

Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Disciplina de Biologia Oral

Módulo II
Genética Molecular

Aplicação da saliva para estudos em genética molecular

Pós-Graduandos:
Ana Cecília de Campos Batista
André Luiz Gomide
Daniela Nobre Vasconcelos
Edmar Fernandes da Costa
Érika Maria Carvalho Bitencourt
Luciana Pimenta e Silva Machado

Coordenadora do Módulo:
Profa Dra Sandra Ventorin von Zeidler

Goiânia, Fevereiro 2010

Objetivos

- Descrever a aplicação da saliva como fluido corpóreo para o diagnóstico
- Conceitos básicos e aplicação das ferramentas de biologia molecular para estudo da saliva e sua correlação com diferentes doenças ou condições

Introdução

- Objetivo ideal na promoção de saúde:

- Habilidade de monitorar o estado de saúde-doença
- Início e progressão da doença
- Resultados do tratamento

Meios não invasivos

- Biomarcadores específicos
- Tecnologias para detectar, distinguir e monitorar biomarcadores

Formas simples e econômicas de obter amostras com mínimo de desconforto

Saliva

Lee et al, 2009

Composição da Saliva

- Diferenciada:
 - 99% água
 - Íons/Substâncias inorgânicas:
 - Ca, P, Bicarbonato, NaF, K
 - IgA
 - IgM e IgG
 - Substâncias Orgânicas:
 - Glicoproteínas, enzimas digestivas, glicose e uréia
 - Restos alimentares
 - Microorganismos
 - Produtos do metabolismo bacteriano
 - Células descamadas do epitélio bucal
 - Muco da cavidade nasal e da faringe
 - Fluido transudato da mucosa e
 - Exsudato dos sulcos gengivais

Moura et al, 2007; Schützemberger et al, 2007

Função da Saliva	Efeito	Constituintes Ativos
Proteção	Lubrificação Impermeabilização Lavagem Formação de película	Glicoproteínas (mucinas) Água
Tamponamento	Manutenção do pH inadequado para colonização Neutralização de acidez	Fosfato Bicarbonato
Digestão	Formação do bolo alimentar Neutralização do conteúdo esofágico Digestão do amido	Água Fosfato Bicarbonato Amilase
Gustação	Moléculas em solução Crescimento e maturação dos corpúsculos gustativos	Gustina
Ação antimicrobiana	Barreira Anticorpos Ambiente hostil	Glicoproteína Imunoglobulina A Lisozima Lactoferrina
Integridade do dente	Maturação do esmalte Reparo	Cálcio Fosfato

Ten Cate, 2001

Saliva

- Potencial da saliva como fluido biológico útil no diagnóstico de doenças bucais ou sistêmicas

“Espelho do corpo”

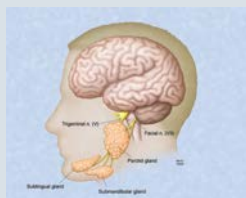
- Propriedades biológicas
 - mistura de fluidos orais e seus conteúdos



Lee et al, 2009; Moura et al, 2007

Coleta

■ Glândula-específica X Saliva total



Lee et al, 2009; Moura et al, 2007; <http://www.corbisimages.com/Search/SearchResults.aspx?q=saliva>

Coleta

■ Estimulada X Não estimulada

Mecânica

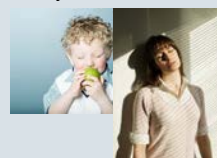


Química



~~Estímulos exógenos~~

Alteração do fluxo salivar



Moura et al, 2007; <http://www.corbisimages.com>

Saliva como fluido diagnóstico

■ Vantagens:

- Facilidade de acesso, estocar e transportar
- Econômico
- Facilidade de coletar quantidade suficiente para análise
- Diagnóstico preciso



Para pacientes:

- Técnica de coleta não invasiva
- Redução do desconforto e ansiedade (monitoramento longitudinal)
- menor risco de contaminação

Para profissionais:

- Coleta mais segura (HIV, hepatite)
- Manuseio facilitado
- Não coagula

Lee et al, 2009; <http://www.corbisimages.com>

Saliva como fluido diagnóstico

■ Desvantagem

- Possui menor quantidade de testes para diagnóstico

Técnicas mais novas e sensíveis



Lee et al, 2009; <http://www.corbisimages.com>

Saliva como fluido diagnóstico

Doenças com envolvimento de agentes biológicos infecciosos	- Meio confiável para avaliar composição da microbiota bucal - Resposta imunológica à infecção pela produção de anticorpos Ex: Cárie, Doença Periodontal, Rubéola, Papiloma vírus Humano (HPV), Vírus Epstein-Barr (EBV), Doenças Estomacais (<i>Helicobacter pylori</i>), HIV
Doenças Neoplásicas Malignas	- Detecção de marcadores potenciais (CD44) para o diagnóstico do carcinoma de células escamosas (CEC) Ex c-erbB-2 marcador prognóstico do Câncer de mama
Psiquiatria	- Acompanhamento de indivíduos com distúrbios psíquicos p/ monitoramento da resposta terapêutica Ex: Depressão + Síndrome do Ardor Bucal (SAB)
Doenças Autoimunes	- Avaliação sialométrica Ex: Síndrome de Sjögren
Endocrinologia	- Simplifica a coleta e a mensuração dos níveis hormonais e suas variações - monitoração Ex: Diabetes tipo I

Saheb Jamee et al, 2009; Moura et al, 2007

Carcinoma oral de células escamosas

- 90% dos casos de câncer de boca
- Fatores etiológicos incluem
 - Fumo/Tabaco
 - Abuso de álcool
 - Mastigação da noz de Betel
- Grupo crescente de pacientes sem exposição tabaco/álcool
 - Adultos jovens e mulheres
- Alta taxa de recidiva
- Biomarcadores sensíveis e específicos do CEC oral → diagnóstico precoce de pacientes de alto risco



Saheb Jamee et al, 2009; Wu et al, 2010; <http://www.corbisimages.com>

Métodos utilizados na identificação dos biomarcadores em saliva

■ Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

- PCR quantitativo em tempo real (RT)
- PCR metilação-específico
- PCR por transcriptase reversa (RT-PCR)



■ DNA/RNA microarray

Wu et al, 2010; <http://www.corbisimages.com>

Abordagens genômicas e proteômicas

- Observar expressões alteradas de genes e proteínas em ampla variedade de neoplasias malignas
- Necessidade de coleta de espécimes (tecido tumoral ou fluido corporal)
- Fluidos corporais - foco de estudos devido a identificação de biomarcadores

Wu et al, 2010

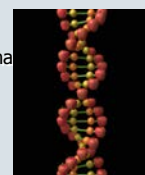
Abordagem proteômica salivar

- Avanços na espectrometria de massa p/ identificação do carcinoma oral de células escamosas (CEC oral)
 - Ex: níveis elevados de citocinas pro-angiogênicas e pro - inflamatórias (TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-8)
- Possibilidade de identificação de mutações genéticas (anticorpo anti-p53) na saliva e soro de pacientes com CEC oral

Wu et al, 2010

Abordagem genômica salivar

- Inúmeros métodos utilizados na biologia molecular
- DNA específico tumoral(gene P53 mutado) na saliva pode ser utilizado como biomarcador para o CEC oral
- Infecção por microorganismos no desenvolvimento do CEC oral



Wu et al, 2010; <http://www.corbisimages.com>

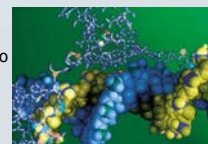
Potenciais biomarcadores do CEC oral na saliva

Molécula	Saliva		Referências
	Proteômica ^a	Genômica ^b	
Albumina	●	●	14
Cancer antigen 125 (CA125)	●	●	15
Catalase	●	●	16
CD44	●	●	17
CD59	●	●	18
Collin-1	●	●	19
Cyfra 21-1	●	●	20
Endothelin-1	●	●	21
Glutathione	●	●	22
Interleukin 1 α (IL-1 α)	●	●	23
Interleukin 1 β (IL-1 β)	●	●	24
Interleukin 6 (IL-6)	●	●	25
Interleukin 8 (IL-8)	●	●	26
Immunoglobulin heavy chain constant region gamma	●	●	27
Mac-2 binding protein (MGP)	●	●	28
MMP-14	●	●	29
p53 antibodies	●	●	30
Profilin	●	●	31
S100 calcium binding protein	●	●	32
Tuberosinase	●	●	33
TNF- α	●	●	34
Tissue polypeptide antigen (TPA)	●	●	35
Transferrin	●	●	36
Transferrin	●	●	37
α -Amylase	●	●	38
β -Globulin	●	●	39
Bacteria	●	●	40
CD44	●	●	41
DNA (promoter hypermethylation)	●	●	42
DUSP1	●	●	43
IL-1 β	●	●	44
IL-1 α	●	●	45
IL-6	●	●	46
IL-8	●	●	47
S100P	●	●	48
SAT	●	●	49

Wu et al, 2010

Biomarcadores para alterações moleculares do CEC oral

- Mutações de genes específicos determinam o $\uparrow$ ou a $\downarrow$ da expressão de proteínas frequentemente encontradas na progressão do CEC oral
- Tais genes podem ser classificados para diferenciar pacientes com prognóstico bom ou ruim no momento do diagnóstico, além de confirmar o sucesso do tratamento (p. ex. cirurgia, radiação)
- Genes específicos associados com progressão histológica do CEC oral podem ser usados como marcadores para prever o diagnóstico e prognóstico



Wu et al, 2010; <http://www.corbisimages.com>

Carcinoma oral de células escamosas

■ Biomarcadores presentes em pacientes alto-risco

Urokinase-type plasminogen activator receptor
 Ki-67 and VEGFA,
 active matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression
 Tissue inhibitor of metalloproteinase-2
 Trophoblast
 RhoC
 Keratin
 serum midkine (S-MK)
 human centromere protein
 H (CENP-H)
 p75 neurotrophin receptor
 RHAMM

Wu et al, 2010

Carcinoma oral de células escamosas

■ Maior expressão

Galectin-1
 Trophoblast 2
 Cyclin B1
 CXCR4
 P63
 Rho C
 Keratin 8
 p21(WAF1/CIP1) e phosphorylated Akt
 Loss of E-cadherin



Metástase

■ Elevação no número

Human telomerase reverse transcriptase
 Tissue inhibitor of metalloproteinase-2
 Interleukin IL-6 (IL-6)
 c-Met
 Stromal syndecan-1



Recidiva

Wu et al, 2010

Carcinoma oral de células escamosas

■ Níveis elevados

CD109
 Akt activation
 P63 a protein encoded by P63
 Gene which is a P53 gene homolog and
 the adverse expression of E-cadher



**Indicador de
prognóstico**

- Inibição do Akt é uma abordagem molecular no tratamento do CEC oral

Wu et al, 2010

Carcinoma oral de células escamosas e saliva

- A mutação de anticorpos anti-p53 em pacientes com CEC oral foram identificados tanto na saliva quanto no soro
- IL-6 – relacionada com a recidiva do CEC oral detectada na saliva

Wu et al, 2010

Conclusão

- Diagnóstico salivar – ótima escolha como teste de triagem inicial
- Procedimento não invasivo de baixo custo
- Meio útil para o diagnóstico e monitoramento da saúde e de patologias bucais e sistêmicas
- Necessidade de mais estudos

Referências Bibliográficas

- Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(3):206-11.
- Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PHd, Oliveira Filho SA. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2007;7(2):187-94.
- Ten Cate AR. *Histologia Bucal.* 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 296-322.
- SahebJamee M, Boorghani M, Ghaffari SR, AtarbashiMoghadam F, Keyhani A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(10):e525-8.
- Schutzemberger ME, Souza RT, Petrucci RE, Naval Machado M, Papalexou V, Brancher JA. Análise bioquímica do fluido salivar de indivíduos portadores de doença periodontal. *RSBO.* 2007;4(1):46-52.
- Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010.