



DIAGNÓSTICO PROTEÔMICO SALIVAR RELACIONADO A ALTERAÇÕES MALIGNAS: UMA REVISÃO

CAMILA MOURA MAIA DORNELAS; MARIA IVAIANE BOAVENTURA DE SOBRAL; SANDRA APARECIDA MARINHO

RESUMO

Introdução: O diagnóstico precoce do câncer bucal é a chave para diminuir a morbidade e mortalidade dos pacientes, pois o tratamento se torna menos agressivo, proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente. A saliva pode ser tida como o espelho do corpo, sendo o meio perfeito para ser explorado na análise da saúde e doença. **Objetivo:** Realizar uma revisão narrativa sobre a presença de biomarcadores proteicos salivares relacionados a alterações malignas. **Materiais e Métodos:** Foi realizada uma busca de artigos disponíveis na língua inglesa, nas bases de dados *Pubmed*, *Scielo* e *Google Scholar*, referente ao tema diagnóstico salivar e câncer bucal. **Resultados:** Após seleção dos artigos que preencheram os critérios estabelecidos, os mesmos foram lidos na íntegra. Foi verificado que a saliva é um fluido importante para detecção de alterações fisiológicas e patológicas do corpo humano, sendo um meio barato, fácil, acessível, não invasivo e prático, que pode auxiliar no diagnóstico precoce do câncer oral. **Conclusão:** A expressão aumentada de citocinas na saliva pode indicar presença de alterações malignas, mas não apresenta capacidade de predizer a evolução de uma lesão com potencial de malignização para uma neoplasia maligna. Além disso, os níveis salivares de algumas citocinas pró-inflamatórias, consideradas biomarcadores do câncer, também podem estar alterados na doença periodontal. Portanto, para se realizar uma detecção mais acurada, deve-se utilizar painéis de quatro a 10 biomarcadores, para cada tipo diferente de câncer. Além disso, a análise do proteoma associada ao transcriptoma pode apresentar maior acurácia para auxílio de detecção de alterações malignas.

Palavras-Chave: Carcinoma de células escamosas; Saliva; Proteoma; Diagnóstico; Neoplasias malignas.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível mundial, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença. Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média rendas (OPAS; OMS, 2020), como o Brasil. Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2020/2022, o câncer de cavidade oral será o quinto mais incidente em homens (INCA, 2019).

O prognóstico de pacientes com carcinomas orais permanece sombrio (KHALILI, 2008), devido à ocorrência de diagnóstico tardio, com taxa de sobrevivência de apenas 40 a 50% em cinco anos (SCHAAIJ-VISSER *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011; PFAFFE *et al.*, 2011). Na maioria das vezes, o paciente apresenta-se para tratamento já com a doença em estágio avançado (HU *et al.*, 2008).

Dentre as alterações que apresentam potencial de malignização, citam-se a leucoplasia, a eritroplasia e a queilite actínica (NEVILLE, DAY, 2002; BARNES *et al.*, 2005). A avaliação

histológica da displasia nessas alterações é um importante indicador do potencial maligno das mesmas, podendo a displasia ser classificada como leve, moderada e severa (BARNES *et al.*, 2005; BOUQUOT *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o diagnóstico precoce de lesões potencialmente malignas e lesões malignas são a chave para diminuir a morbidade e mortalidade associadas aos estágios avançados do carcinoma de células escamosas. Para isso, deve-se realizar um acurado exame clínico associado a uma biópsia, para avaliação histopatológica da lesão, no intuito de se determinar seu potencial maligno. O diagnóstico precoce fornece melhor qualidade de vida e aumento da taxa de sobrevida dos pacientes (GILLENWATER *et al.*, 1998). Além disso, métodos não invasivos, como avaliação de biomarcadores na saliva, podem auxiliar esse diagnóstico de alterações suspeitas.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma breve revisão sobre o tema diagnóstico salivar proteômico em alterações malignas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho de revisão de literatura narrativa foi realizado através de um levantamento bibliográfico nas bases de dados *Pubmed*, *Google Scholar* e *Scielo*, referente ao diagnóstico salivar e presença de alterações com potencial de malignização e alterações malignas. Foram incluídos na busca artigos na língua inglesa, e excluídos artigos não condizentes com o tema.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os artigos foram selecionados, a partir dos critérios estabelecidos. Foram também utilizados livros e acessados *sites* relevantes, como INCA e OPAS, para busca de informações epidemiológicas.

A saliva é um fluido importante para detecção de alterações fisiológicas e patológicas do corpo humano (SHAH *et al.*, 2011). Pela facilidade de acesso à boca, sua obtenção constitui um procedimento fácil, barato e não invasivo, tendo sido utilizado como ferramenta de diagnóstico (CASTAGNOLA *et al.*, 2011; KAKARADDI *et al.*, 2012) para o câncer oral (WONG, 2006; ZIMMERMANN *et al.*, 2007; LEE; WONG, 2009). Esse fluido oral pode ser tido como o espelho do corpo, sendo o meio perfeito para ser explorado na análise da saúde e doença (LEE *et al.*, 2009).

O contato direto entre saliva e mucosa alterada faz com que biomarcadores salivares sejam uma alternativa atrativa em relação ao sangue e à biópsia. As moléculas de DNA, RNA e proteínas das células alteradas podem ser convenientemente obtidas por esse fluido, refletindo estágios fisiológicos e patológicos (LEE, WONG, 2009; SHAH *et al.*, 2011).

A saliva é o único fluido biológico que contém componentes encontrados no soro (SPIELMANN; WONG, 2011). Como ferramenta clínica, a saliva apresenta inúmeras vantagens em relação ao soro, incluindo facilidade de coleta, estocagem e facilidade de obtenção em quantidades suficientes para análise a baixo custo (WONG, 2006). Isso tem particular relevância em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde muitos riscos à saúde e doença permanecem pobremente definidos e recebem tratamento inapropriados (LEE *et al.*, 2009). Apesar de os biomarcadores estarem em menores concentrações na saliva em relação ao soro, atualmente existem métodos sensíveis capazes de detectá-los. E como a coleta é simples, reduz a ansiedade e o desconforto do paciente, com um monitoramento mais frequente (LEE; WONG, 2009; SPIELMANN; WONG, 2011).

De acordo com Shah *et al.* (2011), a saliva pode ser a melhor escolha como teste primário de rastreamento para câncer bucal. A análise sistemática de biomarcadores genômicos (RNA mensageiro- RNAm) e proteômicos facilita a identificação de parâmetros sensíveis e

específicos para câncer oral e auxilia na identificação de pacientes de alto risco, além de indicar melhores modalidades de tratamento, melhorando a sobrevida desses pacientes. Segundo Loo *et al.* (2010), aproximadamente 73% das proteínas salivares não estão presentes no plasma, fornecendo oportunidades únicas para se descobrir marcadores proteômicos exclusivamente salivares. Em relação às imunoglobulinas, há uma relativa linearidade na distribuição dessas proteínas entre saliva e plasma, sendo que a concentração salivar reflete a concentração sérica.

O transcriptoma salivar são moléculas de RNAm que as células utilizam para transportar as instruções fornecidas pelo DNA, para subsequente produção de proteínas. A saliva contém centenas de proteínas menores ou peptídeos, que estão presentes em baixas concentrações, mas que apresentam papel importante na discriminação de doenças. Já o proteoma é a análise da porção genômica já expressa, ou seja, as próprias proteínas. A análise do proteoma salivar pode detectar alteração maligna em estágio precoce e também monitorar a progressão da doença (LEE, WONG, 2009; SPIELMANN; WONG, 2011). Os constituintes proteômicos são a primeira escolha para análise salivar (ZIMMERMANN *et al.*, 2007, BARBOSA *et al.*, 2012).

A importância de se analisar proteínas diretamente reside no fato de que são elas que desempenham funções fisiológicas e patológicas nas células. Além disso, as mesmas estão sujeitas a modificações pós-transcricionais. A taxa de transcrição, medida através do RNAm, ou seja, do transcriptoma, nem sempre apresenta uma relação direta com a atividade biológica da proteína, sua função ou quantidade da mesma (BISCH, 2004). Todavia, Li *et al.* (2020), por meio de uma revisão sistemática, buscaram analisar a proteômica salivar associada as neoplasias malignas orais e observaram que, de acordo com os artigos analisados, em pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide oral, as proteínas salivares apresentaram características particulares associadas ao tipo de câncer, podendo esse ser um aspecto importante para o diagnóstico. Ademais, devem ser utilizados métodos altamente sensíveis para detecção dessas proteínas. No entanto, a análise de proteínas salivares dispõe de limitações relacionadas a modificações pós-traducionais das mesmas, em que ocorrem alterações químicas e estruturais da cadeia proteica, concedendo a ela uma estruturação complexa, caracterizando assim, um impasse para as proteínas salivares como biomarcadores.

Níveis elevados de Interleucina 6 (IL-6) e de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) foram encontrados na saliva em pacientes portadores de leucoplasia, em relação a pacientes sem alterações bucais. A IL-6 inativa o gene supressor tumoral P53, hipermetilando sua região promotora, o que resulta na supressão da apoptose, fazendo com que ocorra proliferação celular descontrolada. O TNF- α ativa fator de transcrição NF κ B, que estimula a proliferação celular e bloqueia apoptose, além de aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias (BRAILO *et al.*, 2006). Sato *et al.* (2010) também verificaram o aumento da concentração de IL-6 na saliva de pacientes com carcinoma oral, quando comparados com controles. Brailo *et al.* (2012) observaram que a IL-6 apresentou-se significativamente aumentada na saliva de pacientes portadores de câncer oral, quando comparada com pacientes portadores de leucoplasia e com controles. Porém, os autores não observaram diferenças significativas nos níveis de IL-6 entre pacientes portadores de leucoplasia em relação aos pacientes-controle. Além disso, observaram que não houve diferenças nos níveis salivares do TNF- α ao se comparar os três grupos de pacientes. Os autores observaram que o aumento de citocinas pró-inflamatórias na saliva refletiu o desenvolvimento do câncer bucal, a partir da leucoplasia. Porém, os autores foram relutantes em afirmar se o aumento da IL-6 e da IL1 β aconteceu antes do carcinoma se tornar evidente clinicamente ou se poderia ser utilizado para monitorar a transformação da leucoplasia em carcinoma. Contudo, Rhodus *et al.* (2005), ao avaliarem os níveis salivares das citocinas pró-angiogênicas e pró-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 em pacientes portadores de lesões potencialmente malignas e de carcinomas de células escamosas, observaram diferenças significativas entre os grupos e pacientes sem lesões. Tais citocinas apresentaram-se significativamente elevadas nos portadores de lesões potencialmente malignas, em relação aos

pacientes sem lesões e também significativamente aumentadas nos portadores de carcinomas orais, quando comparados aos pacientes sem lesões.

Já a IL-8 é um mediador pró-angiogênico e pró-inflamatório, que se apresenta significativamente aumentado na saliva de portadores de carcinoma oral, quando comparados com pacientes-controle. Porém, essa citocina não tem valor preditivo nas lesões com potencial de malignização (PUNYANI; SATHAWANE, 2012). Osman *et al.* (2012), em uma revisão de literatura, relataram a necessidade de novos estudos em larga escala para a validação de citocinas salivares (principalmente IL-6 e IL-8) como biomarcadores para diagnóstico de carcinomas orais, levando em conta que a expressão das mesmas também encontra-se alterada na doença periodontal.

De acordo com Rusling *et al.* (2010), o diagnóstico do câncer usando biomarcadores proteicos salivares requer detecção acurada de painéis de aproximadamente quatro a 10 biomarcadores para cada tipo de câncer. Brinkmann *et al.* (2010), ao avaliarem biomarcadores já validados para população americana em indivíduos sérvios, verificaram que os biomarcadores proteicos IL-8, IL-1B, M2BP e os biomarcadores de RNAm, IL-8, IL-1B, SAT1 e S100P, foram discriminatórios como únicos e reprodutíveis, independente da raça. Os autores também verificaram maior valor preditivo e maior acurácia ao se combinar os marcadores de proteoma e de transcriptoma (proteínas IL-1B + mRNA SAT1 + DUSP1).

4 CONCLUSÃO

Os biomarcadores salivares proteicos, como as citocinas, podem auxiliar no diagnóstico precoce de lesões malignas da cavidade oral. Contudo, o aumento da expressão de citocinas na saliva nas lesões com potencial de malignização, não tem valor preditivo para o câncer. Além disso, deve-se atentar que os níveis das citocinas IL-6 e IL-8 também podem estar alterados na doença periodontal. Para se realizar uma detecção mais acurada, deve-se utilizar painéis de aproximadamente quatro a 10 biomarcadores para cada tipo diferente de câncer. Ademais, a análise proteômica associada ao transcriptoma apresenta maior acurácia para a detecção de alterações malignas. Há também a necessidade de mais estudos clínicos com grandes amostras, para validação dos biomarcadores proteômicos da saliva.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, E. B. *et al.* Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 58, n. 3, p. 366-75, 2012.

BARNES, L. *et al.* World Health Organization. **Classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors.** Lion: IARC Press; 2005.

BISCH, P. M. **Genômica funcional: proteômica.** In: MIR, L. (ed.). **Genômica.** São Paulo: Atheneu. 2004.

BRAILO, V.; BORAS, V. V.; ARAMBASIN, A. C. The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia. **Oral Oncol.**, v. 42, n. 4, p. 370-373, 2006.

BRAILO, V. *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Med Oral Patol Oral Cir. Bucal**, v. 17, n. 1, p. 10-15, 2012.

BOUQUOT, J. E.; SPEIGHT, P. M.; FARTHING, P. M. Epithelial dysplasia of the oral

mucosa: diagnostic problems and prognostic features. **Curr Diag Pathol.**, v. 12, n. 1, p. 11-21, 2006.

BRINKMANN, O. *et al.* Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. **Oral Oncol.**, v. 47, n. 1, p. 51-55, 2011.

CASTAGNOLA, M. *et al.* Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. **Acta Otorhinolaryngol Ital.**, v. 31, n. 6, p. 347-357, 2011.

GILLENWATER, A.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V.; RICHARDS-KORTUM, R. Oral premalignancy: new methods of detection and treatment. **Curr Oncol Rep.**, v. 8, n. 2, p. 146- 154, 2006.

HU, S. *et al.* Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. **Clin Cancer Res.**, v. 14, n. 19, p. 6246-6252, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: Incidência da Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

KAKARADDI, M. *et al.* Sialochemistry: A diagnostic tool. **Pakistan Oral Dent J.**, v. 32, n. 2, p. 222-225, 2012

KHALILI, J. Oral cancer: Risk factors, prevention and diagnostic. **Exp Oncol.**, v. 30, n. 4, p. 259-264, 2008.

LEE, K.D.; LEE, H. S.; JEON, C. H. Body fluid biomarkers for early detection of head and neck squamous cell carcinomas. **Anticancer Res.**, v. 31, n. 4, p. 1161-1167, 2011.

LEE, Y-H.; WONG, D. T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. **Am J Dent.**, v. 22, n. 4, p. 241-248, 2009.

LEE, J. M.; GARON, E.; WONG, D. T. Salivary diagnostics. **Orthod Craniofac Res.**, v. 12, n. 3, p. 206-211, 2009.

LI Q. *et al.* A Review on Salivary Proteomics for Oral Cancer Screening. **Curr Issues Mol Biol.**, v. 37, n. 1, p. 47-56, 2020.

LOO, J. A. Comparative human salivary and plasma proteomes. **J Dent Res.**, v. 89, n. 10, p. 1016-1023, 2010.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin.**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE (OPAS); ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Câncer**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em 17 nov. 2022.

OSMAN, T. A.; COSTEA, D.E.; JOHANNESSEN, A. C. The use of salivary cytokines as a screening tool for oral squamous cell carcinoma : A review of the literature. **J Oral Maxillofac Pathol.**, v. 15, n. 2, p. 256-261, 2012.

PFAFFE, T. *et al.* Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. **Clin Chem.**, v. 57, n. 5, p. 5675-5687, 2011.

PUNYANI, S. R.; SATHAWANE, R. S. Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. **Clin Oral Invest.**, v. 17, n. 2, p. 517-524, 2013.

RHODUS, N. L. *et al.* NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Detect Prev.**, v. 29, n. 1, p. 42-45, 2005.

RUSLING, J. F. *et al.* Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. **Analyst**, v. 135, n. 10, p. 2496-2511, 2010.

SATO, J. *et al.* Changes in interleukin-6 levels in saliva in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 110, n. 3, p. 330-336, 2010.

SCHAAIJ-VISSER, T.B. M. *et al.* Protein biomarker discovery for head and neck cancer. **J. Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1790-1803, 2010.

SHAH, F. D. *et al.* A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. **Ind J Clin Biochem.**, v. 26, n. 4, p. 326-334, 2011.

SPIELMANN, N.; WONG, D. T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Dis.**, v. 17, n. 4, p. 345-354, 2011.

WONG, D.T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. **J Am Dent Assoc.**, v. 137, n. 3, p. 313-321, 2006.

ZIMMERMANN, B. G.; PARK, N. J.; WONG, D. T. Genomic targets in saliva. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1098, n. 1, p. 184-191, 2007.