

Richard Michalsky Cardoso

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2019

Richard Michalsky Cardoso

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da saúde

Porto, 2019

Richard Michalsky Cardoso

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa

como parte dos requisitos para obtenção do grau de

Mestre em Medicina Dentária

Richard Michalsky Cardoso

RESUMO

O presente trabalho consta em uma revisão bibliográfica que tem como objetivo principal analisar a importância da saliva como material para biópsias líquidas e a sua relação com a possível detecção precoce e controle do cancro, afim de buscar tratamentos mais rápidos e terapêuticas mais eficazes. As biópsias líquidas e a saliva são uma combinação altamente harmoniosa, pois por apresentarem diversas vantagens, e a saliva, por ser um material de fácil acesso e não invasivo, têm vindo a ser descritas de forma crescente para detecção de diferentes tipos de neoplasias, e entre elas, o cancro oral. O que por si só ilustra o enorme potencial da introdução das biópsias líquidas na prática clínica. Nessa revisão, vários estudos com diferentes tipos de biomarcadores foram analisados e comparados, para poder investigar a associação destes com a tumorigéne. O campo de pesquisa das biópsias líquidas é bastante novo e mais estudos comparativos precisam ser realizados para consolidar respostas mais precisas.

Palavras-chave: biópsias líquidas; biomarcadores salivares; exossomas; cancêr oral

ABSTRACT

The present work consists of a bibliographic review that has as main objective to analyze the importance of saliva as a material for liquid biopsies and its relationship with the possible early detection and control of cancer, in order to seek faster and more effective therapeutic treatments. Liquid biopsies and saliva are a highly harmonious combination because they have several advantages, and saliva, being an easily accessible and non-invasive material, has been increasingly described for different types of neoplasms and, among them, oral cancer. Which in itself illustrates the enormous potential of introducing liquid biopsies into clinical practice. In this review, several studies with different types of biomarkers were analyzed and compared in order to investigate their association with tumorigen. The field of research on liquid biopsies is quite new and more comparative studies need to be done to consolidate more accurate answers.

Keywords: liquid biopsy; salivary biomarkers; exosomes; oral cancer

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Materiais e Métodos	2
II. DESENVOLVIMENTO.....	3
1. Conceito de Biópsia Líquida	3
2. Biomarcadores Salivares no Cancro Oral	4
3.Exossomas.....	6
4. RNA Tumoral Circulante	7
5. DNA Tumoral Circulante	10
6. Métodos de Colheita da Saliva.....	12
7. Futuro da Biópsia Líquida.....	12
III. DISCUSSÃO.....	12
IV. CONCLUSÃO	14
V. BIBLIOGRAFIA.....	15

LISTA DE ABREVIATURAS

CTCs – Células Tumorais Circulantes

ctRNA – RNA Tumoral Circulante

ctDNA – DNA Tumoral Circulante

mRNAs – RNA Mensageiro

miRNAs – Micro RNAs

piRNAs – RNA que interagem com piwi

OSCC - Carcinoma Oral de Células Escamosas

DUSP1 - Dual specificity protein phosphatase 1

I. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o crescimento celular anormal, conhecido como cancro, é apontado como a segunda principal causa de morte mundial. As conseqüências do cancro na sociedade são preocupantes, e um diagnóstico precoce, sensível e preciso pode ser considerado uma condição necessária no tratamento do cancro, pois leva a procedimentos e intervenções rápidas e terapêuticas eficazes, reduzindo o custo do tratamento e melhorando consideravelmente os resultados e a sobrevida do paciente (Gorgannezhad et al., 2018).

Em 2012, o cancro oral (CO) foi responsável por 145.000 mortes e 300.000 novos casos foram diagnosticados, sendo um sério e grande problema especialmente em regiões menos desenvolvidas (77%) (Ferlay et al., 2015).

Segundo Huang et al. (2010), o CO é um conjunto de cancros da cabeça e pescoço, que inclui cancro das superfícies mucosas bucais e dos lábios, pavimento bucal, dois terços da língua, gengivas, palato duro, palato mole e trígono retromolar. Este tipo de cancro tem um melhor prognóstico em estádios iniciais, mas na maioria dos casos, ele é descoberto em um estágio mais avançado, onde o prognóstico é pior e as terapias já não são tão eficientes (Dzebo et al., 2017).

Atualmente, as biópsias teciduais (ou sólidas) são os métodos utilizados para obter informações detalhadas de um tumor (caracterização histológica, definição do TNM e estadiamento, pesquisa de mutações, entre outros), porém, estão associadas a diversos problemas, como por exemplo uma remoção cirúrgica invasiva que pode causar risco para o doente. Existem vários riscos clínicos inerentes aos procedimentos e possibilidades de complicações cirúrgicas. Além disso, alguns tumores são de difícil acesso em alguns locais anatómicos, sendo difícil realizar a biópsia, e, em alguns casos, a extração pode aumentar o risco de lesões metastáticas (Robertson e Baxter, 2011). Ademais, acordo com Crowley et al. (2013), pode ocorrer que a quantidade de tecido extraído não é suficiente para todas as análises necessárias e a extração precisa ser repetida, necessitando outra intervenção cirúrgica (podendo essa ser de alto risco). Ainda, as técnicas de biópsias sólidas envolvem um alto custo financeiro, requerem tempo prolongado para obter resultados e exigem uma sala cirúrgica.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

A radiologia também é amplamente utilizada para diagnóstico, no entanto, níveis excessivos de radiação podem gerar um risco para a saúde do paciente (Beaver et al., 2014).

Nos últimos anos, os esforços de pesquisa concentram-se na descoberta de novos métodos não invasivos para o diagnóstico e compreensão da arquitetura histológica e genômica do tumor para monitorizar a evolução do tumor e a resposta terapêutica em tempo real (Siravegna et al., 2017).

Conforme Jia et al. (2017), devido às dificuldades ou desvantagens associadas às biópsias teciduais, o campo da biópsia líquida emergiu como uma revolução em múltiplas áreas da oncologia e no desenvolvimento da medicina de precisão de tumores. A biópsia líquida é uma ferramenta de diagnóstico não invasiva, baseada em uma amostra de plasma ou soro, ou até mesmo de outros fluídos corporais como a saliva, urina, líquido cefalorraquidiano e amostras de fezes, que visa a detecção de células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), RNA tumoral circulante (ctRNA), proteínas, exossomas, entre outros.

Sendo assim, a realização de diagnóstico e controle através das biópsias líquidas tem-se revelado vantajosa na prática futura da oncologia. As biópsias líquidas têm vindo a ser descritas de forma crescente para diferentes tipos de neoplasias, entre elas o CO, nomeadamente através de amostras de saliva, o que por si só ilustra o enorme potencial da introdução das biópsias líquidas na prática clínica (Rapado-González et al., 2016).

Pretende-se com esta revisão bibliográfica realizar a descrição do conceito de saliva como biópsia líquida no CO, bem como a discussão das suas potencialidades no diagnóstico e determinação de prognóstico em relação ao CO. No que diz respeito às biópsias líquidas, nesta revisão, foi colocado como foco alguns dos biomarcadores salivares, porque uma revisão exaustiva de todos os potenciais biomarcadores seria impraticável dentro dos moldes previstos para esta dissertação.

1. Materiais e Métodos

A bibliografia que serviu de base a este trabalho de revisão bibliográfica narrativa foi obtida através do motor de busca PubMed e Scielo. Sendo consultados entre os meses

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

de janeiro e agosto de 2019. As palavras-chave utilizadas compreenderam os termos “liquid biopsy”, “salivary biomarkers”, “exosomes” e “oral cancer”. Foram escolhidos 94 artigos e a partir destes foram excluídos 45. Os critérios de exclusão aplicados foram: artigos que não tivessem como tema principal o CO; artigos com data de publicação anterior a 2004 (sendo a grande maioria publicada nos últimos 5 anos), artigos que não envolvessem os biomarcadores salivares em estudo; e apenas artigos no idioma inglês foram escolhidos.

II. DESENVOLVIMENTO

1. Conceito de biópsia líquida

A biópsia líquida consiste em coletar uma amostra de fluidos corporais para detecção de biomarcadores de cancro, que podem ser usados como diagnóstico inicial, determinação do prognóstico, elucidação da predisposição ao cancro e previsão de resposta à terapia (Alix-Panabières e Pantel, 2016).

Esta amostra não invasiva apresenta vantagens por ser um teste simples podendo ser realizado diariamente, além de que, são confiáveis, fornecem um resultado rápido, tem um baixo custo de reagentes e podem ser reproduzidas de modo automatizado para detetar alterações genómicas com alta sensibilidade (Heitzer et al., 2015). Essas são algumas vantagens que fizeram da biópsia líquida um conceito atraente em oncologia. A biópsia líquida constitui uma verdadeira revolução para o atendimento de pacientes com cancro. É altamente provável que as biópsias líquidas sejam cada vez mais usadas. A análise molecular de células e tecidos deve ser integrada com a de amostras de sangue ou outros fluidos corporais (por exemplo, urina ou líquido cefalorraquidiano), a fim de atender às necessidades da medicina personalizada. Estas biópsias líquidas são colhidas para um tubo, de forma a permitir a análise laboratorial dos seus componentes. Várias frações de uma biópsia líquida podem ser analisadas, incluindo células tumorais circulantes (CTCs), exossomas e ácidos nucleicos livres ou complexados, os ctDNA e ctRNA. Os diferentes elementos circulantes serão extraídos e analisados dependendo da

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

necessidade e da situação clínica e das questões a serem respondidas (Heitzer et al., 2015).

2. Biomarcadores salivares no cancro oral

Segundo Cheng et al. (2019), a saliva possui várias vantagens sobre o sangue como fluido corporal para o diagnóstico clínico. A colheita de saliva é realizada de forma fácil e não invasiva, reduzindo o desconforto do paciente. Ao contrário do sangue, a saliva não coagula, facilitando o manuseio e o processamento. A saliva é considerada como um espelho da saúde oral e sistêmica, contendo uma ampla variedade de biomarcadores, tornando-a um atraente biofluido para a detecção precoce de doenças.

De acordo com Tadimety et al. (2018), a saliva é composta basicamente de água com células e outras moléculas orgânicas e inorgânicas libertadas pelas secreções das principais glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) e numerosas glândulas salivares menores, que podem ser estudadas para fins clínicos. Também segundo estes autores, a saliva é um tipo de amostra atraente devido à sua facilidade de colheita e armazenamento, e a validação de biomarcadores para amostras de saliva é uma área ativa de pesquisa. Comparado ao sangue e derivados de sangue, a colheita de saliva é um procedimento verdadeiramente não invasivo.

Yan et al. (2009) diz que as glândulas salivares são densamente cercadas por vasos sanguíneos contendo células epiteliais enriquecidas com transportadores e canais celulares passivos e ativos, para troca substancial de moléculas com sangue circulante. Estudos da saliva revelaram que 20 a 30% do proteoma salivar espelha o proteoma plasmático, indicando que uma porção substancial dos constituintes salivares é derivada do sangue. Assim, a significativa sobreposição entre a saliva e o sangue, devido às suas interações fisiológicas, indica uma abordagem alternativa com potencial para diagnosticar doenças.

Diversos estudos têm descrito uma relação entre o CO e a presença de certos biomarcadores na saliva. Sahibzada et al. (2017) avaliaram, no seu estudo, os níveis de IL-6 e IL-8 na saliva em pacientes com cancro de células escamosas, lesões potencialmente malignas e um grupo controle. No grupo de pacientes com CO os níveis

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

de IL-6 e IL-8 foram elevados, comparando com o grupo controle. Já no grupo de lesões potencialmente malignas apenas os níveis de IL-8 apresentaram-se elevados. Em relação ao tipo de amostra, foi observado que os níveis de IL-8 foram semelhantes em amostras séricas e salivares, enquanto a IL-6 foi encontrada em maior quantidade no soro quando comparado com amostras salivares de pacientes diagnosticados com CO. A detecção destas moléculas na saliva de doentes com CO levou à conclusão de que estas citocinas, entre muitas outras citocinas pró-inflamatórias, poderão estar associadas à indução de CO.

Outro biomarcador tumoral. Cyfra21-1, foi significativamente encontrado em quantidade elevada na saliva de doentes diagnosticados com Carcinoma Oral de Células Escamosas (OSCC) (Rajkumar et al., 2015).

Shpitzer et al. (2009), relataram que o aumento dos marcadores cyclin D1 e ki-67 estava correlacionado com a proliferação do tumor e com a presença de metástases, ou seja, associados com pior prognóstico em doentes com CO.

Também altos níveis de MMP-2, MMP-9 e TNF α foram observados em pacientes com CO, quando comparados com o grupo controlo (Rhodus et al., 2005).

Outras cinco proteínas (M2BP, MRP14, profilin, CD59 e catalase) foram capazes de detetar CO com mais de 90% de precisão clínica (sensibilidade de 90% e especificidade de 83%), segundo o estudo de Hu et al. (2008).

No estudo realizado por Wei et al. (2011), alterações na valina, ácido láctico e fenilalanina produziram alta sensibilidade (90%) e especificidade (83%) com valor preditivo positivo (85%) entre pessoas saudáveis, doentes com cancro e com condições pré-cancerosas.

Também Wang et al. (2014), descrevem diferenças significativas na concentração de colina, betaína e ácido pipercolínico (alta em OSCC) e L-carnitina (baixa em OSCC). Também neste estudo, e utilizando um novo sistema no qual a cromatografia de

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

interação líquida e hidrofílica de fase reversa foi combinada com TOF-MS resultou na descoberta de cinco novos marcadores metabólicos para OSCC, tais como propionilcolina, N-acetil-L-fenilalanina, esfinganina, fitoesfingosina. e Scarboximetil eL-cisteína.

i. Exossomas

Recentemente, as vesículas extracelulares ganharam considerável atenção como mediadores da sinalização intercelular e como potenciais fontes de biomarcadores de cancro. Os exossomas, que são um dos subtipos de vesículas extracelulares, foram inicialmente considerados como um meio das células eliminarem proteínas desnecessárias. Actualmente, são considerados mediadores da sinalização intercelular através, por exemplo, do RNA e da troca funcional de proteínas. Os exossomas estão presentes em quase todos os tipos de biofluidos, significando um enorme potencial para a biópsia líquida e aplicações terapêuticas (Mathieu et al., 2019). Segundo Kalluri (2016), os exossomas são definidos como nanovesículas extracelulares de origem endocítica com 40 a 150 nm de diâmetro.

De acordo com Ruivo et al. (2017), os exossomas são altamente heterogêneos e refletem as características fenotípicas das células que os geram. Similar às células, os exossomas são compostos por uma bicamada lipídica e podem conter todos os constituintes moleculares conhecidos de uma célula, incluindo proteínas, RNA e DNA. Estima-se que o sangue humano normal contenha cerca de 2.000 triliões de exossomas, e o sangue de pacientes com cancro contenha cerca de 4.000 triliões de exossomas. Os órgãos com alguma doença e as células anormais destes, geram mais exossomas que o normal.

Os exossomas derivados de células cancerosas estão surgindo como mediadores intercelulares locais e sistémicos de informações oncogénicas através da transferência de RNA mensageiro (mRNAs), microRNAs (miRNAs) e proteínas durante a formação do tumor. Muitos estudos têm mostrado que células cancerosas libertam uma ampla variedade de exossomas derivados de células cancerígenas que influenciam o comportamento primário das células no microambiente do tumor e nos locais

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

metastáticos (Yoshioka et al., 2018). Os exossomas parecem, assim, apresentarem um importante papel na progressão do tumor.

A descoberta de que os exossomas estão presentes na saliva levantou uma possível explicação de como os biomarcadores de cancro são embalados e transportados para as glândulas salivares, afirma Cheng et al. (2019). A saliva contém um grande número de proteínas que participam da proteção do tecido oral. Foram encontradas, pela primeira vez, pequenas vesículas (30-130 nm de diâmetro) na saliva humana. As vesículas da saliva foram identificadas por microscopia eletrônica. Descobriram que elas contêm dipeptidil peptidase IV (DPP IV), galectina-3 e imunoglobulina A, que possuem potencial para influenciar a resposta imune. Os resultados demonstram que a saliva humana inteira contém vesículas do tipo exossomas; eles podem participar do catabolismo de peptídeos bioativos e desempenhar um papel regulador na defesa imunológica local na cavidade oral.

Sharma et al. (2011), realizaram uma análise bio-molecular de exossomas presentes na saliva de pacientes com CO. Eles demonstraram que nos doentes, os exossomas estavam aumentados em número e tamanho, exibiram uma morfologia diferente e mostraram uma expressão aumentada de CD63.

Da mesma forma, Zlotogorski-Hurvitz et al. (2016) descreveram uma maior concentração e tamanho de exossomas salivares em pacientes com CO em comparação com indivíduos saudáveis, uma maior expressão de CD63 e uma expressão diminuída de CD9 e CD81. Estas moléculas pertencem a uma família de proteínas membranares (“tetraspanins”) e têm sido descritas em exossomas com origem em diferentes tipos celulares (Guo et al., 2017).

ii. RNA tumoral circulante

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de RNA que são produzidos pelo genoma. Refere-se a todos os RNAs, incluindo mRNA, miRNA, RNA que interage com piwi (piRNA) e outros pequenos RNAs. O estudo do transcriptoma salivar usa métodos

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

de alto rendimento que surgiram como ferramentas poderosas para explorar biomarcadores. A saliva contém uma variedade de espécies de RNA extracelular, incluindo mRNA, miRNA e outros pequenos RNAs não codificantes (por exemplo, piRNA). O transcriptoma salivar humano foi descrito inicialmente utilizando tecnologia de microarray. Isso resultou na caracterização do transcriptoma salivar como RNAs codificantes e não codificantes, altamente fragmentados derivados de células hospedeiras e da microbiota oral. O sequenciamento de RNA de alto rendimento (RNA-Seq) usando saliva humana revelou que os tipos mais abundantes de pequenos RNAs são piRNA (7,5%) e miRNA (6,0%) (Ha e Kim, 2014).

No estudo de Li et al. (2004), em vários tipos de cancro, inclusive no CO, certos biomarcadores de RNA foram descobertos na saliva e propostos como possíveis biomarcadores. Entre os biomarcadores de RNA salivares estão os DUSP1, H3F3A, IL1B, IL8, OAZ1, S100P, SAT do mRNA. As combinações desses biomarcadores revelaram uma alta sensibilidade e especificidade (91%) na diferenciação do carcinoma celular de células escamosas em comparação com o grupo controlo. Da mesma forma Brinkmann et al. (2011) e Elashoff et al. (2012) confirmaram que DUSP1 está aumentado no OSCC.

Outros autores têm focado os seus estudos nos miRNA. Estes pequenos RNA são uma classe de RNAs não codificantes de 21 a 25 nucleotídeos e de particular interesse, uma vez que desempenham papéis importantes na regulação da expressão génica em células cancerígenas (Ha e Kim, 2014).

Matse et al. (2013) indicaram que os miRNAs salivares são notavelmente estáveis e os miRNAs salivares endógenos se degradam a uma taxa muito mais lenta do que os miRNAs exógenos. O perfil de miRNA demonstrou que os miRNAs salivares são empacotados em exossomos, tornando-os resistentes à degradação por Rnases, devido à sua bicamada lipídica. Desde então, os miRNAs salivares têm sido estudados como potenciais biomarcadores para cancro da cabeça e pescoço com base em sua relativa facilidade de colheita e deteção. Tal como atrás referido, esta descoberta sugere, também, que os exossomos protegem a sua carga da degradação, tornando-os atraentes ferramentas de diagnóstico para aplicação clínica.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Uma combinação de quatro miRNAs foi capaz de discriminar amostras de saliva entre pacientes com tumores malignos de pacientes com tumores benignos da glândula parótida (sensibilidade de 69%, especificidade de 95%) (Li et al.. 2004).

Nonaka e Wong (2018) descrevem que os miR-125a, miR-200a, miR-139 e miR-375 foram significativamente menos encontrados na saliva coletada em doentes com cancro de boca do que em controles, já os miR-27b e miR-31 tiveram uma expressão aumentada. O miR-125a desempenha um papel importante na proliferação celular e o miR-200a está envolvido na supressão tumoral e na metástase precoce.

Os níveis de miR-125a e miR-200a foram também descritos como aumentados na saliva dos doentes com CO no estudo de Park et al (2009). Este trabalho rastreou um total de 314 miRNAs na saliva de 50 pacientes com OSCC e 50 controles saudáveis.

O trabalho de Wiklund et al (2011), também descreveu um perfil específico para o cancro bucal contendo miR-375 e miR-200a anormais e a metilação do miR-200c-141 que foi capaz de distinguir saliva de pacientes com OSCC e controles saudáveis.

Momen-Heravi et al. (2014) e outros, testaram mais de 700 miRNAs em amostras de saliva de pacientes com OSCC usando a tecnologia NanoString nCounter e identificaram 13 miRNAs que foram diferencialmente expressos em pacientes com OSCC quando comparados a controles saudáveis.

Salazar et al. (2014) testaram 5 miRNAs na saliva de controles saudáveis e pacientes com Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e descobriram que as expressões miR-9, miR-191 e miR-134 podem servir como novos biomarcadores não invasivos para o diagnóstico de Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço com um bom poder discriminatório.

O gene supressor de tumores ligado ao cromossomo X LDOC1 está envolvido no CO. O objetivo do estudo de Liu et al. (2019), foi investigar o potencial da LDOC1 salivar como um biomarcador de cancro bucal. O LDOC1 salivar foi significativamente suprarregulado em mulheres com OSCC ($p = 0,0072$) e significativamente reprimido

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

em homem ($p = 0,0206$). 89% dos indivíduos do sexo masculino com OSCC que fumavam, expressaram baixos níveis de LDOC1. As linhas celulares de OSCC derivadas de sujeitos masculinos do expressaram baixos níveis de LDOC1. Um alto nível de expressão salivar de LDOC1 é um biomarcador de OSCC em mulheres. Uma alta porcentagem de sujeitos do OSCC do sexo masculino que fumam, expressam baixos níveis de LDOC1 salivar. Um nível baixo de expressão salivar de LDOC1 é um biomarcador de OSCC em homens. (Liu et al., 2019).

Os biomarcadores CD44v / SYNE1 / miR34a foram identificados por Shah et al. (2018) por meio de análise de bioinformática e o perfil de expressão desses marcadores foi avaliado na saliva de pacientes com OSCC. O CD44v6 e o CD44v10 demonstraram uma expressão significativamente aumentada, enquanto que o SYNE1 e o miR34a exibiram expressão significativamente diminuída em pacientes com OSCC. A análise estatística sugeriu um provável papel dos CD44v6, SYNE1 e miR34a nos estágios iniciais da malignidade, enquanto uma forte associação foi observada entre a expressão de CD44v6, CD44v10 e miR34a com agressividade loco-regional e condições histopatológicas. Coletivamente, esses achados sugerem um papel plausível do eixo CD44v / SYNE1 / miR34a como biomarcadores salivares não invasivos para diagnosticar esta doença em um estágio inicial e prever o início precoce da metástase.

iii. DNA tumoral circulante

A saliva contém DNA livre de células, e a análise genómica revelou que 70% é derivado do hospedeiro, enquanto 30% se origina da microbiota oral. O DNA salivar é estável e de alta qualidade, sugerindo que o DNA salivar é um alvo útil para biomarcadores. O DNA tumoral circulante (ctDNA) é um fragmento de 180-200 pares de bases de DNA contendo sequências mutadas e acredita-se ser derivado de células tumorais apoptóticas ou necróticas libertando fragmentos de DNA na circulação. Há indícios de que o DNA curto de fita simples (<100 pares de bases) está presente no plasma, o que sugere que essas mesmas espécies podem aparecer na saliva. Um estudo em larga escala sobre vários tipos de cancro demonstrou que uma concentração crescente de ctDNA está associada a um estágio avançado da doença. Não está claro se

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

o ctDNA tem um papel fisiopatológico na promoção de malignidade ou é simplesmente um resíduo da morte celular tumoral. Há alguma evidência, no entanto, de que a presença de ctDNA pode promover o cancro através da transfeção de células saudáveis (Garcia et al., 2010). Dada a natureza heterogénea dos tumores, a análise de ctDNA na biópsia líquida tem o potencial de detetar com precisão e monitorar a progressão do tumor em tempo real, em comparação com a biópsia tecidual (Bettegowda et al., 2014).

O ctDNA salivar demonstrou ser um biomarcador mais sensível que o ctDNA plasmático para CO em estágio inicial. Este estudo demonstrou que o ctDNA pode ser detectado na saliva em estágio inicial de CO com 100% de sensibilidade. Mesmo em pacientes com cancro em outros locais (orofaringe, hipofaringe e laringe), o ctDNA foi encontrado na saliva de 47% a 70% desses grupos de pacientes, tornando-se um valioso biomarcador para a detecção de cancro de cabeça e pescoço. A saliva é enriquecida com DNA tumoral proveniente da cavidade orofaríngea; Assim, analisar tanto a saliva quanto o plasma pode ser ideal para o rastreamento efetivo do cancro de cabeça e pescoço (Nonaka e Wong, 2018).

3. Métodos de Colheita da Saliva

Em termos de colheita de amostras, para estudar os métodos de coleta e armazenamento necessários para uma análise bem-sucedida de biomarcadores, Chiang et al. (2015) disseram ainda não existir um consenso se a amostra de saliva deve ser centrifugada antes ou depois do processamento ou a rapidez com que a amostra deve ser analisada, mas algumas pesquisas mostraram que as amostras devem ser usadas dentro de uma hora e que a centrifugação pode ser realizada dependendo se são células ou moléculas a serem analisadas.

Um aspecto importante a ter em conta na pesquisa de biomarcadores na saliva, é o efeito do estado de estimulação sobre as propriedades e componentes da saliva. A amilase, um exemplo de uma enzima inerente à saliva para a quebra de carboidratos complexos, pode interferir com o diagnóstico durante a análise dos biomarcadores proteicos. Proteínas salivares (histatinas, “statherin”, ou proteínas ricas em prolina ácida) e RNAs

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

são propensos à degradação quando retiradas de seu ambiente ideal (Cheng et al., 2019). Portanto, estratégias preventivas devem ser usadas para estabilizar os componentes salivares com inibidores de protease e inibidores de RNases para preservar sua integridade. Para superar essas limitações, alguns autores (Cheng et al., 2019) sugerem que o diagnóstico salivar deve-se concentrar nas chamadas vesículas extracelulares salivares, nomeadamente nos exossomas pelas razões já atrás referidas.

4. Futuro da Biópsia Líquida

Os métodos “gold-standard” atualmente aceites para o desenvolvimento de biomarcadores incluem cromatografia, espectrometria de massa, eletroforese em gel, microarrays e quantificação baseada em reação em cadeia da polimerase. No entanto, diagnósticos salivares é um campo florescente com o rápido desenvolvimento de novas tecnologias associadas a diagnósticos no PoCT (Point-of-care-testing), sequenciamento de RNA, detecção eletroquímica e biópsia líquida. Essas tecnologias ajudarão a introduzir programas de rastreio de base populacional, permitindo assim detecção, avaliação do prognóstico e monitorização da doença (Kaczor-Urbanowicz et al., 2016).

Medidores de glicemia, automonitoramento de coagulação e kits de testes de gravidez usando amostras de urina são exemplos bem conhecidos de PoCT e se tornaram produtos vendidos sem prescrição médica para serem vendidos em grande escala no mercado. Khan et al. (2017) preveem que a saliva seja um substituto do sangue, coletado de forma não invasiva para o diagnóstico de doenças orais e sistêmicas. Assim, o PoCT substitui os centros de testes especializados usando amostras diferentes do sangue e da urina. Para o desenvolvimento de dispositivos PoCT, é de suma importância considerar o risco mínimo de infecção, ser o menos indolor possível, além da automação, integração, capacidade de detecção multiplexada, análise rápida, tamanho pequeno de amostra para análise. A revolução da saliva humana nas ciências médicas e odontológicas através de sua propriedade como um “espelho da saúde do corpo” na última década trouxe muitas detecções de doenças através de suas mudanças na composição das condições de doença.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

A nanotecnologia tornou-se uma abordagem importante para melhorar o diagnóstico e o tratamento do cancro. Materiais em nanoescala têm propriedades físicas e biológicas únicas que são úteis para a detecção de cancro. Como atrás referido, os exossomas são nanovesículas de ocorrência natural com informações clinicamente relevantes e que, por isso, têm o potencial de reduzir o limite de detecção de biomarcadores de cancro. O conceito de que um paciente pode usar uma única gota de sua própria saliva e testá-la utilizando um dispositivo para determinar seu risco de cancro, há muito tempo é estudado por engenheiros e médicos (Aro et al., 2017).

III. DISCUSSÃO

Diversos riscos e complicações cirúrgicas nos procedimentos para realização de uma biópsia tecidual, além do seu alto custo e exigências, e o facto das biópsias líquidas serem mais baratas, mais simples e não-invasivas, foram os principais motivos para o campo das biópsias líquidas emergir nas diversas áreas de pesquisa da oncologia atual. Nos últimos anos, os esforços de investigação concentram-se nos métodos não invasivos para o diagnóstico e compreensão da arquitetura histológica e genómica do tumor para monitorizar a evolução do tumor e a resposta terapêutica. Sendo assim, a realização de diagnóstico e controle através das biópsias líquidas tem-se revelado vantajosa na prática futura da oncologia (Rapado-González et al., 2016). As biópsias líquidas têm vindo a ser descritas de forma crescente para diferentes tipos de neoplasias, entre elas o CO.

A saliva foi reconhecida como um fluido de diagnóstico emergente, pois, por conter vários biomarcadores (CTCs, ctDNA, ctRNA, proteínas, exossomas, entre outros), é possível a análise e detecção precoce do cancro, através de testes simples, rápidos e de baixo custo (Jia et al., 2017).

Vários estudos relataram variações dos níveis de biomarcadores salivares em pacientes saudáveis comparando-os com pacientes com CO, confirmando uma provável associação desses biomarcadores na tumorigénese.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Sahibzada et al. (2017), Rajkumar et al. (2015), Shipitzer et al. (2009) e Rhodus et al. (2005) relataram aumento em vários biomarcadores tumorais (IL-6 salivar, Cyclin D1, ki-67, MMP-2, MMP-9 e TNF- α). Wei et al. (2011) e Wang et al. (2014) detetaram maior níveis de proteínas salivares em pacientes com CO.

Outros estudos analisaram níveis de exossomas na saliva de indivíduos saudáveis comparando-os com pacientes com CO. Sharma et al. (2011), constatou aumento em número e tamanho e uma expressão aumentada de CD63, da mesma forma que essa evidênciação de aumento de CD63 foi suportada por Zlotogorski-Hurvitz et al. (2016), além de uma expressão diminuída de CD9 e CD81.

Um aspecto importante a ter em conta na pesquisa de biomarcadores na saliva, é o efeito da amilase que pode interferir com o diagnóstico durante a análise dos biomarcadores proteicos (Cheng et al., 2019). Proteínas salivares e RNAs são propensos à degradação quando retiradas de seu ambiente ideal. Os exossomas, por ter uma bicamada lipídica (Ruivo et al., 2017) e conter todos os constituintes moleculares conhecidos de uma célula (incluindo proteínas, RNA e DNA) e os miRNAs endógenos, também com sua carga protegidos da degradação, tornaram-se, dessa maneira, as mais atraentes ferramentas de diagnóstico para aplicação clínica (Matse et al., 2013).

Em estudos que avaliaram biomarcadores de RNA também revelaram associações com cancro. Nos estudos de Li et al. (2004), Brinkmann et al. (2011) e Elashoff et al. (2012), foram encontrados biomarcadores em com níveis elevados, enquanto nos trabalhos de Nonaka e Wong (2018), Park et al. (2009) e Wiklund et al. (2011), diminuídos. No estudo de Liu et al. (2019), foi relatado que em homens e mulheres, o mesmo biomarcador pode ter resultados diferentes.

O ctDNA também foi confirmado como biomarcador por Nonaka e Wong (2018) quando foi encontrado em 100% dos doentes com CO em estágio avançado inicial.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

No que diz respeito a colheita e armazenamento das amostras para uma análise bem-sucedida, ainda não existe um consenso, mas algumas pesquisas mostraram que as amostras devem ser usadas dentro de uma hora e que a centrifugação pode ser realizada dependendo se são células ou moléculas a serem analisadas (Chiang et al., 2015).

O conceito de que um paciente pode usar uma única gota de sua própria saliva e testá-la utilizando um dispositivo PoCT para determinar seu risco de cancro, há muito tempo é estudado por engenheiros e médicos (Aro et al., 2017).

IV. CONCLUSÃO

As biópsias teciduais e líquidas, sem dúvida, complementam-se. A biópsia líquida representa uma ferramenta para monitorar a evolução do cancro, bem como a resposta terapêutica e fornece informações quando uma biópsia de tecido não pode ser obtida. É de se esperar que testes baseados em biópsia líquida sejam desenvolvidos para prever a resposta ao diagnóstico precoce e possível prognóstico. O uso da saliva como meio para avaliação tem suas vantagens exclusivas, incluindo facilidade, manuseio, execução, adesão dos pacientes e, em suma, ser uma ferramenta custo-efetiva de diagnóstico, triagem e avaliação do tratamento do cancro. Esses biomarcadores podem ser utilizados como importante recurso para a detecção precoce, já que sua relação na tumorigênese é extremamente evidente. Infelizmente, os resultados de vários estudos ainda estão incompletos; mais estudos precisam ser realizados para consolidar respostas mais precisas.

V. BIBLIOGRAFIA

Alix-Panabières C., Pantel, K. (2016). Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery* 6, pp.479–491.

Aro, K., et al. (2017). Saliva Liquid Biopsy for Point-of-Care Applications. *Frontiers in Public Health*, 5, p. 77.

Beaver, J.A., et al. (2014) Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin. Cancer Res*, 20, pp. 2643–2650.

Bettegowda, C., et al. (2014). Detection of Circulating Tumor DNA in Early and Late Stage Human Malignancies. *Science Translation Medicine*, 16(224).

Brinkmann O., et al. (2011). Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. *Oral Oncology*, 47, pp. 51–55.

Cheng, J., Nonaka, T., Wong, D.T.W. (2019). Salivary Exosomes as Nanocarriers for Cancer Biomarker Delivery. *Materials*, 12, p. 654.

Chiang, S.H., et al. (2015). RNAPro-SAL: a device for rapid and standardized collection of saliva RNA and proteins. *Biotechniques*, 58(2), pp. 69-76.

Crowley, E. (2013). Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, pp. 472–484.

Dzebo, S., et al. (2017). Frequency of depression and its correlation with quality of life of patients with oral cavity cancer. *Materia Socio-Medica*, pp. 29-97.

Elashoff, D., (2012). Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 21, pp. 664–672.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Câncer Oral

Ferlay, J., *et al.* (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *International Journal of Cancer*, 136, pp. 359–386.

Garcia D.C., (2010). Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Research*, 70(2) pp. 560–567.

Gorgannezhad, L., *et al.* (2018). Circulating tumor DNA and liquid biopsy: Opportunities, challenges, and recent advances in detection technologies. *Lab on a Chip*. 18, pp. 1174–1196.

Guo, W., *et al.* (2017). Exosomes: New players in cancer. *Oncology Reports*, 38(2), pp. 665–675.

Heitzer, E., Ulz, P., Geigl, J.B. (2015). Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical Chemistry*, 61, pp. 112–123.

Hu, S., *et al.* (2008). Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clinical Cancer Research*, 14, pp. 6246–6252.

Huang, Z., *et al.* (2010). Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 127, pp. 118–126.

Jia, S., *et al.* (2017). Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8, pp. 55632–55645.

Kaczor-Urbanowicz, K. E., *et al.* (2016). Emerging technologies for salivaomics in cancer detection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(4), pp. 640–647.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Kalluri, R. (2016) The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 126, pp. 1208–1215.

Khan, R.S., Khurshid, Z., Yahya I.A.F. (2017). Advancing Point-of-Care (PoC) Testing Using Human Saliva as Liquid Biopsy. *Diagnostics*, 7(3), p. 39.

Li, Y., et al. (2004). Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*, 10, pp. 8442–8450.

Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, Eisele D, Abemayor E, Elashoff D, Park NH, Wong DT. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2004; 10:8442–50.

Liu, C., et al. (2019). Salivary LDOC1 is a gender-difference biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Peer Journal*, 7.

Mathieu, M.. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21, pp. 9–17.

Matse, J.H., et al. (2013). Discovery and prevalidation of salivary extracellular microRNA biomarkers panel for the noninvasive detection of benign and malignant parotid gland tumors. *Clinical Cancer Research*, 19, pp. 3032–3038.

Minju, H.A., Kim, V.N. (2014). Regulation of MicroRNA Biogenesis. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 15, pp. 509–524.

Momen-Heravi, F., et al. (2014) Genomewide study of salivary microRNAs for detection of oral cancer. *Journal Dental Research*, 93(71), pp. 86–93.

Nonaka, T., Wong, D.T.W. (2017). Saliva-Exosomics in Cancer: Molecular Characterization of Cancer-Derived Exosomes in Saliva. *Enzymes*, 42, pp. 125–151.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Nonaka, T., Wong, D.T.W. (2018). Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *Journal of Dental Research*, 97(6), pp. 701–708.

Park, N. J., (2009). Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clinical Cancer Research*, 15(17), pp. 5473–5477.

Rajkumar, K., et al. (2015). Salivary and serum level of CYFRA 21-1 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Oral Disease*, 21, pp. 90–6.

Rapado-González Ó., et al. (2016). Cancer Salivary Biomarkers for Tumours Distant to the Oral Cavity. *International Journal of Molecular Science*, 17(9), p. 1531.

Rhodus, N.L., et al.(2005). The feasibility of monitoring NFkappaB associated cytokines: TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. *Molecular Carcinogenesis*, 44, pp. 77–82.

Robertson, E.G., Baxter, G. (2011). Tumour seeding following percutaneous needle biopsy: The real story! *Clinical Radiology*, 66, pp. 1007–1014.

Ruivo, C.F., et al. (2017) The biology of cancer exosomes: Insights and new perspectives. *Cancer Research*, 77, pp. 6480–6488.

Sahibzada, H.A., et al. (2017). Salivary IL-8, IL-6 and TNF- α as Potential Diagnostic Biomarkers for Oral Cancer. *Diagnostics*, 7(2), p. 21.

Salazar, C., et al. (2014). A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncology*, 37(5), pp. 331–338.

Shah, K., et al. (2018). Uncovering the potential of CD44v/SYNE1/miR34a axis in salivary fluids of oral cancer patients. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47(4), pp. 345–352.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Cancro Oral

Sharma, S., et al. (2011). Quantitative Nanostructural and Single-Molecule Force Spectroscopy Biomolecular Analysis of Human-Saliva-Derived Exosomes. *Langmuir*, 27, pp. 14394–14400.

Shpitzer, T., et al. (2009). Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *British Journal of Cancer*, 101, pp. 1194–1198.

Siravegna, G., et al. (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Naure Reviews Clinical Oncology*, 14, pp. 531–548.

Tadimety, A., et al. (2018). Advances in liquid biopsy on-chip for cancer management: Technologies, biomarkers, and clinical analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 55(3), pp. 140–162.

Wang, Q., et al. (2014). The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Scientific Reports*, 4, p. 6802.

Wei, J., et al. (2011). Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *International Journal of Cancer*, 129, pp. 2207–2217.

Wiklund, E.D., et al. (2011). MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PloS One*, 6(11).

Yan, W. (2009). Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clinical Applications*, 3, pp. 116–134.

Yoshioka, Y., Katsuda, T., Ochiya, T. (2018). Extracellular vesicles and encapsulated miRNAs as emerging cancer biomarkers for novel liquid biopsy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. pp. 1-8.

A Importância da Saliva como Biópsia Líquida no Câncer Oral

Zlotogorski-Hurvitz, A., et al. (2016). Morphological and Molecular Features of Oral Fluid-Derived Exosomes: Oral Cancer Patients versus Healthy Individuals. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*, 142, pp. 101–110.