



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

UISEU

Biomarcadores de Cancro da Cabeça e Pescoço Associados ao Metabolismo de NAD: uma revisão sistemática

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Pedro Miguel Figueiredo Pires

Viseu, 2021



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

Biomarcadores de Cancro da Cabeça e Pescoço Associados ao Metabolismo de NAD: uma revisão sistemática

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Pedro Miguel Figueiredo Pires

Orientadora: Professora Doutora Raquel Silva

Coorientadora: Professora Doutora Patrícia Couto

Viseu, 2021

Agradecimentos

Queria agradecer à minha Orientadora, a Professora Doutora Raquel Silva, pelo apoio, orientação e disponibilidade neste trabalho e no meu percurso académico. O meu sincero agradecimento.

À minha Co-Orientadora, a Professora Doutora Patrícia Couto, pelo auxílio, apoio e disponibilidade ao longo deste trabalho

Aos meus pais por todo o apoio nesta caminhada, pelos incentivos e constante motivação.

A todos os meus colegas e amigos pelo carinho, disponibilidade e amizade.

Resumo

Introdução: A identificação de biomarcadores em Oncologia pode permitir melhorias na acuidade diagnóstica, melhorar a seleção da terapêutica e estabelecer o prognóstico de diferentes neoplasias, nomeadamente no que diz respeito aos tumores da cabeça e do pescoço. A quantidade de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) e de moléculas relacionadas com o seu metabolismo, pela sua função em reações redox ao nível celular, pode estar envolvida em processos de carcinogénese e a sua regulação ser modificada como resposta a neoplasias.

Objetivo: Identificação de biomarcadores relacionados com o metabolismo de NAD em tumores da cabeça e do pescoço.

Métodos: Foi realizada uma pesquisa com termos controlados e naturais em bases de dados de literatura científica, nomeadamente a PubMed®, B-ON e Cochrane. Foram incluídos estudos experimentais, quase-experimentais, transversais analíticos ou exploratórios, realizados em doentes adultos com diagnóstico de tumores da cabeça e do pescoço, com pesquisa de biomarcadores relacionados com o metabolismo de NAD, publicados em inglês.

Resultados: Foram incluídas 19 publicações, com pesquisa de biomarcadores em tecido tumoral (63,2%). Os marcadores mais pesquisados foram a nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT, 42,1%) e as sirtuínas (31,6%), maioritariamente utilizando técnicas de imunohistoquímica (42,1%) e de reação em cadeia da polimerase (31,6%). Observou-se um aumento de NAMPT nos tumores da cabeça e do pescoço em todas as publicações incluídas, com resultados variáveis na expressão de sirtuínas e de CD38.

Conclusões: O aumento da expressão de NAMPT é consistente em tumores da cabeça e do pescoço como biomarcador de doença.

Palavras-chave: Tumores da Cabeça e do Pescoço; Biomarcadores; NAD

Abstract

Introduction: Identifying biomarkers in Oncology might allow an increase in diagnostic accuracy, better patient selection and establishing prognosis for different types of cancer, namely head and neck cancer. Given its role in redox reactions, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and NAD-related molecules might be involved in carcinogenesis, and their regulation could change as a response to tumor growth.

Aim: Identifying NAD-related biomarkers in head and neck cancers.

Methods: Controlled and natural terms were used in queries for searching scientific publications in databases, namely PubMed®, B-ON and Cochrane. Publications in English, regarding adult patients diagnosed with head and neck cancers, assessing NAD-related molecule expression were included. Experimental, analytical and exploratory cross-sectional studies were included.

Results: 19 publications were included, and assessing biomarker expression in tumor samples (63.2%). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT, 42.1%) and sirtuin (31.6%) expression were the most used biomarkers, and the most used techniques were immunohistochemistry (42.1%) and polymerase chain reaction (31.6%). An increase in NAMPT expression was observed in head and neck cancers in all publications assessing this biomarker, with contradictory results regarding the expression of both sirtuins and CD38.

Conclusions: The increase in NAMPT expression is consistent among head and neck tumors as a biomarker for this pathology.

Keywords: Head and Neck Neoplasms; Biomarkers, NAD

Índice

ÍNDICE.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	14
INTRODUÇÃO.....	17
CANCRO DA CABEÇA E PESCOÇO	17
IMPORTÂNCIA DO DIAGNOSTICO PRECOCE.....	20
PAPEL DO NAD NA CÉLULA	23
ENZIMAS CONSUMIDORAS DE NAD	24
ENZIMAS DE SÍNTESE DE NAD	24
PAPEL DO NAD NO CANCRO.....	26
OBJETIVOS.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
FORMULAÇÃO DA QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO	32
LOCALIZAÇÃO E SELEÇÃO DOS ESTUDOS	32
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	33
ESTRATÉGIA DE PESQUISA	33
EXTRAÇÃO DOS DADOS.....	35
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	51
BIBLIOGRAFIA	53

Índice de tabelas

Tabela 1: Classificação TNM da <i>American Joint Committee on Cancer</i> , 8ª edição, para os tumores malignos da cavidade oral	21
Tabela 2: Formulação da questão de pesquisa segundo o método PICO	32
Tabela 3: Critérios de inclusão e de exclusão para seleção dos artigos para a revisão sistemática da literatura.	33
Tabela 4: Localização tumoral e objetivos das publicações incluídas na revisão sistemática.	36
Tabela 5: Características dos estudos incluídos na revisão sistemática.....	42

Índice de figuras

Figura 1 : Esquema das vias de produção de NAD ⁺ e enzimas chave e sítio de ação dos inibidores de NAMPT. ²³	25
Figura 2: Fluxograma de seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática segundo as recomendações da PRISMA. ³⁸	35
Figura 3: Distribuição dos estudos incluídos segundo a localização tumoral.....	38
Figura 4: Distribuição dos estudos incluídos segundo o tecido de pesquisa do biomarcador.	39
Figura 5: Distribuição dos estudos incluídos segundo o biomarcador pesquisado. .	39
Figura 6: Distribuição dos estudos incluídos segundo o método de pesquisa do biomarcador.	40
Figura 7: Distribuição dos estudos incluídos segundo o tipo de biomarcador pesquisado.....	40
Figura 8 – Diagrama de Venn sobre sobreposição de artigos entre bases de dados	44

Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosina difosfato

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ATP: Adenosina trifosfato

cADPR: ADP-ribose cíclico

DOI: Profundidade de invasão

EBNA: Antígenos nucleares de Epstein-Barr

EBV: Vírus Epstein-Barr

ELISA: Ensaio imunoenzimático

LMP: Proteínas membranares latentes

NA: Ácido nicotínico

NAAD: Dinucleótido de adenina e ácido nicotínico

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADS: NAD sintetase

NAM: Nicotinamida

NAMN: Mononucleótido de ácido nicotínico

NAMPT: Nicotinamida fosforibosiltransferase

NAPRT: Ácido nicotínico fosforibosiltransferase

NGS: *Next generation sequencing*

NMNAT: Nicotinamida mononucleótido adeniltransferase

NMRK: Nicotinamida ribósido cinase

NNMT: Nicotinamida N-metiltransferase

NR: Ribósido de nicotinamida

PARP: Poli(ADP-ribose) polimerase

QPRT: Quinolinato fosforibosiltransferase

ROS: Espécies reativas de oxigénio

SCCHN: Carcinoma epidermóide da cabeça e do pescoço

SIRT: Sirtuína

Introdução

Cancro da cabeça e pescoço

Os tumores malignos da cabeça e do pescoço correspondem a um grupo de neoplasias com origem topográfica nessa região, excluindo os tecidos correspondentes ao sistema nervoso central. Têm na sua maioria origem nas mucosas da cavidade oral, orofaringe, laringe, hipofaringe e nasofaringe, sendo classificados de acordo com a sua origem topográfica, sendo o tipo histológico mais frequente o carcinoma epidermóide ou de células escamosas.¹ Existem outras topografias associadas de forma menos comum a este tipo de lesões malignas, como as glândulas salivares *major* e *minor*, onde se identificam mais comumente adenocarcinomas ou carcinomas adenoides quísticos, ou ainda a mucosa nasal e seios perinasais.¹

Os carcinomas epidermóides da cabeça e do pescoço (SCCHN, do inglês *squamous cell carcinoma of the head and neck*) correspondem em conjunto à sétima neoplasia maligna mais prevalente a nível mundial, com cerca de 880 000 novos casos registados mundialmente em 2020, e uma mortalidade nesse mesmo período de cerca de 440 000 doentes.² Em Portugal, segundo os dados publicados pela Organização Mundial de Saúde, registou-se em 2020 uma incidência bruta de 24,9 casos/100 000 habitantes e mortalidade de 11,3 casos/100 000 habitantes.³ Separando por localização topográfica, regista-se uma maior incidência dos tumores de lábio e cavidade oral (10,8 casos/100 000 habitantes), seguida pelos laríngeos (5,2 casos/100 000 habitantes), hipofaríngeos (4,0 casos/100 000 habitantes), orofaríngeos (3,7 casos/100 000 habitantes), sendo os menos incidentes os tumores da nasofaringe (1,2 casos/100 000 habitantes).³ A sobrevivência global aos cinco anos varia de acordo com a topografia, entre 25 e 61%.^{4,5}

A maioria dos SCCHN encontra-se associada ao consumo de tabaco e álcool, sendo identificado como fator de risco em 75-85% dos casos.⁵ Estes dois fatores aparentam ter um efeito sinérgico no processo carcinogénico, existindo um risco acrescido mesmo para os não fumadores com consumo etílico excessivo.⁶ Também a infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*) tem vindo a apresentar uma crescente importância no processo de carcinogénese

deste tipo de tumores, nomeadamente dos tumores malignos da orofaringe.⁷ Estima-se que este fator de risco seja responsável por 30-35% dos tumores dessa topografia, sendo identificado noutras localizações de SCCHN numa percentagem muito inferior (menos de 6%).⁷ ⁶ Outro fator viral associado a este tipo de neoplasias é o vírus de Epstein-Barr (EBV, do inglês *Epstein-Barr vírus*), cujo processo de carcinogénese nos tumores não queratinizantes e indiferenciados da nasofaringe se encontra mais estudado.^{8,9} De facto, a expressão de oncoproteínas como os antigénios nucleares Epstein-Barr (EBNA, do inglês *Epstein-Barr nuclear antigens*) e as proteínas membranares latentes (LMP, do inglês *latent membrane proteins*) encontram-se envolvidas na carcinogénese, apresentando um baixo reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro, o que pode facilitar a progressão do processo carcinogénico.⁹ Outros fatores de risco conhecidos para os SCCHN são o género masculino, a exposição prévia a radiação ionizante, processos infecciosos crónicos, défice de higiene oral, imunossupressão, consumo de betel e causas congénitas raras.^{5,6} De salientar que muitos destes fatores são comuns a outros tumores malignos das vias aerodigestivas superiores.

Os tumores da cavidade oral correspondem aos SCCHN mais frequentes, e englobam os tumores primários da língua (dois terços anteriores da língua), pavimento bucal, trígono retromolar, rebordo alveolar, palato e mucosa jugal, com mais de um terço localizados na língua ou pavimento bucal.¹⁰ Apesar de se tratar de uma região anatómica de inspeção fácil, o que permitiria uma identificação precoce de lesões malignas e com potencial de malignização, é frequente o diagnóstico com doença localmente avançada, uma vez que os sintomas iniciais podem ser inespecíficos.⁶ Os sinais e sintomas mais frequentes são a presença de lesão ulcerativa na cavidade oral com invasão progressiva, ou de lesão exofítica em doença mais avançada; a associação a queixas álgicas pode ocorrer em lesões iniciais, apesar de poder ser indolor mesmo em estádios mais avançados. Lesões do pavimento bucal estão mais frequentemente associadas a invasão mandibular, enquanto lesões do rebordo alveolar têm origem habitual em regiões de edentulação. Por outro lado, lesões do trígono retromolar apresentam o potencial de invasão da musculatura mastigatória, nomeadamente da região pterigóide e parafaríngea, podendo levar ao surgimento de trismus mesmo em estádios iniciais. Já as lesões da mucosa jugal e do palato duro são frequentemente assintomáticas

em estádios iniciais, condicionando apenas uma alteração do relevo e consistência da mucosa, sendo as lesões da mucosa jugal mais frequentes na linha de oclusão dentária.¹¹

A metastização cervical dos carcinomas da cavidade oral pode ocorrer em fases iniciais da história natural da doença, devido à extensa rede de vasos linfáticos presente na cavidade oral, estimando-se que 30-40% dos doentes apresentem gânglios cervicais invadidos ao diagnóstico, sendo os níveis IB, II e III os mais frequentemente envolvidos.^{6,11}

Existem lesões da cavidade oral conhecidas como sendo condições pré-malignas. A leucoplasia, definida como uma placa de cor branca que não pode ser removida de forma mecânica, é a lesão pré-maligna mais frequente da cavidade oral. Apesar de não existir uma relação direta entre leucoplasia e a existência de displasia, a progressão deste tipo de lesão para carcinoma invasor pode ocorrer em até 18% dos casos. As características da lesão permitem estabelecer relação com o risco de desenvolver doença maligna: lesões homogêneas, sem relevo, com bordos regulares e bem definidos apresentam uma menor taxa de malignização, podendo regredir ao longo do tempo; leucoplasias heterogêneas, de aspeto verrucoso, nodulares ou rugosas e com bordos mal definidos apresentam uma maior possibilidade de malignização e de presença de displasia à biópsia, devendo o seu tratamento incluir a excisão.^{6,11}

Outra lesão pré-maligna da cavidade oral corresponde à eritroplasia, definida como uma lesão ou alteração mucosa de cor vermelha, não atribuível a causa inflamatória, traumática ou vascular. Apresenta um maior potencial de malignização do que a leucoplasia, com a existência de displasia em 9%, carcinoma *in situ* em 40% e carcinoma invasor em 51% dos casos. A terapêutica de eleição para o tratamento deste tipo de lesões é a excisão cirúrgica com margens livres, permitindo um controlo efetivo do processo carcinogénico.^{6,12}

Ainda no que diz respeito a lesões pré-malignas, é importante realçar o palato do fumador invertido, que ocorre quando os fumadores colocam a extremidade do cigarro em combustão dentro da cavidade oral. São alterações associadas ao calor e ocorrem na sua maioria no palato mole, correspondendo a espessamento da mucosa, com possíveis nodulações, associado a eritema, ulceração e algumas

alterações de cor branca. O consumo invertido de tabaco é um hábito endêmico de algumas regiões da Índia, sendo também prevalente nas Caraíbas, Colômbia, Panamá, Venezuela e Sardenha.¹³

Importância do diagnóstico precoce

O diagnóstico de tumores da cavidade oral implica a obtenção de uma amostra de tecido da lesão através da realização de biópsia. Idealmente, a biópsia deve ser realizada por um cirurgião oral, que tem a possibilidade de realizar um exame objetivo completo da cabeça e do pescoço, incluindo a avaliação da lesão local, sinais indiretos de invasão de estruturas adjacentes, e avaliação das regiões de drenagem ganglionar cervicais. A biópsia a realizar pode ser incisional ou excisional. Em quase todas as situações, a biópsia incisional é a mais indicada, na margem da lesão com tecido não tumoral, numa profundidade adequada para o patologista avaliar a invasão do tumor. A biópsia excisional fica reservada a lesões pequenas, cuja excisão total com margens seja facilmente assegurada sem compromisso funcional.¹⁴

Como referido anteriormente, o tipo histológico mais comum identificado na biópsia de uma lesão suspeita é o carcinoma epidermóide, sendo menos frequente a identificação de adenocarcinoma, usualmente com origem em glândulas salivares *minor*. Para se poder estabelecer o correto estadiamento da lesão, para além da descrição do tipo histológico, é necessária a descrição da profundidade de invasão da lesão, pois tem implicações na definição da categoria T da classificação da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.^{1,5}

Em Oncologia, após o diagnóstico de uma doença maligna, é essencial a definição de um estadiamento rigoroso. Existem diversos sistemas de estadiamento disponíveis, sendo o mais utilizado o da AJCC, atualmente na sua 8ª edição, que utiliza a classificação em três categorias: T, correspondente ao tumor primário, que define a extensão local da lesão primária; N, correspondente à extensão a gânglios locorregionais; M, correspondente à metastização à distância. O estadiamento permite uniformizar a categorização de doentes, a informação prestada entre profissionais e a definição da terapêutica mais adequada para cada doente. A Tabela 1 resume a classificação da AJCC para os tumores malignos da cavidade oral.¹

Para estabelecer o estadiamento clínico da lesão tumoral é necessária a realização de um exame clínico cuidado e de exames complementares de diagnóstico. Estes incluem a realização de uma tomografia computadorizada cervico-torácica com contraste, essencial para avaliação ganglionar e da extensão óssea do tumor primário. A realização de ressonância magnética pode auxiliar na definição da extensão a tecidos moles envolventes, devendo a sua utilização ser considerada de acordo com a clínica. A avaliação de metastização à distância com recurso a tomografia por emissão de positrões deve ser considerada se existir doença ganglionar significativa, que aumente a probabilidade de existência de localizações secundárias.⁶

Tabela 1: Classificação TNM da *American Joint Committee on Cancer*, 8ª edição, para os tumores malignos da cavidade oral. Adaptado de *AJCC Cancer Staging Manual*.¹

Categoria T	Critérios
Tx	Não foi possível avaliar o tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com dimensão ≤ 2cm e com DOI ≤ 5mm
T2	Tumor com dimensão ≤ 2cm e com DOI >5mm mas ≤ 10mm ou Tumor com dimensão > 2cm mas ≤ 4cm e com DOI ≤ 10mm
T3	Tumor com dimensão > 4cm ou com DOI > 10mm
T4a	Tumor moderadamente avançado, com invasão de estruturas adjacentes apenas
T4b	Tumor localmente avançado, com invasão de estruturas mais distantes, como o espaço mastigatório, lâminas pterigóides, base do crânio e/ou com encarceramento da artéria carótida
Categoria N	Critérios
Nx	Não foi possível avaliar gânglios locorregionais
N0	Sem metastização de gânglios locorregionais
N1	Metástases em gânglio locorregional único ipsilateral, com dimensão menor ou igual a 3cm, sem extensão extracapsular
N2a*	Metástases em gânglio locorregional único ipsilateral, com dimensão superior a 3cm mas menor ou igual a 6cm, sem extensão extracapsular
N2b	Metástases em múltiplos gânglios locorregionais ipsilaterais, com dimensão menor ou igual a 6cm, sem extensão extracapsular
N2c	Metástases em gânglios locorregionais bilaterais ou contralaterais, com dimensão menor ou igual a 6cm, sem extensão extracapsular
N3a	Metástases ganglionares com dimensão superior a 6cm, sem extensão extracapsular
N3b	Metástases ganglionares com extensão extracapsular
Categoria M	Critérios
M0	Sem metastização à distância
M1	Metastização à distância

DOI: profundidade de invasão

*Na classificação em peça cirúrgica, são incluídas na classificação pN2a todas as peças cirúrgicas com classificação N1 mas com evidência de extensão extracapsular.

A definição da terapêutica no contexto de oncologia depende de uma avaliação multidisciplinar, que deverá incluir clínicos experientes na área, com cirurgiões orais

e maxilofaciais, oncologistas médicos, radioncologistas, imagiologistas e anatomopatologistas. Também a presença de uma equipa de nutrição é fundamental para o sucesso terapêutico destes doentes, dada a localização do tumor primário que frequentemente impede um aporte nutricional adequado. Deste modo, a decisão neste contexto permite maximizar o controlo oncológico e o prognóstico, com melhoria da qualidade de vida.^{5,6,11}

O tratamento de uma neoplasia maligna da cavidade oral implica, sempre que possível, uma intervenção cirúrgica com abordagem ao tumor primário e disseção ganglionar cervical. Deste modo, as recomendações europeias mais recentes preconizam como tratamento *standard* para estádios clínicos cT1-2 cN0 cM0 a realização de cirurgia, seguida por tratamento adjuvante com radioterapia (com eventual quimioterapia concomitante) dependendo da presença de fatores de risco na análise histológica da peça cirúrgica. Por outro lado, as mesmas recomendações indicam a realização de cirurgia com terapêutica adjuvante como tratamento preferencial para estádios cT3-cT4a ou cN1-3 sem metastização à distância, com associação de quimioterapia ao tratamento adjuvante se houver existência de fatores de mau prognóstico como margens com doença (ressecção R1) ou existência de extensão extracapsular na avaliação ganglionar (pN3b). Já no caso de doença irresssecável, é preconizada a realização de radioterapia e quimioterapia concomitantes a título definitivo ou quimioterapia de indução seguida por radioterapia, também a título radical. Por fim, no caso de doença metastizada aquando do diagnóstico, o tratamento deverá ser ajustado para alívio dos sintomas do doente, com realização de quimioterapia e/ou radioterapia a título paliativo.^{5,6} É importante salientar que as recomendações deverão ser sempre adaptadas ao doente em questão, pois as suas comorbilidades poderão conduzir à necessidade de individualização terapêutica, que deverá ser sempre orientada em contexto de consulta multidisciplinar.

A pesquisa de biomarcadores que permitam a melhoria da acuidade diagnóstica e prognóstica, assim como a otimização da escolha de tratamento é uma das áreas de investigação mais marcada em Oncologia. De facto, em neoplasias malignas da mama e do pulmão já é utilizada com frequência a técnica de *next generation sequencing* (NGS) com o objetivo de encontrar mutações específicas que permitam instituir uma terapêutica individualizada, com melhoria da resposta e prognóstico.

Nos SCCHN existem alguns marcadores identificados. A expressão de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) foi identificada como fator preditor independente de sobrevivência global e livre de doença locorregional nestas neoplasias.¹⁵ A sobreexpressão desta tirosina-cinase transmembranar conduziu à utilização de anticorpos monoclonais em concomitância com a radioterapia no tratamento de SCCHN, nomeadamente de cetuximab, com benefício em termos de sobrevivência global.¹⁶ Também a expressão da proteína p16, marcador indireto da infeção por HPV em SCCHN, evidenciou ser um marcador de bom prognóstico, nomeadamente em tumores da orofaringe.¹⁷ Ainda a expressão de PDL-1 (*programmed death ligand 1*) foi identificada como um marcador para seleção de terapêutica sistémica no contexto de SCCHN recorrente ou metastático. O estudo KEYNOTE-048 veio estabelecer a combinação de pembrolizumab com um derivado da platina e 5-fluorouracilo como o regime de primeira linha nestes doentes, ou a utilização de pembrolizumab isolado em doentes com tumores com expressão de PD-L1.¹⁸ Apesar da existência dos marcadores supramencionados, existe a necessidade de identificar novos biomarcadores, por métodos minimamente invasivos, que permitam estabelecer o prognóstico e melhorar a decisão terapêutica nos doentes com SCCHN.

Papel do NAD na célula

A molécula de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) é formada por uma adenosina ligada por dois grupos fosfato a uma ribose, que por sua vez está ligada a nicotinamida (NAM). NAD⁺ é a forma oxidada da molécula, inicialmente descoberta por Harden e Young em 1906, que se converte na sua forma reduzida, NADH. Estes autores observaram a existência um fator que acelerava a fermentação alcoólica, que 25 anos mais tarde foi identificado por Hans Von Euler-Chelpin como uma adenina, um açúcar redutor e um fosfato. Posteriormente, Otto Heinrich Warburg descobriu a capacidade deste composto de transferir H⁺ de uma molécula para outra, identificando a NAM como um local onde se efetuavam reações de oxidação-redução.¹⁹

Em conjunto, o par NADH/NAD⁺ está envolvido na transferência de eletrões entre moléculas, ou seja, reações de oxidação-redução (redox), apresentando um papel fundamental em vias metabólicas como a glicólise, na conversão de piruvato para

lactato e piruvato para acetilcoenzima A, na beta-oxidação dos ácidos gordos, no ciclo do ácido cítrico e na fosforilação oxidativa. O NAD tem um papel fundamental no metabolismo energético, nomeadamente na produção de adenosina trifosfato (ATP) quer por via aeróbia, quer por via anaeróbia.¹⁹

Enzimas consumidoras de NAD

Para além do seu papel como cofator em vias metabólicas, o NAD⁺ é também um substrato essencial de uma vasta gama de proteínas reguladoras. São exemplos desta função do NAD as sirtuínas (SIRT), que são fundamentais na regulação do metabolismo e no processo de envelhecimento, assim como as poli(ADP-ribose) polimerases (PARPs), que estão envolvidas na reparação do ADN e na morte celular. Também as hidrolases de ADP-ribose cíclico (cADPR), como a CD38, necessitam de NAD para a sua função, sendo responsáveis pelo controlo de fluxos intracelulares de cálcio, relevantes na resposta imunitária e que se encontram frequentemente alterados nos processos de carcinogénese.^{19,20}

Alterações no metabolismo de NAD⁺ estão associadas ao envelhecimento e a diferentes patologias, nomeadamente metabólicas e neuromusculares.¹⁹ O aumento dos níveis de NAD⁺ aparenta ser benéfico num largo espetro de doenças associadas a alterações do metabolismo por melhoria da homeostasia mitocondrial.¹⁹ A biogénese mitocondrial e a mitofagia são duas vias que regulam o conteúdo mitocondrial e o metabolismo, permitindo a manutenção da homeostase. A regulação rigorosa entre esses processos é essencial para a adaptação celular em resposta ao estado metabólico, nomeadamente como consequência de sinais intracelulares ou do meio extracelular.²¹ Em contrapartida, baixos níveis de NAD⁺ aparentam ter associação com patologias como diabetes e alterações no metabolismo lipídico.²²

Enzimas de síntese de NAD

Nas reações redox o NAD é interconvertido entre as formas oxidada e reduzida. Já nas reações em que é substrato, existe um consumo de NAD pelas diferentes enzimas acima referidas, sendo necessários mecanismos que permitam a reposição dos seus níveis intracelulares, de modo a não existir compromisso das vias metabólicas. Deste modo, o NAD intracelular pode ser produzido *de novo* ou

originado a partir de precursores moleculares como NAM, ácido nicotínico (NA) e ribósido de NAM (NR).¹⁹Na figura 1 encontram se as várias vias de síntese de NAD.

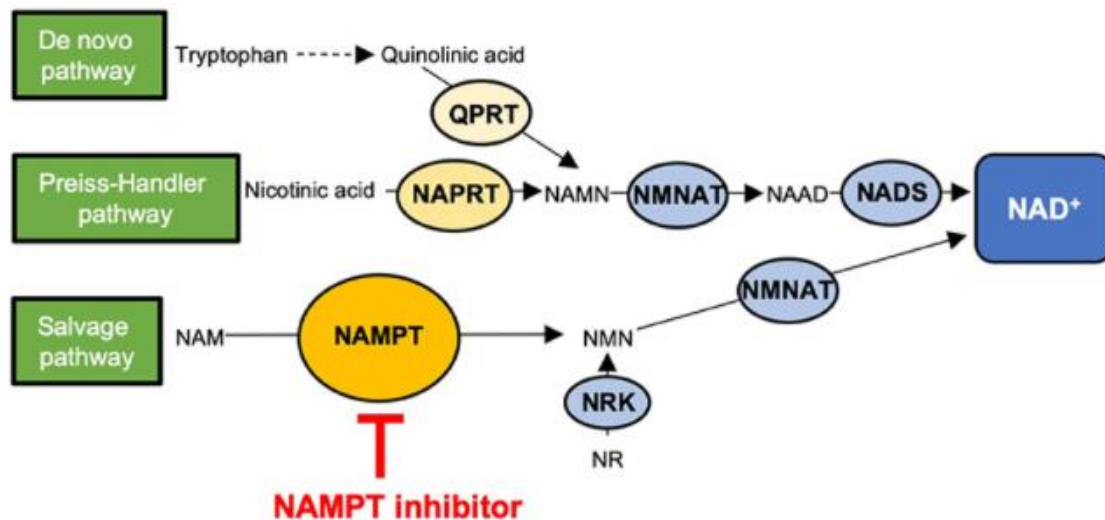


Figura 1: Esquema das vias de produção de NAD⁺ e enzimas chave e sítio de ação dos inibidores de NAMPT.²³

A síntese de NAD pela via *de novo* é realizada a partir de triptofano num processo de várias etapas enzimáticas também conhecido como via da quinurenina. Esta ocorre principalmente a nível hepático e culmina com a síntese de NA mononucleótido (NAMN) a partir de ácido quinolínico, pela ação da enzima quinolinato fosforibosiltransferase (QPRT). O NAMN é então convertido em dinucleótido de adenina e ácido nicotínico (NAAD) e, subsequentemente, em NAD, pela ação da NAD sintetase (NADS).^{19,23} O NAMN pode também ser obtido através da conversão do NA pela ação da enzima NA fosforibosiltransferase (NAPRT) na via de Preiss-Handler.^{19,24,25}

A síntese de NAD a partir de NAM decorre em duas etapas. Na primeira etapa a NAM é convertida em NAM mononucleótido (NMN) pela enzima NAM fosforibosiltransferase (NAMPT). O NMN pode ser obtido por outra via *salvage* (ou de reciclagem), com utilização de NR, que pode ser convertido em NMN através da NAM ribósido cinase (NMRK). O NMN é por sua vez convertido em NAD pela enzima NAM mononucleótido adeniltransferase (NMNAT). Esta enzima apresenta

diferentes isoformas (NMNAT1, NMNAT2, NMNAT3), que tanto reconhecem NAMN como NMN como substratos, convertendo-os em NAD.^{19,26}

Papel do NAD no cancro

Como a produção de energia e a sinalização dependente de NAD são cruciais para a proliferação celular, o papel desta molécula no processo de carcinogénese é relevante. Sendo as alterações metabólicas um dos *hallmarks* dos tumores malignos, é expectável que exista um aumento da necessidade de NAD nas células tumorais pela sua elevada taxa metabólica, constituindo as vias de síntese desta molécula um potencial alvo para as terapêuticas antitumorais.^{27,28} Deste modo, as principais enzimas de biossíntese de NAD em humanos, NAMPT e NAPRT, estão envolvidas no desenvolvimento de novas terapias, em tumores com sobreexpressão de NAMPT e diminuição de expressão de NAPRT.²⁹⁻³¹

A NAPRT aumenta os níveis de NAD intracelular e previne o *stress* oxidativo, fenómeno causado por um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigénio (ROS) em células e tecidos.³² As ROS podem desempenhar vários papéis fisiológicos, como sinalização celular, e são normalmente gerados como subprodutos do metabolismo do oxigénio. Apesar disso, agressores ambientais como a radiação ultravioleta e ionizantes, poluentes e metais pesados contribuem para aumentar significativamente a produção de ROS, gerando *stress* oxidativo. Deste modo, a prevenção do *stress* oxidativo é explorada como uma abordagem terapêutica para prevenção e tratamento de doenças oncológicas.³³ Por outro lado, não deve ser descurado o papel da radioterapia no tratamento de doenças oncológicas, nomeadamente do foro de cabeça e do pescoço, cuja produção de ROS e indução de *stress* oxidativo em células tumorais é um dos mecanismos radiobiológicos fundamentais para o seu efeito citotóxico. A inibição de produção de NAD pode potenciar a ação da radiação ionizante, não só por promover a maior produção de ROS, mas também por diminuir a ação de PARP e SIRT, uma vez que estas enzimas consomem NAD no processo de reparação de ADN e manutenção da integridade do genoma.^{34,35}

Também a ausência de oxigénio intracelular, a hipoxia tumoral, é um fator de crescente importância na investigação em Oncologia, condicionando piores respostas à terapêutica sistémica e com radiações ionizantes. Um ambiente

hipóxico origina uma resposta inicial com consumo de NAD^+ , rapidamente contrabalançado pelo recrutamento de NAM para conversão em NAD, ocorrendo um aumento dos níveis desta molécula nestas condições.³⁶

É importante conhecer os padrões de expressão das diferentes enzimas envolvidas na produção de NAD nos tecidos normais e tumores malignos, assim como de mutações que impliquem uma diminuição da expressão de NAMPT, para o uso dos inibidores de NAMPT como regime terapêutico em Oncologia. O NAMPT tem um papel relevante na imunidade, metabolismo energético e respostas fisiológicas e fisiopatológicas ao *stress*, influenciando ainda o funcionamento das enzimas dependentes de NAD, reparação do ADN, equilíbrio das reações redox, sinalização extracelular e regulação de células estaminais.^{23,32} A título de exemplo, a co-administração de inibidores de NAMPT com NA pode condicionar uma ação inibitória seletiva de células tumorais. Constituindo uma terapêutica promissora, os inibidores de NAMPT têm um elevado grau de toxicidade, que pode ser ultrapassado pelo uso de NA como citoprotetor dos tecidos normais.³² No entanto, a utilidade clínica dos inibidores de NAMPT ainda é limitada, sugerindo que existe uma necessidade de refinar a sua ação para que se torne seletiva de células tumorais.³⁰

Também a expressão de outras enzimas envolvidas no metabolismo da NAD pode estar envolvida no processo de carcinogénese. A expressão elevada de NAM N-metiltransferase (NNMT), uma enzima envolvida no metabolismo da NAM, é frequentemente identificada em diferentes tipos de tumores malignos, estando associada a uma disrupção do metabolismo de NAD.³⁷

Objetivos

Tendo em conta a evidência existente da expressão de enzimas relacionadas com o metabolismo de NAD no processo de carcinogénese, torna-se relevante estudar o seu papel enquanto potencial biomarcador para diagnóstico, tratamento e prognóstico em Oncologia.

Este trabalho tem como objetivo a obtenção de evidência científica sobre biomarcadores de tumores malignos relacionados com o metabolismo de NAD, nomeadamente em SCCHN, com base numa revisão sistemática da literatura. Para cumprir o objetivo proposto, foram definidos como objetivos específicos a obtenção de expressões de pesquisa de acordo com a metodologia de participantes, intervenção, comparação e *outcome* (PICO) para diferentes bases de dados de literatura científica e a sistematização da informação obtida de acordo com as recomendações da *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis* (PRISMA).^{38,39}

Materiais e Métodos

De acordo com o *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, uma revisão sistemática tem como objetivo a recolha de toda a informação disponível para responder a uma questão científica específica, de acordo com critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos, utilizando métodos sistemáticos de pesquisa e recolha de dados por forma a minimizar viés e permitir a obtenção de conclusões com o maior nível de evidência possível.³⁹ Deste modo, este tipo de trabalhos é considerado como evidência de elevada qualidade, por reunir toda a informação de relevo sobre uma determinada questão.

O crescimento exponencial da literatura científica impõe dificuldades na definição de estratégias terapêuticas adequadas no contexto das ciências da saúde, estabelecendo-se as revisões sistemáticas da literatura como um método de sistematização desta crescente evidência e, deste modo, permitindo retirar conclusões sobre questões científicas específicas.⁴⁰

A utilização de métodos sistematizados pauta a realização de uma revisão sistemática da literatura. A metodologia deverá ser rigorosa, sendo crucial definir uma questão de investigação e um protocolo de investigação, com documentação de todo o processo; assegurar uma pesquisa exaustiva, para garantir que toda a literatura relevante é incluída; realizar uma pesquisa com elevada sensibilidade, com formulação da mesma em diferentes bases de dados; extração de dados de forma independente por dois investigadores, para garantir que a seleção de publicações para inclusão e a extração de dados são o mais objetivas possíveis. A utilização de métodos com estes critérios tem como objetivo a redução de viés de seleção, conduzindo a uma metodologia transparente e replicável por qualquer investigador que a utilize com os mesmos critérios.^{39,40}

No presente trabalho, e com o objetivo de avaliar a expressão de biomarcadores relacionados com o metabolismo de NAD em tumores da cabeça e do pescoço, foi necessária a execução de etapas sucessivas para realização de uma revisão sistemática, nomeadamente: formulação da questão de investigação; definição de critérios de inclusão e de exclusão; desenvolvimento de estratégias de pesquisa com elevada sensibilidade; seleção das publicações a incluir de acordo com os

critérios pré estabelecidos e avaliação da sua qualidade; extração de dados dos estudos selecionados e síntese dos dados recolhidos.⁴⁰

Formulação da questão de investigação

Uma revisão sistemática da literatura deve conter a discriminação dos critérios de elegibilidade. Estes devem ser delineados com base na questão de investigação, no tipo de desenho dos estudos a incluir, nos seus participantes e nas comparações a estabelecer. Deste modo, o esquema PICO é um dos mais utilizados para estabelecer a questão de investigação de uma revisão sistemática e, conseqüentemente, as expressões de pesquisa a utilizar.³⁹

No presente trabalho foi colocada a seguinte questão de investigação: existem biomarcadores relacionados com o metabolismo de NAD com expressão diferencial em amostras biológicas de doentes com tumores de cabeça e do pescoço, comparativamente a indivíduos sem diagnóstico de neoplasias? A Tabela 2 discrimina a questão acima descrita de acordo com a metodologia PICO.

Tabela 2: Formulação da questão de pesquisa segundo o método PICO

Item PICO	Descrição
Participantes	Indivíduos com tumores da cabeça e do pescoço
Intervenção	Recolha de biomarcadores
Comparação	Grupo de controlo, constituído por indivíduos sem tumores da cabeça e do pescoço
<i>Outcomes</i>	Expressão diferencial dos biomarcadores entre os grupos

Localização e seleção dos estudos

Numa revisão sistemática da literatura, o processo de seleção de publicações para inclusão deverá ser realizado de forma individual por dois investigadores através da leitura dos títulos e resumos de todas as publicações obtidas pela expressão de pesquisa, seguida por uma leitura do conteúdo integral dos estudos selecionados, novamente de forma independente.^{39,40} Numa fase inicial, após a aplicação das palavras-chave e de filtros de pesquisa, o título e o resumo de cada artigo serão verificados, sendo incluídos os estudos que estiverem de acordo com os critérios de inclusão. Depois deste passo, será realizada a leitura na íntegra dos artigos, e serão considerados não elegíveis aqueles que apresentem pelo menos um dos critérios de exclusão.

Para o presente estudo, foram inicialmente avaliadas as palavras-chave na base de dados de descritores em ciências da saúde (MeSH, do inglês *Medical Subject Headings*), na plataforma informática *MeSH Browser*, tendo sido obtidos como termos MeSH “head and neck neoplasm” e “head and neck cancer”. Foram também considerados os termos “oral cancer”, “NAD”, “CD38”, “NAPRT”, “NAMPT”, “PBEF1”, “visfatin”, “level”, “expression”, “quantity”, “activity”, “alteration”, “change”, “mutation” e “polymorphism” que, apesar de não serem descritores MeSH, correspondem a termos de pesquisa, pois surgem na literatura específica da questão em estudo.

Critérios de inclusão e exclusão

Como acima definido, uma revisão sistemática obriga a uma definição clara de critérios de inclusão e de exclusão, com o objetivo de serem obtidas as publicações relevantes para a questão científica em estudo.⁴⁰ A Tabela 3 resume os critérios de seleção específicos definidos e aplicados no presente estudo.

Tabela 3: Critério de inclusão e de exclusão para seleção dos artigos para a revisão sistemática da literatura.

Critério	Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Participantes	Idade ≥ 18 anos Diagnóstico de neoplasia da cabeça e do pescoço	Idade <18 anos; Tumores noutras localizações (ex: esófago) ou outra tipologia de tumores
Intervenção	Recolha de biomarcadores em doentes com neoplasias da cabeça ou pescoço	Ausência de avaliação das variáveis explícitas nos critérios de inclusão
Comparação	Indivíduos sem evidência de neoplasias	Artigos sem existência de grupo de comparação sem diagnóstico de neoplasia
Outcomes	Expressão diferencial de biomarcadores em doentes com neoplasias da cabeça e do pescoço	Ausência de avaliação diferencial entre grupos dos biomarcadores recolhidos
Tipo de estudo	Estudos experimentais, quase experimentais, transversais analíticos ou exploratórios	Revisões Sistemáticas
Idioma de publicação	Inglês	Outras línguas não constantes dos critérios de inclusão

Estratégia de pesquisa

Para a identificação de estudos relevantes em conformidade com os critérios definidos, realizaram-se pesquisas que incluíssem estudos em inglês, recorrendo às

seguintes plataformas eletrônicas de bases de dados: Cochrane, PubMed e B-ON (cf. Quadro 1).

Foram utilizados os termos previamente citados, conjugados com os operadores booleanos da seguinte forma na base de dados Pubmed: ((head and neck neoplasm [MeSH Terms]) OR (head and neck cancer[MeSH Terms]) OR ("oral cancer")) AND (NAD OR NAMPT OR PBEF OR PBEF1 OR visfatin OR NAPRT OR NAPRT1 OR CD38) AND (level OR expression OR quantity OR activity OR alteration OR change OR mutation OR polymorphism) NOT review. Na B-ON e Cochrane a expressão utilizada foi: ((head and neck neoplasm) OR (head and neck cancer) OR ("oral cancer")) AND (NAD OR NAMPT OR PBEF OR PBEF1 OR visfatin OR NAPRT OR NAPRT1 OR CD38) AND (level OR expression OR quantity OR activity OR alteration OR change OR mutation OR polymorphism) NOT review AND (humans).

Quadro 1: Introdução dos descritores em motores de busca científica segundo expressões de pesquisa.

Motor de busca científica	Descritores	Período temporal	Limitadores	Resultados
S1 PubMed®	((head and neck neoplasm[MeSH Terms]) OR (head and neck cancer[MeSH Terms]) OR ("oral cancer")) AND (NAD OR NAMPT OR PBEF OR PBEF1 OR visfatin OR NAPRT OR NAPRT1 OR CD38) AND (level OR expression OR quantity OR activity OR alteration OR change OR mutation OR polymorphism) NOT review	Sem restrição	Estudos em humanos; Língua Inglesa; Exclusão de revisões sistemáticas	125
S2 B-ON	((head and neck neoplasm) OR (head and neck cancer) OR ("oral cancer")) AND (NAD OR NAMPT OR PBEF OR PBEF1 OR visfatin OR NAPRT OR NAPRT1 OR CD38) AND (level OR expression OR quantity OR activity OR alteration OR change OR mutation OR polymorphism) NOT review AND (humans)	Sem restrição	Estudos em humanos; Língua Inglesa; Exclusão de revisões sistemáticas	67
S3 Cochrane	((head and neck neoplasm) OR (head and neck cancer) OR ("oral cancer")) AND (NAD OR NAMPT OR PBEF OR PBEF1 OR visfatin OR NAPRT OR NAPRT1 OR CD38) AND (level OR expression OR quantity OR activity OR alteration OR change OR mutation OR polymorphism) NOT review AND (humans)	Sem restrição	Estudos em humanos; Língua Inglesa; Exclusão de revisões sistemáticas	0

Da pesquisa nas bases de dados foram obtidas 125 publicações na base de dados PubMed®, 67 na base de dados B-ON e nenhuma na base de dados da Cochrane visto que todos os resultados foram revisões sistemáticas. Foram conseqüentemente removidos os estudos duplicados entre bases de dados, resultando num total de 148 artigos. Após a análise de título e resumo foram excluídas 107 publicações por não cumprirem os critérios de seleção, originando um total de 41 artigos. Após a avaliação do texto integral foram incluídas 19 publicações na presente revisão sistemática. O fluxograma da PRISMA referente às etapas de seleção de artigos encontra-se detalhado na Figura 2.³⁸

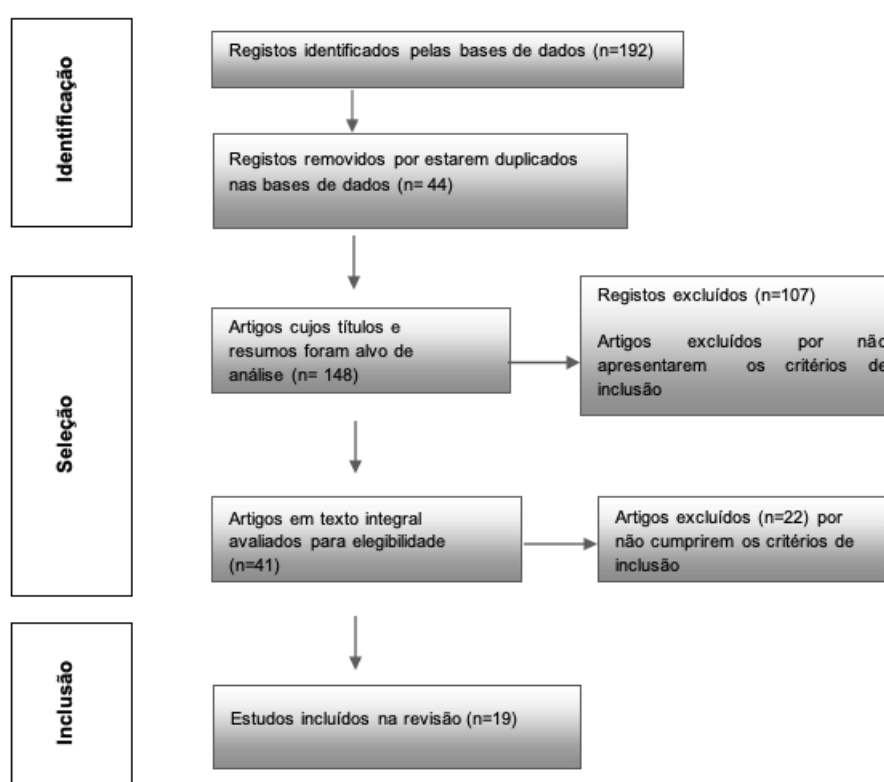


Figura 2: Fluxograma de seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática segundo as recomendações da PRISMA.³⁸

Extração dos dados

A extração dos dados foi realizada por dois investigadores utilizando um formulário padronizado que incluiu informações sobre título e autores, ano e país da publicação, tipo de estudo, localização tumoral, biomarcador pesquisado e metodologia de pesquisa, tecido de avaliação e alteração de expressão identificada. A Tabela 4 sumaria os objetivos principais de cada publicação incluída.

Tabela 4: Localização tumoral e objetivos das publicações incluídas na revisão sistemática.

Autor, ano	País	Localização	Objetivo
Choi <i>et al.</i> , 2021 ⁴¹	USA	Várias localizações HN	Pesquisar a expressão de SIRT6 em tumores de cabeça e do pescoço em modelos <i>in vivo</i> e em doentes
Zhang <i>et al.</i> , 2021 ⁴²	China	Laringe e orofaringe	Avaliar a expressão de plasmócitos C19+CD38+ no microambiente tumoral em tumores de cabeça e do pescoço HPV positivos e negativos.
Kao <i>et al.</i> , 2019 ⁴³	Tailândia	Cavidade oral	Pesquisar a expressão de microRNA miR-31 e de SIRT3 em tumores malignos da cavidade oral.
Ge <i>et al.</i> , 2018 ⁴⁴	China	Nasofaringe	Determinar o nível de expressão de CD38 em tumores malignos da nasofaringe, investigar o papel do CD38 no comportamento biológico destes tumores e possíveis mecanismos envolvidos.
Sowa <i>et al.</i> , 2018 ⁴⁵	Polónia	Parótidas	Avaliar níveis serológicos de adiponectina, leptina, e NAMPT em doentes com tumores parotídeos benignos e malignos.
Wang <i>et al.</i> , 2017 ⁴⁶	China / USA	Cavidade oral	Avaliar a expressão de NAMPT em doentes com carcinoma da cavidade oral e avaliar o efeito do trióxido de arsénico em linhas celulares deste tipo de tumores.
Andrade <i>et al.</i> , 2013 ⁴⁷	Brasil	Várias localizações HN	Avaliar biomarcadores laboratoriais com potencial papel prognóstico e de monitorização em tumores de cabeça e do pescoço.
Yu-Duan <i>et al.</i> , 2013 ⁴⁸	Tailândia	Cavidade oral	Avaliar a expressão plasmática de NAMPT em doentes com carcinoma da cavidade oral.
Yuvaraj <i>et al.</i> , 2013 ⁴⁹	Índia	Cavidade oral	Determinar as diferenças espectroscópicas entre doentes com carcinoma da cavidade oral e controlos no que respeita a autofluorescência a 405nm de excitação.
Alhazzazi <i>et al.</i> , 2011 ⁵⁰	USA	Cavidade oral	Avaliar o papel das sirtuínas no processo de carcinogénese oral.
Feng <i>et al.</i> , 1999 ⁵¹	Singapura	Nasofaringe	Avaliar os níveis de linfócitos circulantes com expressão de CD38 em doentes com tumores malignos da nasofaringe.
Lu <i>et al.</i> , 2020 ⁵²	China	Tiroide	Pesquisar a expressão de linfócitos T CD8+CD38+, CD8+HLA-DR+ e CD4+CD25+ circulantes em doentes com tumores da tiroide e controlos.
Belousov <i>et al.</i> , 2019 ⁵³	Rússia	Tiroide	Pesquisar biomarcadores circulantes em doentes com tumores da tiroide, utilizando técnicas de proteómica.
Sawicka-Gutaj <i>et al.</i> , 2018 ⁵⁴	Polónia	Tiroide	Analisar a expressão de NAMPT em tecido tiroideu de doentes com doença de Grave com e sem orbitopatia, bócio multinodular, tumores malignos da tiroide e controlos.
Turbat-Herrera <i>et al.</i> , 2018 ⁵⁵	USA	Tiroide	Avaliar a expressão de NAMPT e cistationa beta-sintetase em tumores da tiroide.
Qu <i>et al.</i> , 2017 ⁵⁶	China	Tiroide	Pesquisar o papel das sirtuínas nos carcinomas papilares da tiroide, nomeadamente da SIRT6.
Wu <i>et al.</i> , 2016 ⁵⁷	China	Tiroide	Determinar a expressão de HIC1 e SIRT1 em tumores papilares da tiroide.
Sawicka-Gutaj <i>et al.</i> , 2015 ⁵⁸	Polónia	Tiroide	Avaliar a expressão de NAMPT em amostras tiroideias malignas e benignas, utilizando métodos de PCR.
Shackelford <i>et al.</i> , 2013 ⁵⁹	USA	Tiroide	Avaliar a expressão de NAMPT e de SIRT3 em tumores bem diferenciados da tiroide.

Resultados

Foram incluídas 19 publicações científicas neste trabalho, cujas características se encontram resumidas na Tabela 5. A maioria dos trabalhos foi desenvolvida na China ou nos Estados Unidos da América, correspondendo a 52,6%. A maioria dos artigos incluídos abordou a pesquisa de biomarcadores em tumores da tireoide (42,1%), seguida por tumores da cavidade oral (26,3%) e da nasofaringe (10,5%). Três estudos realizaram a pesquisa de biomarcadores em mais do que um tipo de tumor da cabeça e do pescoço (Figura 3).

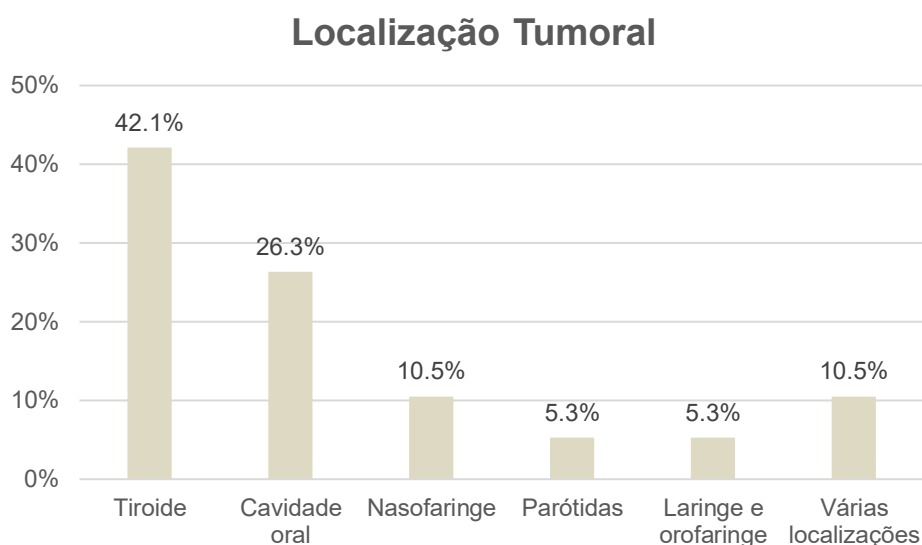


Figura 3: Distribuição dos estudos incluídos segundo a localização tumoral.

Em termos de amostra biológica usada para pesquisa do biomarcador, a grande maioria (63,2%) das publicações refere ter realizado a pesquisa em tecido tumoral, com 31,6% dos estudos a realizar a pesquisa em produto de sangue periférico (sangue total, soro ou plasma). Apenas um artigo é referente à pesquisa de biomarcadores na saliva, tendo sido medido o NADH/NAD(P)H por métodos de espectroscopia de fluorescência, identificando-se diferenças no espectro obtido na excitação a 405nm (Figura 4, Tabela 5).

Na Figura 5 encontra-se discriminada a distribuição das publicações segundo o biomarcador pesquisado. É possível verificar que a maioria dos estudos utilizou como biomarcador alvo a NAMPT (42,1%) e SIRTs (SIRT1, SIRT3 e SIRT6) (31,6%), sendo a pesquisa da expressão de CD38 em linfócitos do microambiente tumoral o biomarcador pesquisado em 26,3% dos casos. Como referido, apenas um

artigo abordou a pesquisa de NADH/NAD(P)H como biomarcador de tumores de cabeça e do pescoço.

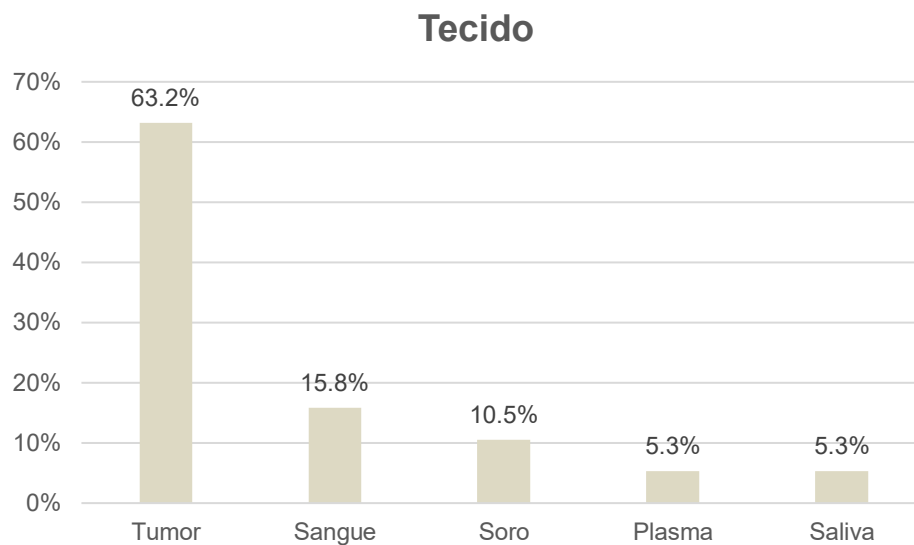


Figura 4: Distribuição dos estudos incluídos segundo o tecido de pesquisa do biomarcador.

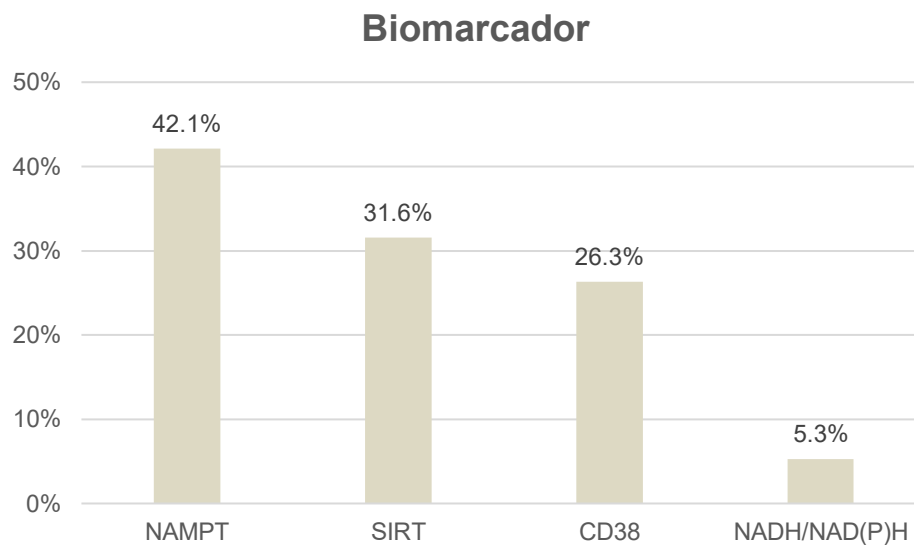


Figura 5: Distribuição dos estudos incluídos segundo o biomarcador pesquisado.

Considerando o método de pesquisa dos referidos biomarcadores, foi mais utilizada a imunohistoquímica (42,1%) para detetar a proteína, e métodos de PCR, normalmente PCR quantitativo em tempo real (31,6%), para quantificar o RNA. A citometria de fluxo foi realizada em 15,8% dos estudos, e em todos eles para pesquisa da expressão de CD38. Foi ainda utilizada a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) em 10,5% dos casos. De entre outros métodos utilizados

encontra-se a espectroscopia com autofluorescência para medir NAD, a imunofluorescência e sequenciação de RNA *single cell*, utilizados na pesquisa de expressão de CD38, e métodos de proteômica, com realização de eletroforese bidimensional com espectroscopia de massa para identificação do biomarcador diferencialmente expresso, neste caso para pesquisa de NAMPT (Figura 6).

Tendo em conta a metodologia utilizada, o tipo de biomarcador pesquisado foi proteína em 78,9% das publicações, RNA em 36,8% e intensidade de fluorescência em apenas 5,3% das publicações (Figura 7).

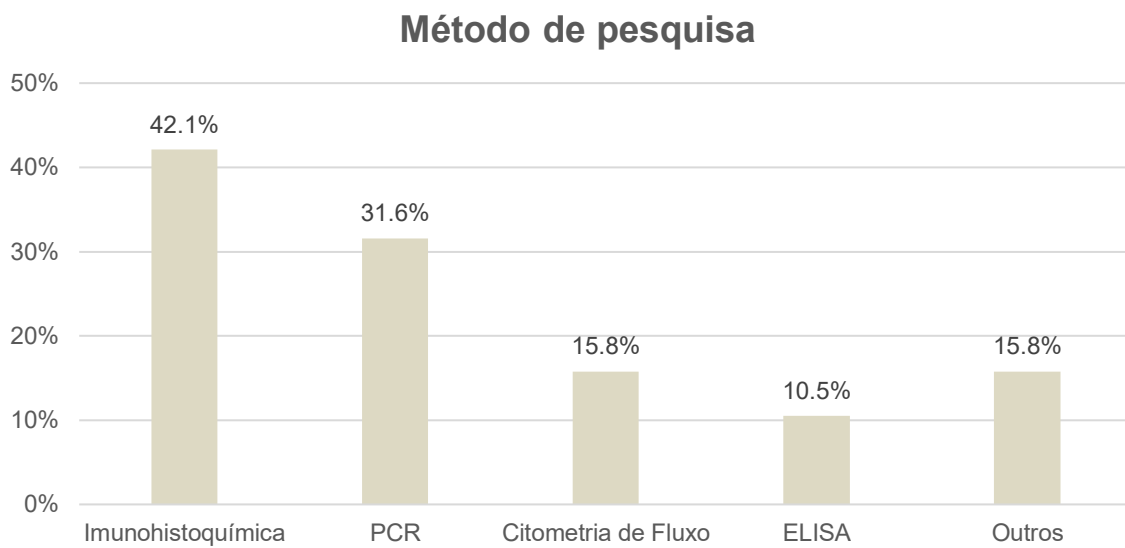


Figura 6: Distribuição dos estudos incluídos segundo o método de pesquisa do biomarcador.

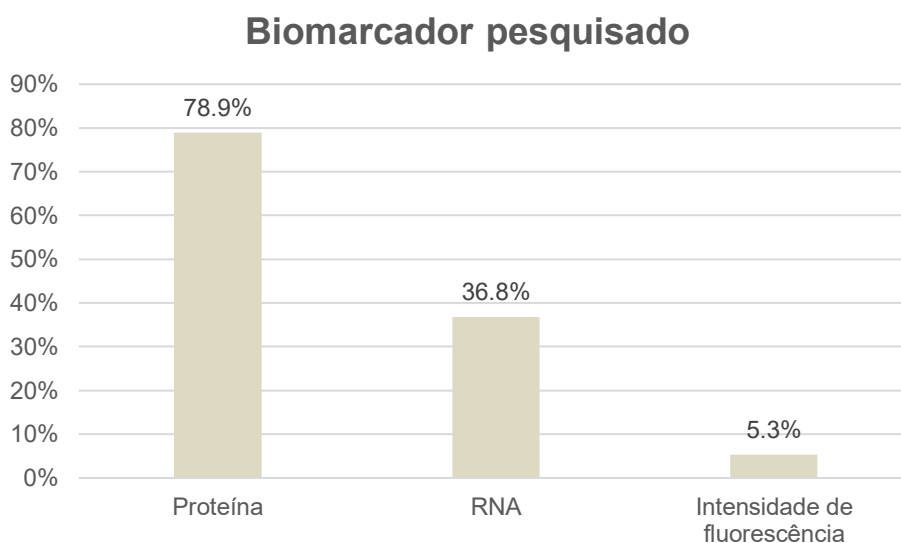


Figura 7: Distribuição dos estudos incluídos segundo o tipo de biomarcador pesquisado.

É possível observar que todos os estudos com pesquisa de NAMPT verificaram um aumento da sua expressão em doentes com tumores de cabeça e do pescoço relativamente aos controlos. Na expressão de SIRT6 verificou-se um aumento de expressão em 66,7% das publicações com avaliação deste biomarcador e uma diminuição em 33,3%. Verificou-se ainda um aumento de expressão de CD38 em 80,0% das publicações em que foi pesquisado este biomarcador, com uma publicação a não revelar diferenças entre casos e controlos neste parâmetro (Tabela 5).

Tabela 5: Características dos estudos incluídos na revisão sistemática

Autor, ano	País	Localização	Casos / controles	Idade casos (anos)	Sexo masculino casos (%)	Tecido de pesquisa	Biomarcador	Medição	Tecnologia / Técnica de detecção	Resultado
Choi et al., 2021 ⁴¹	USA	Várias localizações SCCHN	41 / 13 364*	NS	NS	Tumor	SIRT6	Proteína, RNA	IHC, real time RT-PCR	Diminuição da expressão
Zhang et al., 2021 ⁴²	China	Laringe e orofaringe	20	38-77	70,0%	Tumor	CD38	Proteína, RNA	IF, sequenciação de RNA <i>single cell</i>	Presença de plasmócitos (CD19+CD38+) aumentada no microambiente tumoral em HPV+, associado a melhor prognóstico
Kao et al., 2019 ⁴³	Tailândia	Cavidade oral	43 / 43	Média: 57,7	93,0%	Tumor	SIRT3	RNA	qRT-PCR	Diminuição da expressão em 63% dos casos
Ge et al., 2018 ⁴⁴	China	Nasofaringe	20 / 17	Média: 45	75,6%	Tumor	CD38	Proteína	IHC	Aumento da expressão
Sowa et al., 2018 ⁴⁵	Polónia	Parótidas	59 / 30	Média: 56,3	37,3%	Soro	NAMPT	Proteína	ELISA	Aumento de expressão, sem diferença entre tipos de tumor
Wang et al., 2017 ⁴⁶	China / USA	Cavidade oral	50 / 10	NS	NS	Tumor ^s	NAMPT	Proteína	IHC	Aumento da expressão
Andrade et al., 2013 ⁴⁷	Brasil	Várias localizações SCCHN	23 / 30	28-75	78,3%	Sangue	CD38	Proteína	Citometria de fluxo	Aumento de expressão de CD38 em linfócitos T CD8
Yu-Duan et al., 2013 ⁴⁸	Tailândia	Cavidade oral	51 / 57	Média: 52,6	100%	Plasma	NAMPT	Proteína	ELISA	Aumento da expressão
Yuvaraj et al., 2013 ⁴⁹	Índia	Cavidade oral	63 / 60	25-80	NS	Saliva	NADH NAD(P)H	Intensidade de fluorescência	Espectroscopia com autofluorescência	Diferenças entre doentes e controlos na excitação a 405nm, no intervalo de 445-460nm e a 520nm.
Alhazzazi et al., 2011 ⁵⁰	USA	Cavidade oral	42 / 10	NS	NS	Tumor ^s	SIRT3	Proteína	IHC	Aumento da expressão
Feng et al., 1999 ⁵¹	Singapura	Nasofaringe	28 / 28	NS	NS	Soro	CD38	Proteína	Citometria de fluxo	Sem diferenças nos linfócitos CD4+ e CD8+

(continua na página seguinte)

(continuação da Tabela 5)

Autor, ano	País	Localização	Casos / controles	Idade casos (anos)	Sexo masculino casos (%)	Tecido de pesquisa	Biomarcador	Medição	Tecnologia / Técnica de detecção	Resultado
Lu <i>et al.</i> , 2020 ⁵²	China	Tiroide	79 / 112	19-72	24,1%	Sangue	CD38	Proteína	Citometria de fluxo	Aumento da expressão em linfócitos CD8+
Belousov <i>et al.</i> , 2019 ⁵³	Rússia	Tiroide	60 / 20	NS	NS	Sangue	NAMPT	Proteína	Proteômica (DIGE, MS)	Aumento da expressão
Sawicka-Gutaj <i>et al.</i> , 2018 ⁵⁴	Polónia	Tiroide	40 / 39	40-65	40,0%	Tumor	NAMPT	RNA	qPCR	Aumento da expressão
Turbat-Herrera <i>et al.</i> , 2018 ⁵⁵	USA	Tiroide	48 / 12	NS	NS	Tumor [§]	NAMPT	Proteína	IHC	Aumento da expressão
Qu <i>et al.</i> , 2017 ⁵⁶	China	Tiroide	391 / 45	Média: 47,0	27,6%	Tumor	SIRT6	Proteína e RNA	IHC e qRT-PCR	Aumento da expressão
Wu <i>et al.</i> , 2016 ⁵⁷	China	Tiroide	40	NS	35,0%	Tumor	SIRT1	Proteína e RNA	IHC e qRT-PCR	Aumento da expressão
Sawicka-Gutaj <i>et al.</i> , 2015 ⁵⁸	Polónia	Tiroide	40 / 67	18-81	40,0%	Tumor	NAMPT	RNA	qPCR	Aumento da expressão
Shackelford <i>et al.</i> , 2013 ⁵⁹	USA	Tiroide	71 / 48 38 / 8	NS	NS	Tumor [§]	NAMPT SIRT3	Proteína	IHC	Aumento da expressão para ambos os biomarcadores

DIGE: electroforese bidimensional em gel; ELISA: ensaio imunoenzimático; IF: imunofluorescência; IHC: imunohistoquímica; MS: espectroscopia de massa; NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferase; NMR: ressonância magnética nuclear; NS: não especificado; qPCR: reação de polimerase em cadeia quantitativa; RT-PCR: reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa; SCCHN: carcinoma epidermóide da cabeça e do pescoço; USA: Estados Unidos da América. *Em comparação com uma base de dados de tecidos normais; [§]utilização de *microarrays* de tecidos adquiridos a empresas.

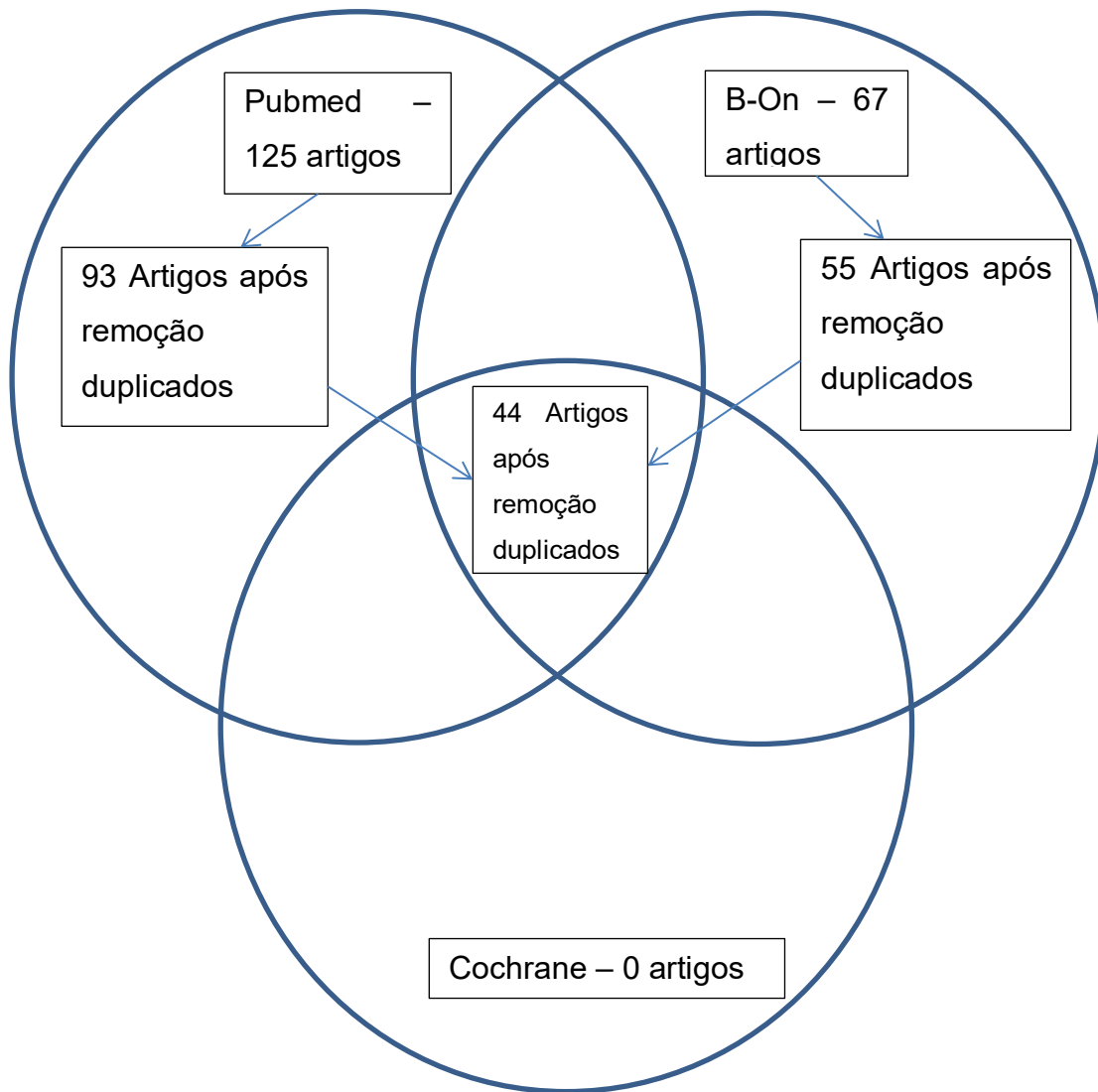


Figura 8 – Diagrama de Venn sobre sobreposição de artigos entre bases de dados antes e depois da seleção.

Discussão

A presente revisão sistemática permitiu a identificação de distintos biomarcadores relacionados com o metabolismo de NAD em neoplasias da cabeça e do pescoço.

A NAMPT corresponde à enzima mais frequentemente reportada nas publicações incluídas como biomarcador de tumores de cabeça e do pescoço, tratando-se da enzima responsável pela conversão de NAM em NMN, que por sua vez será convertido em NAD pela NMNAT. De facto, todas as publicações incluídas demonstraram um aumento da sua expressão neste tipo de neoplasias, quer a nível de amostras tumorais, quer em amostras de sangue periférico, soro ou plasma.^{45,46,48,53-55,58,59} Nas amostras tumorais a sua expressão foi mais frequentemente pesquisada por técnicas de imunohistoquímica e PCR quantitativa, enquanto em amostras periféricas foram utilizadas técnicas de ELISA e de análise proteómica. A sobreexpressão de NAMPT pode estar associada ao processo de carcinogénese neste tipo de tumores, encontrando-se o nível de expressão dependente do grau de diferenciação do tumor.⁴⁶ A sua expressão mais elevada também já se encontra descrita em tumores de outras áreas anatómicas, nomeadamente em tumores renais e gastrointestinais.⁶⁰⁻⁶² O mecanismo inerente à elevação deste marcador ainda não é totalmente conhecido, sendo colocadas como hipóteses a sua associação a um microambiente pró-inflamatório,^{48,54} a modificações no metabolismo celular ao nível do tumor primário,⁵³ condicionando uma maior proliferação celular e síntese de ADN,⁵⁹ e podendo este marcador auxiliar na definição do prognóstico e constituir um potencial alvo terapêutico.^{55,58} São necessários mais estudos relativos a esta via metabólica para se poder estabelecer o papel específico da NAMPT no processo de carcinogénese nos tumores da cabeça e do pescoço.

A CD38 corresponde a uma hidrolase de cADPR, responsável pelo fluxo intracelular de cálcio e associada a respostas imunitárias, cuja função se encontra dependente de NAD. No presente estudo foi possível observar um aumento da sua expressão em linfócitos T CD8+ em amostras de sangue periférico, assim como em amostras de tecido tumoral. Nas amostras de sangue periférico, a técnica mais utilizada foi a de citometria de fluxo, pois permite a identificação diferencial de linfócitos nesse tipo

de amostras, com marcação seletiva de diferentes proteínas por associação a técnicas de fluorescência.⁴⁷

Apenas uma das publicações incluídas não mostrou diferenças na expressão de CD38 em linfócitos CD4+ e CD8+.⁵¹ Trata-se de um estudo realizado em tumores da nasofaringe, com pesquisa em soro por técnicas de citometria de fluxo. A não identificação de expressão diferencial de CD38 pode estar associada a um poder estatístico eventualmente insuficiente neste estudo, ou a utilização de técnicas de citometria de fluxo com menor acuidade para identificação de potenciais diferenças existentes, uma vez que se trata de uma publicação de 1999. A realização de estudos dirigidos à expressão deste marcador, quer a nível circulante, quer ao nível do microambiente tumoral, poderá trazer nova informação acerca do seu papel no processo de carcinogénese nos tumores da cabeça e do pescoço.

Como referido previamente, as SIRTs desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo, sendo proteínas dependentes de NAD. Existem diferentes enzimas desta família, tendo sido identificadas as SIRT1, SIRT3 e SIRT6 como potenciais biomarcadores neste trabalho. No entanto, dependendo do tipo de tumor em estudo é observada uma variação diferencial na sua expressão: para tumores da tiroide foi identificado um aumento consistente da expressão das três enzimas,^{56,57,61} enquanto para os SCCHN foi observada uma diminuição da expressão de SIRT6,⁴¹ com resultados contraditórios relativos à expressão de SIRT3.^{43,50} A expressão das SIRTs em neoplasias malignas aparenta estar dependente da localização do tumor primário, com aumento da expressão de SIRT1 em tumores de mama e de próstata,^{63,64} aumento de expressão de SIRT6 em tumores de pulmão e pele,^{65,66} mas com a sua diminuição em tumores de pâncreas, mama e carcinoma hepatocelular.⁶⁷⁻⁷¹ Deste modo, este tipo de moléculas pode apresentar diferentes funções no processo de carcinogénese consoante o tipo de tumor considerado, com potencial papel de gene supressor tumoral ou de oncogene. Serão necessários mais estudos para compreender a influência específica deste tipo de moléculas no processo de carcinogénese de diferentes tipos de tumores primários e a sua influência consoante o tipo histológico.

Sabe-se que o aumento de expressão de SIRT6 leva a uma diminuição de HIF-1 α , molécula relacionada com estados de hipoxia.⁴¹ As células tumorais em hipoxia de SCCHN têm mecanismos de resistência à radioterapia e quimioterapia já

previamente reportados.⁷² Deste modo, a regulação da via de SIRT6 pode constituir um potencial novo alvo terapêutico neste tipo de neoplasias.

Ao contrário das restantes enzimas SIRT, apenas a SIRT3 mostrou um aumento da sua expressão nos SCCHN, nomeadamente ao nível da cavidade oral. Os resultados dispares entre estudos para o marcador SIRT3 podem correlacionar-se com alguma indefinição existente no que diz respeito à sua função. Alguns autores sugerem que esta molécula tenha interferência como fator pro-apoptótico,^{73,74} enquanto outros salientam a sua função anti-apoptótica, mais consistente com uma atividade na redução de níveis de ROS e num papel ativo no processo de carcinogénese aquando da sua sobreexpressão.^{75,76} Por outro lado, alguns estudos demonstram que uma diminuição de SIRT3 a nível mitocondrial se encontra relacionada com um aumento do metabolismo glicolítico, que poderá constituir uma vantagem no processo de proliferação celular em neoplasias malignas, apesar do aumento da sua expressão mitocondrial poder ser um estímulo para a sobrevivência celular aquando da produção exacerbada de ROS.⁷⁵⁻⁷⁸ Dada a ubiquidade de funções descritas para a SIRT3, deverá existir mais do que um mecanismo de promoção de carcinogénese e influência da sua expressão em tumores malignos, sendo necessários mais estudos que permitam uma avaliação detalhada das vias intracelulares influenciadas pela modificação de expressão desta molécula.

Existem diferentes tipos de amostra implicadas no estudo de biomarcadores relacionados com o metabolismo de NAD em tumores de cabeça e do pescoço. De facto, alguns autores optam por utilização de amostras periféricas (sangue, soro e plasma), enquanto outros autores preferem a sua pesquisa em tecido tumoral. Apesar de as amostras periféricas serem mais acessíveis, o que poderá ser benéfico para avaliação de variação temporal dos biomarcadores, podendo estes constituir um potencial método de avaliação de resposta ao tratamento (e conseqüente prognóstico), as amostras em tecido tumoral são mais específicas, pois avaliam de forma dirigida a expressão nas células em estudo, minimizando a influência de fatores externos que possam modificar os resultados esperados.

Neste estudo, foi observada uma maior consistência nos resultados relacionados com a expressão de NAMPT, podendo constituir esta enzima o biomarcador mais consensual nos tumores de cabeça e do pescoço. Serão necessários mais estudos,

nomeadamente ensaios clínicos, para avaliar o seu potencial de rastreio, diagnóstico e prognóstico.

Conclusão

Com o presente trabalho foi possível identificar como biomarcadores relacionados com o metabolismo de NAD em tumores malignos da cabeça e pescoço a NAMPT, a CD38 e as SIRT. Existe uma consistência de resultados relacionados com a NAMPT, com o aumento da sua expressão tanto em SCCHN como em tumores da tireoide. A expressão de SIRT em tumores da cabeça e do pescoço poderá ser variável, e a expressão de CD38 aparenta estar aumentada em linfócitos T nos doentes com este tipo de neoplasias.

A sobreexpressão de NAMPT nestas neoplasias poderá traduzir um potencial alvo terapêutico, permitindo, desta forma, melhorar o prognóstico destes doentes e individualizar a terapêutica de acordo com a sua expressão.

É necessária a realização de estudos clínicos randomizados que permitam estabelecer o papel dos diferentes biomarcadores identificados no diagnóstico, seguimento e prognóstico dos tumores de cabeça e do pescoço, assim como para definir a melhor amostra e melhor método para a avaliação da sua expressão.

Bibliografia

1. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer; 2017.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. May 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
3. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. Accessed 17/09/2020, <https://gco.iarc.fr/today>
4. Bossi P, Chan AT, Licitra L, et al. Nasopharyngeal carcinoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(†). *Ann Oncol*. Apr 2021;32(4):452-465. doi:10.1016/j.annonc.2020.12.007
5. Machiels JP, René Leemans C, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. Nov 2020;31(11):1462-1475. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.011
6. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. Jul 2015;24(3):491-508. doi:10.1016/j.soc.2015.03.006
7. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*. Oct 1 2017;28(10):2386-2398. doi:10.1093/annonc/mdx304
8. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. Apr 2009;10(4):321-2. doi:10.1016/s1470-2045(09)70096-8
9. Bruce JP, Yip K, Bratman SV, Ito E, Liu FF. Nasopharyngeal Cancer: Molecular Landscape. *J Clin Oncol*. Oct 10 2015;33(29):3346-55. doi:10.1200/jco.2015.60.7846
10. Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc*. Mar 1976;92(3):571-4. doi:10.14219/jada.archive.1976.0556
11. Mañón RR, Myers JN, Skinner HD, Harari PM. Oral Cavity. In: Halperin EC, E. WD, Perez CA, Brady LW, eds. *Principles and Practice of Radiation Oncology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer; 2013:chap 44.
12. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol*. Jul 2005;41(6):551-61. doi:10.1016/j.oraloncology.2004.12.003
13. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*. Oct 31 2020;doi:10.1111/odi.13704
14. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J*. Mar 2018;63 Suppl 1:S91-s99. doi:10.1111/adj.12594
15. Cooper JS, Farnan NC, Asbell SO, et al. Recursive partitioning analysis of 2105 patients treated in Radiation Therapy Oncology Group studies of head and neck cancer. *Cancer*. May 1 1996;77(9):1905-11. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19960501)77:9<1905::Aid-cnrc22>3.0.Co;2-2
16. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3

- randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* Jan 2010;11(1):21-8. doi:10.1016/s1470-2045(09)70311-0
17. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* Jul 1 2010;363(1):24-35. doi:10.1056/NEJMoa0912217
 18. Burtneess B, Harrington KJ, Greil R, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* Nov 23 2019;394(10212):1915-1928. doi:10.1016/s0140-6736(19)32591-7
 19. Katsyuba E, Auwerx J. Modulating NAD(+) metabolism, from bench to bedside. *Embo j.* Sep 15 2017;36(18):2670-2683. doi:10.15252/embj.201797135
 20. Yu P, Cai X, Liang Y, Wang M, Yang W. Roles of NAD(+) and Its Metabolites Regulated Calcium Channels in Cancer. *Molecules.* Oct 20 2020;25(20)doi:10.3390/molecules25204826
 21. Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol.* Aug 2014;56:182-8. doi:10.1016/j.exger.2014.01.021
 22. Okabe K, Yaku K, Tobe K, Nakagawa T. Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *J Biomed Sci.* May 11 2019;26(1):34. doi:10.1186/s12929-019-0527-8
 23. Heske CM. Beyond Energy Metabolism: Exploiting the Additional Roles of NAMPT for Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2019;9:1514. doi:10.3389/fonc.2019.01514
 24. Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects. *J Biol Chem.* Aug 1958;233(2):493-500.
 25. Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *J Biol Chem.* Aug 1958;233(2):488-92.
 26. Nikas IP, Paschou SA, Ryu HS. The Role of Nicotinamide in Cancer Chemoprevention and Therapy. *Biomolecules.* Mar 20 2020;10(3)doi:10.3390/biom10030477
 27. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* Mar 4 2011;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
 28. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* Jan 12 2016;23(1):27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
 29. Duarte-Pereira S, Silva SS, Azevedo L, Castro L, Amorim A, Silva RM. NAMPT and NAPRT1: novel polymorphisms and distribution of variants between normal tissues and tumor samples. *Sci Rep.* Sep 9 2014;4:6311. doi:10.1038/srep06311
 30. Ghanem MS, Monacelli F, Nencioni A. Advances in NAD-Lowering Agents for Cancer Treatment. *Nutrients.* May 14 2021;13(5)doi:10.3390/nu13051665
 31. Pramono AA, Rather GM, Herman H, Lestari K, Bertino JR. NAD- and NADPH-Contributing Enzymes as Therapeutic Targets in Cancer: An Overview. *Biomolecules.* Feb 26 2020;10(3)doi:10.3390/biom10030358
 32. Duarte-Pereira S, Pereira-Castro I, Silva SS, et al. Extensive regulation of nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRT) expression in human tissues and tumors. *Oncotarget.* Jan 12 2016;7(2):1973-83. doi:10.18632/oncotarget.6538
 33. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763. doi:10.1155/2017/8416763

34. Lewis JE, Singh N, Holmila RJ, et al. Targeting NAD(+) Metabolism to Enhance Radiation Therapy Responses. *Semin Radiat Oncol*. Jan 2019;29(1):6-15. doi:10.1016/j.semradonc.2018.10.009
35. Kennedy BE, Sharif T, Martell E, et al. NAD(+) salvage pathway in cancer metabolism and therapy. *Pharmacol Res*. Dec 2016;114:274-283. doi:10.1016/j.phrs.2016.10.027
36. Yan X, Qu X, Tian R, et al. Hypoxia-induced NAD(+) interventions promote tumor survival and metastasis by regulating mitochondrial dynamics. *Life Sci*. Oct 15 2020;259:118171. doi:10.1016/j.lfs.2020.118171
37. Novak Kujundžić R, Prpić M, Đaković N, et al. Nicotinamide N-Methyltransferase in Acquisition of Stem Cell Properties and Therapy Resistance in Cancer. *Int J Mol Sci*. May 26 2021;22(11)doi:10.3390/ijms22115681
38. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Syst Rev*. Mar 29 2021;10(1):89. doi:10.1186/s13643-021-01626-4
39. Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, et al. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Cochrane; 2021. Updated February 2021. Accessed 10/10/2021. www.training.cochrane.org/handbook
40. Donato H, Donato M. [Stages for Undertaking a Systematic Review]. *Acta Med Port*. Mar 29 2019;32(3):227-235. Etapas na Condução de uma Revisão Sistemática. doi:10.20344/amp.11923
41. Choi JE, Sebastian C, Ferrer CM, et al. A unique subset of glycolytic tumour-propagating cells drives squamous cell carcinoma. *Nat Metab*. Feb 2021;3(2):182-195. doi:10.1038/s42255-021-00350-6
42. Zhang S, Wang B, Ma F, et al. Characteristics of B lymphocyte infiltration in HPV(+) head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. Apr 2021;112(4):1402-1416. doi:10.1111/cas.14834
43. Kao YY, Chou CH, Yeh LY, et al. MicroRNA miR-31 targets SIRT3 to disrupt mitochondrial activity and increase oxidative stress in oral carcinoma. *Cancer Lett*. Aug 1 2019;456:40-48. doi:10.1016/j.canlet.2019.04.028
44. Ge Y, Long Y, Xiao S, et al. CD38 affects the biological behavior and energy metabolism of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Oncol*. Feb 2019;54(2):585-599. doi:10.3892/ijo.2018.4651
45. Sowa P, Misiólek M, Orecka B, Czecior E, Adamczyk-Sowa M. Serum levels of selected adipocytokines in benign and malignant parotid gland tumor patients. *Cytokine*. Jun 2018;106:40-44. doi:10.1016/j.cyto.2018.03.004
46. Wang XY, Wang JZ, Gao L, et al. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase and depletion of nicotinamide adenine dinucleotide contribute to arsenic trioxide suppression of oral squamous cell carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol*. Sep 15 2017;331:54-61. doi:10.1016/j.taap.2017.05.008
47. Andrade MC, Ferreira SB, Gonçalves LC, et al. Cell surface markers for T and B lymphocytes activation and adhesion as putative prognostic biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Immunol*. Dec 2013;74(12):1563-74. doi:10.1016/j.humimm.2013.08.272
48. Yu-Duan T, Chao-Ping W, Chih-Yu C, et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-b cell colony-enhancing factor in male oral squamous cell carcinoma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Mar 1 2013;18(2):e180-6. doi:10.4317/medoral.18574

49. Yuvaraj M, Udayakumar K, Jayanth V, et al. Fluorescence spectroscopic characterization of salivary metabolites of oral cancer patients. *J Photochem Photobiol B*. Jan 5 2014;130:153-60. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.11.006
50. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Joo N, et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer*. Apr 15 2011;117(8):1670-8. doi:10.1002/cncr.25676
51. Feng P, Chan SH, Ooi EE, et al. Elevated blood levels of soluble tumor necrosis factor receptors in nasopharyngeal carcinoma: correlation with humoral immune response to lytic replication of Epstein-Barr virus. *Int J Oncol*. Jul 1999;15(1):167-72. doi:10.3892/ijo.15.1.167
52. Lu H, Zhang L, Dai Y, et al. Markers of immune activation: novel biomarkers to predict the early-warning indicator of patients with papillary thyroid carcinoma. *Diagn Pathol*. Feb 12 2020;15(1):16. doi:10.1186/s13000-020-00931-1
53. Belousov PV, Afanasyeva MA, Gubernatorova EO, et al. Multi-dimensional immunoproteomics coupled with in vitro recapitulation of oncogenic NRAS(Q61R) identifies diagnostically relevant autoantibody biomarkers in thyroid neoplasia. *Cancer Lett*. Dec 28 2019;467:96-106. doi:10.1016/j.canlet.2019.07.013
54. Sawicka-Gutaj N, Andrusiewicz M, Czarnywojtek A, et al. Changes of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Expressions in Thyroid Glands of Patients with Different Thyroid Pathologies. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1316390. doi:10.1155/2018/1316390
55. Turbat-Herrera EA, Kilpatrick MJ, Chen J, et al. Cystathione β -Synthase Is Increased in Thyroid Malignancies. *Anticancer Res*. Nov 2018;38(11):6085-6090. doi:10.21873/anticancer.12958
56. Qu N, Hu JQ, Liu L, et al. SIRT6 is upregulated and associated with cancer aggressiveness in papillary thyroid cancer via BRAF/ERK/Mcl-1 pathway. *Int J Oncol*. May 2017;50(5):1683-1692. doi:10.3892/ijo.2017.3951
57. Wu W, Zhang L, Lin J, et al. Hypermethylation of the HIC1 promoter and aberrant expression of HIC1/SIRT1 contribute to the development of thyroid papillary carcinoma. *Oncotarget*. Dec 20 2016;7(51):84416-84427. doi:10.18632/oncotarget.12936
58. Sawicka-Gutaj N, Waligórska-Stachura J, Andrusiewicz M, et al. Nicotinamide phosphorybosiltransferase overexpression in thyroid malignancies and its correlation with tumor stage and with survivin/survivin DEx3 expression. *Tumour Biol*. Sep 2015;36(10):7859-63. doi:10.1007/s13277-015-3506-z
59. Shackelford R, Hirsh S, Henry K, Abdel-Mageed A, Kandil E, Coppola D. Nicotinamide phosphoribosyltransferase and SIRT3 expression are increased in well-differentiated thyroid carcinomas. *Anticancer Res*. Aug 2013;33(8):3047-52.
60. Li H, Bai E, Zhang Y, Jia Z, He S, Fu J. Role of Nampt and Visceral Adiposity in Esophagogastric Junction Adenocarcinoma. *J Immunol Res*. 2017;2017:3970605. doi:10.1155/2017/3970605
61. Shackelford RE, Abdulsattar J, Wei EX, Cotelingam J, Coppola D, Herrera GA. Increased Nicotinamide Phosphoribosyltransferase and Cystathionine- β -Synthase in Renal Oncocytomas, Renal Urothelial Carcinoma, and Renal Clear Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. Jul 2017;37(7):3423-3427. doi:10.21873/anticancer.11709
62. Sun Y, Zhu S, Wu Z, et al. Elevated serum visfatin levels are associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. Apr 4 2017;8(14):23427-23435. doi:10.18632/oncotarget.15080

63. Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, et al. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res.* Jul 15 2007;67(14):6612-8. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-0085
64. Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer. *Cancer Res.* Nov 1 2011;71(21):6654-64. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-1446
65. Bai L, Lin G, Sun L, et al. Upregulation of SIRT6 predicts poor prognosis and promotes metastasis of non-small cell lung cancer via the ERK1/2/MMP9 pathway. *Oncotarget.* Jun 28 2016;7(26):40377-40386. doi:10.18632/oncotarget.9750
66. Ming M, Han W, Zhao B, et al. SIRT6 promotes COX-2 expression and acts as an oncogene in skin cancer. *Cancer Res.* Oct 15 2014;74(20):5925-33. doi:10.1158/0008-5472.Can-14-1308
67. Elhanati S, Ben-Hamo R, Kanfi Y, et al. Reciprocal Regulation between SIRT6 and miR-122 Controls Liver Metabolism and Predicts Hepatocarcinoma Prognosis. *Cell Rep.* Jan 12 2016;14(2):234-42. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.023
68. Khongkow M, Olmos Y, Gong C, et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. *Carcinogenesis.* Jul 2013;34(7):1476-86. doi:10.1093/carcin/bgt098
69. Kugel S, Sebastián C, Fitamant J, et al. SIRT6 Suppresses Pancreatic Cancer through Control of Lin28b. *Cell.* Jun 2 2016;165(6):1401-1415. doi:10.1016/j.cell.2016.04.033
70. Marquardt JU, Fischer K, Baus K, et al. Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology.* Sep 2013;58(3):1054-64. doi:10.1002/hep.26413
71. Thirumurthi U, Shen J, Xia W, et al. MDM2-mediated degradation of SIRT6 phosphorylated by AKT1 promotes tumorigenesis and trastuzumab resistance in breast cancer. *Sci Signal.* Jul 29 2014;7(336):ra71. doi:10.1126/scisignal.2005076
72. Göttgens EL, Ostheimer C, Span PN, Bussink J, Hammond EM. HPV, hypoxia and radiation response in head and neck cancer. *Br J Radiol.* Jan 2019;92(1093):20180047. doi:10.1259/bjr.20180047
73. Allison SJ, Milner J. SIRT3 is pro-apoptotic and participates in distinct basal apoptotic pathways. *Cell Cycle.* Nov 1 2007;6(21):2669-77. doi:10.4161/cc.6.21.4866
74. Marfe G, Tafani M, Indelicato M, et al. Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *J Cell Biochem.* Mar 1 2009;106(4):643-50. doi:10.1002/jcb.22044
75. Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol.* Oct 2008;28(20):6384-401. doi:10.1128/mcb.00426-08
76. Yang H, Yang T, Baur JA, et al. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell.* Sep 21 2007;130(6):1095-107. doi:10.1016/j.cell.2007.07.035
77. Finley LW, Carracedo A, Lee J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization. *Cancer Cell.* Mar 8 2011;19(3):416-28. doi:10.1016/j.ccr.2011.02.014
78. Iwahara T, Bonasio R, Narendra V, Reinberg D. SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression. *Mol Cell Biol.* Dec 2012;32(24):5022-34. doi:10.1128/mcb.00822-12