

MICROARN-URILE SALIVARE CA BIOMARKERI PENTRU MALIGNITATEA ORALĂ

MicroRNAs as biomarkers salivary sites for oral malignancy

Asist Univ. Dr. Silvana Cănjău¹, Prof. Dr. Carmen Todea¹, Prof. Dr. Cosmin Sinescu², Ovidiu Sîrbu³,
Alexandra Moatăr³, Cristina Bejinar³, Conf. Dr. Marius Pricop⁴, Prof. Dr. Meda Lavinia Negruțiu²,
Prof. Dr. Virgil-Florin Duma⁵

¹Departamentul de Reabilitare Orală și Urgențe în Medicina Dentară, Facultatea de Medicină Dentară,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara

²Departamentul de Materiale Dentare și Tehnologia Protezelor, Facultatea de Medicină Dentară,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara

³Departamentul de Bichimie, Facultatea de Medicină,

Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara

⁴Conferențiar, Departamentul de Chirurgie Maxilo-Facială, Facultatea de Medicină Dentară,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara

⁵3OM Grup de Optomecatronică, Facultatea de Inginerie, Universitatea „Aurel Vlaicu”, Arad

REZUMAT

Obiective. Testarea salivei reprezintă o alternativă non-invazivă, ieftină și ușor de accesat comparativ cu testarea țesuturilor sau a sângelui. Saliva este un indicator de precizie al condițiilor fizice iar biomarkerii salivari pot fi folosiți ca instrumente diagnostice. În acest studiu, am avut ca obiectiv validarea expresiilor salivare pentru un panel de 5 microARN-uri, identificate într-o revizie a literaturii ca potențiali biomarkeri non-invazivi pentru diagnosticul și monitorizarea terapiei carcinomului scuamo-celular oral (CSCO).

Material și metodă. Subiecții cercetării sunt reprezentati de pacienți diagnosticați cu CSCO spitalizați în Clinica de Chirurgie Maxilo-Facială din Timișoara. Proba biologică de salivă s-a recoltat de la pacienți înainte de efectuarea biopsiei. În studiu au fost incluși un grup de 4 pacienți și un grup control de patru indivizi fără diagnostic de CSCO. Pentru cuantificarea microARN-urilor, s-a realizat o transcripție inversă utilizând kitul TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (ThermoFisher) urmat de PCR cantitativ în timp real (qRT-PCR) pentru care s-au folosit TaqMan™ MicroRNA Assays (ThermoFisher); toate reacțiile qRT-PCR s-au realizat triplicat.

Rezultate. Cu excepția miR-181b, toate microARN-urile investigate s-au dovedit a avea expresii neregulate în saliva pacienților cu CSCO. Tot în saliva acestor pacienți s-a descoperit că hsa-miR-137 este supra-regulat în timp ce hsa-miR-205 este puternic sub-regulat. Cu toate acestea, am putut confirma activarea expresiei hsa-miR-127-5b și o puternică reprimare a hsa-miR-375 în saliva pacienților cu CSCO. Datele legate de expresia hsa-miR-181 în CSCO au fost contradictorii, variind de la o puternică sub-regulare la nivelul probelor de țesut și o posibilă utilizare a lor ca instrument terapeutic la o corelare cu predispoziția dezvoltării metastazelor. Cu toate acestea la nivel salivar nu s-au depistat modificări ale nivelelor de expresie genică.

Concluzii. Identificarea biomarkerilor microARN neregulați din saliva reprezintă o analiză non-invazivă promițătoare pentru evaluarea riscului malignității orale, care poate adăuga valoare diagnosticului histologic.

Cuvinte cheie: cancerul oral, microARN, salivă, biomarkeri și diagnostic non-invaziv

ABSTRACT

Background. Saliva sampling is a non-invasive, cheap, easy-to-access alternative to traditional tissue and blood sampling. Saliva is an accurate indicator of bodily conditions, and salivary biomarkers may serve as early diagnostic tools. In this study we aimed to validate the salivary expression of a panel of 5 microRNAs, identified from a literature screen as potential noninvasive biomarkers for oral squamous cell carcinoma (OSCC) diagnosis, prediction and therapy monitoring.

Materials and methods. The research subjects included patients diagnosed with oral squamous cell carcinoma hospitalized at the Clinic of Oral & Maxillofacial Surgery in Timișoara. The biological samples (saliva) were collected from the patients before the biopsy procedure. We included in this study a group of 4 patients and a control group of 4 individuals without OSCC. For microRNA quantification, we performed reverse transcription using the

Autor corespondent:

Prof. Dr. Carmen Todea, Departamentul de Reabilitare Orală și Urgențe în Medicina Dentară, Facultatea de Medicină Dentară,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara

E-mail: carmentodea@gmail.com

TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher) followed by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) using TaqMan™ MicroRNA Assays (Thermofisher); all qRT-PCR reactions were performed in triplicate.

Results. With the exception of miR-181b, all the investigated microRNAs were found to have deregulated expression in OSCC patients' saliva. Hsa-miR-137 was found to be up-regulated in the saliva of OSCC patients while hsa-miR-205 was found to be strongly down-regulated. However, we were able to confirm the activation of expression of hsa-miR-127-5b and the strong repression of hsa-miR-375 in the saliva of OSCC patients. The data upon hsa-miR-181 expression in OSCC have been conflicting, ranging from strong down-regulation in tissue samples and possible usage as therapeutic tool to correlation with metastasis propensity; however, we have not detected changes in the expression levels in saliva.

Conclusions. Detection of deregulated miRNA biomarkers in saliva samples is a promising noninvasive assay for risk assessment of oral malignancy, which may add value to the histologic diagnosis.

Keywords: oral cancer, microRNA, saliva, biomarkers, and non-invasive diagnostic

INTRODUCERE

Aproximativ 90% din cancerile de la nivelul capului și gâtului sunt carcinoame scuamoase celulare orale (CSCO). CSCO este o malignitate agresivă și letală care reprezintă o problemă majoră la nivel mondial datorită prevalenței sale extrem de crescute și a prognosticului foarte prost (1,2). Rata medie de supraviețuire la 5 ani pentru pacienții diagnosticați cu CSCO este de aproximativ 50% (3,4). De aceea, este necesară o metodă de depistare precoce a acestei patologii astfel încât să se îmbunătățească tratamentul și rata de supraviețuire a pacientului pe termen lung (5). Este cunoscut faptul că aproape 20-60% din CSCO se dezvoltă din leziuni premaligne (6), ce se pot identifica clinic ca leziuni albe sau roșii la nivelul mucoasei, denumite leucoplazie sau eritroplazie.

În prezent, diagnosticul CSCO se realizează prin evaluarea histopatologică a materialului biopsiat. Referitor la procesul carcinogenezei orale, s-a raportat faptul că este un proces multifazic, care progresează datorită acumulării de modificări genetice induse de carcinogeni (7). De asemenea, în diagnosticul CSCO, saliva a fost utilizată ca mediu diagnostic datorită analizelor proteinelor și ADN-ului pe care le conține (8,9).

Testarea salivei reprezintă o alternativă non-invasivă, ieftină și ușor de accesat comparativ cu testarea țesuturilor sau a sângelui (10,11). Saliva este un indicator de precizie al condițiilor corporale iar biomarkerii salivari pot fi folosiți ca instrumente diagnostice. Diagnosticul salivar se consideră a fi o alternativă extrem de promițătoare pentru epidemiologia clasică a mediului (12,13). Ușurința eșantionării alături de eficiența costurilor pentru testele bazate pe salivă asigură avantaje asupra tehnicilor tradiționale pentru screeningurile populaționale pe scară largă și mai ales în situațiile unde este necesară testarea repetată, cum ar fi monitorizarea și managementul progresiei bolii (14). Tehnologiile lab-on-a-chip (LOC) încep să fie folosite în setări

clinice pentru diagnostice de tip point-of-care (POC) (15). Testarea salivară s-a utilizat cu succes pentru identificarea de multiple entități patologice, inclusiv unele care au generat afecțiuni ale cavității orale (16,17).

MicroARN-urile (miARN) sunt ARN-uri scurte (20-25 nucleotide) necodate care s-au dovedit a fi jucători importanți în geneza tumorală datorită proximității lor cu punctele de întrerupere cromozomiale și a nivelelor expresiilor neregulate în multe malignități (18-20). Supraexpresia anumitor miARN-uri poate conduce la subregularea genelor supresoare tumorale, în timp ce subexpresia altor miARN-uri poate cauza supraregularea oncogenică (21). Consecutiv, mai multe studii au evaluat potențialul miARN-urilor ca biomarkeri diagnostici și prognostici pentru patologia cancerosă (5,18, 22,23).

Scopul acestei cercetări a fost acela de a valida expresia salivară a unui panel de 5 miARN-uri, identificate prin studiul literaturii de specialitate ca potențiali biomarkeri non-invasivi pentru diagnosticul și monitorizarea terapiei în cazurile de CSCO.

MATERIAL ȘI METODĂ

Criterii de includere:

Subiecții incluși în studiu sunt pacienți diagnosticați cu CSCO și spitalizați la Spitalul de Chirurgie Maxilo-Facială din Timișoara, care au semnat un acord informat de participare la studiu.

Recoltarea și pregătirea probelor:

Probele biologice (saliva) au fost colectate de la pacienți înainte de procedura de biopsiere. Pacienții care au primit un diagnostic de CSCO au fost incluși în studiul nostru ca și cazuri. Din acest grup au făcut parte patru pacienți. De asemenea, un alt grup de patru indivizi care nu suferă de CSCO au format grupul de control. Informația clinic-patologică a pacienților incluși în cele două grupuri s-a obținut din dosarele lor medicale.

Colectarea salivei:

Pacienții (cu o vârstă medie de 61,25 ani și o distribuție a sexului de 300) și indivizii din grupul control (cu o vârstă medie de 66,5 ani și o distribuție a sexului de 300) au fost rugați să se abțină de la mâncat, băut și periat pe dinți o oră înainte de a li se recolta 2 ml de salivă; fiecare probă a fost mixată imediat cu 1 ml reactiv RNA Protect Saliva (Qiagen, Germany) și depozitat la – 20C până la utilizarea ei ulterioară.

Izolarea ARN-ului:

Purificarea ARN-ului din salivă s-a realizat utilizând kitul RNeasy® kit (Qiagen, Germany), conform protocolului indicat de producător și s-a depozitat ulterior – 80 C. De reținut faptul că fiecare probă a fost țintuită cu un *C. elegans* miR-39 sintetic, care a servit ca și control al normalizării. Cantitatea și calitatea ARN-ului extras a fost apreciată spectrofotometric (prin rațiile A260/280 și A260/230) utilizând NanoDrop ND-1000™ (Thermo Scientific).

Cuantificarea miARN-urilor

Pentru cuantificarea miARN-urilor, am realizat transcripția inversă folosind kitul TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (ThermoFisher) urmat de PCR cantitativ în timp real (qRT-PCR) prin utilizarea TaqMan™ MicroRNA Assays (ThermoFisher); toate reacțiile qRT-PCR s-au realizat triplizat. Pentru normalizare, s-a folosit o procedură în două faze, având un control extern (*C. Elegans* miR-39) și un control intern (RNU48, care a fost identificat în literatura de specialitate ca fiind cel mai de încredere control intern) (14). Ulterior, metodele $\Delta\Delta CT$ ale cuantificării relative s-a utilizat pentru calcularea modificărilor dintre pacienți și indivizii din grupul control.

Analiza statistică

După ce s-a verificat dacă valorile Ct normalizate sunt distribuite normal, s-a utilizat un two tails student t-test heteroscedastic pentru a stabili dacă nivelul expresiei miARN este semnificativ diferită în salivă pacienților cu CSCO în comparație cu grupul control sănătos (15).

REZULTATE

Cu excepția miR-181b, toate miARN-urile investigate s-au dovedit a avea expresii neregulate în salivă pacienților cu CSCO (Fig. 1). Contrar raportărilor anterioare (24), hsa-miR-137 s-a dovedit a fi supra-regulată în salivă pacienților cu CSCO în timp ce hsa-miR-205 s-a dovedit a fi puternic sub-regulată în salivă, cu toate că analiza tumorală a CSCO nu a prezentat nici o schimbare a expresiei

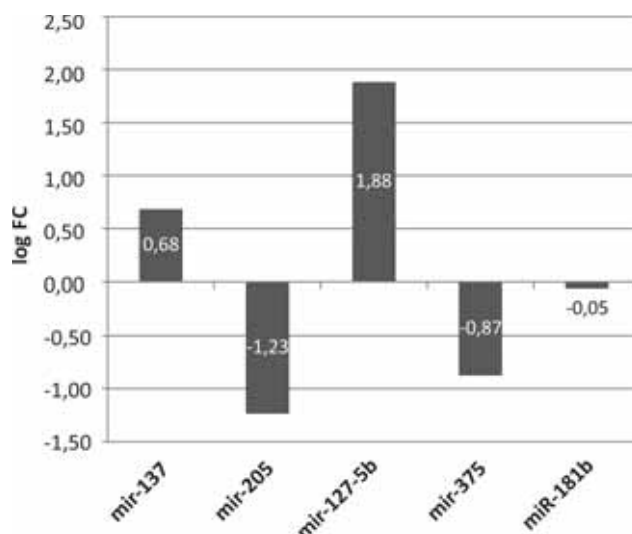


FIGURA 1. Modificarea nivelelor salivare ale miARN-urilor în cazul pacienților cu CSCO vs. grupul pacienților sănătoși.

TABELUL 1. Puterea analizei statistice pentru cele două grupuri incluse în studiu.

	Puterea statistică
mir-137	11,70%
mir-205	50,50%
mir-127-5b	54,20%
mir-375	30,80%
miR-181b	5,10%

(25). Chiar și așa, a fost posibil să confirmăm activarea expresiei hsa-miR-127-5b (26) și o puternică reprimare a hsa-miR-375 (27) în salivă pacienților cu CSCO. Datele legate de expresia Hsa-miR-181 în CSCO au fost contradictorii, variind de la sub-regularea în probele de țesut și o posibilă utilizare a lor ca instrument terapeutic (28) la corelarea cu predispoziția pentru dezvoltarea metastazelor (29); cu toate acestea nu am identificat modificări al nivelului de expresie în salivă. Puterea statistică a testelor noastre este destul de limitată (Tabelul 1) și analiza t-test nu a demonstrat nici o semnificație statistică, fapt ce era de așteptat, dat fiind dimensiunea mică a celor două grupuri.

DISCUȚII

În ultimii 10 ani, multe studii de cercetare au raportat faptul că evenimentele epigenetice, sunt implicate și au un rol important în dezvoltarea cancerului³⁰. În cazul cancerelor, cel mai comun de identificat eveniment epigenetic este hipermetilarea ADN a genelor de supresie tumorală cu o asociere de hipometilare a activării oncogenelor (24).

Descoperirea miARN-urilor a deschis noi căi pentru diagnosticul non-invaziv, pentru prognostic și pentru abordările terapeutice pentru toate tipurile

de cancere. MiARN-urile sunt o clasă de 18-22 nucleotide ARN necodificate care regulează expresia post-transcripțională (31) și care este alterată în majoritatea tipurilor de cancere (32).

În ultimi ani au fost identificate peste 1000 miARN-uri umane (miRBase, www.mirbase.org). Raporturi recente de cercetare au demonstrat ca un număr semnificativ de miARN-uri s-au dovedit a fi extracelulare și că nivelele lor în circulație au fost legate de diverse condiții fiziopatologice. Unele exemple includ asocierea miR-141 cu cancerul de prostată, miR-499 cu infarctul miocardic și miR-122 cu afectarea indusă medicamentos a ficatului³³. Aceste descoperiri au ridicat posibilitatea de utilizare a nivelelor anumitor miARN-uri ca biomarkeri pentru diferite condiții patologice. De asemenea, miARN-urile au prezentat unele avantaje în raport cu alți biomarkeri bazați pe proteine, cum ar fi: miARN-urile sunt stabile în diverse fluide ale corpului (ser, plasma, urina, saliva); secvențele lor sunt conservate printre diverse specimene clinice; iar expresiile lor sunt restricționate la anumite stagii tisulare sau biologice (34).

Doar câteva studii au investigat profilele expresiei miARN pentru CSCO. Kozaki et al (35) au descoperit niște miARN-uri candidate implicate în etiologia și progresia cancerului oral, incluzând pierderea miR-34b, miR-100, miR-125b, miR-137, miR-193a și miR-203. Aceste miARN-uri par a fi implicate în CSCO atunci când se compară cu mucoasa orală normală. De asemenea, s-a sugerat ca supra-expresia miR-21, miR-181b, și miR-345 este legată de transformarea malignă a leucoplaziei. În acest caz, biopsia histologică are o valoare prognostică limitată³⁵. S-a demonstrat că paternurile de hipermetilare ADN au fost implicate în expresia alterată a 30-35 microARN-uri din diverse tipuri de cancere (33).

Legat de atenuarea epigenică a genelor microARN implicate în CSCO, s-a realizat doar un studiu extensiv, în care s-a identificat faptul că reprimarea miR-34b, miR-137, miR-193a și miR-203 este asociată cu hipermetilarea ADN în liniile celulare și în tumorile scuamo-celulare orale (36).

S-a demonstrat că miARN-urile din afara celulelor care se regăsesc în fluidele corporale (saliva, ser, plasma și urină) sunt stabile în condiții aspre inclusiv, fierbere, PH redus/ridicat, depozitare prelungită și multiple cicluri de congelare/decongelare (37-39).

Există un număr de studii care au evaluat miARN-urile ca biomarkeri diagnostici pentru CSCO. MiARN-urile ce au fost descoperite cu expresii diferențiale sunt prezentate în Tabelul 2.

TABELUL 2. Expresii diferențiale ale miARN-urilor în patologia cancerosă umană.

miRNA	Afecțiune	Sursa probei	Expresie	Bibliografie
miR-139-5p	CSCO	Salivă	Redusă	Duz et al. (40)
miR-211	CSCO	Țesut	Crescută	Chang et al. (41)
miR-125a, miR200a	CSCO	Salivă	Crescută	Park et al. (5)
miR-145	CSCO	Salivă	Redusă	Zahrn et al. (42)
miR-184	CSCO	Salivă	Crescută	Zahrn et al. (42)
miR-21, miR-155, let-7i, miR142-3p, miR-423, miR-106b, miR-20a, miR-16	CSCCG	Țesut	Crescută	Hui et.al. (43)
miR-125b, miR-375, miR-10a	CSCCG	Țesut	Redusă	Hui et.al. (43)
miR-24	CSCO	Plasmă	Crescută	Lin et al. (44)
miR-31	CSCO	Plasmă	Crescută	Liu et al. (45) Hung et al. (46)
miR-99a, miR-100	CSCCG	Țesut	Redusă	Chen et al. (47)
miR-9	CSCCG	Salivă	Crescută	Salazar et al. (48)
miR-134, miR-191	CSCCG	Salivă	Redusă	Salazar et al. (48)
miR-21	CSCO	Sânge total	Crescută	Zahrn et al. (42) Ren et al. (49)
miR-155	CSCO	Țesut	Crescută	Shi et al. (50)
miR-27b	CSCO	Salivă	Crescută	Momen-Heravi et al. (21)

* Carcinom scuamos celular la nivelul capului și gâtului (CSCCG), carcinom scuamos celular lingual (CSCO), carcinom scuamos celular lingual (CSCL)

CONCLUZII ȘI DIRECȚII VIITOARE

În lumina articolelor publicate anterior și a prezentului studiu preliminar, putem specula că miARN-urile pot deține un rol important în patogeneza tumorală orală. Neregularea tipurilor de miARN-uri diferă în funcție de comportamentul biologic însă în acest moment biopsia ar trebui să rămână standardul de aur pentru diagnosticul cancerului oral. Cu toate acestea, identificarea biomarkerilor miARN în probele de salivă reprezintă o analiză non-invazivă promițătoare pentru evaluarea riscului la malignitate orală, ce poate adăuga valoarea rezultatului histologic.

Disponibilitatea noilor tehnologii de testare genetică cum ar fi secvențializarea ARN, vor permite limitărilor tehnice actuale să fie depășite și vor crește acuratețea testelor atunci când se vor folosi

probe extrem de mici. Cercetarea fundamentală în ceea ce privește mecanismul de bază al controlului și activității miARN-urilor va facilita identificarea legăturilor dintre diverse afecțiuni. Adicional, modele numerice de predicție mai eficiente și mijloace bioinformatică îmbunătățite vor permite o utilizare optimă a bazelor de date miARN.

BIBLIOGRAFIE

1. Chiu T.J., Chen Y.J., Rau K.M. et al. Midkine neurite growth-promoting factor 2 expression as a potential prognostic marker of adjuvant therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2013; 18:687–698.
2. Markopoulos A.K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *Open Dent. J.* 2012; 6:126–130.
3. Brinkman B.M., Wong D.T. Disease mechanism and bio- markers of oral squamous cell carcinoma. *Curr. Opin. Oncol.* 2006; 18:228–233.
4. Gillison M.L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007; 29:779–792.
5. Park N.J., Zhou H., Elashoff D. et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15:5473–5477.
6. Nappier S.S., Speight P.M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions; an overview of the literature. *J. Oral Pathol. Med.* 2008; 37(1):1–10.
7. Williams H.K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol. Pathol.* 2000; 53:165–172.
8. Brinkman B.M., Wong D.T. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Curr. Opin. Oncol.* 2006; 18:228–233.
9. Chai R.L., Grandis J.R. Advances in molecular diagnostics and therapeutics in head and neck cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2006; 7:3–11.
10. Genco R.J. Salivary diagnostic tests. *J. Am. Dent. Assoc.* 2012; 143:3S–5S.
11. Giannobile W.V., Wong D.T. Salivary diagnostics: oral health and beyond!. *J. Dent. Res.* 2011; 90:1153–1154.
12. Giannobile W.V., Beikler T., Kinney J.S. et al. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol.* 2000 2009; 50:52–64.
13. Bonassi S., Neri M., Puntoni R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat. Res.* 2001; 480–481:349–358.
14. Fabryova H., Celec P. On the origin and diagnostic use of salivary RNA. *Oral Dis.* 2014; 20:146–152.
15. Christodoulides N., Floriano P.N., Miller C.S. et al. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of peri-odontitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1098:411–428.
16. Malamud D. Salivary diagnostics: the future is now. *J. Am. Dent. Assoc.* 2006; 137:284–286.
17. Giannobile W.V., McDevitt J.T., Niedbala R.S., Malamud D. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Adv. Dent. Res.* 2011; 23:375–380.
18. Farazi T.A., Spitzer J.I., Morozov P., Tuschl T. miRNAs in human cancer. *The J. Pathol.* 2011; 223:102–115.
19. Lu J., Getz G., Miska E.A. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435:834–838.
20. Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* 2004; 101:2999–3004.
21. Momen-Heravi F., Trachtenberg A.J., Kuo W.P., Cheng Y.S. Genomewide study of salivary microRNAs for detection of oral cancer. *J. Dent. Res.* 2014; 93:86S–93S.
22. Wang Y., Wang Q., Zhang N. et al. Identification of microRNAs as novel biomarkers for detecting esophageal squamous cell carcinoma in Asians: a meta- analysis. *Tumour Biol.* 2014; 35:11595–11604.
23. Yanaihara N., Caplen N., Bowman E. et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9:189–198.
24. Ross J.P., Rand K.N., Molloy P.L. Hypomethylation of repeated DNA sequences in cancer. *Epigenomics* 2010; 2:245–269.
25. Manikandan M., Deva Magendhra Rao A.K., Rajkumar K.S. et al. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J. Oral Pathol. Med.* 2015; 44(10):792–800.
26. Wiklund E.D., Gao S., Hulf T., Sibbritt T. et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2011; 6(11):e27840.
27. Siow M.Y., Ng L.P., Vincent-Chong V.K. et al. Dysregulation of miR-31 and miR-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Dis.* 2014; 20(4):345–351.
28. Shin K.H., Bae S.D., Hong H.S. et al. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 404(4):896–902.
29. Yang T.L., Lou P.J., Chang Y.L. et al. Tumor satellite in predicting occult nodal metastasis of tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011; 145(4):599–605.
30. Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31:27–36.
31. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004; 116:281–297.
32. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6:259–269.
33. Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* 2010; 56:1733–1741.
34. Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science* 2010; 101:2087–2092.
35. Kozaki K., Imoto I., Mogi S. et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(7):2094–2105.
36. Cervigne N.K., Reis P.P., Machado J. et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18:4818–4829.
37. Lujambio A., Ropero S., Ballestar E. et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67:1424–1429.
38. Hasegawa M., Nelson H.H., Peters E. et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21:4231–4236.
39. Chen X., Ba Y., Ma L. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell. Res.* 2008; 18:997–1006.
40. Duz M.B., Karatas O.F., Guzel E. et al. Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cell. Oncol. (Dordr).* 2016; 39(2):187–193.
41. Chang K.W., Liu C.J., Chu T.H. et al. Association between high miR-211 microRNA expression and the poor prognosis of oral carcinoma. *J. Dent. Res.* 2008; 87:1063–1068.
42. Zahran F., Ghalwash D., Shaker O. et al. Salivary microRNAs in oral cancer. *Oral Dis.* 2015; 21(6):739–747.
43. Hui A.B., Lenarduzzi M., Krushel T. et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16:1129–1139.
44. Lin S.C., Liu C.J., Lin J.A. et al. miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol.* 2010; 46:204–208.

MULȚUMIRI

Acest studiu este susținut de Partnership Grant of the Romanian National Authority for Scientific Research, CNDI–UEFISCDI cu număr de proiect PN-II-PT-PCCA-2011-3.2-1682 (<http://3om-group-optomechatronics.ro/>).

45. Liu C.J., Lin S.C., Yang C.C. et al. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34:219–224.
46. Hung K.F., Liu C.J., Chiu P.C. et al. MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. *Oral Oncol.* 2016; 53:42-47.
47. Chen Z, Jin Y., Yu D. et al. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012; 48:686–691.
48. Salazar C., Nagadia R., Pandit P. et al. A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell. Oncol.* 2014; 37:331–338.
49. Ren W., Qiang C., Gao L. et al. Circulating microRNA-21 (MIR-21) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) are promising novel biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2014; 19(7):590–596.
50. Shi L.J., Zhang C.Y., Zhou Z.T. et al. MicroRNA-155 in oral squamous cell carcinoma: overexpression, localization, and prognostic potential. *Head neck* 2014; 37:970–976.