas de muy bajo peso molecular y cuya función es bastante similar a la de las citoquinas, pero éstas logran generar un proceso de quimioatracción celular principalmente de células inmunológicas. En la actualidad, las quimioquinas se pueden clasificar en 4 subfamilias: CC, CXC, CX3C y XC diferenciándose en la presencia de residuos de cisteína (Panda *et al.*, 2016). La subfamilia CC abarca la mayor cantidad de quimioquinas, siendo la subfamilia de mayor tamaño. Las quimioquinas también han presentado funciones beneficiosas para las células cancerosas como la evasión de apoptosis, angiogénesis y favorecimiento de su crecimiento.



En etapas temprana de OSCC y en lesiones pre-cancerosas se han reportado el aumento de este grupo de proteínas, estando asociado al ambiente pro-inflamatorio inicial de los procesos cancerígenos, la cascada de señales intercelulares y al aumento en la migración de linfocitos a las zonas comprometidas.

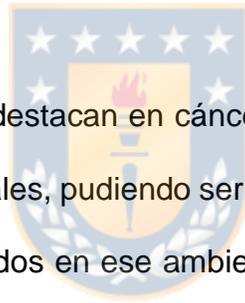
Dentro de las lesiones pre-cancerosas, las leucoplasias orales han reportado un aumento en los niveles de ARN-m de quimioquinas como CCL17, CCL22, CCL1 y CCL18 (Xia *et al.*, 2013). Con respecto a etapas tempranas en OSCC, aumentos en secreción de quimioquinas CCL20, CCL18 y CXCL8/IL-8 pueden justificar la migración de linfocitos y monocitos/macrófagos y el cambio de macrófago M1 a M2 proinflamatorio (Jiang *et al.*, 2020). Sin embargo, todas estas quimioquinas han reportado un aumento en su secreción en etapas tardías de OSCC, dejando como problemática esclarecer la tasa de variación entre los estados pre-cancerosos y

etapas tempranas y tardías de OSCC. Las quimioquinas CCL2, CCL17 y CCL18 son secretadas por células tumorales, macrófagos M2 y por células dendríticas, donde su producción es regulada por las citoquinas IL-4 y TNF- α (Chenivesse, 2018). Dado que los linfocitos Th2 poseen el receptor CCR4 y CCR8 para CCL17 y CCL18, respectivamente, se postula a estas quimioquinas como las encargadas de reclutar a los linfocitos T mediante una respuesta quimiotáctica, como parte de la respuesta inmune en contra de leucoplasias. En condiciones patológicas, la quimioquina CCL18 ha sido relacionada a dos otros distintos receptores: PITPNM3 y GPR30. Estos receptores se relacionan a su vez con la migración de células cancerosas junto a linfocitos T naive y a leucemias linfocíticas agudas (Su *et al.*, 2017). Además, cabe destacar que CCL18 no sólo está presente en procesos de leucoplasias, sino que también se ha descrito que se encuentra ampliamente expresada en sangre en casos de metástasis de cáncer de mama (Chen *et al.*, 2011).



Con respecto a CCL20, es una quimioquina de 70 aminoácidos cuyo receptor CCR6 se encuentra en células dendríticas y se ha demostrado un aumento de secreción de CCL20 en problemas dentales tales como periodontitis. Principalmente sus elevados niveles son consecuencia de LPS de bacterias del género *Fusobacterium*, las cuales también se han relacionado con cáncer oral, sin embargo, no se ha logrado establecer si estas bacterias son el origen de OSCC o viceversa (Ueda *et al.*, 2018). Sus funciones se han descrito como favorecer el reclutamiento de linfocitos infiltrantes tumorales y de células dendríticas inmaduras.

Finalmente, la última quimioquina ampliamente mencionada durante el desarrollo de un OSCC temprano es IL-8 o CXCL8 correspondiente a la subfamilia de quimioquinas CXC. Su aumento en OSCC se ha relacionado con su función como mediador en el proceso de proliferación de células cancerosas (Punyani *et al.*, 2013). Además, se han reportado otras funciones como la quimioatracción de neutrófilos a los sitios de inflamación y favorecimiento la angiogénesis. Esta información permite pensar en CCL18, CCL20 e IL-8 como posibles marcadores de cáncer oral, sin embargo, aún no se ha logrado establecer diferencias de concentración en procesos iniciales y avanzados de dicho cáncer lo que limita el progreso para etapas posteriores.



Las quimioquinas presentadas destacan en cáncer oral por presentar un aumento principalmente en patologías orales, pudiendo ser estas las moléculas más idóneas para percibir los cambios ocurridos en ese ambiente y reflejarlo en sus niveles de secreción.

1.6.- Métodos de detección de quimioquinas en saliva

Las quimioquinas poseen un bajo peso molecular de alrededor de 8-10 kDa (Liu *et al.*, 2019) y una concentración plasmática situada en el rango 0.1-1000 ng/mL (Schutyser *et al.*, 2015).

Para lograr cuantificar quimioquinas, se requiere de un método que permita detectar tanto los cambios en sus niveles fisiológicos, como en sus niveles patológicos pudiendo discriminar entre estos dos niveles independiente del aumento o disminución de ellos. El método que se aplique debe ser, además altamente reproducible, específico, sensible y económicamente conveniente.

A continuación, se señalan 3 tipos de métodos para cuantificar quimioquinas:

1.6.1 Métodos inmunológicos

Estos métodos se basan en la interacción covalente entre un antígeno y un anticuerpo a la cual se le asocia una señal luminiscente pudiendo medir la concentración del antígeno y/o anticuerpo de interés (Alhabbab, 2018). Lo más destacable de estos métodos es la elevada sensibilidad de sus resultados, pudiendo cuantificar concentraciones ínfimas de antígeno y/o anticuerpos.

1.6.1.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima más conocido como ELISA, es una técnica ampliamente utilizada en el laboratorio clínico para cuantificar anticuerpos, antígenos y proteínas presentes en diversos fluidos biológicos.

Como su nombre lo indica, su principio se basa en la utilización de una placa de absorción en donde se fija un anticuerpo o antígeno de captura (dependiendo del

tipo de ELISA) cuya función es interactuar con la molécula a cuantificar e inmovilizarla. La molécula capturada puede venir ligada a una enzima la cual, junto a su sustrato correspondiente, procederá a generar una respuesta luminiscente medible en un espectrofotómetro (Ramirez *et al.*,2010). La señal resultante es proporcional a la concentración del analito de interés.

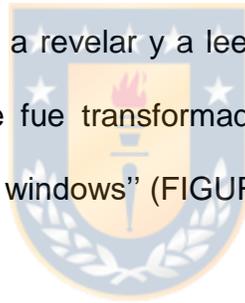
Dependiendo de la molécula de interés, existen diferentes variantes de ELISA que, si bien funcionan bajo el mismo principio de captura y respuesta medible, modifican o añaden ciertos componentes para aumentar la sensibilidad del método y, por ende, obtener mejores resultados.

El ELISA directo funciona fijando el antígeno (proteína) a la placa para posteriormente incubarlo con un anticuerpo anti-antígeno acoplado a una enzima. Si bien este método es sensible, se puede ver afectado por una muestra múltiples antígenos y baja concentración del antígeno de interés. Generalmente es usado para analitos de elevado peso molecular.

El ELISA indirecto funciona de la misma manera que el ELISA directo, pero en este caso se le añade un segundo anticuerpo anti-anticuerpo de antígeno asociado a enzima. Si bien en este caso aumenta la sensibilidad por el segundo anticuerpo añadido, sigue existiendo el mismo problema de múltiples antígenos (Aydin *et al.*, 2015).

En el caso del ELISA sándwich, disminuye el problema anterior de sensibilidad ya que ahora es un anticuerpo el que se fija en la placa y cumple el rol de capturar el antígeno de interés. Luego, un segundo anticuerpo acoplado a enzima se une al mismo antígeno. Aumenta la sensibilidad, pero también aumentan los costos del ensayo.

El protocolo para ELISA sándwich inicia con la obtención de una muestra de suero o saliva (Rodríguez-Pelier *et al.*, 2017). Luego, la muestra se incubó junto a un anticuerpo monoclonal anti HBsAg en una placa de polietileno. Posteriormente, se agregaron las muestras y un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano. Finalmente se procedió a revelar y a leer el complejo colorido formado a 492 nm, lo que posteriormente fue transformado a unidades de concentración mediante el software "ELISA for windows" (FIGURA 1).



Si bien las ventajas y desventajas de esta técnica dependen del tipo de ensayo ELISA se estén realizando, mayoritariamente sus fortalezas y debilidades van a radicar en la calidad de los anticuerpos empleados. Se recomienda el uso de anticuerpos que posean gran especificidad contra el epítotope de su antígeno correspondiente, como es el caso de los anticuerpos monoclonales que presentan una menor reactividad cruzada y mayor sensibilidad a la hora de cuantificar algún antígeno (Merino, 2011). De igual manera, un anticuerpo que no sea correctamente almacenado tenderá a ser menos sensible, desencadenando un peor rendimiento, resultados incorrecto e irreproducibles.

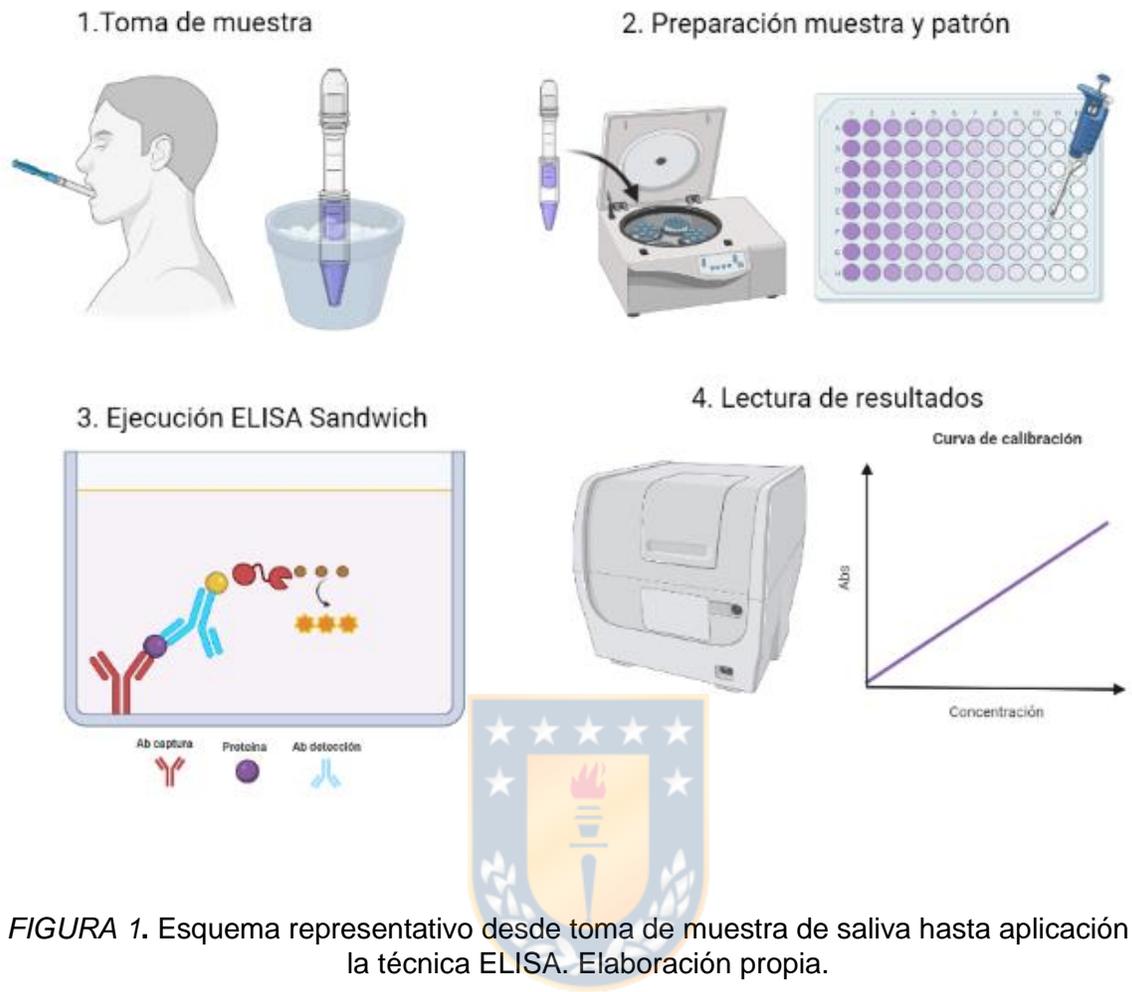


FIGURA 1. Esquema representativo desde toma de muestra de saliva hasta aplicación de la técnica ELISA. Elaboración propia.

1.6.1.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar y cuantificar partículas, usualmente células, de manera individual dentro de una muestra homogénea fluida. La partícula es incubada junto a micro esferas, moléculas de captura (anticuerpos) y moléculas de señal (anticuerpo asociado a fluoróforo) que permiten identificar y cuantificar la célula, proteína o partícula de interés en el mismo momento.

Para llevar a cabo esta técnica se requiere de un citómetro de flujo, el cual está compuesto por 3 sistemas: de fluidos, óptico y electrónico. La unión de estos 3 sistemas permitirá medir múltiples parámetros a la vez en un corto periodo de tiempo.



El sistema de fluidos tiene la función de alinear y generar un paso individual entre las partículas a medir hacia el haz de luz. Esto se debe a la presión que ejerce el buffer en la entrada y salida del sistema, realizando un enfoque hidrodinámico. enfoque hidrodinámico que ejerce el buffer en la entrada y salida del sistema.

El sistema óptico consiste en un complejo de láser que inciden sobre la partícula y dependiendo de su tamaño y granularidad dispersará la luz de una u otra manera. Si el láser que incide la partícula se dispersa frontalmente, hablaremos del parámetro *forward scatter* que indica el tamaño de la partícula. Si el láser que incide la partícula se dispersa lateralmente, hablaremos de *side scatter* que señala la granularidad de la célula o partícula (Pérez-Lara *et al.*, 2019).

Finalmente, el sistema electrónico traduce las señales electrónicas enviadas por el resto del sistema y despendiendo del software expresará una respuesta.

Si bien en la literatura la mayoría de la metodología con citometría de flujo está dirigida al trabajo con células, hay estudios que han dirigido esta técnica a la determinación de proteínas u otras partículas.

Protocolo de literatura

En el siguiente estudio se determinó la concentración de múltiples citoquinas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) en plasma sanguíneo de pacientes con VIH tipo 1 para determinar su nivel de inmunodeficiencia. Las muestras se analizaron mediante el método CBA que consta 3 elementos clave: beads de captura unidos a anticuerpos (captura del analito), ficoeritrina unido a anticuerpo (señal) y el analito (Array, 2008). Al estar estos 3 elementos dentro de una misma solución, generarán una especie de "sandwich" el cual tendrá al analito en el centro y podrá ser cuantificado mediante la señal emitida de la ficoeritrina.

Se reconstituyen los patrones estándar liofilizados y se toma como control negativo el diluyente utilizado. Las muestras de plasma sanguíneo fueron incubadas con los beads y la ficoeritrina del kit BD CBA y posteriormente fueron suspendidas en buffer para ser analizada por el citómetro de flujo (FIGURA 2). Finalmente se utilizó el software BD CBA para obtener la curva de calibrado y con eso las concentraciones de las citoquinas de interés (Aguilar *et al.*, 2015).

La implementación de esta técnica dentro del laboratorio clínico supone un sinnúmero de ventajas desde el punto de vista analítico, sin embargo, no hay que pasar por alto los requerimientos mínimos que conlleva su utilización: Correcto manejo de anticuerpos y uso de la muestra en suspensión.

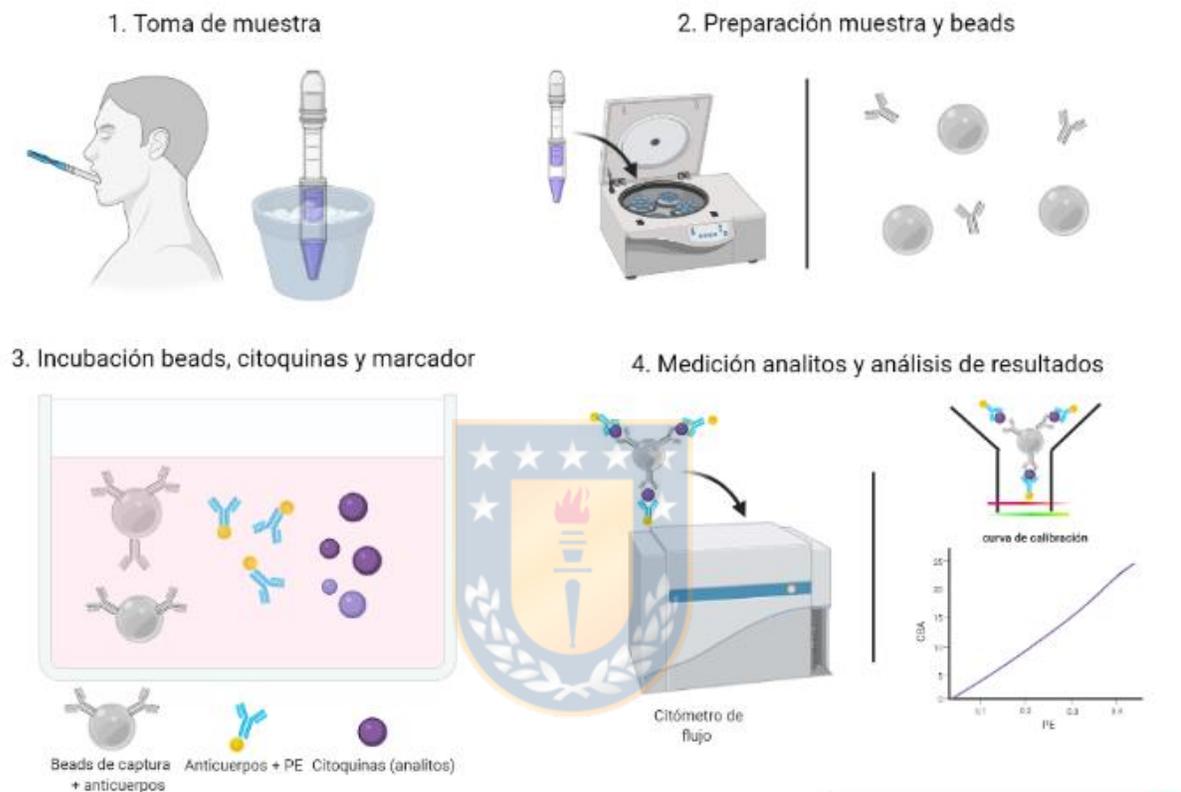


FIGURA 2. Esquema representativo desde toma de muestra de saliva hasta aplicación de la técnica de citometría de flujo. Elaboración propia.

1.6.1.3 Análisis multiplex

La técnica multiplex busca analizar múltiples analitos en un menor tiempo, con menos cantidad de reactivo y de manera más automatizada (Vashist *et al.*, 2018). Al igual que la técnica ELISA sándwich, requiere de un anticuerpo de captura y uno de detección, pero en este caso el anticuerpo de captura está unido a un micro bead único fluorescente y no a la placa del ensayo. Posterior a la unión del microbead al analito, se agrega el anticuerpo biotinilado de detección y junto a la adición de estreptavidina-ficoeritrina, se procede a leer la muestra en un sistema de láser similar a un citómetro de flujo. Cuando el láser impacta la muestra reconocerá el analito mediante la fluorescencia específica del bead y la concentración del analito mediante la señal expresada por la ficoeritrina. La gran ventaja de esta técnica consta de determinar un amplio panel de analitos en un bajo volumen de muestra.



Protocolo de literatura

En el siguiente estudio se logró cuantificar citoquinas (IL-8 e IL-1 β) en saliva como posibles biomarcadores de cáncer oral (FIGURA 3). La muestra utilizada fue diluida e incubada con los microbeads y los anticuerpos biotinilados en el respectivo orden. Posteriormente las muestras resuspendidas en buffer fueron medidas en el analizador Luminex 100® (Arellano-García *et al.*, 2008).

En un segundo ensayo se buscó cuantificar un panel de 13 citoquinas en una muestra de sobrenadante de tejido de bazo de ratón. En este estudio se cuantificaron las citoquinas de la misma manera que el ensayo previamente

mencionado, pero las muestras fueron leídas en un citómetro de flujo. Se destaca la imprescindible agitación de la muestra con los microbeads y la correcta reconstitución de los estándares (Lehmann *et al.*, 2017).

Las ventajas de esta técnica radican en la utilización de micro esferas por cada analito presente en la muestra, pudiendo entregar hasta 100 beads por analito para así ampliar número de ensayos para la misma cantidad de muestra.



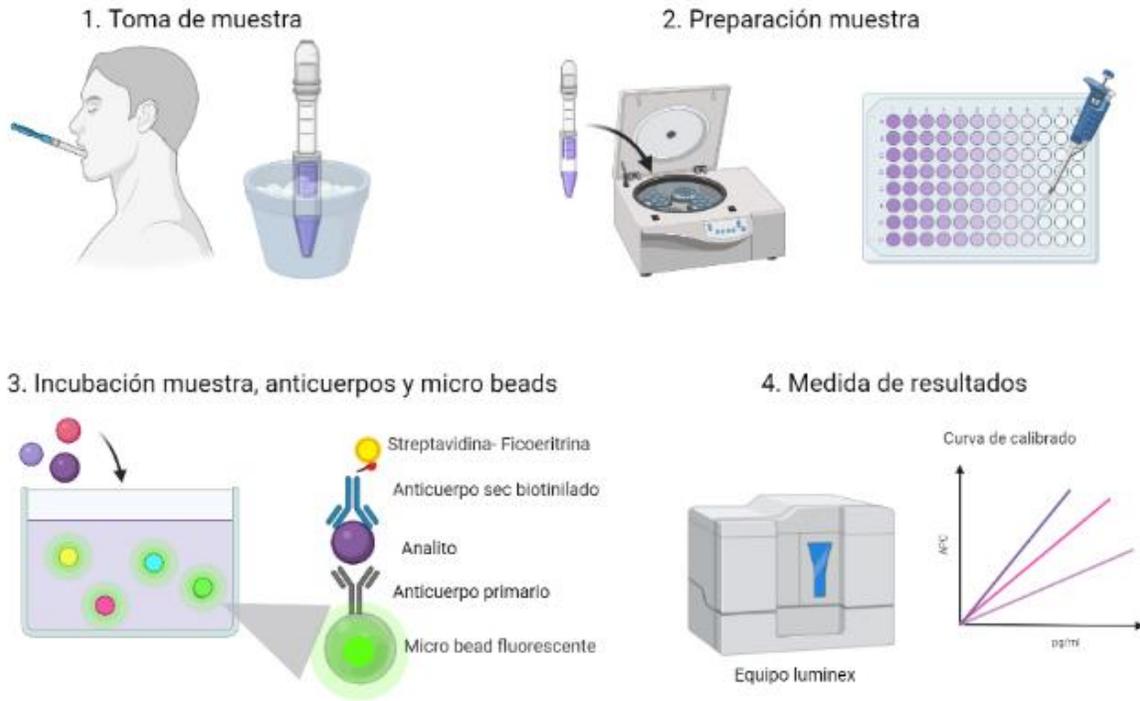


FIGURA 3. Esquema representativo desde toma de muestra de saliva hasta aplicación de la técnica multiplex. Elaboración propia.

1.6.2- Métodos de análisis proteómico

La proteómica es la ciencia que analiza el plano completo de proteínas expresadas en un organismo en un periodo determinado, generando un dinamismo por la variación en la expresión de las misma en distintos momentos. Los métodos que nacen de esta ciencia permiten realizar un análisis más completo desde el punto de vista proteico, pudiendo caracterizar un gran número de proteínas dentro de un complejo pool de una muestra en un menor periodo de tiempo y con una menor cantidad de muestra.

Espectrometría de masas

Corresponde a una técnica altamente eficiente capaz de detectar y cuantificar múltiples analitos en muestras de interés clínico como lo son plasma sanguíneo, orina y saliva.

El principio de la espectrometría de masas se basa en la generación de iones a partir de una muestra, que posteriormente serán identificados según su relación masa/carga (m/z) (Andrews *et al.*, 2012).

Para llevar a cabo esta técnica se requiere de un espectrómetro de masas, el cual varía en su estructura dependiendo el tipo de ionización que use, la matriz de la muestra, etc (Clarke *et al.*, 2020). Sin embargo, cada espectrómetro de masas debe contar con un general de componentes pudiendo nombrar los 5 principales: (1)

Fuente ionizadora, (2) Sistema o bomba de vacío, (3) Analizador de masas, (4) Detector y (5) Procesador de señal.

La identificación y/o cuantificación del analito comienza con la introducción de la muestra previamente preparada a la fuente ionizadora cuya finalidad es generar los iones que reconocerá el detector. Existen múltiples tipos de fuentes ionizantes desde la ionización por electrones hasta la ionización por electrospray. Lo que todas estas fuentes deben de cumplir es generar una fase gaseosa con los iones para que luego pueda entrar en el analizador de masas. Una vez generada la fase gaseosa, los iones son llevados al analizador mediante un sistema de vacío que impide que éstos colisionen entre sí y permite eliminar las burbujas de aire presente en el sistema.



Una vez en el analizador de masas, se dividirán los iones por su relación masa/carga y los moviliza hacia el detector, el cual los sensorará y convertirá su carga en corriente. Finalmente, la corriente producida llegará al procesador de señal interpretándola en un espectro de masas que compara la abundancia relativa del ión contra la relación m/z .

Las ventajas de esta técnica son principalmente la capacidad de entregar un análisis cualitativo y cuantitativo al mismo tiempo dentro de un mismo ensayo y para la misma muestra, a su vez, esta técnica es muy dependiente de la matriz en el que se encuentre el analito, siendo fundamental una matriz ionizable (Díaz, 2017).

Protocolo de literatura

En el siguiente experimento de cuantificaron proteínas plasmáticas mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (FIGURA 4) (Kramer, 2015). Para poder trabajar con este tipo de muestra fue necesario añadir una etapa de digestión proteolítica posterior al tratamiento de la misma, para la obtención de péptidos de menor tamaño y ionización más simple. El espectrómetro lleva acoplado una fuente ionizadora en spray ideal para cromatografía en fase líquida y como gas de colisión se utilizó argón. Una vez detectados los iones fragmentados y completos, se buscó similitud en base de datos proteica Uniprot. La cuantificación se llevó a cabo sin utilizar marcadores (label free), en cambio, se utilizó la sumatoria de las intensidades de los péptidos más abundantes de cada proteína en particular dividido por la sumatoria de las intensidades de los péptidos más abundantes de un estándar para cada proteína.

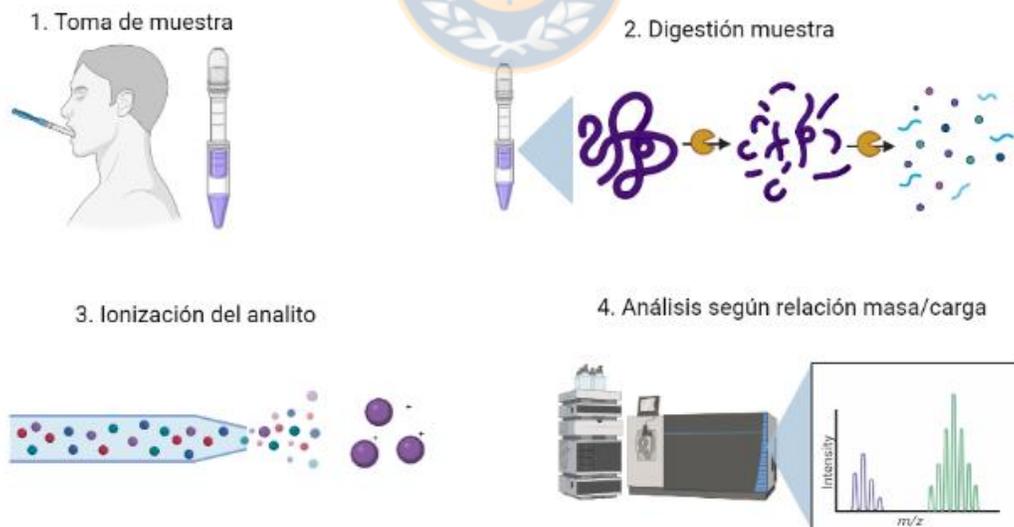


FIGURA 4. Esquema representativo desde toma de muestra de saliva hasta aplicación de de técnica de espectrometría de masa. Elaboración propia.

1.6.3 Métodos moleculares

A diferencia de las metodologías anteriores, este método no se basa en medir la cantidad de proteínas en sí, si no se centra en la expresión de los genes que codificarán una determinada proteína. Gracias a que se basan en la genética logran entregar un enfoque integral del conocimiento proteico, desde su síntesis.

RT-qPCR

La técnica de la reacción de la polimerasa en cadena, o bien, técnica PCR ha sido ampliamente utilizada por su gran especificidad a lo largo de los años, abriendo un gran campo dentro del diagnóstico molecular. Hoy en día una de sus variantes, la RT-PCR ha cumplido un rol fundamental dentro del diagnóstico de COVID-19 y con esto generando una mayor accesibilidad a esta técnica que pocos laboratorios poseían.

El principio de esta técnica se basa en la amplificación de una secuencia específica de ADN o ARN con el objetivo de hacerlo detectable y de ser posible, cuantificarlo. La calidad del resultado de esta técnica se va a deber de la pureza del material genético, necesitando la esterilidad máxima en cada etapa.

Debido a la gran utilidad de esta técnica, múltiples variables de la PCR se han implementado como lo son la qPCR, la RT-PCR y RT-qPCR. Esta última cumple con la particularidad de poder cuantificar ARN conforme la reacción avanza y se amplifica el material genético.

Dentro del proceso podemos dividir la RT-qPCR en dos grandes etapas: 1) La retrotranscripción de la molécula de ARN a ADNc y 2) la qPCR. Es la primera etapa la que presenta la menor reproducibilidad debido a la falta de estandarización en la retrotranscripción, no así la qPCR (Tamay *et al.*, 2013).

El protocolo de una RT-qPCR inicia con la extracción del material genético de la muestra (ARN total o mensajero) y su posterior refrigeración a -70°C para evitar que se degrade. Al utilizar ARN como material de partida es altamente probable una contaminación en la muestra, por lo que todo el material utilizado tanto reactivos como instrumentos, deben estar estériles. La molécula de ARN tiende a formar estructuras secundarias con mayor facilidad por lo que iniciar con un golpe de calor debe considerarse dentro del protocolo de trabajo previamente a la etapa de qPCR. Una vez obtenido el ARN total o mensajero de la muestra, se seguirá con la etapa de retro transcripción. Esta etapa es fundamental para la qPCR puesto que la enzima polimerasa que copia la secuencia genética, lo hace en la hebra de ADN y no ARN. Por esto se requiere de una retro transcriptasa que retro-transcriba la molécula de ARN a una molécula de ADN complementario (ADNc) a la secuencia de ARN de la muestra. Este ADNc será el templado a utilizar en la amplificación.

Una vez obtenido el templado de ADNc comienza la segunda etapa correspondiente a la qPCR. Para esto se deben añadir los reactivos de una típica PCR, como lo son ADN polimerasa, nucleótidos, buffers y el reportero fluorescente específico o no específico. Una vez agregados los reactivos y los partidores, se inicia la fase de denaturación con un gran aumento de temperatura (95°C) con el objetivo de separar las hebras del templado de ADNc rompiendo los enlaces hidrógeno entre los nucleótidos. Luego, en la fase hibridación (50-60°C) los partidores se alinean con su secuencia complementaria de cada una de las hebras de ADN templado separadas y finalmente en la fase de elongación en la cual los primers y templado junto con la enzima polimerasa replicará la hebra de ADN a una temperatura específica de 72°C.



Para llevar a cabo una RT-qPCR y una qPCR se requiere de un termociclador especial para qPCR, la cual, además de realizar las funciones de un termociclador para PCR convencional posee un software que permite analizar el avance de la reacción (curva de amplificación) y entregar información acerca de la especificidad de la fluorescencia (curva de melting).

La cuantificación en RT-qPCR es posible mediante el uso de reporteros fluorescentes (Nolan *et al.*, 2006) que emiten una señal que posteriormente es captada por el termociclador y permiten registrar el avance de la reacción conforme se va amplificando la secuencia de interés.

Protocolo de literatura

Se describirá el protocolo de SYBR Green 1, una molécula fluorescente no específica que emite señal al replicarse la molécula de ADN (FIGURA 5). El protocolo inicia con el ARN templado para la síntesis de ADNc, para lo que se requiere de “verso mix” que contiene la retro transcriptasa e inhibidores de la degradación de ARN. La temperatura óptima para esta enzima es dentro del rango 42-57°C. Una vez obtenido el templado de ADNc, se debe agregar “SYBR qPCR mix” que contiene la ADN polimerasa, nucleótidos, buffers y SYBR Green necesarios para ejecutar la reacción. El protocolo para esta RT-qPCR permite agregar todos los reactivos, desde la retro transcripción hasta la qPCR sin la necesidad de abrir el tubo de reacción para agregar algún reactivo extra, disminuyendo la capacidad de contaminar la muestra y también aumentado la reproducibilidad de la técnica. Finalizada la qPCR, se puede cuantificar la cantidad de ADN/ARN según la relación señal emitida y cantidad de copias replicadas por ciclo de PCR.

Aunque el método de SYBR Green permite detectar los productos amplificados de la reacción, no es un método específico pudiendo reconocer cualquier molécula de ADN doble hebra y unirse a ella. Lo anterior puede verificarse en la curva de melting, cuyo fin entregar información de la especificidad de la técnica pudiendo indicar si se formaron productos no deseados o bien, que no hubo uniones indeseadas y únicamente se amplificó un solo producto.

Existen otros métodos que, diferencia del método SYBR Green, presentan una gran especificidad como lo son las sondas TaqMan que, al hibridar exclusivamente con

2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Hay múltiples métodos que permiten detectar proteínas en diferentes matrices biológicas (plasma, suero, orina), sin embargo, es incierto que estos métodos puedan cuantificar quimioquinas en estas muestras o que puedan hacerlo usando matriz de saliva.

Se desconocen las ventajas y desventajas de los métodos que permitan cuantificar quimioquinas en saliva para ser utilizado como potencial biomarcador temprano de cáncer oral.



¿Cuál es el método más apropiado para la cuantificación de quimioquinas en muestras de saliva de individuos con sospecha de cáncer oral?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar los métodos inmunológicos, moleculares y proteómicos que permitan cuantificar quimioquinas en saliva como potenciales biomarcadores temprano de cáncer oral.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar los protocolos de toma de muestra y procesamiento de saliva para la detección de quimioquinas como potenciales biomarcadores de cáncer oral en saliva.
2. Evaluar las características de los métodos inmunológicos, moleculares y proteómicos que permiten la cuantificación de quimioquinas como potenciales biomarcadores de cáncer oral en saliva.
3. Comparar los métodos que permiten la cuantificación de quimioquinas en saliva.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica de documentos científicos para cumplir con el objetivo de la investigación, tales como, artículos científicos y revisiones bibliográficas.

El motor principal de búsqueda utilizado fue Google Académico, en el cual se logró obtener los documentos citados en esta revisión. La principal base de datos consultada fue PubMed/ncbi, donde se pudo filtrar por año de publicación y uso de palabras claves.

Con respecto a las palabras claves utilizadas para limitar el criterio de la búsqueda se utilizaron términos como "Saliva", "Biomarker", "Oral Cancer" y "Chemokine". Además, para agregar términos de búsqueda se usó la conjunción "AND" añadida automáticamente por la misma base de datos. La totalidad de los documentos reportados corresponden a idioma inglés.

Criterios de exclusión: Artículos no relacionados con el objetivo de investigación, artículos que no especifican metodología de toma de muestra, artículos en los cuales técnicas utilizadas no sean del interés de la investigación.

Criterios de inclusión: Artículos que describan la toma de muestra de saliva en pacientes con cáncer oral o sospecha de cáncer oral, artículos que incluyan citoquinas/quimioquinas en su investigación.



5. RESULTADOS

5.1. Identificar los protocolos de toma de muestra y procesamiento de saliva para la detección de quimioquinas como potenciales biomarcadores de cáncer oral en saliva.

Para la búsqueda de protocolos de toma de muestra de saliva en pacientes con sospecha de cáncer oral o con cáncer oral propiamente tal, se utilizó la base de datos de PubMed/NCBI (Esquema 1). En ella se estableció un filtro de 6 años de antigüedad (2015-2021) y junto a la búsqueda avanzada con palabras claves (*Saliva, biomarker y oral cancer*) se encontraron 364 artículos. De acuerdo a nuestro objetivo de estudio, se agregó la palabra "*Chemokine*" en el campo de búsqueda y los resultados se redujeron a 16. Finalmente, se descartaron aquellos artículos que cumplían con los criterios de exclusión mencionados anteriormente, resultando 10 en artículos para su análisis.

De los artículos seleccionados se extrajo la información de los grupos de estudio (pacientes), toma de muestra de saliva y la(s) molécula(s) determinadas destacando las quimioquinas en color azul (FIGURA 6).

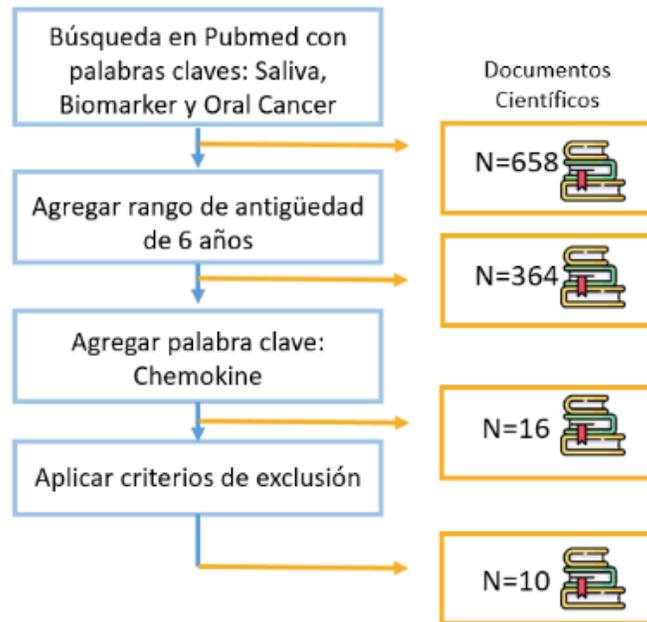


FIGURA 6. Esquema de metodología selección artículos científicos para protocolos de toma de muestra en saliva.

De los 10 resultados obtenidos se describe en la Tabla I los grupos de estudio asociados al cáncer oral, los protocolos de toma de muestra y las moléculas medidas asociadas a la presencia de quimioquinas. Los resultados muestran que la mayoría de los estudios restringe la alimentación y lavado de dientes aproximadamente 1 hora antes de la toma de muestra. Algunos estudios reportan la toma de saliva sin estimulación, mientras que otros utilizan dispositivos que promueven la estimulación. Los volúmenes varían de acuerdo a cada estudio. Posterior a la toma de muestra se establece una centrifugación y posterior almacenamiento a -80C.

TABLA I : Toma y procesamiento de muestra de estudios reportados por búsqueda de palabras claves.

Grupo de estudio	Toma muestra	Molécula(s)	Referencia
<p>2 grupos: -25 pacientes sanos -24 pacientes con OSCC</p>	<p>2 mL de saliva completa sin estimulación. Se toma entre 9 AM y 11 AM. Se prohibió la acción de beber, masticar, comer y fumar durante al menos una hora antes de la toma de muestra. Antes de la toma de la muestra se pidió un enjuague previo. Se utilizó dispositivo Orange DNA</p>	<p>IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-γ y TNF-α.</p>	<p>Rai <i>et. al.</i>, 2021</p>
<p>3 grupos: -35 pacientes con lesiones orales posiblemente malignas -35 pacientes con OSCC no tratado -35 pacientes sanos.</p>	<p>Saliva recolectada con cabeza boca abajo y sin estimulación, con tubo de recolección para recibir la muestra. Muestras refrigeradas a -20°C. Posteriormente fueron centrifugadas durante 15 minutos a 4500 rpm a 4°C. Se usa sobrenadante de saliva para la detección.</p>	<p>IL-6 e IL-8</p>	<p>Khyani <i>et. al.</i>, 2017</p>
<p>2 grupos: -30 pacientes sanos -30 pacientes con factores de riesgo cáncer oral (naswar).</p>	<p>Saliva matutina completa sin estimulación. Recolección con dispositivo PureoSal™</p>	<p>IL-8</p>	<p>Sohail <i>et. al.</i>, 2020</p>
<p>5 grupos: -18 pacientes con OSCC -21 pacientes con periodontitis -21 pacientes con factores de riesgo y lesiones en la boca -20 pacientes con factores de riesgo, pero sin lesiones bucales -21 pacientes sanos</p>	<p>Muestra de saliva tomada entre 6 y 12 AM. Se toman 8 mL en forma de escupo. La saliva se mantuvo en hielo. Se prohibió a sujetos de estudios no comer, beber o realizar limpieza de boca antes de la recolección. Previo a la toma, se pidió aseo con agua. La muestra se centrifugó por 20 minutos a 4°C. Sobrenadante separado de pellet</p>	<p>IL-6 e IL-8</p>	<p>Cheng <i>et. al.</i>, 2015</p>
<p>5 grupos -31 pacientes con OSCC etapa 1-2 -27 pacientes con OSCC etapa 3-4</p>	<p>Se recolectó saliva de mañana sin estimulación, con ayuno de 1 hora antes. Saliva fue almacenada a -80°C.</p>	<p>IL-1β e IL-8</p>	<p>Sighn <i>et. al.</i>, 2020</p>

-30 pacientes con lesiones pre-cancerosas -29 pacientes post-tratamiento para cáncer -42 pacientes sanos	Muestras se centrifugan previo a su utilización. Se usó dispositivo Salivette cortisol.		
3 grupos: -15 pacientes con OSCC en etapa 1-2. -15 pacientes con lesiones pre cancerosas. -15 pacientes sanos .	Recolección matutina de 10 mL de saliva completa sin estimulación. Se escupió la saliva en un tubo estéril. Se prohibió comer y cepillado dental antes de la toma de muestra. La saliva fue centrifugada y el sobrenadante filtrado y almacenado a -80°C.	Chemerin y MMP-9	Ghallab <i>et. al.</i> , 2017
2 grupos: -21 pacientes con OSCC etapa 1-2 -20 pacientes sanos	Muestra saliva completa y sin estimulación, con tubo de recolección para recibir la muestra. Se prohibió comer y cepillarse. Posteriormente fueron centrifugadas y el sobrenadante almacenado a -80°C.	IL-6, IL-8 , IFN- γ	Val <i>et. al.</i> , 2019
3 grupos: -60 pacientes con OSCC -60 pacientes con lesiones pre cancerosas -60 pacientes sanos	Muestra saliva completa sin estimulación. Se prohibió comer, beber, fumar y realizarse higiene oral. Saliva centrifugada y sobrenadante reservado a -80°C.	IL-8 e IL-1 β	Gleber-Netto <i>et. al.</i> , 2016
2 grupos -35 pacientes con cáncer del pulmón -35 pacientes sanos	Muestra saliva sin estimulación. Tubo se llenó pasivamente durante 1 minuto, recolectando 150 μ L. Se prohibió comer y masticar 30 minutos antes la toma de saliva. Saliva completa reservada a -80°C. Se utiliza sobrenadante	IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8 , IL-10 y CCL11	Koizumi <i>et. al.</i> , 2018
3 grupos: -48 pacientes con OSCC -35 pacientes con factores de riesgo -50 pacientes sanos	Saliva ADN: 2 mL saliva al recién despertar, previo a ingesta de comida y líquidos. Recolección por escupo. Saliva ARN: Recolección en la mañana. Se prohíbe comer, beber 1 hora antes de la toma de muestra. Se	CCL20	Ueda <i>et. al.</i> , 2021

	toman 2mL bajo el método de escupo.		
--	-------------------------------------	--	--

****En negrita se demarcan las proteínas con efectos quimioattractantes.**

Con respecto a la toma de muestra de acuerdo a los métodos establecidos se presenta la Tabla II.

TABLA II: Resumen toma y procesamiento de muestra según método.

Método	Toma de muestra	Procesamiento de muestra	Autor
Inmunológico	Se prohíbe comer, beber o aseo bucal 1 hora antes de la toma de saliva. Enjuagar con 5 mL de agua desionizada y esperar 5 minutos. Escupir en tubo de recolección hasta recolectar 2-3 mL de muestra. Mantener muestra a -20°C.	Centrifugar saliva a 4°C y obtener sobrenadante. Mantener a -20°C para ELISA y -80°C para multiplex y citometría de flujo junto con diluyente de suero de albúmina.	Fraga <i>et. al.</i> , 2021
Proteómico (MS)	Se prohíbe comer, beber o aseo bucal 30 minutos antes de la toma de saliva. Enjuagar con 5 mL de agua desionizada y esperar 5 minutos. Escupir dentro de tubo de recolección el volumen de saliva sin estimulación hasta 10 minutos. Mantener tubo de recolección en hielo.	Centrifugar muestra inmediatamente a 4°C. Descartar pellet y utilizar sobrenadante. Agregar solución de extracción de proteínas y tripsina para digestión proteica. Se trabaja con sobrenadante directamente.	Fraga <i>et. al.</i> , 2021
Molecular (RT-qPCR)	Se prohíbe comer, beber o aseo bucal 1 hora antes de la toma de saliva. Escupir dentro de tubo de recolección durante 2 minutos, evitando escupir burbujas.	Agregar estabilizador de ARN y mantener a temperatura ambiente o centrifugar a 4°C y reservar sobrenadante a -80°C. Se extrae ARN directamente de sobrenadante.	Henson <i>et. al.</i> , 2010

Finalmente, dentro de las posibilidades presentes en la toma de muestra, se destaca el uso de dispositivos que presentan sus propios protocolos de toma de muestra y procesamiento descritos en la Tabla III.

TABLA III: Dispositivos para toma de muestra de saliva.

Dispositivo	Volumen	Método más apropiado	Aplicación	Características
Quantisal	1 mL (+/- 10%)	Inmunológico, proteómico	Gotero colector se aplica debajo de la lengua previa estimulación de saliva por movimiento lingual. Gotero se retira luego de 10 minutos o hasta que llegue a su límite azul. Finalmente la saliva se deposita en un segundo tubo para transporte y almacenaje.	-especializado en detectar drogas. -beber y comer prohibido 10 minutos antes de la toma.
Salivette	1.1 (±0.3) mL	Inmunológico, proteómico	Contiene una tórula de algodón la cual se introduce durante 60 segundos en la boca y se remueve con la lengua. Luego la tórula se devuelve al tubo y se centrifugar para obtener sólo la saliva sin restos de comida o interferentes.	-tórula de algodón posee ácido cítrico para estimular secreción de saliva. -especializado para la determinación de cortisol en saliva. -no se mencionan prohibiciones de comer y/o beber previa a la recolección.
UltraSal-2	2 mL en 3 minutos (24 mL max)	Inmunológico, proteómico	Consta de 2 tubos y 1 dispositivo insertable en la boca para recibir y distribuir la saliva en ambos tubos. Es necesario inclinar la cabeza hacia abajo para favorecer la recolección.	-el segundo tubo cumple la función de muestra de emergencia, en caso de querer repetir un examen. -no especifica en interferentes y/o requisitos previos antes de la toma de muestra.
RNAProSAL	1 mL	Proteómico, molecular	Posee un tubo absorbente que se dispone en la boca durante 1-3 minutos. Posteriormente, el tubo se comprime en un	-no beber, fumar, comer o realizarse higiene oral hasta 10 minutos antes -especializado en muestra de ARN

			segundo tubo colector y este desemboca la saliva en 2 tubos tamaño eppendorf.	salival y proteínas salivales
Pure SAL	4 mL	Proteómico, molecular	Posee un tubo absorbente que se dispone en la boca por 1-3 minutos. Posteriormente, el tubo se comprime en segundo tubo colector y este desemboca la saliva en un tubo tamaño eppendorf.	-logra obtener ADN,ARN y proteínas libres de células, especial para estudios genéticos -no beber, fumar, comer o realizarse higiene oral hasta 10 minutos antes
Oragene Dx	1-4 mL	Molecular	Debe escupirse en el tubo hasta la línea delimitada (2mL), pudiendo completar más o menos de la línea. Evitar escupir saliva con muchas burbujas. Una vez lleno, tapar y agitar durante 5 segundos el tubo.	-no beber, fumar, comer, masticar goma o realizarse higiene oral hasta 30 minutos antes. -permite obtener muestras de ADN salival para análisis genómicos



5.2 Evaluar las características de los métodos inmunológicos, moleculares y proteómicos que permiten la cuantificación de quimioquinas como potenciales biomarcadores de cáncer oral en saliva.

Para la búsqueda de métodos de cuantificación para quimioquinas en pacientes con sospecha de cáncer oral o con cáncer oral propiamente tal, se utilizó la base de datos de PubMed/ncbi (FIGURA 7). En ella se estableció un filtro de 6 años de antigüedad (2015-2021) y junto a la búsqueda avanzada con palabras claves (Saliva, biomarker y oral cáncer) se encontraron 364 artículos. Para restringir aún más el campo de búsqueda se agregó la palabra “Chemokine” y los resultados se redujeron a 16 artículos. Finalmente, se descartaron aquellos artículos que posean los criterios de exclusión mencionados anteriormente. Sólo 10 artículos resultan de la búsqueda.



De los artículos seleccionados se extrajo: Método, técnica y kit de cuantificación utilizada, resultado de la expresión de la(s) molécula(s) en cáncer oral o sospecha de cáncer oral y el límite de detección del kit utilizado.

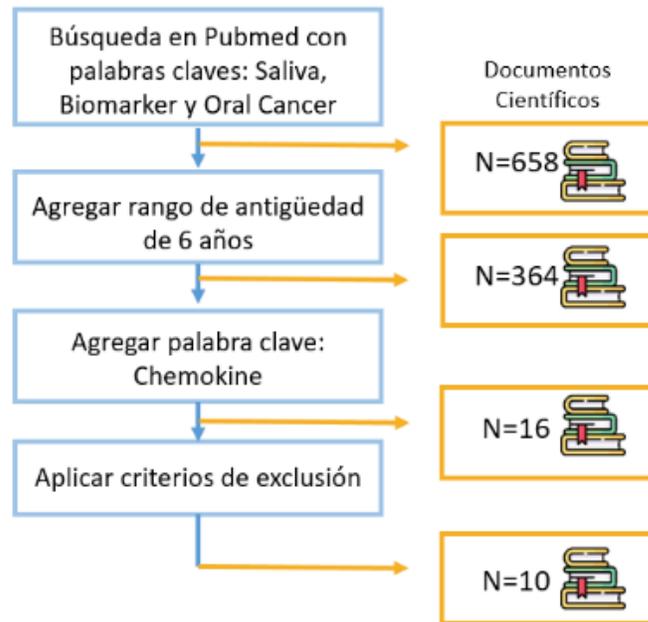


FIGURA 7. Esquema de metodología selección artículos científicos para métodos de cuantificación de quimioquinas reportados en la literatura.

En la tabla IV se expone la información técnica extraída de los 10 resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica. Se informa el método, técnica y kit utilizado en cada estudio en particular, además de informar el resultado en cáncer oral de las moléculas medidas y los límites de detección de los kits utilizados informados por el proveedor. Los resultados muestran un aumento de las quimioquinas CCL20, CCL11 y principalmente IL-8. Con respecto a los límites de detección informados para las quimioquinas medidas, el promedio para éstas es 1,95 pg/mL y al ser IL-8 la quimioquina mayormente mencionada y medida, se informa un promedio de 2,35 pg/mL. De los 10 estudios extraídos, 9 utilizaron métodos inmunológicos para la cuantificación de quimioquinas siendo 6 de ellos técnica ELISA y los 3 restantes,

técnica de análisis multiplex. Se informa 1 método de cuantificación molecular de quimioquinas correspondiente a la técnica RT-qPCR. Dentro de los 10 estudios no se mencionan y/o utilizan métodos proteómicos para cuantificación de quimioquinas

TABLA IV. Comparación de los métodos de detección para quimioquinas reportados en estudios de búsqueda

Método, técnica y kit	Resultado en cáncer	Límite detección	Autor
Inmunológico: Multiplex Bio-Plex™ Pro Human Cytokine 8-plex Assay	↑ IL-6, IL-8, IFN-γ, TNF-α = IL-2, IL-4, IL-10	IL-2: 1.6 pg/mL IL-4: 0.7 pg/mL IL-6: 2.6 pg/mL IL-8: 1.0 pg/mL IL-10: 0.3 pg/mL IFN-γ: 6.4 pg/mL TNF-α: 6.0 pg/mL	Rai <i>et. al.</i> , 2021
Inmunológico: ELISA BDBioscience™ human s IL-6 and IL-8/nap-1 instant ELISA	↑ IL-8 = IL-6	IL-6: 0.9 pg/mL IL-8: 1.3 pg/mL	Khyani <i>et. al.</i> , 2017
Inmunológico: ELISA Human IL-6-8 /Interleukin-6-8/CXCL8 ELISA Kit PicoKine™	↑ IL-8	IL-8: 1.0 pg/mL	Sohail <i>et. al.</i> , 2020
Inmunológico: ELISA Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA R&D systems™	↑ IL-6 ↑ IL-8	IL-6: 0.7 pg/mL IL-8: 3.5 pg/mL	Cheng <i>et. al.</i> , 2015
Inmunológico: ELISA Human IL-1β -8 ELISA Kit Elabscience®	↑ IL-1β ↑ IL-8	IL-1β: 4.69 pg/mL IL-8: 4.69 pg/mL	Sighn <i>et. al.</i> , 2020
Inmunológico: ELISA Human MMP-9 ELISA R&D systems™	↑ MMP-9	MMP-9: 0.3 pg/mL	Ghallab <i>et. al.</i> , 2017
Inmunológico: Multiplex Bio-Plex™ Pro Human Cytokine, Chemokine and Growth factor assays	↑ IL-6 ↑ IL-8 ↓ IFN-γ	IL-6: 2.6 pg/mL IL-8: 1.0 pg/mL IFN-γ: 6.4 pg/mL	Val <i>et. al.</i> , 2019
Inmunológico: ELISA Human IL-1β-8 ELISA kit Thermo Fisher Scientific	↑ IL-1β ↑ IL-8	IL-1β: 3.9 pg/mL IL-8: 5.0 pg/mL	Gleber-Netto <i>et. al.</i> , 2016
Inmunológico: Multiplex Bio-Plex™ Pro Human Chemokine panel	= IL-1β = IL-6 ↑ IL-7 ↑ CCL11 ↑ IL-8 ↑ IL-10 (varía mucho en la mañana)	IL-1β: 0.6 pg/mL IL-6: 2.6 pg/mL IL-7: 1.1 pg/mL IL-8: 1.0 pg/mL IL-10: 0.3 pg/mL CCL11: 0.7 pg/mL	Koizumi <i>et. al.</i> , 2018

Molecular: RT-qPCR TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus)	↑ CCL20	< 100 copias	Ueda <i>et. al.</i> ,2021
-----------------------------------------------------------------------	---------	--------------	---------------------------

A continuación, en la tabla V se presentan los kits comerciales de cuantificación y/o protocolos reportados para la quimioquina mayormente mencionada en los estudios previos en cáncer oral, IL-8.

TABLA V. Kit comerciales de cuantificación y protocolos reportados

Método/técnica	Fabricante o autores	Nombre kit o publicación con protocolo reportado	Sensibilidad	Rango detección	Tipo de muestra
Inmunológico/ ELISA	Thermo Fisher Scientific	Human IL-8 ELISA Kit	< 5.0 pg/mL	15.6-1000 pg/mL	Sobrenadante, plasma, suero
Inmunológico/ ELISA	Wuhan Fine Biotech Co	Human IL-8 ELISA kit	< 18.75 pg/mL	31.25 - 2000 pg/mL	Sobrenadante, plasma, suero, tejidos homogenizados
Inmunológico/ CBA	BD	BD Human Inflammatory Cytokine Bead Array	Sin información	Sin información	Sin información
Inmunológico/ Multiplex	Bio Rad	Bio-Plex Pro™ Human Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays	1.0 pg/mL	1.9 – 26.403 pg/mL	Sobrenadante, plasma, suero
Proteómico/MS	Pelin Esmir Emirbayer y Monika Pischetsrieder	Targeted label-free quantification of interleukin-8 in PMA-activated U937 cell secretome by nanoLC-ESI-MS/MS-sSRM	Sin información	27.4 ng/mL to 398.5 ng/mL	Secretoma
Molecular/ RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific	TaqMan® Gene Expression Assays for IL-8 primer	Sin información	Sin información	mRNA
Molecular/ RT-qPCR	R&D	Human IL-8 Primer Pair	Sin información	Sin información	mRNA

5.3. Comparación de los métodos que permiten la cuantificación de quimioquinas en saliva

Anteriormente se describieron las características de cada método, centrándose en su utilidad, principio, aplicaciones y ventajas. A continuación, en la Tabla VI se agruparon los 3 métodos analizados y se ordenaron de manera comparativa centrándose en sus principales cualidades, sin embargo, a la fecha no existe ninguna medición validada clínicamente. En la Tabla VII se comparan los métodos de acuerdo a sus ventajas y desventajas.

TABLA VI. **Comparación de métodos de cuantificación.**

Tipo método	Técnica	Instrumento	Límite de cuantificación	Valor por test ^(Ref)	Cantidad de muestra
Inmunológico	ELISA	Lector de placas	ng/mL	\$5.562	200 µL saliva
Inmunológico	Citometría de flujo	Citómetro de flujo	pg/mL	\$30.512. NDC.	25 µL saliva
Inmunológico	Multiplex	Luminex	pg/mL	\$36.100.	25 µL saliva
Proteómico	MS	LC-MS	pg/mL	\$250.000	500 µL saliva
Molecular	RT-qPCR	Termociclador	<5 copias/µL	\$25.000 NDC.	500 µL saliva

MS: Espectrometría de masa. LC: Cromatografía líquida NDC: No disponible comercialmente. Ref: Referencia.

TABLA VII. Ventajas y desventajas de métodos de cuantificación.

Método	Ventajas	Desventajas
Inmunológico	<ul style="list-style-type: none"> •Múltiples reportes de cuantificación de quimioquinas en saliva. •Elevados límites de detección. •Elevada sensibilidad para detectar bajas concentraciones de analitos. •Compatibilidad para trabajar con múltiples matrices biológicas. •Protocolos de obtención y tratamiento de muestra detallados 	<ul style="list-style-type: none"> •Resultados dependientes de calidad de anticuerpos, su manejo y almacenamiento. •En mayoría de las técnicas requiere de fluidez de muestra para cuantificar.
Proteómico	<ul style="list-style-type: none"> •Capaz de detectar múltiples analitos dentro de una misma muestra. •Elevados límites de detección. •Elevada sensibilidad para detectar bajas concentraciones de analitos. 	<ul style="list-style-type: none"> •Escasos reportes de cuantificación de quimioquinas en saliva y quimioquinas en otras matrices. •Estado físico de la muestra debe ser ionizable (idealmente líquido). •No presenta kits comerciales. •Elevados costos por examen. •Presenta muy pocos/nulos protocolos de toma y tratamiento de muestra de saliva.
Molecular	<ul style="list-style-type: none"> •Permite visualizar la cuantificación de quimioquinas desde su síntesis. •Posee una elevada especificidad, pues trabaja con secuencias únicas. •Protocolos de obtención y tratamiento de muestra detallados. 	<ul style="list-style-type: none"> •Alto riesgo de contaminación de la muestra durante el proceso. •Requiere de técnicas complementarios para evaluar relación ARNm-proteína.

6. DISCUSIÓN

Bajo la necesidad de conocer el mejor método de cuantificación para quimioquinas en saliva para su futuro uso como biomarcadores tempranos de cáncer oral, se analizaron múltiples documentos en detalle para evaluar diferentes aspectos técnicos de los métodos como, además, de lograr identificar los protocolos y procesamientos de saliva.

A lo largo de esta revisión se expusieron los diferentes protocolos de toma de muestra de saliva y su procesamiento que, si bien variaban por documento, pudo encontrarse un punto en común en las principales indicaciones como lo fueron la estimulación, restricciones previas y modo de recolección. Lo mismo ocurre para el procesamiento de saliva en donde hubo una gran preferencia por el uso de sobrenadante posterior a la centrifugación.

El uso de saliva como muestra exige que dentro de su procesamiento se apliquen ciertas medidas para amortiguar el efecto producido por proteasas y bacterias inherentes a ella, por lo que se aconseja tratar la muestra a bajas temperaturas o en su defecto, conservarla en hielo. Los tratamientos adicionales para el procesamiento de la muestra dependerán del tipo de método para el cual se utilizará el fluido.

La cuarta parte de los estudios analizados mencionó haber utilizado dispositivos para la recolección del espécimen, reduciendo el proceso de toma de muestra en varias etapas significando una disminución en los errores pre analíticos si se aplican correctamente. Sin embargo, debe tenerse claro de qué manera se trabajará con la muestra puesto que los dispositivos presentan un protocolo único dependiendo del método o proceso en donde se vaya a aplicar la saliva.

La quimioquina más reportada y medida en los estudios fue IL-8, presentando un aumento en todos ellos y aunque puede presentarse como la mejor alternativa del grupo de quimioquinas para cáncer oral no hay que olvidar el requisito de especificidad que requiere para ser calificada como biomarcador. Otra quimioquina medida en los estudios analizados fue CCL20 y que también presentó un aumento en sus niveles con respecto a pacientes con cáncer oral, sin embargo, al haber estado asociada su respuesta a otras enfermedades orales similares no se puede asumir que su aumento sea exclusivo para cáncer oral.

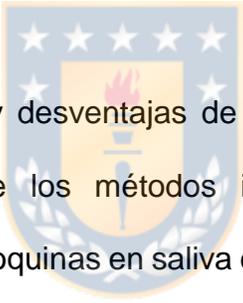
En su mayoría, las metodologías utilizadas en los estudios fueron de naturaleza inmunológica y, aunque en menor cantidad, también molecular. Las preferencias por estos métodos se deben a los elevados límites de detección y cuantificación que estas técnicas entregan, sumado a los relativos bajos costos de su aplicación en laboratorio clínico. Contrastando con métodos proteómicos cuyo valor asciende 10 veces más por sobre los valores de las metodologías mencionadas y si bien es presenta correctos límites de detección, es una metodología mucho más vasta que lo que la clínica actualmente necesita.

En la actualidad, los métodos inmunológicos llevaban la delantera con respecto a su implementación en laboratorios clínicos, facilitando la medición de moléculas a partir de técnicas de la misma categoría. Sin embargo, gracias a la pandemia por SARS-CoV-2, muchos laboratorios a lo largo del país y el mundo han ido implementando las técnicas de biología molecular como el diagnóstico mediante PCR y sus variantes, logrando abaratar costos a nivel de examen para los pacientes y dando una mirada clínica desde el punto de vista molecular.



7. CONCLUSIÓN

1.- Si bien la toma de muestra varía dependiendo del método para cuantificar quimioquinas que se va a utilizar, se puede establecer un protocolo en común dada las similitudes de los procesos, siempre respetando las restricciones de cada una de las tomas de muestra. Además, varios kits permiten trabajar con sobrenadante obtenido, facilitando y unificando el procesamiento de la muestra.



2.- Considerando las ventajas y desventajas de cada método expuesto en este trabajo, podemos concluir que los métodos inmunológicos serían la mejor alternativa para cuantificar quimioquinas en saliva en un futuro estudio de validación de potenciales biomarcadores. Estos métodos presentan una considerable especificidad y son altamente sensibles, además de no ser excesivamente costosa su aplicación. Por otro lado, el RT-qPCR sería la mejor opción para cuantificar quimioquinas en pellet obtenido de células que se obtengan de la muestra de saliva posterior a la centrifugación. Por último, el método proteómico, es la mejor opción para estudios de descubrimiento de nuevos biomarcadores ya que es una técnica que permite analizar muchas proteínas desde una misma muestra. Si bien los tres métodos permiten cuantificar quimioquinas en saliva, cada uno podría tener un mejor uso dependiendo del objetivo que plantee el proyecto de investigación.

3.- Hasta la fecha CXCL8/IL-8 se presenta como la quimioquina mayormente descrita hasta la fecha para cáncer oral, sin embargo, no se sabe si el aumento de su secreción es exclusivo de este proceso inflamatorio. Se requiere revisar más estudios al respecto de su especificidad con respecto al cáncer oral y los niveles en etapas tempranas, tardías y en pacientes con factores de riesgo.

Como proyección, sería interesante ampliar el estudio en otras quimioquinas que podrían jugar un rol importante en el desarrollo del cáncer oral y además, el poder generar un método transversal de obtención de saliva para poder utilizarla en un mayor número de determinaciones y darle una mayor importancia y versatilidad a nivel clínico.



8. REFERENCIAS

1. Aguilar, E. C., Gonzales, L. A., & Zúñiga, C. S. (2015). Identificación y cuantificación de linfocitos T y citoquinas plasmáticas en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. *Theorēma (Lima, Segunda época, En línea)*, (3), 69-81.
2. Alhabbab, R. Y. (2018). *Enzyme Immunoassay (EIAs) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. 83–95.
3. Andrews, D. L., Belton, P. S., Creaser, C. S., Cudby, M. E. A., Kettle, S. F. A., MCCoustra, M. R. S., Mellon, F. A., Powell, D. B., Sheppard, N., Sodeau, J. R., Thomson, A. J., Williamson, D. J., Willis, H. A., & Wilson, R. H. (2012). *Perspectives in Modern Chemical Spectroscopy*. 262-280.
4. Angulo, G. B., & Sánchez, E. A. H. (2016). Utilidad de las muestras de saliva en el diagnóstico por el laboratorio. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 63(1), 13-18.

5. Antón, M. S., & Somacarrera Pérez, M. L. (2015). Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. revisión de la literatura. *Avances en Odontoestomatología*, 31(4), 247-259.
6. Arellano-Garcia, M. E., Hu, S., Wang, J., Henson, B., Zhou, H., Chia, D., & Wong, D. T. (2008). Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. *Oral diseases*, 14(8), 705-712.
7. Array, B. B. (2008). Human Th1/Th2 Cytokine Kit II-Instruction Manual. *San Jose: Becton, Dickinson and Company BD Biosciences*.
8. Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
9. Barbany, J. R. (2008). Cáncer oral: Métodos de diagnóstico (screening) rápido en la consulta odontológica. *Avances en Odontoestomatología*, 24(1), 123-128.
10. Candia, J., Fernández, A., Somarriva, C., & Horna-Campos, O. (2018). Mortalidad por cáncer oral en Chile, 2002-2012. *Revista médica de Chile*, 146(4), 487-493.

11. Chen, J., Yao, Y., Gong, C., Yu, F., Su, S., Chen, J., Liu, B., Deng, H., Wang, F., Lin, L., Yao, H., Su, F., Anderson, K. S., Liu, Q., Ewen, M. E., Yao, X., & Song, E. (2011). CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell*, 19(4), 541–555.
12. Chenivesse, C., & Tsicopoulos, A. (2018). CCL18–Beyond chemotaxis. *Cytokine*, 109, 52-56.
13. Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & Elio, F. (2007). Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica chimica acta*, 383(1-2), 30-40.
14. Choi, S., & Myers, J. N. (2008). Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of dental research*, 87(1), 14-32.
15. Clarke, W., & Marzinke, M. (2020). *Contemporary practice in clinical chemistry*. Academic Press.171-181.
16. Díaz Zamora, R. (2017). Ventajas y desventajas del análisis por ICP-MS de metales pesados en muestras biológicas.

17. Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., Bray F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today>.
18. Fraga, M., Yáñez, M., Sherman, M., Llerena, F., Hernandez, M., Nourdin, G., Álvarez, F., Urrizola, J., Rivera, C., Lamperti, L., Nova, L., Castro, S., Zambrano, O., Cifuentes, A., Campos, L., Moya, S., Pastor, J., Nuñez, M., Gatica, J., ... Nova-Lamperti, E. (2021). Immunomodulation of T Helper Cells by Tumor Microenvironment in Oral Cancer Is Associated With CCR8 Expression and Rapid Membrane Vitamin D Signaling Pathway. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.643298>.
19. Ghallab, N. A., & Shaker, O. G. (2017). Serum and salivary levels of chemerin and MMP-9 in oral squamous cell carcinoma and oral premalignant lesions. *Clinical oral investigations*, 21(3), 937–947.
20. Gleber-Netto, F. O., Yakob, M., Li, F., Feng, Z., Dai, J., Kao, H. K., Chang, Y. L., Chang, K. P., & Wong, D. T. (2016). Salivary Biomarkers for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Taiwanese Population. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(13), 3340–3347.

21. Henson, B. S., & Wong, D. T. (2010). Collection, storage, and processing of saliva samples for downstream molecular applications. In *Oral Biology* (pp. 21-30). Humana Press, Totowa, NJ.
22. Islam, S. A., Ling, M. F., Leung, J., Shreffler, W. G., & Luster, A. D. (2013). Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor CCR8 is a CCL18 receptor. *The Journal of experimental medicine*, 210(10), 1889-1898.
23. Jiang, X., Huang, Z., Sun, X., Zheng, X., Liu, J., Shen, J., Jia, B., Luo, H., Mai, Z., Chen, G., & Zhao, J. (2020). CCL18-NIR1 promotes oral cancer cell growth and metastasis by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway. *BMC Cancer* 2020 20:1, 20(1), 1–13.
24. Khyani, I., Qureshi, M. A., Mirza, T., & Farooq, M. U. (2017). Detection of interleukins-6 and 8 in saliva as potential biomarkers of oral pre-malignant lesion and oral carcinoma: A breakthrough in salivary diagnostics in Pakistan. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 30(3), 817–823.
25. Koizumi, T., Shetty, V., & Yamaguchi, M. (2018). Salivary cytokine panel indicative of non-small cell lung cancer. *The Journal of international medical research*, 46(9), 3570–3582.

26. Korostoff, A., Reder, L., Masood, R., & Sinha, U. K. (2011). The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. *Oral oncology*, 47(4), 282-287.
27. Kramer, G., Woolerton, Y., Straalen, J. P. van, Vissers, J. P. C., Dekker, N., Langridge, J. I., Beynon, R. J., Speijer, D., Sturk, A., & Aerts, J. M. F. G. (2015). Accuracy and Reproducibility in Quantification of Plasma Protein Concentrations by Mass Spectrometry without the Use of Isotopic Standards. *PLOS ONE*, 10(10), e0140097.
28. Kumar, M., Nanavati, R., Modi, T. G., & Dobariya, C. (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of cancer research and therapeutics*, 12(2), 458.
29. Lehmann, J. S., Zhao, A., Sun, B., Jiang, W., & Ji, S. (2017). Multiplex cytokine profiling of stimulated mouse splenocytes using a cytometric bead-based immunoassay platform. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (129), e56440.
30. Li, Y., Zhou, X., St. John, M. A. R., & Wong, D. T. W. (2004). RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *Journal of dental research*, 83(3), 199-203.

31. Lisa Cheng, Y. S., Jordan, L., Gorugantula, L. M., Schneiderman, E., Chen, H. S., & Rees, T. (2015). Salivary interleukin-6 and -8 in patients with oral cancer and patients with chronic oral inflammatory diseases. *Journal of periodontology*, 85(7), 956–965.
32. Liu, Y., Zheng, H., Li, Q., Li, S., Lai, H., Song, E., Li, D., & Chen, J. (2019). Discovery of CCL18 antagonist blocking breast cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 2019 36:3, 36(3), 243–255.
33. Martín-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L. M., Tuñón, J., Muñoz-García, B., Madrigal-Matute, J., Moreno, J. A., & Egido, J. (2009). Biomarcadores en la medicina cardiovascular. *Revista española de cardiología*, 62(6), 677-688.
34. Merino, A. G. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26(5), 301-306.
35. Mücke, T., Wagenpfeil, S., Kesting, M. R., Hölzle, F., & Wolff, K. D. (2009). Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer. *Oral oncology*, 45(8), 687-691.
36. Nagao, T., & Warnakulasuriya, S. (2020). Screening for oral cancer: Future prospects, research and policy development for Asia. *Oral oncology*, 105, 104632.

37. Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.
38. Panda, S., Padhiary, S. K., & Routray, S. (2016). Chemokines accentuating protumoral activities in oral cancer microenvironment possess an imperious stratagem for therapeutic resolutions. *Oral oncology*, 60, 8-17.
39. Pérez-Lara, J. C., Santiago-Cruz, W., Romero-Ramírez, H., & Rodríguez-Alba, J. C. (2019). Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 18(2), 41-52.
40. Puntmann, V. O. (2009). How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgraduate medical journal*, 85(1008), 538-545.
41. Punyani, S. R., & Sathawane, R. S. (2013). Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Clinical oral investigations*, 17(2), 517-524.
42. Pushalkar, S., Ji, X., Li, Y., Estilo, C., Yegnanarayana, R., Singh, B., Li, X., & Saxena, D. (2012). Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues

of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiology* 2012 12:1, 12(1), 1–15.

43.Rabe, A., Gesell Salazar, M., Fuchs, S., Kocher, T., & Völker, U. (2018). Comparative analysis of Salivette® and paraffin gum preparations for establishment of a metaproteomics analysis pipeline for stimulated human saliva. *Journal of oral microbiology*, 10(1), 1428006.

44.Rai, A. K., Panda, M., Das, A. K., Rahman, T., Das, R., Das, K., Sarma, A., Katak, A. C., & Chattopadhyay, I. (2021). Dysbiosis of salivary microbiome and cytokines influence oral squamous cell carcinoma through inflammation. *Archives of microbiology*, 203(1), 137–152.

45.Rai, V., Mukherjee, R., Ghosh, A. K., Routray, A., & Chakraborty, C. (2018). “Omics” in oral cancer: New approaches for biomarker discovery. *Archives of oral biology*, 87, 15-34.

46.Ramírez, D. F. H., & Cabiedes, J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatología Clínica*, 6(3), 173-177.

47. Ramirez, V., Vásquez-Rozas, P., & Ramírez-Eyraud, P. (2015). Mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile, años 2002-2010. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 8(2), 133-138.

48. Rodríguez-Pelier, C. V., Chang-Monteagudo, A., Zúñiga-Rosales, Y., Torres-Rives, B., Martínez-Tellez, G., Rosa-Hernández, D. L., & Martínez-Perera, A. (2017). Validación de un inmunoensayo tipo ELISA para la cuantificación de los niveles séricos de antígeno de superficie en pacientes con infección crónica por Virus de la Hepatitis B. *Revista biomédica*, 28(3), 111-123.

49. Salimetrics, L. L. C., & SalivaBio, L. L. C. (2011). Saliva collection and handling advice. *State College, PA: Salimetrics LLC, SalivaBio LLC*, 1-14.

50. Schutyser, E., Richmond, A., & Van Damme, J. (2005). Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *Journal of leukocyte biology*, 78(1), 14-26.

51. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30.

52. Singh, P., Verma, J. K., & Singh, J. K. (2020). Validation of Salivary Markers, IL-1 β , IL-8 and Lgals3bp for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in an Indian Population. *Scientific reports*, 10(1), 7365.
53. Sohail, K., Siddiqi, K. M., Baig, M. Z., Sahibzada, H. A., & Maqbool, S. (2020). Salivary Biomarker Interleukin-8 Levels in Naswar Users and Non-users. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, 30(1), 99–101.
54. Su, S., Liao, J., Liu, J., Huang, D., He, C., Chen, F., Yang, L., Wu, W., Chen, J., Lin, L., Zeng, Y., Ouyang, N., Cui, X., Yao, H., Su, F., Huang, J., Lieberman, J., Liu, Q., & Song, E. (2017). Blocking the recruitment of naive CD4+ T cells reverses immunosuppression in breast cancer. *Cell Research* 2017 27:4, 27(4), 461–482.
55. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
56. Ueda, S., Goto, M., Hashimoto, K., Hasegawa, S., Imazawa, M., Takahashi, M., Oh-Iwa, I., Shimo zato, K., Nagao, T., & Nomoto, S. (2021). Salivary CCL20 Level as a Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer genomics & proteomics*, 18(2), 103–112.

57. Val, M., Sidoti Pinto, G. A., Manini, L., Gandolfo, S., & Pentenero, M. (2019). Variations of salivary concentration of cytokines and chemokines in presence of oral squamous cell carcinoma. A case-crossover longitudinal prospective study. *Cytokine*, 120, 62–65.
58. Vashist, S. K., & Luong, J. H. (2018). Immunoassays: An Overview. In *Handbook of Immunoassay Technologies* (pp. 1-18). Academic Press.
59. Viet, C. T., & Schmidt, B. L. (2008). Methylation array analysis of preoperative and postoperative saliva DNA in oral cancer patients. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17(12), 3603-3611.
60. Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M., & Wishart, D. S. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics*, 9(2), 280-299.
61. Xia, J., Wang, J., Chen, N., Dai, Y., Hong, Y., Chen, X., & Cheng, B. (2011). Expressions of CXCR7/ligands may be involved in oral carcinogenesis. *Journal of molecular histology*, 42(2), 175.

62. Xu, J., Yang, X. X., Wu, Y. G., Li, X. Y., & Bai, B. (2014). Meat consumption and risk of oral cavity and oropharynx cancer: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*, 9(4).

