UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

NOVOS BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DO CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

ALUNA: Paula Cristina Batista de Faria

ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA – M.G
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

NOVOS BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DO CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

ALUNA: Paula Cristina Batista de Faria

ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA – M.G.
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F224n Faria, Paula Cristina Batista de, 1981-
Novos biomarcadores para o diagnóstico não invasivo do carcinoma oral de células escamosas [manuscrito] / Paula Cristina Batista de Faria. - 2010.
93 f. : il.

Orientador:.Luiz Ricardo Goulart Filho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Boca - Câncer - Teses. 2. Boca - Doenças - Diagnóstico - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 616.31-006.6

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

NOVOS BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO DO CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Aluna: Paula Cristina Batista de Faria

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores: Dr. Adriano Mota Loyola (UFU)
Dr. Jair Pereira da Cunha Junior (UFU)
Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay (INCA)
Dra. Sonia Maria Oliani (UNESP)

Data de Defesa: 26/02/2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

_____
Luiz Ricardo Goulart Filho

Dedicatória

Dedico às pessoas mais importantes da minha vida...

Mamãe Neusinha, a mais linda do mundo! Meu maior exemplo de vida... de coragem, de independência, de força, de fé, de dedicação... Meu alicerce maior! Meu porto seguro! Dizer "obrigada" é muito pouco!!! Te amo mais que tudo!

Papai Paulinho querido! Obrigada por me transmitir os genes da curiosidade e da criatividade... são eles os responsáveis por grande parte do meu gosto pela pesquisa! Muito obrigada pela torcida! Amo você!

Meus irmãos Dedé, Ju, Márcio, Ana e Delei... sou uma grande privilegiada por tê-los ao meu lado! Se cheguei até aqui é porque tenho a certeza de que posso sempre contar com vocês! Obrigada pela força! Amo vocês demais!

Meus afilhadinhos fofíssimos Rafael, Matheus e Gabriela... que dão um brilho todo especial à minha vida! Obrigada pelos sorrisos sinceros! Sou a dindinha mais apaixonada e orgulhosa do mundo!

Babys, meu amor, a quem tanto admiro! Agradeço por dividir comigo sonhos e momentos, que por mais singelos, tornam-se inesquecíveis ao seu lado... Obrigada amor da vida, por tudo!!! É bom demais ter você comigo! Somos doutores agora!!! Te amo pra sempre!

Obrigada a todos de coração! Essa conquista não faria o menor sentido se eu não tivesse como compartilhá-la com vocês!

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, pela saúde que tenho para enfrentar cada dia, pelas oportunidades que me são apresentadas e pelas pessoas que colocou em minha vida. Ao meu anjo da guarda São Geraldo, meu super companheiro e intercessor.

Ao meu orientador Dr. Luiz Ricardo Goulart. Que bom que a minha pequena “ameaça” logo no segundo ano de graduação funcionou... “se não me aceitasse no seu laboratório eu trancaria meu curso e sairia da UFU, pois nada mais me interessava ali...” Tudo friamente calculado, claro... pois já sabia que estava diante de um exemplo de sucesso profissional, competência e paixão pela ciência. Sou e serei sempre muito grata pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e pela confiança que sempre depositou em mim em cada projeto que participei, em cada aula que tive o prazer de lhe substituir, em cada palestra que me indicou. Obrigada por tudo!

Ao Dr. Jair Junior, Dr. Adriano Loyola, Dra. Eliana Abdelhay, Dra. Sonia Oliani, Dra. Ana Graci Madurro e Dr. Carlos Ueira por terem prontamente aceitado o convite para participarem da banca, estou certa de que suas contribuições serão de extrema importância para o fechamento desse trabalho.

De forma muito especial agradeço a cada um dos pacientes que mesmo passando por um momento complicado, muitas vezes de tristeza e dor, confiaram em mim, cedendo amostras e dividindo comigo suas angústias. A vocês todo o meu respeito e gratidão. Aos voluntários saudáveis que compreenderam a importância do trabalho e colaboraram com imensa boa vontade.

A todas as pessoas que fazem parte da Unidade de Diagnóstico Estomatológico/UFU, obrigada pelo carinho e por terem me recebido de braços abertos. A cada aluno ou profissional que permitiu com que eu realizasse as entrevistas e coletas de material. Aos professores Marcus e Ailton pela colaboração. Anísio, obrigada pela amizade e parceria, sua ajuda foi

indispensável! Em especial ao Professor Durighetto, a quem admiro demais, agradeço pela confiança, pela oportunidade, pela atenção, pelos ensinamentos e principalmente pelo otimismo e alegria de sempre que me ajudaram muito quando tudo dava errado. O tempo que passei com vocês foi além de produtivo, muito prazeroso.

Aos médicos do Serviço de Cabeça e Pescoço HC/UFU Dr. Sindeval, Dr. Sávio e Dra. Veruska por acreditarem no projeto e permitirem o acesso aos pacientes dentro e fora do centro cirúrgico. Aprendi muito e sou imensamente grata pela oportunidade de acompanhar tudo tão de perto.

À Cizelene, Ana Flávia e Taís pela ajuda com as coletas e questionários.

A todos os funcionários do Hospital de Clínicas/UFU e do Hospital do Câncer de Uberlândia, em especial Edésio e Luiz, por colaborarem com minhas inúmeras buscas aos arquivos de prontuários e por me tratarem sempre com tanta atenção.

Ao amigo Gerson Fraissat pelas palavras certas no momento certo. Aos demais funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica/UFU por fornecerem os meios necessários para o desenvolvimento do projeto. Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que me receberam tão bem no Instituto Nacional de Câncer (INCA). Dra. Renata Binato, muito obrigada pela disponibilidade, atenção, empenho em fazer dar certo e por abraçar com tanto carinho meu projeto.

À Nathalia que gentilmente me recebeu em sua casa durante os dias que passei no Rio. Muito obrigada, amiga!

Às “flores” do laboratório de patologia bucal, em especial à Deborah que me recebeu com muita simpatia e colaborou de forma imprescindível para os bons resultados dos ensaios de imuno-histoquímica. Sua ajuda foi muito importante em todos os sentidos!

Aos queridos amigos do laboratório de hansenologia pelas boas risadas, pelas trocas de conhecimento, enfim, pela colaboração de sempre!

A todos meus colegas dos demais laboratórios do INGEB. Obrigada por me atenderem sempre que busquei ajuda, algum equipamento ou reagente.

Aos meus companheiros do Laboratório de Nanobiotecnologia pelo convívio, respeito, troca de experiência e amizade nesses últimos anos. Meu “obrigada” a cada um de vocês, aos presentes, aos que chegaram há pouco tempo e aos que já não estão mais no laboratório. Carol Reis e Ana Paula, obrigada pela ajuda com as coletas no centro cirúrgico. Carol Siquieroli, muito obrigada por pelo grande auxílio na realização do primeiro “*panning* em saliva do universo”, aprendi muito com você! Yara, obrigada pela ajuda com o projeto e as extrações de RNA. Ângela, agradeço por ter aceitado a parceria em um momento tão delicado, quando me faltava calma e tempo! Sua ajuda foi fundamental para a finalização dessa tese.

Stael, Cris e Cíntia, minhas companheiras de casa durante o doutorado... vocês agüentaram algumas crises de stress por causa do gel que não correu, da bactéria que não cresceu, do clone que não reagiu... e mesmo me achando meio maluca, me consolaram e torceram pra dar tudo certo... Obrigada! À minha amiga Marcela, que mesmo distante, está sempre presente!

À minha amiga Renata, com a qual sei que posso SEMPRE contar, pro que der e vier. Isso pra mim é o mais importante! Obrigada por tudo, AMIGA querida! Sua amizade é muito preciosa!

Ao querido amigo Marco Lara, pelas inúmeras caronas, palavras de incentivo e otimismo contagiante.

Paula e Rafael, deixei vocês por último porque, na verdade, não sei o que dizer. Estou certa de que se não fossem as mãos que vocês dois me estendiam a cada vez eu tentava me levantar após um experimento fracassado, eu não teria chegado ao fim! E isso, a gente sabe bem, aconteceu inúmeras vezes. E vocês SEMPRE estavam ali, bem do meu lado, dizendo que da próxima vez iria dar certo e que me ajudariam. Eu jamais me esquecerei do que fizeram por mim! Muuuuuuito obrigada mesmo, de coração! Ficarei muito lisonjeada se eu puder, algum dia, fazer o mesmo por vocês. É bom demais saber que conquistei a amizade de pessoas tão especiais! Esse título é nosso!

"Na verdade os resultados finais dos empreendimentos estanques pouco ou nada importam no contexto de uma vida, isso porque o ato de vencer não é exatamente triunfar em batalha. É, antes de tudo, a glória de conseguir sentir na alma que você é capaz de se levantar quando as pernas pedem repouso; que você é capaz de, na encruzilhada da vida, decidir se seguirá pelo norte ou pelo sul; que você é capaz de tentar, sempre e sempre, ainda que as chances sejam pequenas, ou nem existam mais; que você é capaz de continuar a luta mesmo quando a derrota se avizinha e, afinal, se acaso as forças se exaurirem, se sequer forem suficientes para lhe fazer ecoar o seu grito de guerra, e nem mesmo lhe permitirem esboçar um largo sorriso, você ainda será um vencedor se puder reafirmar para o seu eu, com absoluta convicção, que, apesar dos percalços, cada minuto vivido valeu à pena,

e muito."

Danilo Santana

ÍNDICE

Lista de Figuras iii
Lista de Tabelas iv
Lista de Abreviaturas v

Apresentação 01

Fundamentação Teórica 03

1. Carcinoma Oral de Células Escamosas 04
   1.1. Aspectos Epidemiológicos 04
   1.2. Fatores de Risco 07
   1.3. Estágios Clínicos de Desenvolvimento, Diagnóstico e Tratamento 10
   1.4. Fatores Genéticos 12
2. A Biologia Molecular no Estudo do Câncer 14
   2.1. Anticorpos Recombinantes 14
   2.2. Phage Display 17
   2.3. PCR em Tempo Real 21
3. Métodos Não Invasivos: A Saliva como Fluido Diagnóstico 24
4. Referências Bibliográficas 29

Capítulo 1 - Seleção e Caracterização de Peptídeos Sintéticos Ligantes a Proteínas Salivares de Pacientes com Carcinoma Oral de Células Escamosas por Phage Display 45

Resumo 46
Abstract 47
1. Introdução 48
2. Pacientes e Métodos 50
   2.1. Coleta e Preparo do Material Biológico..... 50
   2.2. Biblioteca de Fragmentos de Anticorpos scFv..... 51
   2.3. Seleção por *Phage Display* dos Anticorpos scFv (*Panning*)..... 51
   2.4. Produção dos Anticorpos scFv Solúveis 52
   2.5. Ensaio de *Dot Blotting* 52
   2.6. Sequenciamento do DNA e Bioinformática 53
   2.7. Purificação dos Anticorpos scFv por Cromatografia de Afinidade 53
   2.8. Ensaio Imunoenzimático ELISA 54
   2.9. Análises Estatísticas 54
   2.10. Imuno-histoquímica 55
   2.11. Gel SDS-PAGE Bidimensional e Espectrometria de Massas 56
3. Resultados 58
4. Discussão 64

Capítulo 2 - Anexina A1 como biomarcador sanguíneo para o Carcinoma Oral de Células Escamosas 74

Resumo 75
Abstract 76
1. Introdução 77
2. Pacientes e Métodos 78
   2.1. Coleta e Preparo das Amostras 78
   2.2. Extração de RNA e Transcrição Reversa 79
   2.3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real 79
   2.4. Análises Estatísticas 80
3. Resultados 81
   3.1. Diminuição da Expressão Gênica da Anexina A1 no Sangue Periférico dos Pacientes com Carcinoma Oral de Células Escamosas 81
   3.2. Expressão Difefrencial da Anexina A1 de acordo com os Parâmetros Clínicos 83
4. Discussão 85
5. Referências Bibliográficas 89

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Carcinoma oral de células escamosas diagnosticado em diferentes sítios anatômicos bucais 05

Figura 2. Representação esquemática do fragmento scFv..... 16

Figura 3. Estrutura básica do bacteriófago filamentoso 19

Figura 4. Ciclos de seleção de proteínas a partir de uma biblioteca de *Phage Display* 20

Figura 5. Mecanismos de transporte de proteínas e íons do soro para os ductos das glândulas salivares 26

CAPÍTULO 1

Figura 1. Alinhamento das sequências de aminoácidos das cadeias leve (VL e VK) e pesada (VH) dos dez clones selecionados 59

Figura 2. Imunoreatividade do fragmento de anticorpo scFv D09 em ELISA 60

Figura 3. Análise imuno-histoquímica de amostras de tecido de OSCC e mucocele 62

Figura 4. Eletroforeses Bidimensionais e respectivos ensaios de *Western blotting* para identificação das proteínas ligantes ao scFv D09..... 63

CAPÍTULO 2

Figura 1. Detecção dos produtos de PCR por brometo de etídeo em gel de agarose 1,5% 81

Figura 2. Expressão da *ANXA1* no sangue periférico como biomarcador para o carcinoma oral 82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Correlação entre os níveis de expressão da *ANXA1* em sangue periférico e o perfil clínico e histopatológico dos pacientes com carcinoma oral de células escamosas 84

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
ANXA1	Anexina A1
AUC	*Area under curve*
B2M	β-2 Microglobulina
BSA	Soroalbumina bovina
Ca	Cálcio
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CDR	Região Determinante de Complementaridade
C_T	*Cycle Threshold*
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico de fita dupla
OD	Densidade ótica
dNTp	Desoxinucleotídeo Trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	*Enzime-Linked Immunosorbent Assay*
g	Grama
HPV	Papiloma Vírus Humano
IARC	*International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa do Câncer)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ig	Imunoglobulina
INGEB	Instituto de Genética e Bioquímica
IPTG	Isopropil α-D- thiogalactopyranoside
K	Potássio
kDa	Quilodalton

L	Litro
M	Molar
M13KE	Cêpa M13KE de Bacteriófago filamentoso
mA	Miliampere
Mg	Magnésio
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
Na	Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OSCC	Carcinoma Oral de Células Escamosas
rpm	Rotação por Minuto
RNA	Ácido Ribonucléico
pmol	Picomol
pb	Par de bases
pComb3XSS	Vetor de clonagem para expressão em *E.coli*
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial de Hidrogênio
Ph.D.	*Phage Display*
p/v	Peso por volume
ROC	*Receiver Operating Characteristic*
scFv	Fragmento variável de cadeia simples
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Taq	*Thermus aquaticus* (Enzima DNA Polimerase)
TBS	Tampão Trisma Base-Salino
TBST	Tampão Trisma Base-Salino com Tween-20
TNM	*Tumor Node Metastasis*
U	Unidade de Enzima
ufc	Unidades formadoras de colônias
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VCSM13	Bacteriófago Auxiliar
v/v	Volume por volume
WHO	*World Health Oragnization* (Organização Mundial da Saúde)

Apresentação

O câncer bucal está situado entre as 10 neoplasias que mais frequentemente acometem homens e mulheres em todo o Brasil. O seu diagnóstico, nos dias de hoje, pode ser encarado como um grande desafio, já que grande parte é feito tardiamente, levando a medidas terapêuticas que acarretam desfigurações faciais com consequências socialmente relevantes. Diante deste fato, faz-se necessário o diagnóstico precoce da lesão, a fim de que abordagens terapêuticas não invasivas sejam priorizadas, preservando a integridade dos pacientes, contribuindo, assim, para uma melhora significativa na qualidade de vida dos mesmos.

A tecnologia de bibliotecas apresentadas em fagos, conhecida como *Phage display*, tem sido importante para a identificação e caracterização de ligantes de alta afinidade e os seus receptores, em diversas doenças, incluindo o câncer. Por meio dessa metodologia é possível identificar proteínas que podem ser empregadas como biomarcadores para detecção precoce do câncer, predição do estádio tumoral, além de permitir o desenvolvimento de terapias inovadoras.

Os fluidos corporais, nos últimos anos, têm se tornado alvos comuns de interesse dos pesquisadores que buscam incessantemente meios mais eficazes para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento do câncer. A saliva é um bom exemplo disso, pois representa um fluido biológico facilmente acessível que pode ser repetidamente obtido para a detecção de cânceres humanos, predizendo a agressividade e as chances de recorrência do tumor, o que pode eventualmente levar ao desenvolvimento de importantes ferramentas clínico-oncológicas.

Com o intuito de auxiliar no desenvolvimento de métodos diagnósticos mais simples, rápidos, sensíveis, reprodutíveis, além de minimamente invasivos, o presente trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar novos biomarcadores potenciais para a detecção precoce do carcinoma oral de células escamosas em fluidos corporais. Nesse contexto, aplicou-se a tecnologia de *Phage display* para a seleção e caracterização de antígenos tumor-específicos, utilizando-se como alvo o repertório protéico salivar (Capítulo 1). De forma complementar investigou-se a expressão gênica por PCR em tempo real da Anexina A1, um marcador já previamente correlacionado ao câncer bucal, porém, pela primeira vez, avaliado em amostras de sangue periférico (Capítulo 2).

Fundamentação Teórica

1. Carcinoma Oral de Células Escamosas

1.1. Aspectos Epidemiológicos

O câncer é uma terminologia mundialmente conhecida para uma série de doenças que possuem em comum a hiperproliferação de populações celulares específicas, com potencial de invasão de tecidos próximos e/ou distantes. Em termos patológicos, o câncer é classificado como uma neoplasia maligna, ou seja, é o desenvolvimento de novos clones celulares com atividade proliferativa superior às das células vizinhas e com caráter de invasão e destruição tecidual adjacente acentuada (Knowles e Selby, 2005).

Em 2008, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*) estimou que ocorreriam 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes seriam o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (INCA, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, que também serão válidas para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Em 2010 são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. (INCA, 2009).

O câncer de cabeça e pescoço é considerado um dos principais tumores no mundo e no Brasil, em função da sua mortalidade, prevalência, incidência e sobrevida. Sua origem histológica é majoritariamente em células epiteliais e glandulares, compreendendo cavidade bucal, glândulas salivares, faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), seios paranasais e laringe. Os tumores de olhos, cérebro e crânio, músculos e ossos da cabeça e do pescoço são usualmente analisados separadamente (IARC, 2003). O câncer de boca é a mais freqüente dentre as neoplasias de cabeça e pescoço e incluem lesões nos lábios

e na cavidade oral (mucosa jugal, palato duro, assoalho bucal, língua, gengiva e região retromolar) (Figura 1).

Mais de 90% dos cânceres de boca e garganta são carcinomas de células escamosas, também conhecidos como carcinomas espinocelulares ou ainda carcinomas epidermóides. O restante inclui adenocarcinomas (de origem glandular salivar), sarcomas, e raramente, melanomas (Mitchell *et al*., 2006). O câncer bucal é uma doença genética, complexa e multifatorial. É potencialmente fatal e continua a ter uma incidência global elevada, sendo considerado, assim, um problema de saúde pública.

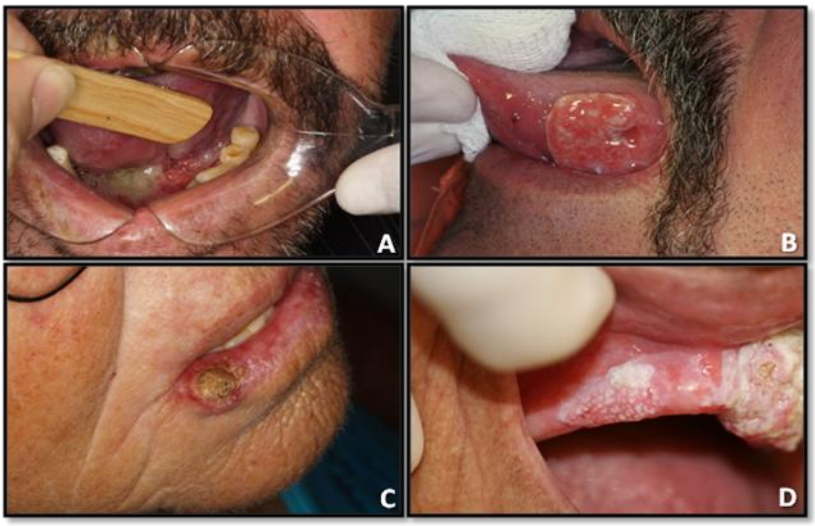

Figura 1: Carcinoma Oral de Células Escamosas diagnosticado em diferentes sítios anatômicos bucais. A-D: Lesões presentes em assoalho bucal, língua, lábio e rebordo alveolar, respectivamente. *Imagens gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antônio Francisco Durighetto Jr. (Unidade de Diagnóstico Estomatológico – Universidade Federal de Uberlândia)*

O carcinoma oral de células escamosas (OSCC) representa 3% de todos os tumores malignos, com estimativa mundial anual de 500.000 novos casos (Kesting *et al*., 2009), sendo considerado o sexto mais freqüente, com variações regionais de incidência e mortalidade (Khanna e Karjodkar, 2006). De acordo

com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em relação ao câncer de boca no Brasil, é possível afirmar que a incidência dessa neoplasia foi crescente até o ano de 2009. O INCA estimou para o ano de 1999 o surgimento de 7.950 novos casos de câncer de boca; em 2003 as estimativas foram de 10.635 novos casos e em 2008, válidas também para 2009, aumentaram ainda mais, alcançando 14.160 casos novos. Segundo a estimativa mais recente apresentada pelo INCA, são esperados 14.120 novos casos para o ano de 2010 no Brasil, sendo 10.330 no sexo masculino e 3.790 no sexo feminino. A região sudeste seria responsável por aproximadamente 53,7% de todos os casos de câncer de boca no país, com estimativas de 7.590 novos casos (INCA, 2009).

Segundo Sartori (2004), o carcinoma epidermóide de boca possui 95% de prevalência, sendo que menos de 1% é diagnosticado em fase inicial. Essa situação traduz uma falta absoluta de diagnóstico precoce e, nessa condição, a sobrevida está relacionada diretamente à gravidade da doença e com o início precoce de tratamento especializado. O carcinoma de células escamosas representa, portanto, a condição mais séria entre as enfermidades que afetam a boca, resultando em óbito para a grande maioria dos pacientes que, desinformados, demoram a procurar ajuda profissional.

Boing (2005) realizou um levantamento epidemiológico do número de óbitos causado por câncer de boca no período de 1979 a 2002 no Brasil. Neste período encontrou um total de 38.263 óbitos por esta patologia, correspondendo a 1,8% das mortes por neoplasias no Brasil. As Regiões Sul e Sudeste apresentaram as maiores taxas durante todo o período, sendo igual a 1,40 e 1,52 por 100.000 habitantes, respectivamente. Apenas as taxas de mortalidade do sul e do nordeste apresentaram tendência de acréscimo ao longo dos anos, as demais regiões mantiveram taxas estáveis.

O câncer bucal afeta principalmente o sexo masculino, com idade acima de 45 anos (Reichart, 2001; Scully e Bagan, 2009). O câncer de lábio é mais freqüente em pessoas brancas e registra maior ocorrência no lábio inferior em relação ao superior (INCA, 2009). Há mudanças nos padrões entre os cânceres de lábio e as lesões intra-orais. Durante um período de cerca de 30 anos houve uma diminuição na incidência de câncer de lábio em homens, mas vários estudos mostram um aumento nos tumores de língua, especialmente em pacientes mais

jovens, atualmente atribuídos ao tabagismo e ao consumo excessivo de álcool entre os mesmos (Scully e Bagan, 2009).

1.2. Fatores de Risco

Acredita-se que as diferenças de incidência de tumores bucais nas diferentes populações estão diretamente relacionadas aos diferentes graus de exposição a fatores de risco nesses grupos. A maior prevalência de homens com tumores bucais em relação às mulheres deriva de sua maior exposição a tais fatores, como tabaco, álcool e radiação ultravioleta proveniente dos raios solares (Kumar *et al*., 2007).

Dentre os principais fatores de risco associados ao carcinoma oral, assume papel de destaque a exposição aos produtos do fumo e do álcool, havendo efeito sinérgico pelo consumo frequente de ambos os produtos; e a exposição à radiação ultravioleta do sol para as neoplasias de lábio. A consistência e a força dessas associações, bem como o aumento cumulativo do risco de acordo com o tempo de duração do hábito e a dose de consumo, foram demonstradas em numerosos estudos de coorte e caso-controle (Mahboubi e Sayed, 1996). Outros fatores, como composição da dieta, infecções virais e fatores hereditários são também apresentados como potenciais fatores de risco (Sciubba, 2001; Kojima *et al*., 2002).

O tabaco é fator causal de dezenas de doenças, dentre elas diversas neoplasias. Sua ação deletéria se dá por meio de mais de 4.000 substâncias tóxicas e cerca de 60 elementos cancerígenos que o usuário do produto absorve no organismo (WHO, 2002). A interação dos metabólitos oriundos dos agentes carcinogênicos com o DNA das células pode provocar severas alterações genotípicas, evento crítico para o desenvolvimento de tumores (Canevari e Rogatto, 2004). Configurando um efeito dose-resposta, há maior risco entre aqueles que apresentam padrão de maior e mais longo consumo de tabaco (MacFarlane *et al*., 1995; Garrote *et al*., 2001). Também há gradiente na magnitude da medida de associação de acordo com o tempo de cessação do tabagismo. A chance de desenvolver câncer de boca é menor conforme aumenta o tempo desde a interrupção do consumo (Schlencht *et al*., 1999).

Hábito bastante difundido nas culturas ocidentais, o consumo de bebidas alcoólicas também tem sido indicado como fator de risco para cânceres do trato aero-digestivo superior (cavidade oral, faringe, laringe, esôfago). O álcool é considerado agente etiológico do carcinoma oral, exercendo ação independente e sinérgica com a do tabaco. O consumo elevado de bebidas alcoólicas pode levar à deficiência nutricional e imunossupressão, aumentando a susceptibilidade a substâncias carcinogênicas (Schottenfeld, 1979). As bebidas alcoólicas também exercem ação solvente, favorecendo a absorção intracelular de substâncias carcinogênicas do tabaco pelos tecidos do epitélio bucal (Dobróssy, 2005). Reichart (2001) explicou a associação entre etilismo e o câncer bucal em função do aumento da permeabilidade das células da mucosa oral aos agentes carcinogênicos do tabaco. Além disso, outros autores apontaram como causa a oxidação do etanol pela flora bucal, produzindo acetaldeído, substância considerada promotora tumoral (Homann *et al*., 2000; Kurkivuori *et al*., 2006).

Apesar do câncer de boca ocorrer com maior frequência em indivíduos com mais de 40 anos de idade, vem crescendo o número de casos dessa neoplasia em indivíduos mais jovens (Sherin *et al*., 2008). Além disso, na grande maioria dos casos, esses indivíduos não fumam e não têm o hábito de ingerir bebidas alcoólicas com frequência (Mackenzie *et al*., 2000; O'regan *et al*., 2006; Dahlstrom *et al*., 2008). Em relação ao histórico familiar, foi observado que mais indivíduos que desenvolveram câncer de boca com idade inferior a 40 anos possuíam familiares com história prévia de neoplasia maligna quando comparados a indivíduos com idade superior (Llewellyn *et al*., 2001; Hirota *et al*., 2008).

Outro fator a ser considerado em relação ao desenvolvimento do câncer de boca em indivíduos mais jovens é a dieta. Segundo Llewellyn *et al*. (2001), a maioria dos jovens com câncer de boca, de ambos os sexos, relataram um consumo diário de frutas e vegetais inferior ao recomendado pela Sociedade Americana de Câncer. Vários estudos têm avaliado hipóteses de hábitos alimentares potencialmente associados à manifestação de câncer bucal. Ao revisar estudos sobre fatores de risco de ordem sócio-cultural para a doença, Zain (2001) sintetizou as evidências disponíveis sobre a associação entre uma dieta mais pobre em nutrientes e risco de desenvolvimentos de neoplasias bucais e lesões potencialmente cancerizáveis. Dietas ricas em beta caroteno, frutas

frescas e fibras parecem exercer papel protetor em relação ao câncer de boca (Key *et al*., 2002; Toporcov *et al*., 2004). Deficiências nutricionais poderiam contribuir para a atrofia da mucosa oral, tornando-a mais suscetível a substâncias carcinogênicas de ação local (Woutersen *et al*., 1999).

Entre outros fatores relacionados ao carcinoma oral de células escamosas estão as imunodepressões, as infecções fúngicas e, conforme apontam algumas pesquisas, a presença de alguns vírus, em especial o papilomavírus humano (HPV) (Herrero *et al*., 2003; Ha e Califano, 2004; Schiffman *et al*., 2005; Li e Sturgis, 2006; Furniss *et al*., 2007; Termine *et al*., 2008). Estudos indicam que a detecção do HPV parece estar frequentemente aumentada em epitélios orais displásicos e carcinomatosos em relação ao epitélio de mucosa oral normal, porém, o papel real do HPV na carcinogênese oral ainda é controverso na literatura (Miller e Johnstone, 2001). Devido à semelhança entre a mucosa do colo uterino e a mucosa bucal, foi sugerida a possibilidade da associação do HPV com a carcinogênese bucal (Syrjanen *et al*., 1983). Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar o papel do HPV no desenvolvimento do câncer oral, e os resultados desses estudos apontam o HPV 16 e 18 como os mais frequentes nas amostras estudadas (Yeudall e Campo, 1991; Nair e Pillai, 2005; Ragin *et al*., 2007).

Velly e colaboradores (1998) reportaram que feridas decorrentes do uso de próteses dentárias mal adaptadas também estão associadas ao câncer de boca. A partir da análise dos dados de dois estudos multicêntricos de caso-controle conduzidos na América Latina e Europa Central, Guha *et al*. (2007) apontaram evidências adicionais sobre outros fatores comportamentais associados aos tumores de cabeça e pescoço. Esses autores relataram que a não escovação dentária, a ausência de dentes permanentes e o uso diário de anti-sépticos bucais mostraram-se também associados ao carcinoma oral, independente do uso de tabaco e álcool (Guha *et al*., 2007).

1.3. Estágios Clínicos de Desenvolvimento, Diagnóstico e Tratamento

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), o carcinoma epidermóide bucal pode ser classificado como bem diferenciado, moderadamente e pouco diferenciado. Ele é histologicamente classificado como bem diferenciado quando se assemelha ao epitélio escamoso normal. O OSCC moderadamente diferenciado apresenta pleomorfismo nuclear e atividade mitótica distintos, incluindo mitoses atípicas e normalmente existe menos queratinização no tecido. Em lesões pouco diferenciadas existe o predomínio de células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima queratinização. O sistema TNM (*tumor-node-metastasis*) para o estadiamento clínico do carcinoma oral de células escamosas foi desenvolvido para fornecer uma uniformidade clínica. O *T* é a medida do tumor primário, o *N* é uma estimativa de metástases em linfonodos regionais e o *M* é a determinação de metástases à distância. O uso desse sistema permite uma comparação mais precisa de dados de diferentes instituições e ajuda a guiar as decisões de conduta terapêutica. O estádio clínico avança de “0” a “4”, sendo que o prognóstico piora à medida que esse aumenta (Parise, 2000).

Em estádios mais precoces o câncer bucal é assintomático e, na maioria das vezes, o paciente só percebe a lesão quando esta atinge dimensões consideráveis. A sua apresentação clínica é variável, podendo manifestar-se como lesão infiltrativa, ulcerada, exofítica, eritroplásica, leucoplásica ou como a combinação de mais de um padrão. As metástases envolvem principalmente os linfonodos cervicais superiores e mais tardiamente pulmão, ossos e fígado (Parise, 2000).

O estadiamento clínico tem papel importante no planejamento do tratamento do paciente, na definição do prognóstico quanto às chances de disseminação neoplásica, sobrevida livre de doença e sobrevida global (Parise, 2000). Em artigo de revisão, Wunsch-Filho (2002) verificou que no Brasil, em 2000, 50% dos pacientes chegaram aos serviços de saúde no estágio IV (avançado) da doença, enquanto que 8,7% no estágio I (inicial). O diagnóstico tardio e a grande demanda nos hospitais fazem com que os pacientes recebam tratamento em momentos tardios, quando procedimentos mais invasivos tornam-

se necessários e o tratamento desses casos implica muitas vezes em mutilações que podem inabilitar o paciente para a reintegração familiar, social e profissional, temporária ou definitivamente (Parise, 2000).

O tratamento básico para os vários tipos de câncer bucal consiste na eliminação dos tecidos neoplásicos por meio de cirurgia com margem de segurança, radioterapia, quimioterapia ou uma associação destas três modalidades terapêuticas. A decisão sobre a escolha da modalidade terapêutica depende da extensão, estadiamento tumoral, relação com estruturas anatômicas anexas, envolvimento de cadeia linfática, idade e cooperação do paciente (Lung *et al*., 2007). Apesar de apresentar bons resultados, essas terapias apresentam várias complicações pós-tratamento. Mesmo com procedimentos de reconstrução cirúrgica, uma das consequências após os tratamentos é a ocorrência de algum grau de desfiguração facial, promovendo graves defeitos estéticos e funcionais. Nesses casos, a qualidade de vida dos pacientes tratados é fortemente comprometida, gerando alterações psicológicas e emocionais fortes, afetando seu grau de recuperação. Muitas vezes os pacientes tratados necessitam do acompanhamento de equipes multidisciplinares para a recuperação completa e retorno à vida cotidiana normal (Chandu *et al*., 2006).

Apesar dos avanços tecnológicos com as descobertas e aperfeiçoamentos de terapias alternativas como a radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e a terapia fotodinâmica para o tratamento do câncer nos últimos 50 anos (Scully e Bagan, 2007), o prognóstico para o carcinoma epidermóide bucal continua obscuro, uma vez que sua base molecular ainda não é muito bem compreendida e envolve múltiplos eventos genéticos que culminam na carcinogênese, incluindo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (Bell *et al*., 2007). Estima-se que a sobrevida seja de 40% no primeiro ano, reduzindo para 10% no quinto ano (Perussi *et al*., 2002). Diversas teorias têm sido postuladas para explicar as diferenças de sobrevida entre os indivíduos. Dentre elas incluem-se diferentes exposições aos fatores de risco, a diferença no tratamento oferecido e aceito pelo paciente, acesso aos serviços de saúde, a condição sócio-econômica, a apresentação e comportamento da lesão no momento do diagnóstico e as diferenças na predisposição genética (Nichols e Bhattacharyya, 2007).

1.4. Fatores Genéticos

A transformação celular maligna é iniciada por mutações genéticas e epigenéticas que ativam oncogenes e inativam vias supressoras de tumor. Sendo assim, o câncer surge quando as células somáticas escapam dos mecanismos intrínsecos e extrínsecos supressores de tumor no contexto de seu microambiente celular.

A biologia molecular do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço sugere que vias específicas são relevantes para o desenvolvimento e progressão desta doença. Durante a última década, investigações científicas relacionadas a estes eventos têm sido realizadas para investigar parâmetros biológicos, diagnósticos e prognósticos. Diferenças na superexpressão, supressão e/ou mutações de vários genes que codificam para moléculas envolvidas na progressão do ciclo celular, regulação do crescimento, apoptose, oncogênese, supressão de tumor, resposta a danos no DNA, fatores de crescimento e citocinas têm sido relatadas em casos de OSCCs (Shah *et al*., 2009). No entanto, as alterações moleculares que são exatamente críticas na patogênese dessa neoplasia são ainda desconhecidas (Scully *et al*., 2000a; b; c; Schwartz, 2000). Cheong *et al*. (2009) identificaram, por meio da tecnologia de *microarray*, 281 genes diferencialmente expressos entre amostras de OSCC e mucosa oral normal independente de fatores etiológicos, incluindo *MMP1* (*Matrix metalloproteinase 1*), *PLAU* (*Plasminogen activator, urokinase*), *MAGE-D4* (*Melanoma antigen family D4*), *GNA12* (*Guanine nucleotide binding protein alpha 12*), *IFITM3* (*Interferon induced transmembrane protein 3*) and *NMU* (N*euromedin U*).

Entre outras alterações conhecidamente envolvidas com o carcinoma oral de células escamosas estão a hipermetilação promotora no *locus* cromossômico 9p21 que resulta na inativação do gene *p16*, um inibidor de cinase dependente de ciclina (Mao *et al*., 1996); mutações no gene supressor de tumor *p53* estão relacionadas à progressão à displasia (Boyle *et al*., 1993); e alterações no gene da Ciclina D1 (localizado no cromossomo 11), que ativa caracteristicamente a progressão do ciclo celular, conferindo a habilidade de invasão de certos clones (Izzo *et al*., 1998). Rosin e colaboradores (2000) também demonstraram a relação entre alterações genômicas como perda de heterozigozidade, bem como

deleções nos *loci* 4q, 6p, 8p, 11q, 13q e 14q, e a progressão de carcinogênese oral.

Dentre os demais mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca, defeitos nas vias de reparo de DNA têm sido sugeridos na literatura como fatores associados ao desenvolvimento dessa neoplasia (Scully *et al*., 2000a). Kim e colaboradores (2006) encontraram defeitos no reparo do DNA mitocondrial induzidos por 4NQO (4-nitroqinolina-1oxido) em células provenientes de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. De acordo com Bau *et al*. (2008), alterações genéticas relacionadas às vias de reparo da quebra da dupla hélice podem contribuir para uma vulnerabilidade genética a fatores de risco, como o fumo, causando danos ao DNA e, consequentemente, levando à carcinogênese bucal.

Além disso, ensaios de imuno-histoquímica têm revelado níveis alterados de expressão de outros marcadores celulares relacionados à progressão do carcinoma de células escamosas, como, por exemplo, citoqueratinas, enzimas (ciclooxigenase-2), genes anti-apoptóticos e pró-angiogênicos (famílias *Bcl* e *VEGF*, respectivamente), imunomoduladores (*IL-10* e *IL12*) (Vishwanatha *et al*., 2003) e mediador endógeno regulador de GCs (ANXA1).

A expressão da Anexina A1 (ANXA1) tem sido amplamente investigada em vários tipos de cânceres, incluindo o carcinoma oral de células escamosas, tanto em nível de RNA quanto protéico. Trata-se de uma proteína intracelular cálcio-dependente e que desempenha importantes papéis na proliferação celular, regulação da apoptose, fagocitose e carcinogênese (Coupade *et al*., 2000; Hsiang *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2009). Há controvérsias acerca de seu papel na tumorigênese, pois sua expressão encontra-se diminuída em alguns tipos de câncer e aumentada em outros (Zhang *et al*., 2009), podendo alterar também conforme os distintos estágios tumorais (Kamal *et al*., 2005).

De acordo com os achados de Nomura *et al*. (2009), a perda da ANXA1 é frequente nos eventos iniciais durante a carcinogênese oral, sendo que a mesma poderia contribuir para a manutenção da diferenciação epitelial em OSCC. Em outro estudo recente, Zhang e colaboradores (2009) demonstraram por meio das técnicas de *Western blotting*, PCR em tempo real e imuno-histoquímica que a expressão gênica e protéica da ANXA1 diminui em várias linhagens celulares e

também em amostras de tecido de OSCC quando comparados ao epitélio adjacente não-maligno. A localização celular da ANXA1 também foi sugerida como fator de prognóstico da doença, uma vez que sua expressão nuclear aumenta significativamente nos casos de OSCC quando comparada à mucosa oral normal, onde se localiza predominantemente na membrana celular (Lin *et al*., 2008). Todos esses dados sugerem o potencial da ANXA1 como um biomarcador para o carcinoma oral de células escamosas.

2. A Biologia Molecular no Estudo do Câncer

2.1. Anticorpos Recombinantes

O reconhecimento e remoção das células transformadas é uma incumbência permanente do processo de vigilância imunológica, sendo os anticorpos componentes fundamentais desta atividade anti-tumoral do sistema imune (Vollmers e Brändlein; 2009).

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de massa molecular elevada, em torno de 150 kDa, encontradas em abundância no soro de animais vertebrados. Essas moléculas são de natureza tetramérica, compostas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, unidas por uma extensiva rede de interações não-covalentes, estabilizadas por pontes dissulfeto. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas, contêm uma série de domínios globulares repetitivos homólogos, cada uma com cerca de 110 resíduos de aminoácidos que se enovelam independentemente em um motivo globular classificado como Domínio Imune (Padlan, 1994).

Cada cadeia leve contém um domínio variável (V_L) e um domínio constante (C_L); as cadeias pesadas contêm um domínio variável (V_H) e três domínios constantes (C_H1, C_H2 e C_H3). A molécula de anticorpo pode ser subdividida em porções Fc e Fab, onde Fc é constituída pelos domínios constantes (C_H2-C_H3) e Fab constituída pelos domínios V_H-C_H1 e V_L-C_L, responsáveis pela ligação aos antígenos e, portanto, denominado sítio combinatorial para o antígeno. Dentro de cada domínio V_H e V_L existem três regiões hipervariáveis, onde a variabilidade está concentrada e *loops* são formados. Em uma imunoglobulina, as três regiões hipervariáveis da cadeia leve e as três regiões hipervariáveis da cadeia pesada

ocupam conjuntamente um espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação para o antígeno. Como estas sequências formam uma superfície complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, as regiões hipervariáveis são também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) (Ferreira e Teixeira, 2005).

Os fragmentos de anticorpos scFv (*single-chain variable fragment*) representam o menor domínio funcional V_H-V_L de um anticorpo necessário para uma ligação de alta afinidade a um antígeno. Os peptídeos conectores flexíveis que ligam as cadeias V_H e V_L são usualmente compostos por 10 a 25 aminoácidos, sendo o decapentapeptídeo $(Gly_4Ser)_3$ o mais comum deles (Figura 2) (Weisser e Hall, 2009). As regiões variáveis podem ser conectadas no sentido V_H-conector-V_L ou V_L-conector-V_H e a orientação das cadeias no scFv pode afetar a eficiência da expressão (Merk *et al*., 1999), estabilidade e capacidade de ligação do mesmo ao antígeno (Desplancq *et al*., 1994).

Embora os tumores possam ter uma capacidade de obter diferentes respostas frente à transformação celular, o sistema imune frequentemente falha em reconhecer o câncer como uma ameaça ou se torna tolerante ao crescimento tumoral e metástases (Smyth *et al*., 2001).

O interesse imediato na aplicação terapêutica da imunidade do câncer concentra-se em estimular o sistema imune contra os antígenos tumorais. Isso levou ao desenvolvimento de inúmeros protocolos de vacinação contra o câncer. A habilidade dessas vacinas de estimular a produção de anticorpos e de ativar os linfócitos T é observada com frequência, porém, clinicamente ainda não se converteram em uma resposta antitumoral objetiva (Dupont, 2002).

Além disso, esforços têm sido também destinados à caracterização de marcadores que reconheçam especificamente alvos tumorais com utilidade diagnóstica. Um bom exemplo disso foi o trabalho em que foram mapeados os anticorpos produzidos por pacientes com câncer de próstata utilizando uma biblioteca de peptídeos apresentada em fagos, havendo a identificação um potencial marcador de progressão tumoral, a proteína GRP78, altamente expressa em metástases. Concluiu-se que, essa abordagem feita em larga escala, poderia permitir a identificação de marcadores moleculares específicos para cada tipo de tumor (Minitz *et al*., 2003).

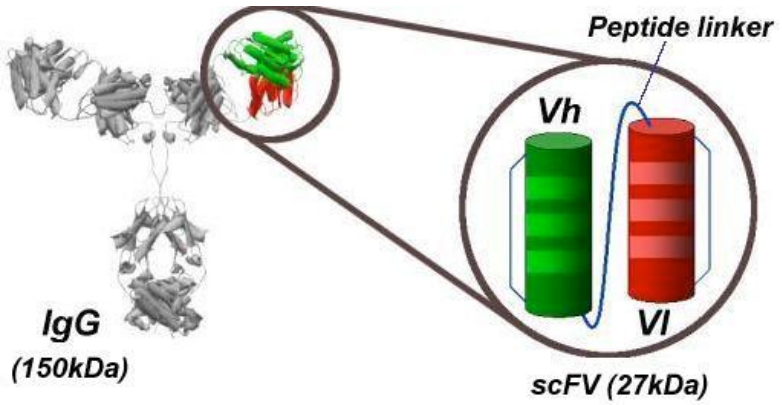

Figura 2: Representação esquemática do fragmento scFv. Os domínios V_H e V_L presentes na molécula scFv aparecem nas cores verde e vermelho, respectivamente. O polipeptídeo (*peptide linker*) estabilizador dos domínios está indicado pela seta (Weisser e Hall, 2009).

Tradicionalmente, a maioria dos métodos de identificação de marcadores tumorais é baseada em anticorpos monoclonais, com anticorpos contra proteínas das quais se tenha alguma suspeita e, dessa forma, buscam os mesmos marcadores para diversos tipos de câncer. A utilização de metodologias que fazem uma varredura das células tumorais, sem conhecimento prévio das proteínas nelas presentes, propicia a identificação de marcadores tumorais novos. A técnica de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos permite a utilização não apenas de um anticorpo monoclonal, mas de uma vasta biblioteca de anticorpos ou peptídeos contra o conjunto das proteínas do tumor. Por esta vantagem, a técnica de *Phage Display* vem sendo empregada visando à identificação de marcadores tumorais (Austin, 1989).

2.2. *Phage Display*

Diversas metodologias de apresentação de moléculas na superfície de vírus e células têm sido descritas, incluindo as técnicas de *Phage-Display* (Ph.D.) (McCafferty *et al*., 1990), *Ribossome Display* (Hanes e Pluckthun, 1997; He e Taussig, 1997) e C*ell-Surface Display* (Francisco *et al*., 1993), por meio das quais polipeptídeos podem ser selecionados pela maturação da reatividade a antígenos de interesse.

A tecnologia *Phage Display* de apresentação de polipeptídeos na superfície de bacteriófagos filamentosos foi introduzida por George Smith em 1985, que expressou pela primeira vez a enzima de restrição *EcoRI* como uma fusão da proteína pIII do capsídeo do fago (Smith, 1985). Desde então, bibliotecas de peptídeos randômicos lineares ou conformacionais (Miceli *et al*., 1994; Parhami-Seren *et al*., 1997), bibliotecas de fragmentos de antígenos ou anticorpos (Christmann *et al*., 2001; Mullaney e Pallavicini, 2001), ou ainda uma combinação de ambos (Stephen *et al*., 1995; Fack *et al*., 1997; Coley *et al*., 2001), são utilizadas no mapeamento de epítopos protéicos. Bibliotecas de peptídeos combinatoriais, que podem ser construídas contendo bilhões de cópias de sequencias peptídicas, representam ricas fontes de moléculas com diferentes potenciais de interação molecular (Uchiyama *et al*., 2005; Irving *et al*., 2001). Estratégias de seleção e construção de bibliotecas randômicas de peptídeos, flexíveis ou constritas, têm sido extensivamente discutidas. (Pelletier e Sidhu, 2001; Nestler, 2005; Eichler, 2005)**.** Nesse propósito, bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos têm sido muito utilizadas como uma eficiente ferramenta biotecnológica para a seleção e caracterização de proteínas-alvo ligante-específicas de órgãos, tumores ou outras proteínas antigênicas. (Pasqualini e Ruoslahti, 1996; Ellerby *et al*., 1999; Joyce *et al*., 2003; Koivunen *et al*., 1999).

Recentemente, Hsiao e colaboradores (2009) utilizaram uma biblioteca de peptídeos expressa em fagos para selecionar proteínas-alvo câncer-específicas em linhagem celular de carcinoma oral de células escamosas. Foi identificado e caracterizado, nessa investigação, um peptídeo que se liga preferencialmente à integrina $\alpha v\beta 6$; uma proteína que, além de ter sua expressão elevada em mais 90% dos casos de OSCC, também se encontra superexpressa em tumores de pele, glândula salivar, ovário, mama, pâncreas e estômago, estando

correlacionada a um pior prognóstico em tumores cervicais e coloretais. Tais dados evidenciam a eficácia da metodologia de *Phage Display*, que possibilitou a identificação de um peptídeo que certamente será útil em um vasto repertório de aplicações clínico-oncológicas.

Os anticorpos representam uma das ferramentas mais poderosas no âmbito da terapêutica e do diagnóstico. Fragmentos de anticorpos recombinantes, tais como moléculas scFvs (*Single-Chain Variable Fragment*), vêm tornando-se cada vez mais uma alternativa ao uso de anticorpos monoclonais completos no tratamento do câncer, bem como de doenças inflamatórias, auto-imunes e doenças virais crônicas; uma vez que são menores, possuem algumas particularidades que são vantajosas em certas aplicações clínicas, como por exemplo a grande variabilidade, sua produção é mais econômica e são mais facilmente manipulados (Weisser e Hall, 2009).

Em 1990, foram obtidos os primeiros fragmentos de anticorpos expressos em fagos (McCafferty *et al*., 1990). Normalmente, bibliotecas combinatórias de anticorpos são sintetizadas a partir da construção de genes dos fragmentos de anticorpos recombinantes na forma de scFv ou Fab e, em seguida, estes genes são introduzidos por manipulação genética em plasmídeos fusionados ao gene codificador de uma proteína capsídica. No caso das bibliotecas são utilizados genes codificadores para milhões de fragmentos distintos. A descoberta de que sítios funcionais de anticorpos, como os scFvs, podem ser apresentados na superfície de bacteriófagos permitiu a seleção de anticorpos contra antígenos de interesse sem a necessidade da utilização da tecnologia de produção de hibridomas (McCafferty *et al*., 1990). Bibliotecas de scFv apresentadas em fagos consistem em diversos domínios de cadeias leves e pesadas fusionados à proteína pIII do fago e apresentados externamente como um scFv. O DNA codificador para uma biblioteca de scFv pode ser clonado no genoma de um fago ou em um vetor fagomídeo para produzir uma fusão scFv-pIII (Vaughan *et al*., 1996).

Tipicamente, são utilizados bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, f1), vírus bacteriófagos filamentosos que parasitam bactérias gram-negativas que possuem o pílus F (Sidhu, 2001). O vírus aproveita a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. O bacteriófago M13 não

provoca lise na célula hospedeira, mas induz um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (Azzazy e Highsmith, 2002).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 3). Destas cinco proteínas, existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado ao gene de uma dessas duas proteínas da capa protéica do fago (Phizicky e Fields, 1995).

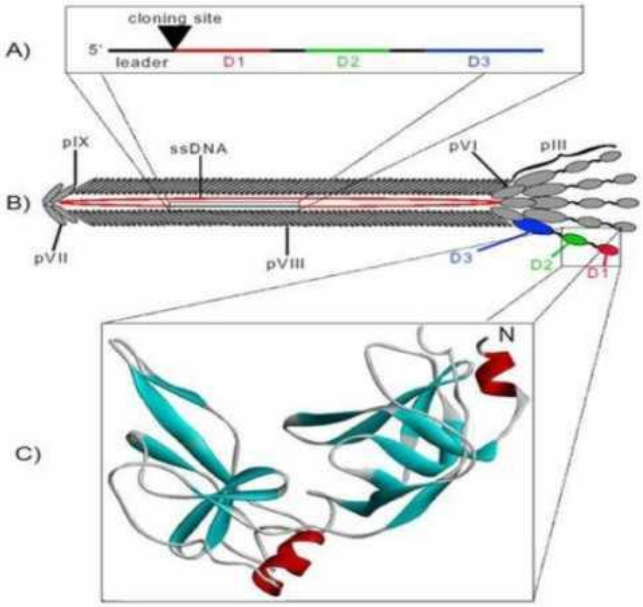

Figura 3: Estrutura básica de um bacteriófago filamentoso. A - Sítio de clonagem junto à sequência da proteína pIII. B - Estrutura do capsídeo viral, mostrando as proteínas de superfície pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. C - Sub-unidades D1 e D2 da proteína pIII, mostrando a extremidade N-terminal da proteína (Holliger e Williams, 1999).

A seleção das moléculas expressas em fagos é um procedimento relativamente padronizado que envolve a exposição dos fagos ao antígeno alvo,

permitindo a ligação e o enriquecimento daqueles que expressam moléculas antígeno-específicas em um processo conhecido como *panning* (Figura 4). No processo de seleção, a biblioteca de fagos apresentando os polipeptídeos é incubada com o antígeno alvo que está imobilizado em um suporte sólido, como uma placa de microtitulação (Schofield *et al*., 2007) ou ligada a antígenos biotinilados em solução (Parmley e Smith, 1988). Os fagos não ligantes são removidos por sucessivas lavagens e os ligantes eluídos pela incubação dos mesmos em soluções com valores de pH extremamente altos ou baixos (MacKenzie e To, 1998; Pincus *et al*., 1988), por clivagem proteolítica (Goletz *et al*., 2002) ou pela incubação com antígenos livres (Meulemans *et al*., 1994).

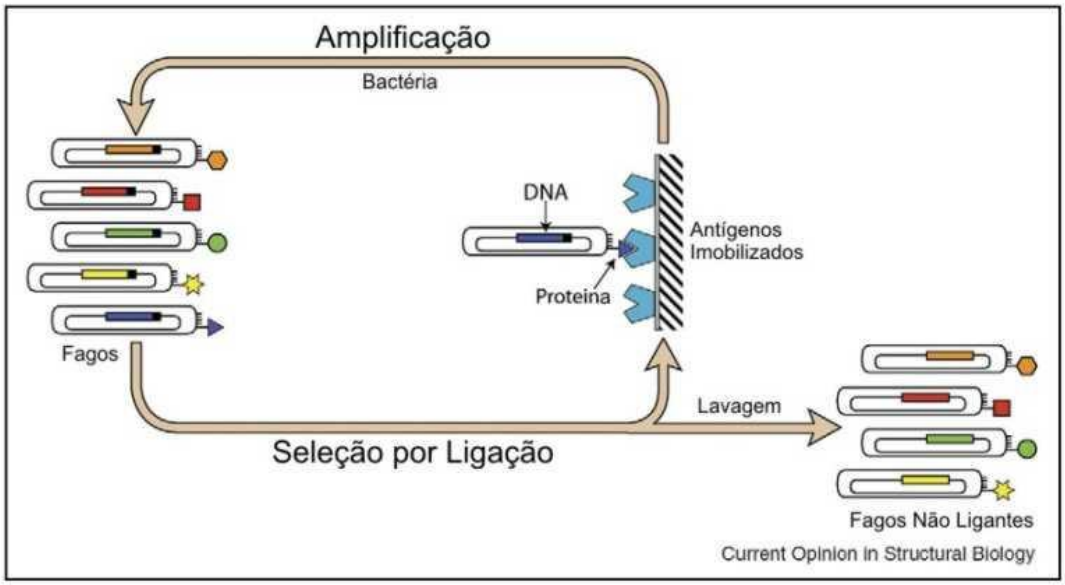

Figura 4: Ciclos de seleção de proteínas a partir de uma biblioteca de *Phage Display*. Bibliotecas de proteínas (coloridas) são apresentadas em partículas de fagos fusionadas às proteínas de superfície (preto). Bibliotecas altamente diversas podem ser apresentadas em fagos e clones com especificidade a determinados antígenos podem ser selecionados pela ligação aos antígenos imobilizados, seguido pela lavagem e remoção dos fagos não ligantes. Os fagos ligantes podem ser amplificados pela infecção em bactérias e utilizados em outros ciclos de seleção para enriquecimento dos fagos ligantes ao antígeno de interesse. O DNA de cada clone selecionado pode ser sequenciado e revelar a sequência da proteína apresentada que possui afinidade com o antígeno (Adaptado de Sidhu e Koide, 2007).

Em função da ligação de fagos não específicos, principalmente quando se faz uso dos suportes sólidos (Levitan, 1998), são necessários sucessivos ciclos de seleção com o aumento da estringência para que os clones com alta afinidade ao alvo sejam enriquecidos. A estringência pode ser aumentada pela diminuição da concentração do antígeno ou pelo aumento do número de lavagens em cada ciclo de seleção.

2.3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é um refinamento do revolucionário método da PCR, desenvolvido por Kary Mullis em meados da década de 80, o qual permite aos pesquisadores amplificar segmentos específicos de DNA mais de um bilhão de vezes (Mullis, 1990; Mullis e Faloona, 1987; Saiki *et al*., 1985). Estratégias baseadas na técnica de PCR potencializaram os estudos de biologia molecular, uma vez que facilitaram de maneira indiscutível a manipulação dos ácidos nucléicos. Isso tornou possível o desenvolvimento de ferramentas indispensáveis para a engenharia genética como, por exemplo, a clonagem e o sequenciamento. Porém, como técnica analítica, o método original da PCR apresenta algumas limitações (Kubista *et al*., 2006).

A PCR em tempo real é uma ferramenta extremamente sensível e reprodutível de quantificação da expressão gênica. Como método diagnóstico clínico e molecular, a PCR em tempo real pode ser utilizada na determinação de cargas virais, bacterianas, ou ainda auxiliar na avaliação do estadiamento de tumores (Valasek e Repa, 2005).

A habilidade de identificar sequências específicas de DNA é crucial em qualquer análise molecular, inclusive na área da oncologia clínica. A PCR em tempo real pode ser utilizada, por exemplo, para detectar e, em algumas vezes, quantificar translocações cromossômicas ou ainda fusões gênicas presentes em amostras de pacientes que apresentam mínimos resíduos de malignidade. Esta técnica tem sido utilizada na detecção de vários produtos de fusões gênicas característicos da leucemia mieloblástica aguda (Krauter *et al*., 2001), leucemia linfoblástica aguda (Pongers-Willemse *et al*., 1998), ou ainda na avaliação da resposta de pacientes ao tratamento com interferons por meio da quantificação do produto gênico da fusão *BCR-ABL* no caso da leucemia mielóide crônica (Barthe

et al., 2001). A PCR em tempo real pode ainda ser usada na determinação do número de cópias de DNA que podem levar à malignidade (Ginzinger *et al*., 2000), ou ser usada para analisar a expressão gênica em tumores sólidos a partir de alvos muito restritos, como as punções (Ohnmacht *et al*., 2001). Detecções assim tão sensíveis e precisas, como as permitidas pela técnica de PCR em tempo real, podem ser úteis não apenas para um melhor entendimento do câncer ou da biologia dos tumores, mas também para a determinação de estratégias terapêuticas mais eficazes e melhores perspectivas dos riscos de desenvolvimento e de recorrência da doença (Valasek e Repa, 2005).

A PCR em tempo real é uma técnica altamente específica, pois se baseia na detecção de fluorescência emitida por sondas fluorogênicas ou corantes intercalantes, como o *SyBRGreen*. À medida que o produto amplificado aumenta, o sinal de fluorescência cresce proporcionalmente. A quantificação dos amplicons ocorre durante a fase exponencial da reação e o limiar desta fase é determinado pelo ciclo no qual é detectada emissão de fluorescência significativa, denominado de *cycle threshold* (C_T) (Applied Biosystems, 2004).

Os corantes intercalantes emitem fluorescência apenas quando associados ao DNA de fita dupla (dsDNA) (Bustin, 2000; Peters, *et al*. 2004). A fluorescência emitida pelas moléculas de *SYBRGreen* em suspenção no meio, quando ocorre a desnaturação, é pequena e subtraída pelo software ao longo da reação (Bustin, 2000). Durante a polimerização catalisada pela enzima DNA polimerase, as moléculas de *SYBRGreen* se ligam ao produto recém sintetizado e um aumento da fluorescência é observado em tempo real, o que possibilita o monitoramento contínuo da reação (Applied Biosystems, 2004). No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do fluoróforo são liberadas e uma queda no sinal da fluorescência é observada. Apesar de o *SYBRGreen* não ser específico, podendo ligar-se à dímeros de *primers* ou outros produtos inespecíficos, é possível monitorar essas situações pela análise da curva de dissociação observando a temperatura *melting* (Applied Biosystems, 2004).

Nos sistemas em que se utilizam sondas, o método de detecção mais comum é a utilização de sondas marcadas com um corante repórter na extremidade 5’ e um quencher na 3’. Quando a sonda está intacta, o quencher capta a energia emitida pelo repórter devido a proximidade dos dois corantes por

meio da transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço (FRET). Quando a sonda é clivada pela atividade exonuclease 5' da DNA polimerase, os fluoróforos são separados, aumentando o sinal da fluorescência que é detectado pelo aparelho (Applied Biosystems, 2004).

A quantificação dos produtos da PCR é realizada, principalmente, por dois métodos: a quantificação absoluta e relativa. Pelo método da quantificação absoluta utiliza-se uma curva padrão, previamente padronizada, que deve estar presente em todas as placas de ensaio. Interpolando as quantidades da amostra alvo com base na curva padrão, o software fornece a quantidade exata de moléculas alvo contidas na amostra (Applied Biosystems, 2004).

A quantificação relativa é subdividida em dois métodos, o método da curva padrão e o método do C_T comparativo. Com base no método C_T comparativo deve-se, primeiramente, avaliar se a eficiência das amplificações do alvo e do controle endógeno são equivalentes. A eficiência da reação é calculada pela construção de uma curva padrão que é graficamente representada como uma regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inical do ácido nucléico. Um *slope* da curva padrão próximo de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência e produzirá um aumento de 10 vezes no *amplicon* a cada 3,32 ciclos durante a fase exponecial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$). Valores que diferem muito desses podem indicar má qualidade da amostra ou erro de pipetagem. Para cada curva padrão o software procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R^2 que mede quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de C_T das amostras padrão (ideal $R^2 \geq 0.99$), *slope* e o *y-intercept* que indicam o valor esperado de C_T para uma amostra com quantidade 1. Para esse método é também necessário utilizar uma amostra padrão em todas as placas de ensaio, o calibrador, que deve ser uma amostra de concentração conhecida. Durante a reação de rqPCR, o alvo é normalizado com um gene *housekeeping* (controle endógeno) e comparado diretamente com o calibrador, contabilizando uma quantidade maior ou menor de RNAm (Applied Biosystems, 2004).

São várias as vantagens da PCR em tempo real em relação à convencional, dentre elas destacam-se a maior sensibilidade, pois a PCR em tempo real utiliza a fluorescência para detecção do *amplicon*; e maior

reprodutibilidade, pois fornece a quantificação em números. Enquanto isso, a PCR convencional utiliza gel de agarose e corantes intercalantes, como o brometo de etídio, que é altamente tumorigênico e, além disso, baseia-se no cálculo da densidade óptica para quantificação, o que diminui sua sensibilidade e reprodutibilidade (Applied Biosystems, 2004).

Para ambos os sistemas, o desenho do experimento e a padronização da reação são essenciais para a obtenção de bons resultados (Bustin, 2000; Livak e Schmittegen, 2001).

3. Métodos Não Invasivos: A Saliva como Fluido Diagnóstico

Pacientes em estágios avançados de câncer frequentemente desenvolvem recorrência local, bem como metástases à distância. Estes dados indicam que os métodos tradicionais de diagnóstico, como a histopatologia e radiologia, não são sensíveis o bastante para detectar um pequeno número de células tumorais que podem ser deixadas para trás, definida como doença residual mínima. Métodos diagnósticos sensíveis baseados em marcadores moleculares parecem ser poderosas ferramentas para melhorar o acompanhamento desses casos (van Houten *et al*., 2000).

É sabido que a biópsia do tecido é o modelo ideal para o estudo de biomarcadores. No entanto, em termos de diagnóstico e prognóstico da doença, a utilização de testes baseados em fluidos corporais humanos (por exemplo, sangue, urina, líquor, saliva, líquido sinovial, líquido aspirado do mamilo, fluido lacrimal e líquido amniótico) parece ser muito mais atrativa, visto que oferece várias vantagens importantes, incluindo a pequena invasão, o custo mínimo e a facilidade da coleta e processamento do material biológico. A análise do proteoma de fluidos corporais se tornou uma das abordagens mais promissoras para a descoberta de biomarcadores para doenças humanas (Hu *et al*., 2006).

A saliva é a secreção das glândulas salivares, a qual garante a estabilidade no ambiente da cavidade oral. A base da saliva é líquido intersticial dos capilares sanguíneos que entra através dos ductos das glândulas salivares, onde ele é modificado de isotônico em líquido hipotônico (Pink *et al*., 2009). A água é o maior componente da saliva, representando 99% da sua composição. Os componentes sólidos, moléculas orgânicas e inorgânicas encontram-se dissolvidos no

constituinte aquoso, variando amplamente de um indivíduo para outro e ainda no mesmo indivíduo algumas vezes durante o dia. A parte inorgânica é composta por íons fracos e fortes, tais como Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, Ca^{2+}, HCO^{3}, Mg^{2+} e NH^{3}. O conteúdo orgânico contém componentes, como produtos de secreção (uréia, ácido úrico e creatinina), produtos de putrefação (putrescina, cadaverina, lipídeos como colesterol e ácidos graxos), e mais de 400 tipos de proteínas. As proteínas mais relevantes têm origem glandular (amilase, histatinas, cistatinas, lactoferrinas, lisozimas, mucinas e proteínas ricas em prolina (PRPs)) ou são derivadas do plasma (albumina, imunoglobulinas, transferrinas) (Lima *et al*., 2009).

Muitas vezes chamado de "espelho do corpo" ou "uma janela sobre o estado de saúde", o fluido oral é um meio perfeito para ser explorado na vigilância dos estados saúde/doença (Segal e Wong, 2008). Um número crescente de evidências tem sido estabelecido para o uso da saliva como uma ferramenta eficaz para o monitoramento de doenças sistêmicas. Existe uma grande expectativa no sentido de que as aplicações de diagnósticos salivares de doenças bucais sejam, em breve, seguidas por uma aplicação de alto-impacto em doenças sistêmicas, utilizando-se painéis altamente informativos de biomarcadores salivares genômicos e proteômicos. Isto possibilitará aos investigadores uma conexão entre pesquisas da saúde oral e o diagnóstico de doenças sistêmicas por meio de um biofluido que é filtrado, processado e secretado a partir da vasculatura que nutre as glândulas salivares dentro da cavidade oral (Figura 5) (Wong, 2006).

Nos últimos anos, a proteômica surgiu como uma tecnologia poderosa para identificar a expressão diferencial de proteínas associadas ao desenvolvimento e progressão do câncer. Suas duas técnicas mais populares e confiáveis, eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, têm sido amplamente aplicadas na investigação de diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma oral de células escamosas em amostras de tecido (He *et al*., 2004, Chen *et al*., 2004; Turhani *et al*., 2006, Lo *et al*., 2007) e linhagens celulares (Koike *et al*., 2005; Mlynarek *et al*. 2007; Staab *et al*., 2007).

O proteoma salivar pode ser explorado para a detecção precoce de cânceres humanos, predizendo a agressividade e as chances de recorrência do tumor, o que pode eventualmente levar ao desenvolvimento de simples

ferramentas clínicas com dois propósitos principais, assim como nas análises sanguíneas: o primeiro, identificar os indivíduos com a doença e, o segundo, acompanhar o progresso do indivíduo afetado em tratamento. Avanços na utilização da saliva como fluido diagnóstico têm sido tremendamente afetados pela atual evolução tecnológica. Por exemplo, a capacidade de medir e controlar uma ampla gama de componentes moleculares na saliva e compará-los aos do soro tornou viável o estudo de micro-organismos, produtos químicos e marcadores imunológicos. Como consequência, estende a utilidade da saliva além das análises de saúde bucal, podendo ser explorada também na avaliação de características essenciais da saúde como um todo (Streckfus e Bigler, 2002).

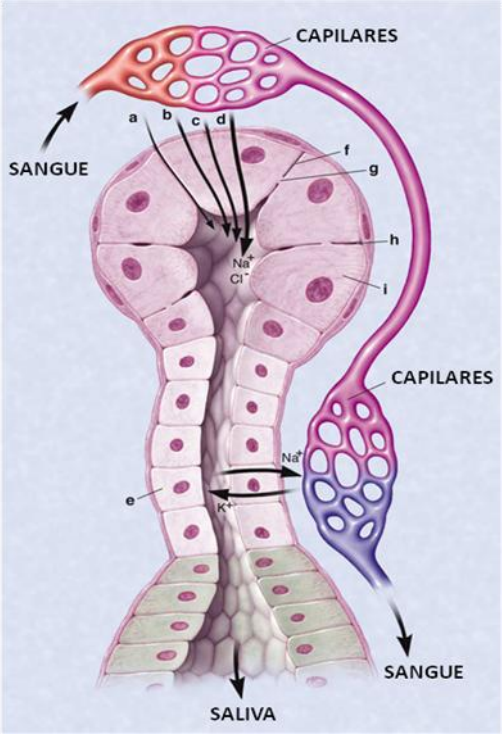

Figura 5: Mecanismos de transporte de proteínas e íons do soro para os ductos das glândulas salivares. a: transporte ativo de compostos selecionados. b: difusão passiva de compostos lipídicos solúveis. c: filtração simples de compostos selecionados. d: células acinares bombeiam ativamente íons sódio (Na+) para dentro dos ductos, seguido pela água. e: células do ducto bombeiam Na+ de volta para o sangue, produzindo saliva hipotônica. f: membrana celular. g: poro da membrana celular. h: espaço intracelular. i: célula acinar. Cl−: íon cloro. K+:íon potássio . (Adaptado de: Wong, 2006).

Devido à proximidade anatômica entre as glânduas salivares e os sítios de neoplasias orais, a saliva seria aparentemente ideal para o rastreamento dessas lesões. Vários investigadores têm testado esta hipótese. Por exemplo, um estudo realizado por Boyle *et al*. (1994) examinou o possível valor do supressor de tumor *p53* na saliva como um marcador para o carcinoma de células escamosas. Curiosamente, eles detectaram e identificaram mutações tumor-específicas neste gene em amostras de saliva pré-operatórias de indivíduos que apresentavam carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Resultados positivos foram observados em 71% dos pacientes estudados. Em outra investigação relacionada foram encontrados anticorpos salivares anti-p53 elevados entre os pacientes com carcinomas orais (Tavassoli *et al*., 1998). Estudos com outros marcadores oncológicos têm demonstrado que testes salivares podem também ser úteis na detecção de câncer de mama. O produto protéico do oncogene *c-erbB-2* encontra-se elevado na saliva das mulheres diagnosticadas com câncer de mama (Streckfus *et al*., 2000a). Tal investigação demonstrou que este marcador salivar é confiável e também pode ser utilizado no seguimento pós-operatório das pacientes (Streckfus *et al*., 1999, 2001). Esse mesmo grupo também constatou a presença de CA15-3, receptor de EGF, catepsina-D, p53, e Waf-1 na saliva e investigam também sua utilidade coletiva em um painel diagnóstico para detecção de câncer (Streckfus *et al*, 2000b). A saliva tem sido também utilizada de forma consistente na detecção de HIV 1 e 2, e hepatite viral A, B e C (Lee *et al*., 2009).

A coleta da saliva é um processo totalmente não invasivo, que pode ser realizado em qualquer ambiente e não requer habilidades nem equipamentos especiais. A fisiologia da cavidade oral permite o fluxo contínuo do fluido secretado atualizando o conteúdo líquido da boca constantemente. Portanto, a composição da saliva, em qualquer momento, temporariamente reflete a atividade metabólica dos elementos secretores que geram esse fluido (Streckfus *et al*., 2008). Como uma ferramenta clínica, a saliva tem muitas vantagens, incluindo a facilidade de coleta, armazenamento e transporte, e pode ser obtida a baixo custo em quantidades suficientes para várias análises (Wong, 2006). Uma desvantagem do uso saliva como fluido diagnóstico seria o fato de que os analitos informativos são geralmente presentes em menor quantidade na saliva do que no soro. Porém,

com o desenvolvimento de novas técnicas altamente sensíveis, o nível mais baixo dos analitos na saliva já não é uma limitação (Miller, 1994).

Apesar da incorporação de novas tecnologias pelo setor de saúde nos últimos anos, o câncer de boca continua tendo efeitos devastadores para o paciente. As desfigurações faciais decorrentes têm consequências socialmente relevantes e acarretam prejuízos na comunicação, na alimentação e no paladar (Gelrich *et al.,* 2002). Nesse contexto, a busca por métodos eficazes de diagnóstico precoce e não invasivos tem recentemente emergido com soluções biotecnológicas inovadoras que, além de todas as outras vantagens já citadas, ajudam a melhorar a qualidade de vida do paciente tanto em relação ao diagnóstico, representando alternativas às biópsias que são muitas vezes desconfortáveis e/ou dolorosas, quanto em relação ao tratamento, evitando procedimentos cirúrgicos mutiladores.

4. Referências Bibliográficas

Applied Biosystems. Guide to Performing Relative Quantitation of gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Foster City, Califórnia, 2004.

Austin, P. Will dAbs challenge mAbs? *Nature*; 341:484-85, 1989.

Azzazy Hassan, M.E.; Highsmith, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Bioch.*; 35:425-45, 2002.

Barthe, C.; Mahon, F.X.; Gharbi, M.J.; Faberes, C.; Bilhou-Nabera, C.; Hochhaus, A.; *et al*. Expression of interferon-βα (IFN-α) receptor 2c at diagnosis is associated with cytogenetic response in IFN-α-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*; 97:3568-73, 2001.

Bau, D.T.; Tseng, H.C.; Wang, C.H.; Chiu, C.F.; Hua, C.H.; Wu, C.N.; *et al*. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. *Oral Oncol*; 44:1047-51, 2008.

Bell, R.; Kademani, D.; Homer, L.; Dierks, E.; Potter, B. Tongue cancer: is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *Journal Oral Maxillofacial Surgery*; 65:229-36, 2007.

Boing, A. F. O câncer de boca e de faringe no Brasil: tendências e padrões regionais de mortalidade entre 1979 e 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

Boyle, J.O.; Mao, L.; Brennan, J.A.; Koch, W.M.; Eisele, D.W.; Saunders, J.R.; Sidransky, D. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg*; 168:429-32, 1994.

Boyle, O.; Hakim, J.; Koch, W.; van der Riet, P.; Hruban, R.H.; Roa, R.A.; *et al*. The incidence of p53 mutations increase with progression of head and neck cancer. *Cancer Res*; 53:4477-80, 1993.

Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*; 25:169-93, 2000.

Canevari, R.A.; Rogatto, S.R. Câncer de Cabeça e Pescoço. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C. Oncologia Molecular. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 189-201.

Chandu, A.; Smith, A.C.; Rogers, S.N. Health-related quality of life in oral cancer: a review. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*; 64:485-582, 2006.

Chen, J.; He, Q.Y.; Yuen, A.P.; Chiu, J.F. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. *Proteomics*; 4: 2465-75, 2004.

Cheong, S.C.; Chandramouli, G.V.R.; Saleh, A.; Zain, R.B.; Lau, S.H.; Sivakumaren, S.; *et al*. Gene expression in human oral squamous cell carcinoma is influenced by risk factor exposure. *Oral Oncol*; 45:712-9, 2009.

Christmann, A.; Wentzel, A.; Meyer, C.; Meyers, G.; Kolmar, H. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries. *J Immunol Methods*; 257:163-73, 2001.

Coley, A.M.; Campanale, N.V.; Casey, J.L.; Hodder, A.N.; Crewther, P.E.; Anders, R.F.; *et al*. Rapid and precise epitope mapping of monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum AMA1 by combined phage display of fragments and random peptides. *Protein Eng*; 14:691-98, 2001.

Coupade, C.D.; Gillet, R.; Bennoun, M.; Briand, P.; Russo-Marie, F.; Solito, E. Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice. *Hepatology*; 31:371-80, 2000.

Dahlstrom, K.R.; Little, J.A.; Zafereo, M.E.; Lung, M.; Wei, Q.; Sturgis, E.M. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head and Neck*; 30:75-84, 2008.

Desplancq, D.; King, D. J.; Lawson, A. D. G.; Mountain, A. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Eng*; 7:1027-33, 1994.

Dobróssy, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev*; 2:9-17, 2005.

Dupont, B. Introduction: current concepts in immunity to human cancer and therapeutic antitumor vaccines. *Immunol Rev*; 188:5-8, 2002.

Eichler, J. Synthetic peptide arrays and peptide combinatorial libraries for the exploration of proteinligand interactions and the design of protein inhibitors. *Comb Chem High Throughput Screen*; 8:135–43, 2005.

Ellerby, H.M.; Arap, W.; Ellerby, L.M.; Kain, R.; Andrusiak, G.D.R.; Krajewlski, S.; *et al*. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med*; 5:103-8, 1999.

Fack, F.; Hugle-Dorr, B.; Song, D.; Queitsch, I.; Petersen, G.; Bautz, E.K. Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *J Immunol Methods*; 206:43-52, 1997.

Ferreira, A.P.; Teixeira, H.C. Tópicos de imunologia básica. 1ª ed. Juiz de Fora: Do Autor, 2005. 83 p.

Francisco, J.; Campbell, R.; Iverson, B.; Georgiou, G. Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:10444-8, 1993.

Furniss, C.S.; McClean, M.D.; Smith, J.F.; Bryan, J.; Nelson, H.H.; Peters, E.S.; *et al*. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*; 120:2386-92, 2007.

Garrote, L.F.; Herrero, R.; Reyes, R.M.; Vaccarella, S.; Anta, J.L.; Ferbeye, L.; *et al*. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer*; 85:46-54, 2001.

Gellrich, N.; Schimming, R.; Schramm, A.; Schmalohr, D.; Bremerich, A.; Kugler, J. Pain, function and psychologic outcome before, during and after intraoral tumor ressection. *J Oral Maxillofac Surg*; 60:772-7, 2002.

Ginzinger, D.G.; Godfrey, T.E.; Nigro, J.; Moore, D.H.; Suzuki, S.; Pallavicini, M.G.; *et al*. Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis. *Cancer Res*; 60:5405–09, 2000.

Goletz, S.; Christensen, P. A.; Kristensen, P.; Blohm, D.; Tomlinson, I.; Winter, G.; *et al*. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol*; 315:1087-97, 2002.

Guha, N.; Boffeta, P.; Wunsch-Filho, V.; Eluf Neto, J.; Shangina, O.; Zaridze, D.; *et al*. Oral health and risk os squmous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results os two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*; 166:1159-73, 2007.

Ha, P.K.; Califano, J.A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*; 15:188-96, 2004.

Hanes, J.; Pluckthun, A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:4937-42, 1997.

He, M.; Taussig, M.J. Antibody–ribosome–mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res*; 25:5132-4, 1997.

He, Q.Y.; Chen, J.; Kung, H.F.; Yuen, A.P.; Chiu, J.F. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*; 4:271–8, 2004.

Herrero, R.; Castellsagué, X.; Pawlita, M.; Lissowska, J.; Kee, F.; Balaram, P.; *et al*. Human papillomavirus and oral cancer: the international agency for research on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*; 95:1772-83, 2003.

Hirota, S.K.; Braga, F.P.; Penha, S.S.; Sugaya, N.N.; Migliari, D.A. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 13:E227-31, 2008.

Holliger, P.; Williams, R.L. Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 A: evidence for conformational lability. *Journal of Molecular Biology*; 288:649-57, 1999.

Hommann, N.; Tillonen, J.; Meurman, J.H.; Rintamaki, H.; Lindqvist, C.; Raution, M.; *et al*. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis*; 21:663-8, 2000.

Hsiang, C.H.; Tunoda, T.; Whang, Y.E.; Tyson, D.R.; Ornstein, D.K. The impact of altered Annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. *Prostate*; 66:1413–24, 2006.

Hsiao, J.R.; Chang, Y.; Chen, Y.L.; Hsieh, S.H.; Hsu, K.F.; Wang, C.F.; *et al*. Cyclic αvβ6-targeting peptide selected from biopanning with clinical potential for head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, 2009.

Hu, S.; Loo, J.A.; Wong, D. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*; 6:6326-53, 2006.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.

International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report. Lyon: IARC, 2003.

Irving, R.A.; Coia, G.; Roberts, A.; Nuttall, S.D.; Hudson, P.J. Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J Immunol Methods*; 248:31–45, 2001.

Izzo, J.G.; Papadimitrakopoulou, V.A.; Li, X.Q.; Ibarguen, H.; Lee, J.S.; Ro, J.Y.; *et al*. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene*; 17:2313-22, 1998.

Joyce, J.A.; Laakkonen, P.; Bernasconi, M.; Bergers, G.; Ruoslahti, E.; Hanahan, D. Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell*; 4:393–403, 2003.

Kamal, A.M.; Flower, R.J.; Perretti, M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 100:39-48, 2005.

Kesting, M.R.; Sudhoff, H.; Hasler, R.J.; Nieberler, M.; Pautke, C.; Wolff, K.D.; *et al*. Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features. *Oral Oncol*; 45:731–6, 2009.

Key, T.J.; Allen, N.E.; Spencer, E.A.; Travis, R.C. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet*; 360:861-8, 2002.

Khanna, S.S.; Karjodkar, F.R. Circulating immune complexes and trace elements (Copper, Iron and Selenium) as markers in oral precancer and cancer: a randomised, controlled clinical trial. *Head Face Med;* 2:33, 2006.

Kim, M.M.; Glazer, C.A.; Mambo, E.; Chatterjee, A.; Zhao, M.; Sidransky, D.; *et al*. Head and neck cancer cell lines exhibit differential mitochondrial repair deficiency in response to 4NQO. *Oral Oncol;* 42:201-7, 2006.

Knowles, M.; Selby, P. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 4ª ed. New York: Oxford University Press, 2005. 550 p.

Koike, H.; Uzawa, K.; Nakashima, D.; Shimada, K.; Kato, Y.; Higo, M.; *et al*. Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach. *Int J Oncol*; 27: 59–67, 2005.

Koivunen, E.; Arap, W.; Valtanen, H.; Rainisalo, A.; Medina, O.P.; Heikkilä, P.; *et al*. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol*; 17:768–74, 1999.

Kojima, A.; Maeda, H.; Sugita, Y.; Tanaka, S.; Kameyama, Y. Human papillomavirus type 38 in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*; 38:591-96, 2002.

Krauter, J.; Heil, G.; Ganser, A. The AML1/MTG8 fusion transcript in t(8;21) positive AML and its implication for the detection of minimal residual disease; malignancy. *Hematology*; 5:369–81, 2001.

Kubista, M.; Andrade, J.M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jona´k, J.; Lind, K.; *et al*. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*; 27:95–125, 2006.

Kumar, S.K.; Liu, L.; Sedghizadeh, P.P.; Jayakar, A.N.; Shuler, C.F. Oral squamous cell carcinoma incidence by subsite among diverse racial/ethnic populations in California. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End*; 103:797, 2007.

Kurkivuori, J.; Salaspuro, V.; Kaihovaara, P.; Kari, K.; Rautemaa, R.; Gronroos, L.; *et al*. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol*; 43:181-6, 2006.

Lee, J.M.; Garon, E.; Wong, D.T. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res*; 12:206-11, 2009.

Levitan, B. Stochastic modeling and optimization of phage display. *J Mol Biol*; 277:893-916, 1998.

Li, G.; Sturgis, E.M. The role of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Oncol Rep*; 8:130-9, 2006.

Lima, D.P.; Diniz, D.G.; Moimaz, S.A.S.; Sumida, D.H.; Okamoto, A.C. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis*; 2009. In press.

Lin CY, Jeng YM, Chou HY, Hsu HC, Yuan RH, Chiang CP, *et al*. Nuclear localization of annexin A1 is a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*, 97:544-50, 2008.

Livak, K.J.; Schmittegen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*; 25:402-08, 2001.

Llewellyn, C.D.; Johnson, N.W.; Warnakulasuriya, K.A.A.S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - a comprehensive literature review. *Oral Oncol*; 37:401-18, 2001.

Lo, W.Y.; Tsai, M.H.; Tsai, Y.; Hua, C.H.; Tsai, F.J.; Huang, S.Y.; *et al*. Identification of overexpressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. *Clin Chim Acta*; 376: 101-7, 2007.

Lung, T.; Tascau, O.C.; Almasan, H.A.; Muresan, O. Head and neck cancer, treatment, evolution and post therapeutic survival – part 2: a decade's results 1993-2002. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 35:126-31, 2007.

MacFarlane, G.J.; Zheng, T.; Marshall, J.R.; Boffetta, P.; Niu, B.; Brasure, J.; *et al*. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol*; 31:181-7, 1995.

Mackenzie, J.; Ah-See, K.; Thakker, N.; Sloan, P.; Maran, A.G.; Birch, J.; *et al*. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol*; 36:387-9, 2000.

MacKenzie, R.; To, R. The role of valency in the selection of anti-carbohydrate single-chain Fvs from phage display libraries. *J Immunol Methods*; 220:39-49, 1998.

Mahboubi, E.; Sayed, G.M. Oral Cavity and pharynx. In: Schottenfeld, D.; Fraumeni, Jr. Cancer epidemiology and prevention. New York: Oxford, 1996. p. 583-95.

Mao, L.; Lee, J.S.; Fan, Y.H.; Ro, J.Y.; Batsakis, J.G.; Lippman, S.; *et al*. Frequent microsatellite alterations of chromosome 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nature Med*; 2:682-5, 1996.

McCafferty, J.; Griffiths, A.D.; Winter, G.; Chiswell, D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*; 348:552-4, 1990.

Meulemans, E.V.; Slobbe, R.; Wasterval, P.; Ramaekers, F.C.S.; van Eys, G.J.J.M. Selection of phagedisplayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody. *J Mol Biol*; 244:353-60, 1994.

Merk, H.; Stiege, W.; Tsumoto, K.; Kumagai, I.; Erdmann, V. A. Cell-free expression of two single-chain monoclonal antibodies against lysozyme: effect of domain arrangement on the expression. *J Biochem*; 125:328-33, 1999.

Miceli, R.M.; DeGraaf, M.E.; Fischer, H.D. Two-stage selection of sequences from a random phage display library delineates both core residues and permitted structural range within an epitope. *J Immunol Methods*; 167:279–87, 1994.

Miller, C.S.; Johnstone, B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 91:622-35, 2001.

Miller, S.M. Saliva testing: a nontraditional diagnostic tool. *Clin Lab Sci*; 7:39-44, 1994.

Minitz, P.J.; Kim, J.; Do, K.A.; Wang, X.; Zinner, R.G.; Cristofanilli, M, *et al*. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol*; 21:57-63, 2003.

Mitchell, R.N.; Kumar, V.; Abbas, A.K; Fausto, N. Fundamentos de Robbins & Cotran Patologia. 7ª ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. 848 p.

Mlynarek, A.M.; Balys, R.L.; Su, J.; Hier, M.P.; Black, M.J.; Alaoui-Jamali, M.A. A cell proteomic approach for the detection of secretable biomarkers of invasiveness in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 133: 910–8, 2007.

Mullaney, B.P.; Pallavicini, M.G. Protein-protein interactions in hematology and phage display. *Exp Hematol*; 29:1136-46, 2001.

Mullis, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Science*; 262:56–61, 1990.

Mullis, K.B.; Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*.; 155:335-50, 1987.

Nair, S.; Pillai, M.R. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis*; 11:350-9, 2005.

Nestler, H.P. Combinatorial chemistry and fragment screening--two unlike siblings? *Curr. Drug Discov Technol*; 2:1–12, 2005.

Nichols, A.C.; Bhattacharyya, N. Racial differences in stages and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *The laryngoscope*; 117:770-5, 2007.

Nomura, H.; Uzawa, K.; Yamano, Y.; Fushimi, K.; Nakashima, D.; Kouzu, Y.; *et al*. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in

premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with epithelial differentiation. *J Cancer Res Clin Oncol*; 135:943-9, 2009.

O'regan, E.M.; Tiner, M.E.; Smiyth, P.C.; Finn, S.P.; Timon, C.; Cahill, S.; *et al*. Distinct array comparative genomic hybridization profiles in oral squamous cell carcinoma occurring in young patients. *Head and Neck*; 28:330-8, 2006.

Ohnmacht, G.A.; Wang, E.; Mocellin, S.; Abati, A.; Filie, A.; Fetsch, P.; *et al*. Short-term kinetics of tumor antigen expression in response to vaccination. *J Immunol*; 167:1809–20, 2001.

Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology;* 31: 169-217, 1994.

Parhami-Seren, B.; Keel, C.; Reed, G.L. Sequences of antigenic epitopes of streptokinase identified via random peptide libraries displayed on phage. *J Mol Biol*; 271:333–41, 1997.

Parise, O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier, 2000. 256 p.

Parmley, S.; Smith, G. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*; 73:305-18, 1988.

Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*; 380:364-6, 1996.

Pelletier, J.; Sidhu, S.; Mapping protein-protein interactions with combinatorial biology methods. *Curr Opin Biotechnol*; 12:340–7, 2001.

Perussi, M.R.; Denardin, O.V.P.; Fava, A.S.; Abrão, R. Carcinma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 48:341-44, 2002.

Peters, I.R.; Helps, C.R.; Hall, E.J.; Day, M.J. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *J Immunol Methods*; 286:203-17, 2004.

Phizicky, E.M.; Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*; 59:94-123, 1995.

Pincus, S.H.; Shigeoka, A.O.; Moe, A.A.; Ewing, L.P.; Hill, H.R. Protective efficacy of IgM monoclonal antibodies in experimental group B streptococcal infection is a function of antibody avidity. *J Immunol*; 140:2779-85, 1988.

Pink, R.; Simek, J.; Vondrakova, J.; Faber, E.; Michl, P.; Pazdera, J.; *et al*. Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*; 153:103–10, 2009.

Pongers-Willemse, M.J.; Verhagen, O.J.; Tibbe, G.J.; Wijkhuijs, A.J.; de Haas, V.; Roovers, E.; *et al*. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*; 12:2006–14, 1998.

Ragin, C.C.; Modugno, F.; Gollin, S.M. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*; 86:104-14, 2007.

Reichart, P.A. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Invest*; 5:207-13, 2001.

Rosin, M.P.; Cheng, X.; Poh, C.; Lam, W.L.; Huang, Y.; Lovas, J.; *et al*. Use of allelic loss to predict malignant risk of low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*; 6:357-362, 2000.

Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science;* 230:1350–54, 1985.

Sartori, L. C. Rastreamento do câncer bucal: aplicações no programa saúde da família. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2004.

Schiffman, M.; Herrero, R.; Desalle, R.; Hildesheim, A.; Wacholder, S.; Rodriguez, A.C.; *et al*. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*; 337:76-84, 2005.

Schlecht, N.F.; Franco, E.L.; Pintos, J.; Kowalski, L.P. Effect os smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Epidemiology*; 10:412-8, 1999.

Schofield, D.; Pope, A.; Clementel, V.; Buckell, J.; Chapple, S.; Clarke, K.; *et al*. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome Biol*; 8:254, 2007.

Schottenfeld, D. Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer. *Cancer*; 43:1962-6, 1979.

Schwartz, J.L. Biomarkers and molecular epidemiologyand chemoprevention of oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med;* 11:92–122, 2000.

Sciubba, J.J. Oral cancer and its detection. *Journal of American Dental Association*; 132:12-8, 2001.

Scully, C.; Bagan, J.V. Recent advances in oral oncology. *Oral Oncol*; 43:107-115, 2007.

Scully, C.; Bagan, J.V. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol;* 45:301-08, 2009.

Scully, C.; Field, J.K.; Tanzawa, H. Genetic abberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control *Eur J Cancer (Oral Oncol)*; 36:256–63, 2000a.

Scully, C.; Field, J.K.; Tanzawa, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Eur J Cancer (Oral Oncol)*; 6:311–27, 2000b.

Scully, C.; Field, J.K.; Tanzawa, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Eur J Cancer (Oral Oncol)*; 36:404–13, 2000c.

Segal, A.; Wong, D. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *Eur J Dent Educ*; 12:22-9, 2008.

Shah, N.G.; Trivedi, T.I.; Tankshali, R.A.; Goswami, J.V.; Jetly, D.H.; Shukla, S.N.; *et al*. Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis. *Head Neck*; 2009. In press.

Sherin, N.; Simi, T.; Shameena, P.M.; Sudha, S. Changing trends in oral cancer. *Indian J Cancer*; 45:93-6, 2008.

Sidhu, S.S. Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng*; 18:57-63, 2001.

Sidhu, S.S.; Koide, S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Current Opinion in Structural Biology*; 17:481-7, 2007.

Smith, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*; 228:1315-7, 1985.

Smyth, M.J.; Godfrey, D.I.; Trapani, J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*; 2: 293-299, 2001.

Staab, C.A.; Ceder, R.; Jagerbrink, T.; Nilsson, J.A.; Roberg, K.; Jornvall, H. Bioinformatics processing of protein and transcript profiles of normal and transformed cell lines indicates functional impairment of transcriptional regulators in buccal carcinoma. *J Proteome Res*; 6:3705-17, 2007.

Stephen, C.W.; Helminen, P.; Lane, D.P. Characterisation of epitopes on human p53 using phagedisplayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol*; 248:58–78, 1995.

Streckfus, C.; Bigler, L.; Dellinger, T.; Pfeifer, M.; Rose, A.; Thigpen, J.T. CA15-3 and c-erbB-2 presence in the saliva of women. *Clin Oral Invest*; 3:138-43, 1999.

Streckfus, C.; Bigler, L.; Tucci, M.; Thigpen, J.T. A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma. *Cancer Invest*; 18:103-11, 2000a.

Streckfus, C.F.; Bigler, L.; Dellinger, T.D.; Dai, X.; Kingman, A.; Thigpen, J.T. The presence of c-erbB-2, and CA 15-3 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. *Clin Cancer Res*; 6:2363-70, 2000b.

Streckfus, C.F.; Bigler, L.; Navazesh, M.; Al-Hashimi, I. Cytokine concentrations in stimulated whole saliva among patients with primary Sjogren's, secondary Sjogren's syndrome, and primary Sjogren's syndrome receiving varying doses of

interferon for symptomatic treatment of the condition: a preliminary study. *J Clin Oral Invest*; 5:133-35, 2001.

Streckfus, C.F.; Bigler, L.R. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Disease*; 8:69-76, 2002.

Streckfus, C.F.; Mayorga-Wark, O.; Arreola, D.; Edwards, C.; Bigler, L.; Dubinsky, W.P. Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in sito of the breast. *Cancer Inves*; 1-9, 2008.

Syrjänen, K.J.; Syrjänen, S.M.; Lamberg, M.A.; Pyrhönen, S. Human Papillomavirus (HPV) Involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proc Finn Dent Soc*; 79:1-8, 1983.

Tavassoli, M.; Brunel, N.; Maher, R.; Johnson, N.W.; Soussi, T. P53 antibodies in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Cancer*; 78: 390-1, 1998.

Termine, N.; Panzarella, V.; Falaschini, S.; Russo, A.; Matranga, D.; Lo Muzio, L.; *et al*. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol*; 19:1681-90, 2008.

Toporcov, T.N.; Antunes, J.L.F.; Tavares, M.R. fat food habitual intake and risk of oral cancer. *Oral Oncol*; 40:925-31, 2004.

Turhani, D.; Krapfenbauer, K.; Thurnher, D.; Langen, H.; Fountoulakis, M. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *Electrophoresis*; 27:1417–23, 2006.

Uchiyama, F.; Tanaka, Y.; Minari, Y.; Tokui, N. Designing scaffolds of peptides for phage display libraries. *J Biosci Bioen.*; 99:448–56, 2005.

Valasek, M.A.; Repa, J.J. The power of the real-time PCR. *Advan Physiol Educ*; 29:151-159, 2005.

van Houten, V.M.; van den Brekel, M.W.; Denkers, F.; Colnot, D.R.; Westerga, J.; van Diest, P.J.; *et al*. Molecular diagnosis of head and neck cancer. Recent Results Cancer Res; 157:90-106, 2000.

Vaughan, T.J.; Williams, A.J.; Pritchard, K.; Osbourn, J.K.; Pope, A.R.; Earnshaw, J. C.; *et al*. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol*; 14:309-14, 1996.

Velden, V.H.; Hochhaus, A.; Cazzaniga, G.; Szczepanski, T.; Gabert, J.; van Dongen, J.J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*; 17:1013-34, 2003.

Velly, A.M.; Franco, E.L.; Schlecht, N.; Pintos, J.; Kowalski, L.P.; Oliveira, B.V.; *et al*. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*; 34:284-91, 1998.

Vishwanatha, J.K.; Swinney, R.; Banerjee, A.G. Modulation of annexin I and cyclooxygenase-2 in smokeless tobacco-induced inflammation and oral cancer. *Mol Cell Biochem*; 48:67-75, 2003.

Vollmers, H.P.; Brändlein, S. Natural antibodies and cancer. *New Biotechnology*; 25:294-98, 2009.

Weisser, N.E.; Hall, J.C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*; 27:502–20, 2009.

Wong, D.T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc*; 137:313-21. 2006.

World Health Organization (WHO). Mackay, J.; Eriksen, M. The tobacco atlas. Hong Kong: WHO, 2002.

World Health Organization (WHO). Pathology and genetics of head and neck tumors. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon:IARC Press, 2005.

Woutersen, R.A.; Appel, M.J.; va Garden-Hoetmer, A.; Wijnands, M.V.W. Dietary fat and carcinegenesis. *Mutat Res*; 443:111-27, 1999.

Wunsch-Filho,V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol*; 38:737-46, 2002.

Yeudall, W.A.; Campo, M.S. Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissues. *J Gen Virol*; 72:173-6, 1991.

Zain, R.B. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer – a brief overview. *Oral Oncol*; 37:205-10, 2001.

Zhang, L.; Yang, X.; Zhong, L.P.; Zhou, X.J.; Pan, H.Y.; Wei, K.J.; *et al*. Decreased expression of Annexin A1 correlates with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*; 38:362-370, 2009.

Capítulo 1

Identificação de um Fragmento de Anticorpo scFv Ligante a Proteínas Salivares e Teciduais de Pacientes com Carcinoma Oral de Células Escamosas por *Phage Display*

RESUMO

A detecção precoce do carcinoma oral de céulas escamosas (OSCC) é fator importante na diminuição das taxas de mortalidade e o sucesso do tratamento relaciona-se diretamente com seu diagnóstico em fases iniciais. Contudo, infelizmente, a maioria dos carcinomas orais é diagnosticada em fases tardias da doença. No presente trabalho, pela primeira vez, é descrito um fragmento scFv, selecionado por *Phage Display* contra proteínas totais salivares, que reconhece efetivamente antígenos com potencial diagnóstico para a detecção precoce do câncer oral. A análise de reatividade por meio do teste imunoenzimático ELISA em 30 amostras de saliva de pacientes com OSCC e 30 indivíduos saudáveis, mostrou que o scFv D09 reconhece antígenos presentes na saliva tumoral ($p<0.0001$). O teste diagnóstico apresentou elevado poder discriminativo, avaliado estatisticamente pela curva ROC (AUC=0.97), além de 100% de especificidade. Ensaios de imunohistoquímca mostraram que o anticorpo seleciondo também apresenta afinidade por estruturas teciduais características de carcinomas orais bem diferenciados, como, por exemplo, pérolas de queratina. A análise proteômica bidimensional revelou que o scFv D09 reconhece 2 *spots* nas amostras de saliva (~50 kDa; pI 5.75 e 5.86) e apenas um nas amostras de tecido (~28 kDa and pI 4.68). A caracterização final das sequências peptídicas está em andamento por meio de espectrometria de massas. Esses dados, embora preliminares, alteram significativamente o diagnóstico do câncer oral, pois fornecem fortes evidências de que a saliva representa uma poderosa ferramenta clínica para sua detecção precoce, por meio de um método diagnóstico de baixo custo, minimamente invasivo e altamente sensível.

Palavras chave: Carcinoma oral de células escamosas*, Phage Display*, fragmentos de anticorpos scFv, Saliva.

ABSTRACT

Early detection of oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an important factor to reduce mortality rates and treatment success is directly related to its diagnosis at early stages. However, unfortunately, most oral carcinomas are diagnosed in late stages of the disease. This is the first study that describes an scFv fragment, selected by *Phage Display* against total salivary proteins, that effectively recognize antigens with diagnostic potential for early detection of oral cancer. ELISA immunoassays in 30 samples of saliva from OSCC patients and 30 healthy subjects showed that the scFv D09 recognize antigens present in tumoral samples ($p < 0.0001$). The diagnostic test showed high discriminative power with a significant ROC curve (AUC=0.97) and 100% specificity. Imunohistochemistry tests revealed that the selected antibody also showed higher affinity to tissues related to well differentiated oral carcinomas, such as keratin pearls. The two-dimensional proteomic analysis revealed that the scFv D09 recognizes two spots in saliva samples (~50 kDa; pI 5.75 e 5.86) and only one in tissue samples (~28 kDa and pI 4.68). Final characterization of the peptides sequences is under investigation through mass spectrometry. These data, although preliminary, may significantly alter the diagnosis of oral cancer, once they provide strong evidence that saliva is a powerful clinical tool for early detection through a non-invasive and highly sensitive diagnostic method.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, Phage Display, scFv antibody fragments, Saliva.

1. Introdução

O carcinoma oral de células escamosas (OSCC) é o tumor malígno mais comumente encontrado na cavidade bucal, compreendendo mais de 90% de todos os casos de câncer de boca.[1] É uma doença que acomete particularmente indivíduos do sexo masculino, principalmente aqueles com idade acima de 45 anos. Essa neoplasia apresenta uma taxa de sobrevida de 5 anos de aproximadamente 50%.[2] A alta taxa de mortalidade de tumores malignos como o OSCC é geralmente atribuída à dificuldade em detectar a doença numa fase inicial tratável. O diagnóstico clínico atual da maioria dos cânceres epiteliais, incluindo o carcinoma oral, geralmente envolve a realização de biópsias invasivas, seguidas de exame histológico do tecido proveniente da excisão. O procedimento pode causar, além de risco de infecção, traumas psicológicos para o paciente.[3] Ademais, o diagnóstico histopatológico convencional é baseado em alterações morfológicas e estruturais em nível celular ou tecidual, que podem não ser óbvias para tumores em estágios iniciais.[4]

Estudos têm demonstrado que alterações precoces na tumorigênese podem ser identificadas com sucesso em fluidos corporais que drenam o órgão afetado pelo tumor. Diante desta perspectiva, enormes esforços têm sido dedicados na identificação e quantificação em larga escala de proteínas e/ou peptídeos em fluidos corporais humanos, sendo que diversas plataformas tecnológicas têm sido testadas com este propósito. Em termos de diagnóstico e prognóstico, fluidos, tais como sangue, urina, lágrima ou saliva, oferecem muitas vantagens relevantes, incluindo a mínima invasão, o baixo custo e a facilidade da coleta e processamento. A análise do proteoma dos fluidos corporais tornou-se uma das abordagens mais promissoras na busca por novos biomarcadores clínicos e alvos terapêuticos.[5]

A saliva contém uma grande variedade de proteínas, muitas das quais podem ser bastante informativas para detecção de patologias humanas.[5] Além disso, o proteoma salivar, em contraste com o do soro, é altamente suscetível a vários processos fisiológicos e bioquímicos.[6] A análise da saliva pode ser utilizada na avaliação de alterações específicas relacionadas à carcinogênese como, por exemplo, marcadores tumorais epiteliais, que têm se mostrado significativamente

aumentados na saliva de pacientes com OSCC,[7] podendo ainda ser uma ferramenta clínica poderosa no monitoramento da agressividade e das possibilidades de recorrência do tumor.[8] Dentre outras vantagens, a saliva é fácil de coletar, armazenar e transportar, e pode ser obtida a baixo custo em quantidades suficientes para várias análises. Para os pacientes, as técnicas não invasivas de coleta reduzem drasticamente a ansiedade e o desconforto, e simplificam o recolhimento de repetidas amostras para o acompanhamento da doença ao longo do tempo.[9]

A análise do potencial de centenas ou milhares de proteínas diferentes que constituem um proteoma exige um elevado número de ferramentas versáteis e altamente específicas, perfis de expressão representativos e profundos estudos funcionais.[10] A tecnologia de *Phage display* tem sido amplamente bem sucedida na geração de ligantes contra uma grande variedade de alvos, incluindo antígenos tumor-associados.[11] Bibliotecas de fragmentos de anticorpos scFv (*Single chain fragment variable*) expressas em bacteriófagos possuem várias características vantajosas que, em alguns casos, superam as limitações dos anticorpos monoclonais. Esses fragmentos, que representam os sítios funcionais de ligação ao antígeno, podem ser expressos rapidamente, em grandes quantidades e a um custo mais baixo em comparação à geração dos anticorpos monoclonais em cultura de células animais.[12]

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método diagnóstico não invasivo baseado na identificação de um potencial biomarcador salivar para a detecção precoce do carcinoma oral de células escamosas, por meio da tecnologia de *Phage display*.

2. Pacientes e Métodos

2.1. Coleta e Preparo do Material Biológico

Foram coletadas amostras de 30 pacientes com carcinoma oral de células escamosas, no momento da internação pré-cirúrgica para exérese total da lesão, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Com os pacientes em jejum, o fluxo salivar foi coletado sem estimulação prévia utilizando-se tubos *Salivette*® (Sarstedt) durante cinco minutos sem interrupção. Como controles negativos amostras de saliva de 30 voluntários saudáveis sem histórico pessoal de quaisquer tipos de câncer e sem histórico familiar de carcinoma oral foram coletadas exatamente da mesma maneira, no momento em que recorreram à Unidade de Diagnóstico Estomatológico da Universidade Federal de Uberlândia para tratamento de outras doenças bucais, não-neoplásicas. Os mesmos foram orientados a enxaguarem a boca repetidamente com água potável antes da coleta. Aproximadamente 2 mL de saliva obtidos de cada indivíduo foram levados ao Laboratório de Nanobiotecnologia e imediatamente centrifugados por 10000 x *g* durante 10 minutos a 4°C para a remoção de debris celulares. O sobrenadante foi removido e estocado em pequenas alíquotas a –80°C até o momento das análises. As amostras de tecido foram coletadas no momento da cirurgia e imediatamente congeladas a –80°C. Para a quantificação das proteínas totais foi utilizado o kit *BCA™ Protein Assay* (Thermo Scientific). Todas as lesões foram histopatologicamente analisadas e informações clínicas como sexo, idade, históricos de etilismo, tabagismo, recorrência e tratamentos foram também coletadas. O estadiamento dos tumores foi determinado após a cirurgia de acordo com o sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*)[13] e a classificação histopatológica segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).[14] A fim de se preservar a identidade de cada paciente, todos foram identificados por meio dos seus respectivos números de prontuário. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFU sob o número de protocolo 249/09, e todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2. Biblioteca de Fragmentos de Anticorpos scFv

A biblioteca de fragmentos de anticorpos scFv utilizada foi construída a partir de amostras de RNA total obtidas de leucócitos (sangue periférico) de 25 pacientes com carcinoma bem diferenciado de tireóide, um tipo de tumor de cabeça e pescoço, assim como o carcinoma epidermóide bucal. O *Kit Super Script III* (Invitrogen™) foi utilizado para a síntese do cDNA. Em seguida, as regiões variáveis das imunoglobulinas foram amplificadas em 55 reações independentes de PCR, utilizando-se 20 *primers* diferentes para a síntese das cadeias pesada e leve (V_H e V_L, respectivamente), esta última formadas pelas cadeias kappa κ e lambda λ. Para a amplificação das sequências scFv, os produtos de PCR das cadeias V_H e V_L foram reunidos em quantidades iguais para gerar um produto final de sobreposição (*overlap*) que foi purificado e em seguida submetido a uma reação de restrição com a enzima de restrição Sfi I (Fermentas Life Sciences) para a clonagem. A digestão do vetor fagomídeo pComb3X com a mesma enzima foi feita simultaneamente e a reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Promega). Ao final de todo o processo de construção, foi obtida uma biblioteca da ordem de 1,2 x 10^6 sequências de fragmentos de anticorpos scFv.[15]

2.3. Seleção por Phage display dos anticorpos scFv (Panning)

Foram conduzidos dois ciclos de seleção, sendo cada um deles antecedido pela re-amplificação da biblioteca de scFv em *E.coli* XL1-Blue (Stratagene) com o auxílio do fago *helper* VCSM13 (Stratagene) para montagem e replicação das proteínas virais.[16] Para a seleção dos fagos apresentando fragmentos de anticorpos scFv com maior afinidade ao alvo, 10 µg de proteínas totais de saliva diluídos em 50 µL de tampão TBS (Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM, pH 8,6) foram imobilizados em cada poço de uma placa de microtitulação (MaxiSorp™, Nunc). Quatro poços foram sensibilizados com um *pool* de saliva total de 20 indivíduos saudáveis e um poço foi sensibilizado com um *pool* de saliva de 20 indivíduos com OSCC. A placa foi mantida sob agitação em câmara úmida durante 18 horas a 4°C. Ao final da sensibilização, o excesso de saliva que não se ligou foi descartado e substituído por 350 µL de solução de bloqueio TBS-BSA 3% (p/v). A placa foi selada e incubada por 1 hora a 37°C. A solução de bloqueio foi então

descartada e o primeiro poço contendo saliva de indivíduos controle foi submetido a seis lavagens de um minuto cada, com de tampão TBST 0,05% (v/v). Foram adicionados 50 µL da biblioteca recém amplificada ao primeiro poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Aos demais poços, foram adicionados 200 µL de tampão TBS e permaneceram selados. O sobrenadante foi coletado em um microtubo. O segundo poço, que também continha saliva de indivíduos controle, foi submetido a seis lavagens com tampão TBST 0,05%. O sobrenadante retirado do primeiro poço foi adicionado ao segundo poço e novamente incubado por 1 hora a 37°C. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes para subtrair os fagos ligantes às proteínas salivares de indivíduos saudáveis. Após as quatro etapas de seleção negativa, a biblioteca foi adicionada ao quinto poço contendo saliva dos indivíduos portadores de OSCC, sendo incubada por 2 horas a 37°C. Os fagos não ligantes foram removidos por lavagem por seis vezes com TBST 0,05% no primeiro ciclo e dez lavagens com TBST 0,1% no ciclo seguinte. Os fagos ligantes foram eluídos por meio de solução ácida (Glicina-HCl, pH 2,2) e posteriormente neutralizados com 2M de Tris-HCl, pH 7,4. Os fagos eluídos de cada ciclo de seleção foram estocados a 4°C.

2.4. Produção dos anticorpos scFv solúveis

Células de *E. coli* da linhagem não supressora TOP10 (Invitrogen) transformadas com a biblioteca de scFv selecionada foram cultivadas em meio SB suplementado com 50 µg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2M (v/v). Após atingir uma $D.O._{600nm}$=0,9, a cultura foi centrifugada a 3.700 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspensas em meio SB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e IPTG em uma concentração final de 2,5 mM, para indução da expressão dos fragmentos scFv por meio do promotor LacZ presente na sequência do vetor fagomídeo.[16] O sobrenadante contendo os anticorpos solúveis livres da proteína pIII do bacteriófago foi coletado após 18 h de indução a 30°C sob agitação de 300 rpm e, então, armazenado a 4°C.

2.5. Ensaio de Dot-blotting

Após o cultivo dos clones isolados induzidos por IPTG, avaliou-se a presença dos fragmentos scFv no sobrenadante da cultura por meio de um ensaio

de *dot-blotting*. A detecção do scFv na forma solúvel torna-se possível utilizando-se anticorpos comercialmente disponíveis contra um decapeptídeo viral Hemaglutinina (HA), que é produzido na porção C-terminal da proteína recombinante.[16] Para tanto, 5 µL do sobrenadante de cultura de cada clone expresso foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL de 0,2 µm (Amersham Biosciences) e deixados secar por 15 minutos a 37°C. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de PBS e BSA 3% (p/v) por 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 2 vezes com PBST 0,05% (v/v) e então incubada em uma solução de PBS contendo o anticorpo anti-HA marcado com peroxidase (Roche Applied Science) em diluição de 1:2500 por 1 hora a 37°C. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST 0,05% e revelada com SIGMA*FAST*™ 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich).

2.6. Sequenciamento de DNA e Bioinformática

O DNA plasmidial dos clones selecionados após o *panning* foi extraído das culturas de bactérias TOP10, utilizando-se o kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich), seguindo-se as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático capilar MegaBace™ 1000 (GE Healthcare) utilizando-se o kit *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* e os seguintes *primers*: MMB4 (5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT - 3') e MMB5 (5'-CGTTTGCCATCTTTTCATAATC - 3'). As cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas e suas respectivas famílias gênicas foram determinadas utilizando-se o banco de dados Ig-BLAST.[17]

2.7. Purificação dos anticorpos scFv por Cromatografia de Afinidade em HPLC

A cromatografia líquida de alta afinidade para purificação de proteínas é fundamentada na capacidade de alguns aminoácidos doadores de elétrons, tais como a histidina (his), o triptofano (trp) e a fenilalanina (phe), de se ligarem de maneira reversível a íons metálicos (como o níquel) imobilizados em uma matriz. Após a indução, as moléculas de scFv solúveis foram purificadas utilizando-se a coluna HisTrap HP (GE Healthcare) em sistema de HPLC (AKTA™ purifier) por meio da captura da cauda de hexa-histidina (His_6) que encontra-se fusionada à

porção C-terminal da proteína recombinante.[16] A purificação foi conduzida segundo as recomendações do fabricante. As frações que apresentaram maiores concentrações de anticorpos foram liofilizadas por 24 horas, ressuspensas em água bidestilada e estocadas a -20°C.

2.8. Ensaio Imunoenzimático

No ensaio de ELISA foi avaliada a afinidade de um dos clones selecionados (scFv D09) pelos antígenos salivares tumorais. O teste foi conduzido em duplicatas para 30 pacientes portadores de OSCC e 30 indivíduos controles. Placas de microtitulação Maxisorp™ (Nunc) foram sensibilizadas com 5 μg/poço de proteínas totais salivares diluídos em tampão carbonato ($NaHCO_3$ 0,1M, pH=8,6), por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas por 1 hora a 37°C com BSA 3% em PBS (p/v). Após o bloqueio, 50 μL (5 mg/mL)da solução contendo os fragmentos de anticorpos scFv purificados e concentrados foram adicionados a cada poço. Após incubação de 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBST 0,05% (v/v) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase diluído em solução de bloqueio na proporção de 1:3000. As placas foram novamente submetidas a 3 lavagens com PBST 0,05% e reveladas com OPD Sigma*Fast*™ (Sigma-Aldrich). As leituras foram realizadas a 492 nm. Os valores das absorbâncias individuais foram obtidos pela seguinte fórmula: [médias dos valores de D.O. do paciente] – [média dos valores de D.O. do BSA].

2.9. Análises Estatísticas

O *software GraphPad Prism 4.0* foi utilizado para a análise descritiva dos dados, as análises de correlação e criação do diagrama. Como os dados apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado o Teste *t* não pareado com correção de Welch para comparar as médias das absorbâncias ($D.O._{492nm}$) obtidas no teste imunoenzimático ELISA entre os grupos de pacientes com OSCC e indivíduos controles. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para discriminar o melhor ponto de corte (*cutoff point*) do teste diagnóstico, foi utilizada a curva ROC (*Receiver operating characteristic*). A análise foi feita por

meio de um método gráfico simples, no qual se representa no eixo das ordenadas (Y) a sensibilidade e no eixo das abscissas a proporção de falsos positivos, ou seja, 1 - especificidade. O desempenho do teste foi avaliado por um índice de precisão associado à curva ROC, mais especificamente, pela área abaixo desta (AUC - *area under the curve*). O sistema no qual a curva ROC se aproxima do canto superior esquerdo (AUC próximo de 1.0) fornece um maior poder discriminativo. O *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) foi utilizado para a construção da curva.

Com base no *cutoff* obtido, a razão de chances (*odds ratio,* OR) foi calculada para avaliar a probabilidade de ocorrência do câncer quando o teste ELISA for positivo, com o respectivo intervalo de confiança de 95%. A especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia do teste diagnóstico foram calculados com base no *cutoff* pré-estabelecido, de acordo com as seguintes expressões: sensibilidade = VP(verdadeiros positivos)/VP+FN (falsos negativos); especificidade = VN (verdadeiros negativos)/VN+FP (falsos positivos); VPP = VP/VP+FP, VPN = VN/VN+FN.

2.10. Imuno-histoquímica

Após seleção e purificação do scFv D09, sua capacidade de ligação também por tecidos de carcinoma oral e outras anomalias bucais não-neoplásicas foi verificada por imuno-histoquímica. Todos os blocos de tecidos foram cedidos pelo Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Uberlândia. Cortes de 5 µm foram preparados em micrótomo (Lupe). Foi utilizado um caso de carcinoma bem diferenciado de lábio, e como controle negativo foi usado o tecido proveniente de uma mucocele, um tipo de lesão bucal não-neoplásica. Para a reação de imuno-histoquímica, as secções foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato de sódio por 1 hora a 90°C. Em seguida, os cortes foram incubados com 3% de peróxido de hidrogênio em água (v/v) por 15 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e com 10% de BSA em PBS (p/v) à temperatura ambiente para bloqueio dos sítios inespecíficos. Os cortes foram lavados com PBS e o anticorpo scFv D09 purificado e concentrado foi adicionado, seguido por incubação durante 18 horas a 4°C. A ligação dos

fragmentos de anticorpos ao antígeno foi verificada pela incubação das secções com o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído em PBS na proporção de 1:400. Nos cortes utilizados como controles negativos da reação, a incubação com o scFv D09 foi substituída por PBS. As lâminas foram reveladas com 5 mg/mL de SIGMA*FAST*™ 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich), contra-coradas com hematoxilina de Harris e examinadas ao microscópio de luz Olympus BX 40.

2.11.Eletroforese Bidimensional em Gel SDS-PAGE e Western Blotting

Os experimentos de eletroforese bidimensional foram todos realizados no Laboratório de Células Tronco do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Os tumores foram macerados, reconstituídos em tampão de extração de proteínas totais (50mM de Tris pH 7,5; 5mM EDTA; 10mM EGTA; 50mM NaF; 20mM β-Glicerofosfato; 250mM NaCl; 0.1% de Triton X-100), acrescidas de um mistura de inibidores de proteases (240 μg/mL AEBSF; 10 μg/mL Bestatina; 10 μg/mL Pepstatina; 10 μg/mL Leupeptina; 18 μg/mL E-64), na proporção 1:100 de tampão de extração, incubadas durante trinta minutos a 4°C e depois centrifugadas a 12.000 x *g* durante 30 minutos. O sobrenadante foi retirado, novamente centrifugado por 2 minutos, sendo o sobrenadante desta última centrifugação considerado o extrato de proteínas totais. Os extratos foram quantificados e armazenados em alíquotas a -70°C.

Para as análises em gel bidimensional, 320 µg do extrato protéico de tecido tumoral e de saliva bruta de pacientes com OSCC, foi precipitado com o *Kit 2-D Clean-up* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. Os precipitados secaram por, no máximo, 5 minutos e foram imediatamente ressuspensos em 200 μL tampão de re-hidratação (6M uréia; 2M Thiouréia; 2% ASB-14 (p/v); 15 mM DTT; 0,002% Azul de Bromofenol 1%) acrescidos de 0,5% (v/v) de IPG Buffer, pH 3-10 (GE Healthcare). A re-hidratação foi realizada no sistema IPGPhor III (GE Healthcare) e se deu sob voltagem de 40V por 14 horas. Foram utilizadas tiras de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (Immobiline DryStrip) com faixa de pH 4-7 e 11 cm de comprimento (GE Healthcare). Após a re-hdratação, as tiras foram submetidas à focalização

isoelétrica (IEF) no sistema IPGphor III (GE Healthcare), em um programa com total de 34636 V/h.

As tiras focalizadas foram equilibradas em duas fases, em 10 mL de solução de equilíbrio por 15 minutos (1,5M Tris-HCl pH 8,8; 6M Uréia; 30% Glicerol; 2% w/v SDS; 0,002% Azul de Bromofenol 1% w/v). Na primeira fase foram adicionados 10 mg/mL de DTT (USB) à solução de equilíbrio e na segunda foram adicionados 25 mg/mL de iodocetomida (Sigma). As tiras foram submetidas, posteriormente, à eletroforese em gel SDS-PAGE 8-18% (GE Healthcare) no sistema Multiphor II, de acordo com o programa sugerido pelo manual do fabricante. O padrão de massa molecular utilizado foi o *BenchMark protein ladder* (Invitrogen). Os géis foram corados com Comassie Blue coloidal (2% (w/v) Coomassie G-250), por 72 horas, descorados com água destilada e mantidos em ácido acético 1% (v/v) até a sua digitalização. Após a eletroforese bidimensional, os géis foram digitalizados no scanner Image Scanner (GE Healthcare), utilizando-se o programa Image Master LabScan^{TM} v 5.0 (com resolução de 300 dpi). As análises foram feitas visualmente e também pelo programa Image Master 2D Platinum v 6.0 (GE Healthcare), conforme recomendações do manual.

Em seguida, procedeu-se o ensaio de *Western blotting* com o intuito de identificar a(s) proteína(s) alvo do reconhecimento do anticorpo scFv D09, tanto na amostra de saliva, como na de tecido de OSCC. Os géis 2D foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond, GE HealthCare) em sistema de transferência semi-dry (GE HealthCare). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% (p/v) de leite em pó desnatado Molico (Nestlé Brasil Ltda) em TBS-T 0,01% (v/v). Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 2 vezes por 10 minutos em TBS-T 0,5% e incubadas nessa solução com o anticorpo scFv D09 durante 16 h a 4°C. Após esse período, as membranas foram lavadas 2 vezes por 10 minutos em TBS-T 0,01%. Em seguida, as membranas foram incubadas por 2 h com anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase em TBS-T 0,01%. Por fim, as proteínas foram detectadas por quimiluminescência (*ECL detection reagents*® – GE HealthCare) captada por autoradiograma.

3. Resultados

Partículas de fagos expressando moléculas scFv ligantes a proteínas salivares de pacientes com carcinoma oral foram isoladas da biblioteca com sucesso. Este processo ocorreu em dois ciclos de seleção, os quais consistiram em ligações dos fragmentos de anticorpos scFv aos antígenos, lavagens das sequências não ligadas, eluição e amplificação dos fagos específicos. Para obter sequências com alta afinidade, houve aumento na pressão de seleção mediante aumento progressivo na quantidade de lavagens do 1° para o 2° ciclo de seleção. Devido à elevação na estringência, ocorreu enriquecimento na quantidade de clones eluídos do 1° para o 2° ciclo, sendo os títulos obtidos de $6,5 \times 10^3$ e $7,8 \times 10^4$, respectivamente.

Após a indução com IPTG, clones isolados de bactérias TOP10 transformadas foram avaliados quanto à expressão dos scFv solúveis, livres da proteína pIII viral. A presença das imunoglobulinas heterólogas nos sobrenadantes induzidos foi detectada indiretamente pela observação da expressão do epítopo da hemaglutinina (HA) fusionado ao anticorpo clonado no vetor pComb3X. O reconhecimento do epítopo HA pelo anticorpo monoclonal anti-HA reflete a expressão correta deste epítopo e, consequentemente, pela sua proximidade ao fragmento scFv, pode-se inferir a integridade de todo o sistema de expressão. Dez clones diferentes expressaram o epítopo da hemaglutinina e foram reconhecidos pelo anticorpo anti-HA no ensaio de *dot blotting.* Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante de cultura de bactérias TOP10 transformadas com o vetor pComb3X vazio e que foram induzidas nas mesmas condições descritas para as bactérias que expressaram os fragmentos de anticorpos. Os controles negativos não exibiram marcação (dados não mostrados).

Todos os dez clones com expressão positiva foram sequenciados eficazmente (Figura 1). As regiões variáveis dos anticorpos scFv selecionados derivaram-se de oito famílias distintas do gene V. A análise da sequência do DNA por meio do IgBLAST (Figura 1) mostrou que os genes VH foram derivados de quatro famílias gênicas (VH1, VH3, VH4 e VH5). Quanto aos subgrupos VL, foram selecionadas as famílias gênicas 1 e 3, tanto para Vλ quanto para Vκ. Apesar de algumas sequências repetidas, nenhum clone sequenciado foi idêntico ao outro.

CADEIA LEVE

Clone	Família	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3
C09	VK3	VLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSS-YLA	WYQQKPGQAPRLLIY	DASNRAT	G--IPARFS-GSGSGTDFTLTIS--SLEPEDFAVYYC-
C10	VK3	VLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSVSNNYLA	WYQQKPGQPPRLLIY	DAFSRAT	G--IPDRFS-GSVSGTDFLLTIS--SLXPEDFAVYYC-
D09	VK3	VMTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSS-NLA	WYQQKPGQASRPLIY	GASTRAT	G--IPARFS-GSGSGTEFTLTIS--SLQSEDFAVYYC-
D06	VL1	VLTQPPSASATPGQRVAI-SC	SGGSSNIGSNSVN	WYQQLPGTAPNSSFI	NNSQLAL	G-SLTDSLA-P-SLAPTASLAISG--LQSEDEADYYC-
H07	VK1	QMTQSPSFLSS--IDRVTITC	LGQSGHQLFS	GISKNQGKAPKLLIY	AASTLQS	G--VPSRFTRQVDLGQEFTXHNHRPALQPKTFCNLLP-
A10	VK1	QMTQSPSFLSASVGDRVTITC	RASQGISS-YLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASTLQS	G--VPSRFS-GSGSGTEFTLTIQAALASPERFWQLIYW
A02	VK1	QMTQSPSFLSASVGDRVTITC	RASQGISS-YLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASTLQS	G--VPSRFS-GSGSGTEFTLTIS--SLQPEDFATYYC-
B08	VL3	VVTQPPSVSVAPGQTAR—ITC	--GGSDIGSKSVH	WYQQRPGQAPVLVVY	DDSDRPS	RGSLSDSLA-P-NLGTRLPPSAVV--ESRGGRLLL---
C01	VL3	VLTQPPSVSVAPGKTAS—ITC	--GGNNVGGKNVH	WYQQKPGQAPVLVVY	DDSDRPS	TGSLSDSLA-P-TLGTRHPDHQQX--SKPGMSADYFC-
C02	VL3	VLTQPPSVSVAPVTDGQDYL	WC-GNNVGSKSVH	WYQQKPGQAPVLVVY	DDSDLAS	X--IPERFS-GSNSGNTAPPSAG---SKPGMRPTITV-

CADEIA PESADA

Clone	Família	FWR1	CDR1	FWR2	CDR2	FWR3
D06	VH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	N-YAMT	WVRQAPGKGL-EWVS	SISG---SGGSTQYAGSVRG	RFTISRDNSKN--TLYLQMN-SLRAEDT-AVYYCAN
C01	VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S-YDMS	WVRQAPGKGL-EWVS	VISG---SGGSTYYADSVKG	RFTVSRDNSKN--TLYLQMN-SLRAEDT-AVYYCAK
C09	VH3	--QLVESGGGVVQPGRSPETLLLQRLDSPS	AMACT	GSCQAPGKGA-GVVG	VIWY---DGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKN--TLYLQMN-SLRAEDT-AVYYCAK
A02	VH3	-VQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S-YWMS	WVRQAPGKGL-EWVA	NIKQ---DGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKN--SLYLQMN-SLRAEDT-AVYYCVR
A10	VH3	-VQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	S-YWMS	WVRQAPGKGL-EWVA	NIKQ---DGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKN--SLYLQMN-SLRAEDT-AVYYCVR
H07	VH3	-VQLVQSGGRLWSSLGXVPGDSPVQPLDSP	S-YWMS	------GKGVWSWVS	YYKSXRMGSEXILYVDLXRA	RFTXSRDNEPKXLPLYLHNDTSLSSXDTACILHVE-
C02	VH3	--QTGGVWGSLVRPGGSSDSPCAASGFTFD	D-YGMS	WVRQAPGKGL-EWVS	GINW---NGGSTGYADSVKG	RFTISRDSAKN--SLYLQMN-STESRGHGCVLLCE-
C10	VH1	-VQLVESGAEVKKPGPQRSPARLLDSPSP-	DYLHP	GVRHGPMDKDTECDG	MGQ----ILTVLSRHVAVSG	RVSMPRDTSTN--TASMELR-NLNSGDT-AVYYCAR
D09	VH4	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGGSIS	SSNWWS	WVRQPPGKGL-EWIG	EIYH---SGS-TNYNPSLKS	RVTISVDKSKN--QFSLKLS-SVTAADT-AVYYCAR
B08	VH5	EVQLLESGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	S-YWIG	WVRQMPGKGL-EWMG	IIYP---GDSDTRYSPSFQG	QVTISADKSIN--TAYLQWS-SLKASDTSHVLLCE-

Figura 1: Alinhamento das sequências de aminoácidos das cadeias leve (VL e VK) e pesada (VH) dos dez clones selecionados. As famílias encontram-se organizadas de acordo com os subgrupos. Alinhamento gerado pelo programa Clustal W2.

Devido à pequena quantidade de antígenos tumorais presentes na saliva, os valores das absorbâncias do teste imunoenzimático ELISA, utilizando-se como anticorpos primários as moléculas de scFv diluídas no sobrenadante da cultura, foram indetectáveis. Sendo assim, os clones que expressaram os anticorpos scFv foram escolhidos, aleatória e individualmente, para expressão em larga escala, purificação em HPLC, liofilização e, então, avaliação por meio do ELISA.

O teste ELISA com o clone D09 purificado e concentrado, o primeiro a ter sua imunoafinidade avaliada, revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as médias das absorbâncias dos pacientes com OSCC (n=30) e os indivíduos controles (n=30) (Figura 2A). Pode-se observar uma reatividade do scFv selecionado às proteínas salivares dos pacientes com carcinoma oral muito superior àquela encontrada na saliva de indivíduos saudáveis. O sucesso obtido no teste ELISA demonstra a eficiência da estratégia de seleção adotada, uma vez que foram realizados quatro passos de subtração utilizando-se saliva de pacientes controles, eliminando potenciais ligantes às proteínas presentes na saliva de indivíduos sadios.

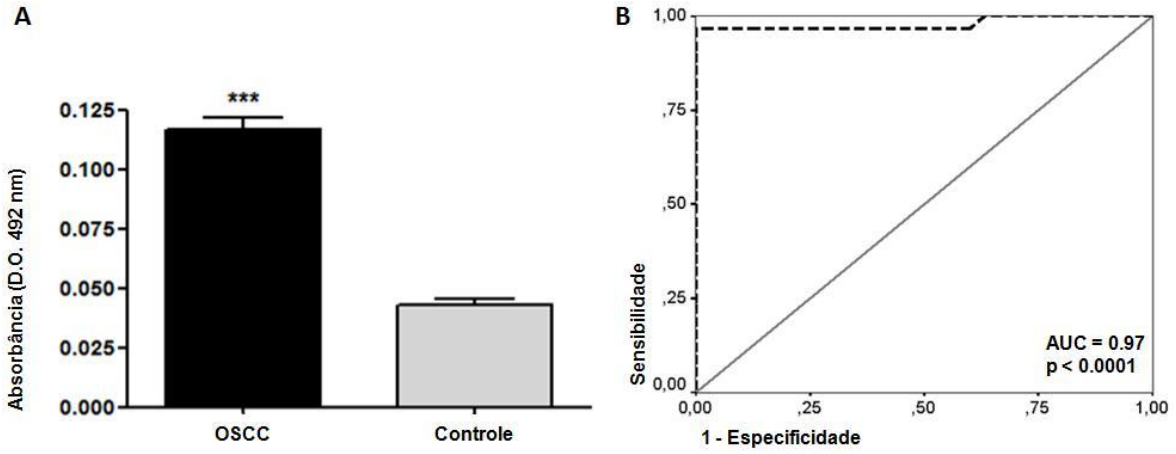

Figura 2: Imunoreatividade do fragmento de anticorpo scFv D09 em ELISA. (A) O diagrama mostra diminuição estatisticamente significativa das médias dos valores de absorbância obtidas na saliva de indivíduos saudáveis em comparação com os pacientes portadores de OSCC (*$p < 0,01$)**.** (B) Curva ROC representativa do teste ELISA, indicando a eficiência do diagnóstico por meio de AUC e respectivo valor de p.

O melhor ponto de corte ou valor de *cutoff* para o teste ELISA obtido por meio da curva ROC (Figura 2B), indicando melhores índices de sensibilidade e especificidade para o teste diagnóstico, foi de 1.020. Com base nesse valor, foram calculados, além da sensibilidade e especificidade, o *odds ratio*, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), e acurácia. Foram considerados positivos os pacientes que apresentaram valores médios de absorbância acima do *cutoff* estabelecido.

De acordo com o *odds ratio* obtido, as chances para ocorrência do carcinoma oral de células escamosas para valores ELISA superiores ao *cutoff* é de aproximadamente 160 vezes maior ($p < 0.0001$, IC 95% 8.854 - 2948). Dos 30 pacientes com OSCC analisados, 8 apresentaram *scores* abaixo de 1.020, mostrando que o teste possui uma taxa de falsos negativos de 26,67%. Contudo, nenhum indivíduo sadio foi diagnosticado como positivo, o que caracteriza uma especificidade e VPP de 100% para o teste ELISA. O valor preditivo do teste negativo foi de 78,95%, enquanto que a sensibilidade e acurácia foram de 73,33% e 86,67%, respectivamente. O poder diagnóstico do teste avaliado por meio de AUC apresentou um valor de 0.97 (95% IC; 0.939 - 1.020, $p < 0.0001$) (Figura 2B).

Após a confirmação da reatividade do scFv selecionado (clone D09) frente às proteínas tumorais salivares, foi realizado um ensaio de imuno-histoquímica visando verificar uma possível reatividade deste clone também em amostras de tecido de carcinoma oral. Foi observada imunoreatividade no caso de OSCC avaliado, principalmente na margem de invasão tumoral, ou seja, região onde o epitélio neoplásico maligno invade o interior do tecido conjuntivo adjacente e nas pérolas de queratina, estruturas formadas por camadas concêntricas características dos tumores espinocelulares bem diferenciados (Figura 3, painéis C e B, respectivamente). Curiosamente, foi observada imunomarcação também nos ductos das glândulas salivares, como pode ser observado no painel A (Figura 3). Como controle negativo, foi utilizada uma amostra de mucocele, uma lesão cística benigna causada pelo rompimento de ductos salivares menores, mostrando ausência de reatividade ao scFv D09 (Figura 3, painéis G, H e I). Da mesma forma, o controle da reação no qual foi suprimida a incubação com o scFv D09 também não apresentou imunomarcação (Figura 3, painéis D, E e F).

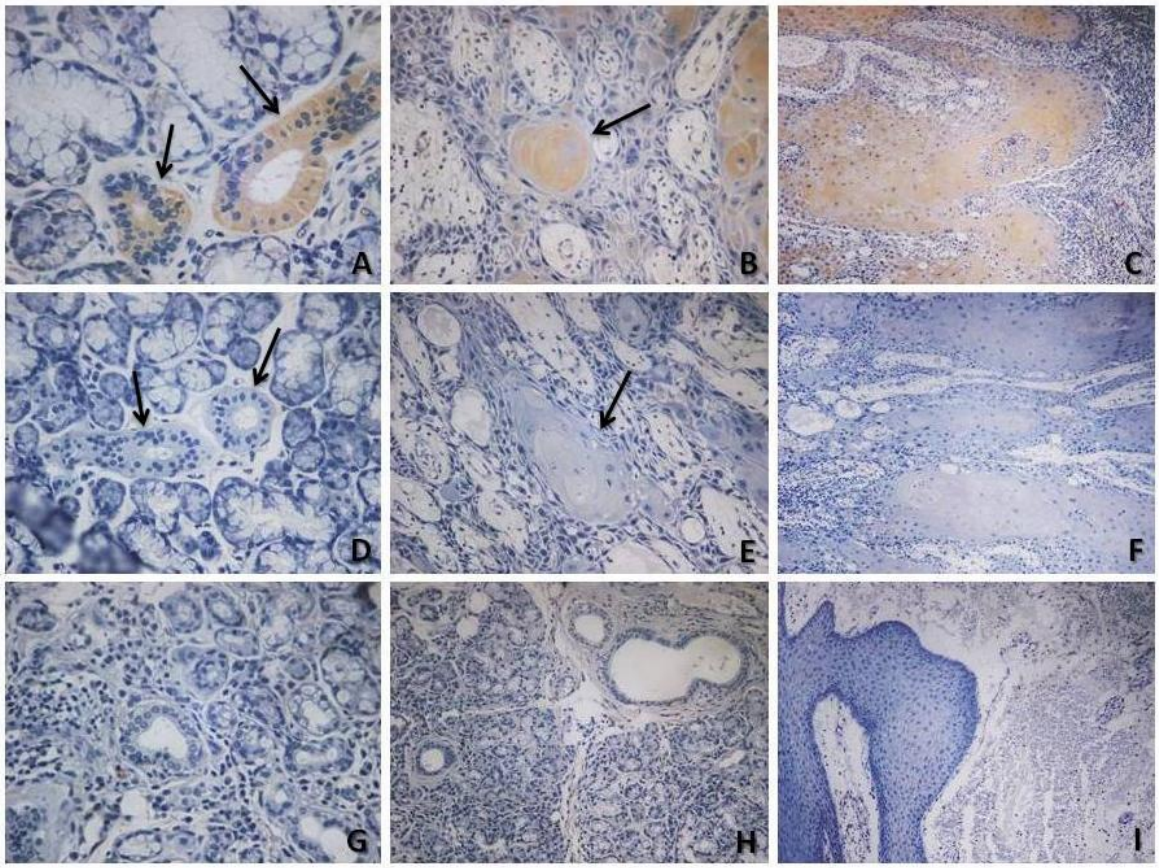

Figura 3: Análise imuno-histoquímica de amostras de tecido de OSCC e mucocele. (A - C): Corte de OSCC bem diferenciado de lábio, mostrando imunoafinidade do scFv selecionado nos ductos das glândulas salivares, pérola de queratina e na margem de invasão tumoral, respectivamente. (D - F): Controles da reação com o scFv D09 suprimido. As setas indicam ductos de glândulas salivares (D) e pérola de queratina (E). (G - I): Amostra de mucocele utilizada como controle negativo, demonstrando ausência de reatividade. Aumento 10X (C, F, I), 20X (H) ou 40X (A, B, D, E, G).

Com o intuito de se identificar os alvos do fragmento de anticorpo D09, as proteínas totais de *pools* de 10 amostras de saliva e de tecido de pacientes com OSCC foram separadas por eletroforese bidimensional em géis SDS-PAGE. Após a coloração com Comassie coloidal, as análises bidimensionais mostraram que as proteínas dos tecidos de OSCC apresentaram pI entre 4.3 a 6.7 e massa na faixa entre 10 a 150 kDa, com aproximadamente 170 *spots*. O mapa eletroforético bidimensional salivar apresentou 130 *spots* totais, com pI entre 4.5 e 6.6, e massa variando de 13 a 94 kDa, aproximadamente. Em seguida, foi realizado um ensaio de *Western Blotting* utilizando-se o scFv selecionado como anticorpo primário. A figura 4 mostra a eletroforese em duas dimensões das proteínas totais de tecido

(A) e saliva (B). Como pode ser observado, foi reconhecida pelo clone D09 uma única proteína na amostra de tecido, com aproximadamente 28 kDa e pI de 4.68. No ensaio feito com as amostras de saliva, o scFv reconheceu dois *spots*, ambos apresentando cerca de 50 kDa e pI de 5.75 e 5.86. Neste último, é provável que sejam isoformas de uma mesma proteína devido às suas características semelhantes. Contudo, é possível afirmar quais são essas proteínas somente a partir das análises das sequências das cadeias polipeptídicas, por meio de espectrometria de massas. Os *spots* reconhecidos pelo clone D09 já foram isolados e a identificação por MALDI-TOF-TOF encontra-se em andamento.

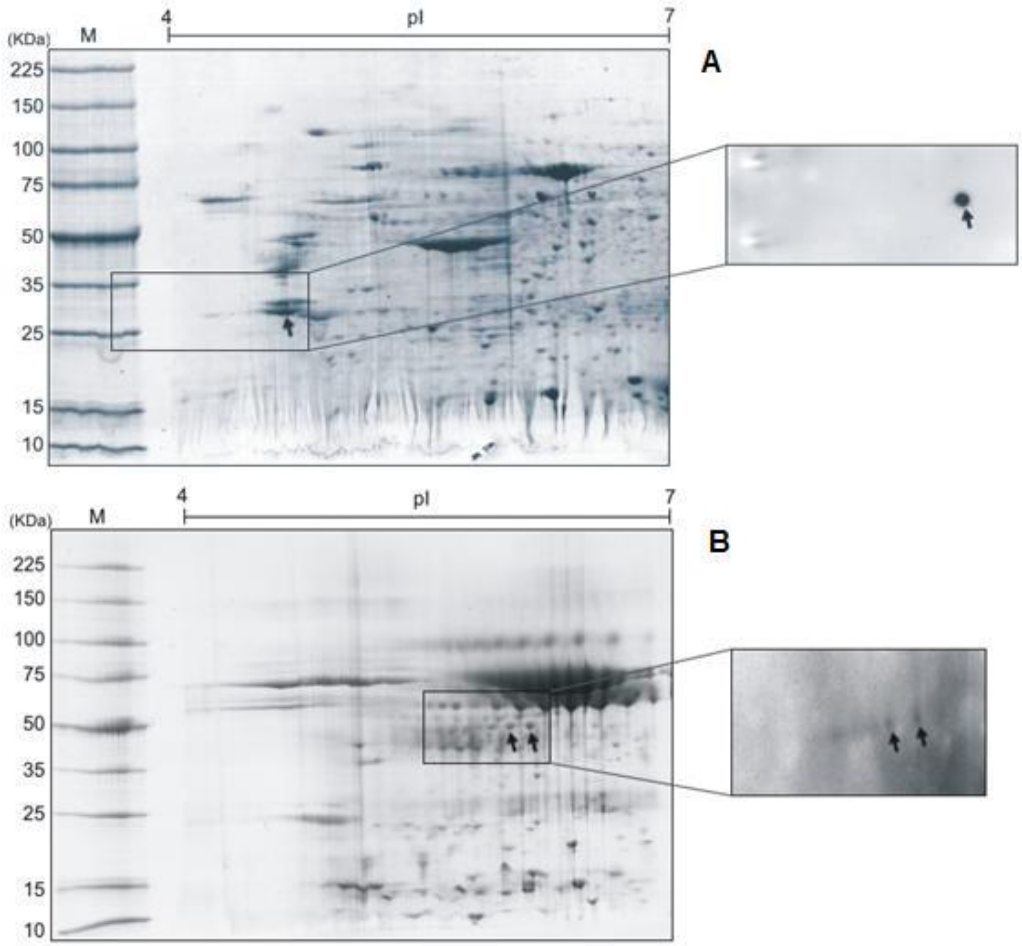

Figura 4: Eletroforeses bidimensionais e respectivos ensaios de *Western blotting* para identificação das proteínas ligantes ao scFv D09. (A) Gel com *pool* de amostras de tecido de OSCC evidenciando o reconhecimento de apenas 1 *spot*. (B) Gel de proteínas totais salivares com 2 *spots* reconhecidos pelo scFv D09. Géis SDS-PAGE com gradiente de concentração de 8-18%, com variação de pI de 4 a 7 e corados com Comassie Blue coloidal. As setas indicam os s*pots* que foram reconhecidos pelo clone D09 nos géis e nos respectivos filmes de autoradiografia. **M-** Padrão de massa molecular.

4. Discussão

Este trabalho descreve pela primeira vez na literatura um fragmento de anticorpo scFv, selecionado por *Phage Display*, que reconhece antígenos salivares em pacientes com carcinoma oral de células escamosas e que possui um alto potencial diagnóstico para este carcinoma. A detecção precoce do câncer oral é fator importante na diminuição nas taxas de mortalidade e o sucesso do tratamento relaciona-se diretamente com seu diagnóstico em fases iniciais. Contudo, infelizmente, a maioria dos carcinomas orais é diagnosticada numa fase tardia da doença, quando o paciente torna-se sintomático aos efeitos da doença primária ou quando metástases linfáticas são palpáveis.[18]

Optar pelo uso da saliva como ferramenta diagnóstica possui diversas vantagens. Dentre elas, uma consideração importante é que a coleta da saliva é um procedimento minimamente invasivo que pode ser conduzido em qualquer ambiente e não requer habilidades e nem equipamentos especiais, oferecendo menor risco de contaminação em seu manuseio. Em contraposição à saliva, o sangue apresenta-se em um “circuito fechado” e pode conter proteínas que estão circulantes por dias, semanas ou meses. Enquanto a saliva, um fluido continuamente produzido, secretado e renovado, reflete o estado atual do organismo. Portanto, a saliva pode ser descrita como um meio o qual provê resultados em “tempo real”.[19] Sendo assim, a saliva torna-se uma poderosa aliada na detecção das alterações iniciais da tumorigênese, alterações estas que precedem as manifestações fenotípicas detectadas pelos métodos diagnósticos tradicionais.

O fragmento scFv isolado na presente investigação foi capaz de identificar com alta sensibilidade, por meio do método ELISA, antígenos salivares tumorais. A utilização do fluido salivar como alvo diagnóstico, além de tratar-se de método simples e não invasivo para detectar o câncer, pode ainda prever sua agressividade e auxiliar na escolha do tratamento mais adequado.[20] O desenvolvimento de um método confiável capaz de detectar o carcinoma oral precocemente contribui de forma imprescindível para que abordagens terapêuticas também menos invasivas sejam priorizadas, contribuindo, assim, para uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes, evitando

procedimentos cirúrgicos que muitas vezes causam desfiguração facial com graves consequências estéticas e funcionais.

O sucesso na obtenção de fragmentos de anticorpos scFv a partir de leucócitos e sua alta reatividade e especificidade contra a saliva de pacientes com OSCC demonstra a importância e o poder da tecnologia de *Phage Display* e da possibilidade de expressar anticorpos com alta afinidade na superfície de fagos fialmentosos, permitindo a seleção de antígenos de interesse a baixos custos e com maior rapidez e simplicidade, sem a necessidade de utilização da tecnologia de produção de hibridomas.

Como tumores possuem um grande repertório de proteínas diferentes capazes de interagir com os peptídeos de uma biblioteca, uma simples seleção contra proteínas salivares totais poderia resultar em grande número de anticorpos sem especificidade. Para evitar o reconhecimento de epítopos irrelevantes, foi realizada uma seleção subtrativa contra amostras de indivíduos saudáveis com o intuito de eliminar antígenos encontrados na saliva sadia, seguida por uma seleção positiva contra proteínas salivares tumorais. Um exemplo bem sucedido do aproveitamento desse conceito foi realizado por Popkov e colaboradores (2004)[21] na identificação de antígenos de superfície celular tumor-associados expressos em tumores de próstata. O *panning* subtrativo também foi utilizado com sucesso na identificação de peptídeos capazes de promover a invasão metastática em carcinoma hepatocelular[22] e também scFvs com atividade anti-melanoma.[23] Nesta investigação foram realizados 4 passos de seleção negativa, o que possibilitou o isolamento de fagos altamente específicos que reconhecem preferencialmente proteínas presentes na saliva de pacientes com OSCC, como pode ser observado pelos resultados obtidos no teste imunoenzimático ELISA.

Para a seleção de anticorpos de alta afinidade e remoção de ligantes inespecíficos, realizou-se um aumento progressivo da estringência por meio de um maior número de lavagens. Alguns pesquisadores sugerem que condições rigorosas devem ser utilizadas a partir do primeiro ciclo de seleção.[24] Contudo, se houver scFvs de alta afinidade presentes em baixa quantidade na biblioteca, eles podem ser perdidos nas etapas iniciais da seleção. Outra medida que favorece a seleção de clones de alta afinidade, como crescente a concentração do detergente nos tampões de lavagem, também foi incorporada ao protocolo

utilizado, a fim de se reduzir as interações hidrofóbicas inespecíficas entre o fago e o alvo e/ou o reagente utilizado para bloqueio.

O sucesso da estratégia de seleção adotada no presente estudo é evidenciado pelo alto índice de acurácia obtido no teste ELISA. A proporção de predições corretas foi de aproximadamente 86%. Trata-se de um método diagnóstico sensível, hígido e que possui elevado valor discriminativo. O bom desempenho do teste pode ser também atribuído à utilização da curva ROC, que permitiu a identificação de um ponto de corte para os valores de absorbância indubitavelmente eficaz na discriminação câncer x controle, revelando alto nível de sensibilidade e máxima especificidade. Esta metodologia tem sido de grande utilidade para visualizar e analisar o comportamento de sistemas diagnósticos em diversas áreas. O ponto mais elevado da curva correspondente ao ângulo superior esquerdo do gráfico, representa 100% de sensibilidade e 0% de falsos positivos, sendo, nesse caso, o valor ideal de uma prova diagnóstica, chamado "padrão ouro".[25] Ainda por meio da análise da curva ROC, é possível inferir que o método de ELISA para o diagnóstico do carcinoma oral de células escamosas desenvolvido com base na detecção de antígenos tumorais salivares apresenta um elevado nível de precisão, pois alcançou um índice de AUC acima de 0.9, muito próximo ao desempenho máximo de um teste. Contudo, estudos subsequentes se fazem necessários para que um número mais expressivo de pacientes seja analisado.

A acurácia clínica da saliva como fluido diagnóstico para o câncer oral foi também avaliada por Li e colaboradores,[26] em comparação ao potencial de biomarcadores sanguíneos, em cerca de 300 indivíduos.[27] Quatro marcadores informativos foram capazes de diferenciar amostras de saliva de pacientes com câncer, da saliva de indivíduos saudáveis com sensibilidade e especificidade de 91% cada, sendo que o valor de AUC coletivo para esses quatro biomarcadores salivares foi de 0.95. Já no sangue, os mesmos encontraram um valor de AUC de 0.88, o que demonstra claramente que para a detecção de câncer bucal, o diagnóstico baseado na saliva apresenta ligeira vantagem. Este exemplo também aponta um importante fato no que diz respeito à descoberta e validação de biomarcadores para o diagnóstico do OSCC: o poder de biomarcadores salivares para discriminar e detectar a doença provavelmente será baseado em um painel

ao invés de um único marcador biológico. Diante disto, o scFv isolado nessa investigação representa a detecção de um novo biomarcador, que em conjunto com aqueles já descritos, pode formar um painel de marcadores para um diagnóstico simples, acurado, reprodutível, confiável e não-invasivo para a detecção do carcinoma oral de células escamosas. Contudo, o marcador descrito nesta investigação, individualmente, possui uma acurácia semelhante aos quatro marcadores descritos em conjunto,[26] os quais apresentaram uma sensibilidade apenas 5% superior à observada neste trabalho.

Além dos antígenos salivares, o fragmento scFv selecionado também foi capaz de reconhecer estruturas teciduais características de tumores epiteliais de boca, como, por exemplo, pérolas córneas ou de queratina. Segundo Shafer (1987)[28], os carcinomas epidermóides bucais apresentam-se mais frequentemente como neoplasmas moderadamente diferenciadas com alguma evidência de queratinização. Uma das características mais evidentes do carcinoma epidermóide bem diferenciado é a presença de queratinização individual das células e a formação de numerosas pérolas epiteliais ou de queratina, de tamanho variável, que podem invadir o tecido conjuntivo. Pela análise imuno-histoquímica é possível observar também intensa marcação na região da margem de invasão, onde frequentemente há presença de células neoplásicas malignas com menor grau de diferenciação e maior grau de dissociação, comparadas às demais regiões da mesma lesão. Contudo, não houve reação na lesão benigna avaliada ou nos tecidos normais presentes na secção de OSCC. Esses resultados reforçam as evidências de especificidade do clone isolado da biblioteca scFv e sugerem sua utilização em conjunto com outros marcadores teciduais já conhecidos auxiliando na avaliação histopatológica e predição do grau de diferenciação tumoral.

Interessantemente, foi observada reação positiva também nos ductos das glândulas salivares da secção de carcinoma oral avaliada por imuno-histoquímica. Relatos na literatura sobre a participação das células ductais na gênese do carcinoma epidermóide são praticamente inexistentes. Contudo, Cury (2008)[29] também encontrou a expressão das citoqueratinas 7 e 8 nesses tipos celulares em casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal. Em 1971, Eversole[30] citou em seu trabalho que as células do ducto excretor glandular seriam capazes

de gerar elementos epidermóides, originando carcinomas. Sendo assim, a intensa marcação imuno-histoquímica do scFv D09 obtida, e também das citoqueratinas encontrada por Cury (2008)[29] reafirmam os estudos de Eversole[30], ou seja, demonstram a participação de células ductais na composição celular do carcinoma epidermóide. Além disso, existe a possibilidade de que a proteína reconhecida nas células dos ductos glandulares seja a mesma identificada pelo scFv D09 na saliva, reafirmando a provável secreção desta para o fluido salivar em função do surgimento e/ou progressão tumoral.

A caracterização proteica em eletroforese bidimensional possibilitou a identificação dos *spots* correspondentes às proteínas reconhecidas pelo clone D09 por meio de *immunoblotting*, sendo dois para a saliva e apenas um para o tecido, que foram analisados quanto ao ponto isoelétrico e massa molecular, inicialmente. O reconhecimento de mais de um *spot* com diferentes massas e pIs pelo clone D09 justifica-se pelo fato de que quando as moléculas scFv associam-se em multímeros, elas podem apresentar alta avidez a um antígeno único ou múltipla especificidade para distintos antígenos-alvo.[31] E ainda há a possibilidade de que o referido fragmento de anticorpo esteja reconhecendo epítopos comuns em diferentes proteínas. A probabilidade de estes alvos representarem de fato novos biomarcadores ou proteínas já descritas na literatura e seus reais papéis na gênese e/ou progressão do carcinoma oral, somente poderão ser confirmados após a identificação e análise das cadeias polipeptídicas por espectrometria de massas.

Contudo, a utilidade diagnóstica do proteoma salivar foi demonstrada com êxito neste estudo para detecção do carcinoma oral de células escamosas. Ademais, um número crescente de evidências tem sido estabelecido para o uso da saliva como uma alternativa eficaz também para o monitoramento de outras doenças sistêmicas[32] e não somente as patologias bucais. Os dados obtidos, embora precoces e exploratórios, fornecem razão suficiente para o prosseguimento da investigação e demonstram a necessidade de se explorar plenamente o proteoma salivar como ferramenta diagnóstica para doenças humanas relevantes.

É importante enfatizar que dentre os dez marcadores selecionados e expressos, apenas um escolhido aleatoriamente para caracterização, foi

plenamente analisado. Isto implica que os outros nove scFvs restantes podem apresentar potencial semelhante ou até superior aos já apresentados pelo clone D09.

Novos biomarcadores com atividades potencialmente relevantes para a detecção precoce de neoplasias vêm sendo extensivamente propostos, porém, ainda não se converteram em testes clínicos, objetivamente.[33] Essa é a primeira investigação que descreve um fragmento scFv, selecionado por *Phage Display*, que reconhece efetivamente antígenos salivares com potencial diagnóstico para a detecção precoce do câncer oral. Contudo, não se explorou a possibilidade do uso de técnicas mais sensíveis para detecção antigênica pelo scFv, o que poderia aumentar ainda mais a sensibilidade do marcador.

A imediata aplicação clinica deste marcador tem a vantagem da simplicidade e facilidade, e apresenta alta especificidade e baixo custo, o que a torna uma abordagem clínica potencial num futuro próximo. O scFv D09 identificado pode ser plenamente explorado como um clone robusto, de alto rendimento e reprodutível, características importantes para um biomarcador que permite a detecção precoce do câncer, aliado à natureza não invasiva de um teste salivar.

5. Referências Bibliográficas

1. Gao, W.; Guo, C.B. Factors Related to Delay in Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*; 67:1015-20, 2009.

2. Scully, C.; Bagan, J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol;* 45:301-8, 2009.

3. Kah, J.C.Y.; Kho, K.W.; Lee, C.G.L.; Sheppard, C.J.R.; Shen, Z.X.; Soo, K.C.; Olivo, M.C. Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*; 2:2785-98, 2007.

4. Wickline, S.A.; Lanza, G.M. Molecular imaging, targeted therapeutics, and nanoscience. *J Cell Biochem Suppl*; 39:90-7, 2002.

5. Hu, S.;, Loo, J.A.; Wong, D.T. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*; 6: 6326-53, 2006.

6. Helmerhorst, E.J.; Oppenheim, F.G. Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res*; 86:680-93, 2007.

7. Nagler, R.M.; Bahar, G.; Shpitzer, T.; Feinmesser, R. Concomitant analysis of salivary tumor markers - a new diagnostic tool for oral cancer. *Clin Cancer Res;* 12:3979-84, 2006.

8. Streckfus, C.F.; Bigler, L.R. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Disease*; 8:69-76, 2002.

9. Lee, J.M.; Garon, E.; Wong, D.T. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res*; 12:206-11, 2009.

10. Kretzschmar, T.; von Rüden, T. Antibody discovery: phage display. *Current Opinion in Biotechnology*; 13:598-602, 2002.

11. Krag, D.N.; Shukla, G.S.; Shen, G.P.; Pero, S.; Ashikaga, T.; Fuller, S., *et al*. Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries. *Cancer Res*; 66:7724-33, 2006.

12. Weisser, N.E.; Hall, J.C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*; 27:502–20, 2009.

13. Sobin, L.H.; Wittekind, C.H. International union against cancer (UICC) TNM classification of malignant tumours. 6th edition. New York: Wiley, 2002. p. 22–26.

14. Barnes, L.; Everson, J.W.; Reichart, P. World health organization classification of tumours pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: JARC Press, 2005. p. 168–175.

15. Santos, A.P.C. Construção e seleção de uma biblioteca de anticorpos monoclonais scFv contra células tumorais de tireóide. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

16. Barbas, C. F.; Dennis, R. B.; Scott, J. K.; Silverman, G. J. Phage Display, A Laboratory Manual. 1 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

17. NCBI: Ig BLAST. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/.

18. Scully, C.; Bagan, J.V. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol;* 45:301-08, 2009.

19. Charles, F.; Streckfus, C.F.; Dubinsky, W.P. Proteomic analysis of saliva for cancer diagnosis. *Exp Rev Prot*; 4: 329-32, 2007.

20. Streckfus, C.F.; Bigler, L.R. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Disease*; 8:69-76, 2002.

21. Popkov, M.; Rader, C.; Barbas iii, C.F. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using phage display technology. *J. Immunol. Methods;* 291: 137-51, 2004.

22. Jia, W.; Sun, H.; Zhang, J.; Xu, Y.; Qian, Y.; Pang, J.; *et al*: A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis. *Cancer Lett*; 247:234-42, 2006.

23.Cai, X.; Garen, A. Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92:6537-41, 1995.

24. Aitken, R. Antibody Phage Display: Methods and Protocols. 2nd edition. New York: Humana Press, 2009. 236 p.

25. Ayres, M.; Ayres-Jr, M.; Ayres, D.L.; Santos, A.A.S. BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. 2003. 292 p.

26. Li, Y.; St. John, M.A.R.; Zhou, X.; Kim, Y.; Sinha, U.; Jordan, R.C.K.; *et al*. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*; 10:8442-50, 2004.

27. Li, Y.; Elashoff, D.; Oh, M.; Sinha, U.; St. John, M.A.R.; Zhou, X.; *et al*. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol*; 24:1754-60, 2006.

28. Shaffer, W.G.; Hine, M.K.; Levy, B.M. Tratado de Patologia Bucal. 4ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1987.

29. Cury, S.E.V. Expressão imuno-histoquímica das citoqueratinas 7 e 8 em carcinomas epidermóides de assoalho bucal. Tese (Doutorado em Odontologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

30. Eversole, L.R. Histogenic classification of salivary tumors. *Arch Pathol*; 92:433-43, 1971.

31. Hudson, P.J.; Alexander, A.A. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods;* 231:177-89, 1999.

32. Wong, D.T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc*; 137:313-21, 2006.

33. Thompson, A.M. Dissecting the molecular mechanisms of human cancer: translating laboratory advances into clinical practice. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel*; 2:1-6, 2004.

Capítulo 2

Anexina A1 como biomarcador sanguíneo para o Carcinoma Oral de Células Escamosas

Capítulo apresentado segundo formato da revista na qual se encontra publicado.
(*Oral Oncology*, 2009)

RESUMO

Vários estudos têm descrito a anexinaA1 (ANXA1) como uma proteína ativa no processo de tumorigênese em muitos órgãos. Contudo, o seu papel como biomarcador tem sido, principalmente, avaliado em amostras de tecido por imuno-histoquímica ou cultura celular. Na presente investigação, amostras de sangue periférico de 27 pacientes com carcinoma oral de células escamosas (OSCC) e 25 voluntários saudáveis foram examinadas por meio da técnica de RT-PCR em tempo real quantitativa. Foram observados menores níveis de expressão dos transcritos nos pacientes com OSCC (p=0.026). Níveis significativamente menores de RNA mensageiro foram correlacionados à idade, sexo e também ao sítio anatômico das lesões tumorais. Ademais, análises estatísticas por meio de curvas ROC revelaram que a análise da expressão da *ANXA1* é adequada para discriminar pacientes com lesões dentro da cavidade oral, especialmente aqueles do sexo feminino e/ou com 60 anos de idade ou mais. Pela primeira vez foi demonstrado o potencial da *ANXA1* como biomarcador sanguíneo e propõe-se a sua adoção como teste diagnóstico complementar não-invasivo. Esses dados sugerem que, além da sua função antiinflamatória, a anexina A1 pode ainda desempenhar um papel supressor de tumor em células do sangue periférico, tais como os leucócitos.

Palavras chave: Carcinoma oral de células escamosas, Anexina A1, Biomarcador sanguíneo, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Several studies have been suggesting annexin A1 protein as an active player in tumorigenesis of many organs. Nevertheless, its tumor biomarker role has been mainly studied in tissues by immunohistochemistry or cell culture. Hence, in this investigation, the peripheral blood from 27 oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients and 25 negative control individuals were examined by quantitative real-time PCR. Down-regulated *ANXA1* expression at mRNA level was observed in OSCC samples (p = 0.026). Significantly diminished mRNA levels correlated to age, sex and the anatomical site of the tumor lesion were observed. Moreover, the ROC curve analysis revealed the performance of *ANXA1* expression as a suitable biomarker for patients with oral cavity cancer, especially those with 60 years of age or older and/or women. For the first time, *ANXA1* mRNA is revealed as blood-based biomarker, and its adoption for complementary non-invasive diagnosis of OSCC is suggested. These results suggest that, beyond the anti-inflammatory function, annexin A1 may also play a tumor suppressor role in peripheral blood cells, such as leukocytes.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, Annexin A1, Blood biomarker, Real-time PCR

1. Introdução

O Carcinoma Oral de Células Escamosas (OSCC), a sexta neoplasia mais comum em todo o mundo, continua sendo a mais prevalente relacionada ao consumo de tabaco, álcool e outros produtos carcinogênicos[1], afetando cerca de 500.000 pessoas a cada ano.[2,3] Todos os anos mais de 300.000 novos casos são registrados na América, sendo que aproximadamente 9.000 mortes são decorrentes da doença, que apresenta taxa de sobrevida de 5 anos por volta de 50%, devido aos vários avanços nos regimes terapêuticos.[4]

A progressão e metástase do câncer oral envolvem elementos detectados no soro, tais como cobre, ferro e selênio e também presentes na super expressão de oncogenes (Ras, c-Myc, c-erb2),[5] mutação, deleção ou regulação de genes supressores de tumor (p53),[6] quinases associadas ao ciclo celular e seus inibidores, receptores de fatores de crescimento (*EGFR, IGFR*) e nucleares como o RARalpha. Além disso, a imuno-histoquímica tem sido uma ferramenta significativa na identificação de níveis alterados de expressão de outros marcadores celulares como o PCNA, citoqueratinas, enzimas (ciclooxigenase-2), genes anti-apoptóticos e pró-angiogênicos (famílias *Bcl* e *VEGF*, respectivamente), e imunomoduladores (IL-10 e IL-12), os quais têm sido relacionados à progressão do carcinoma de células escamosas.[7] A detecção precoce do carcinoma oral é determinante para um apropriado monitoramento da doença; porém, marcadores específicos que distinguam diferentes comportamentos e condições tumorais e que contribuam de forma efetiva para um diagnóstico e tratamento eficientes, ainda são escassos.

A anexina A1 (ANXA1), uma proteína antiinflamatória e dependente de cálcio[8] da superfamília das anexinas, pode desempenhar importantes papéis regulatórios no desenvolvimento e progressão tumoral. Recentes investigações acerca da atividade biológica desta intrigante molécula têm revelado importantes atributos funcionais da ANXA1 em uma grande variedade de vias inflamatórias, na maquinaria de proliferação celular, na sinalização para morte celular, na resolução da fagocitose de células apoptóticas e, com ainda mais destaque, no processo de carcinogênese.[9-11] Sua expressão diferencial em vários tipos de cânceres como próstata, ovário, mama, bexiga, esôfago, laringe, pâncreas, linfomas e tumores de

cabeça e pescoço, demonstra o potencial da ANXA1 como biomarcador, que apresenta níveis de expressão alterados em ambos os sentidos de acordo com distintos estágios tumorais.[9]

Pesquisas atuais revelaram que a anexina A1 tem a sua expressão diminuída, tanto em nível de RNA quanto protéico, em amostras de tecido e também em culturas celulares de linhagens de carcinoma oral.[2] Até o momento, todas as investigações que associaram a ANXA1 ao câncer foram feitas em tecidos ou cultura de células.[12-16] Recentes avanços biotecnológicos têm despertado novos interesses pela identificação de biomarcadores para o câncer em fluidos biológicos,[17] o que possibilitou a demonstração de que mutações idênticas às presentes no tumor primário podem também ser identificadas nos fluidos corporais dos pacientes afetados. As vantagens do uso dos fluidos corporais em relação às biópsias são várias, destacando-se a sua abordagem relativamente não-invasiva. Amostras de RNA em sangue, sêmen, urina e saliva têm demonstrado sua utilidade em alternativa às ferramentas diagnósticas convencionais na identificação de doenças.[18]

No presente estudo, a expressão gênica da *ANXA1* foi investigada por PCR em tempo real, pela primeira vez, em amostras de sangue periférico de pacientes com carcinoma oral de células escamosas e indivíduos controles. Os parâmetros clínicos e histopatológicos foram também avaliados e correlacionados à expressão da *ANXA1*, sugerindo sua relevância como uma importante proteína expressa no sangue e também como um novo biomarcador para o carcinoma oral.

2. Pacientes e métodos

2.1.Coleta e preparo das amostras

Amostras de sangue periférico de 27 pacientes com OSCC foram coletadas no momento da cirurgia, de abril a dezembro de 2008, no Hospital de Clínicas de Uberlândia. Como controles negativos foram utilizadas amostras de sangue de 25 voluntários saudáveis sem histórico pessoal de câncer, coletadas na Unidade de Diagnóstico Estomatológico da Universidade Federal de Uberlândia. Todas as amostras foram histopatologicamente analisadas e as informações clínicas como sexo, idade, históricos de etilismo, tabagismo, recorrência e tratamentos foram

também coletadas. O estadiamento dos tumores foi determinado após a cirurgia de acordo com o sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*)[19] e a classificação histopatológica segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)[20]. A fim de se preservar a identidade de cada paciente, todos foram identificados por meio dos seus respectivos números de prontuário. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFU sob o número de protocolo 249/09 e todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2. Extração de RNA e transcrição reversa

O RNA total foi extraído segundo procedimentos descritos por Chomczynski e Sacchi[21] com algumas modificações. A determinação da concentração de RNA foi obtida por meio de leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm, e a análise qualitativa foi feita por eletroforese em gel de agarose. O material validado foi então armazenado a – 80°C. A transcrição reversa foi realizada durante 1 hora a 37°C, utilizando-se 2 µg de RNA total, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT, 200 µM de cada dNTP (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20 µl com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

2.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)

O ensaio de qPCR foi realizado no aparelho 7300 *Real Time PCR Systems* (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Inicialmente, a qualidade do cDNA de cada amostra foi avaliada pela amplificação do gene endógeno β-2-microglobulin (*B2M*). Os *primers* utilizados foram os seguintes: 5´- CCT GCC GTG TGA ACC ATG T - 3´ e 5’ - GCG GCA TCT TCA AAC CTC C - 3’. As reações quantitativas foram executadas de acordo com as instruções para o fluoróforo *SybrGreen PCR Core Reagent* (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Os *primers* utilizados para a amplificação da *ANXA1* foram: 5’-GAT TCA GAT GCC AGG GCC T - 3’ e 5’- CAC TCT GCG AAG TTG TGG AT-3’.

A viabilidade dos *primers* foi verificada em uma reação de PCR convencional antes do seu uso na PCR em tempo real.

Os níveis transcricionais do alvo em relação ao gene endógeno foram obtidos de acordo com a expressão 2-ΔΔCT, onde CT = *cycle threshold*; ΔCT = CT do gene alvo - CT do gene endógeno (*B2M*); ΔΔCT = ΔCT das amostras de carcinoma oral - ΔCT da amostra do calibrador. Todas as amostras foram amplificadas em duplicatas.

2.4. Análises estatísticas

O *software GraphPad Prism 4.0* foi utilizado para as análises de correlação e criação dos diagramas. Foi utilizado o Teste *U*-Mann-Whitney para comparar os níveis de expressão entre os grupos de pacientes e indivíduos controles. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado devido à distribuição não paramétrica dos dados, para comparar os níveis relativos de expressão no sangue dos pacientes com OSCC estratificados em grupos independentes, considerando-se como variáveis: idade, sexo, sítios anatômicos das lesões, estadiamento TNM, grau de diferenciação, recorrência e terapia. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Para avaliar a eficácia do valor discriminativo câncer versus controle do biomarcador (na ausência de valores *outliers* arbitrários), foram utilizadas curvas ROC (*receiver operating characteristic*). Esta análise, por meio de um gráfico simples, permite a avaliação da sensibilidade (verdadeiros positivos) no eixo Y contra 1 – especificidade (falsos positivos) no eixo X, considerando cada valor observado como um possível valor de corte ou *cutoff*. Os índices de AUC (*área under curve*) foram calculados como medida para o poder discriminativo do teste diagnóstico. Quando um marcador não possui valor discriminativo, a curva ROC tangencia a diagonal do gráfico e o valor de AUC está perto de 0.5. Quando um teste é fortemente discriminativo, a curva ROC se direciona para o ângulo superior esquerdo do gráfico e o valor de AUC se aproxima de 1.0. O *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) foi utilizado para a construção das curvas.

3. Resultados

3.1. Diminuição da expressão gênica da anexina A1 no sangue periférico dos pacientes com carcinoma oral de células escamosas

Amplicons dos genes *ANXA1* e *B2M,* obtidos por PCR convencional, utilizando-se os mesmos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real foram detectados por eletroforese em gel de agarose a fim de se verificar o tamanho esperado dos fragmentos e a qualidade das amostras de cDNA (Fig. 1).

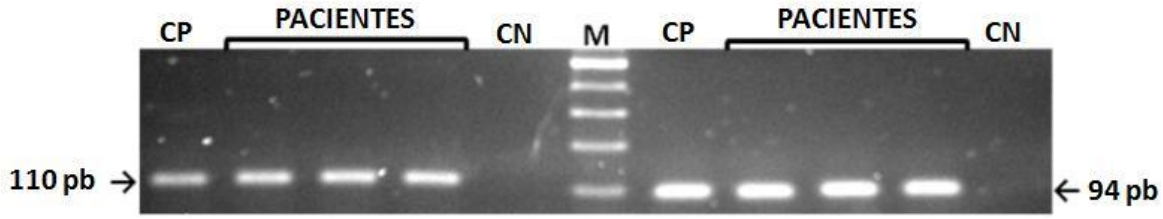

Figura 1. Detecção dos produtos de PCR por brometo de etídeo em gel de agarose 1,5%. *Primers* para os genes *ANXA1* (110pb) e *B2M* (94 pb) foram inicialmente testados e os amplicons foram detectados em amostras de sangue de três pacientes com OSCC. Linha M: Marcador de 100 pb. Linhas CP: Controles Positivos. Linhas CN: Controles Negativos.

A expressão do RNA mensageiro (RNAm) da *ANXA1* foi detectada em todas as amostras de pacientes com OSCC e indivíduos saudáveis. As análises revelaram diminuição significativa nos níveis de expressão gênica no sangue dos pacientes quando comparado ao grupo controle (p = 0.026). Os resultados obtidos para a expressão gênica relativa da *ANXA1* em sangue periférico de pacientes x controles estão apresentados na Figura 2A. Os ensaios de PCR em tempo real revelaram que o nível de expressão relativa da anexina A1 é 1.5 vezes menor em pacientes com OSCC que em indivíduos saudáveis, com um *odds ratio* de 0.33 para o evento do câncer (p = 0.06). O valor diagnóstico do teste foi avaliado pela análise da curva ROC que revelou o valor de AUC = 0.65 (95% IC; 0.51 – 0.78, p = 0.05) (Fig. 2A).

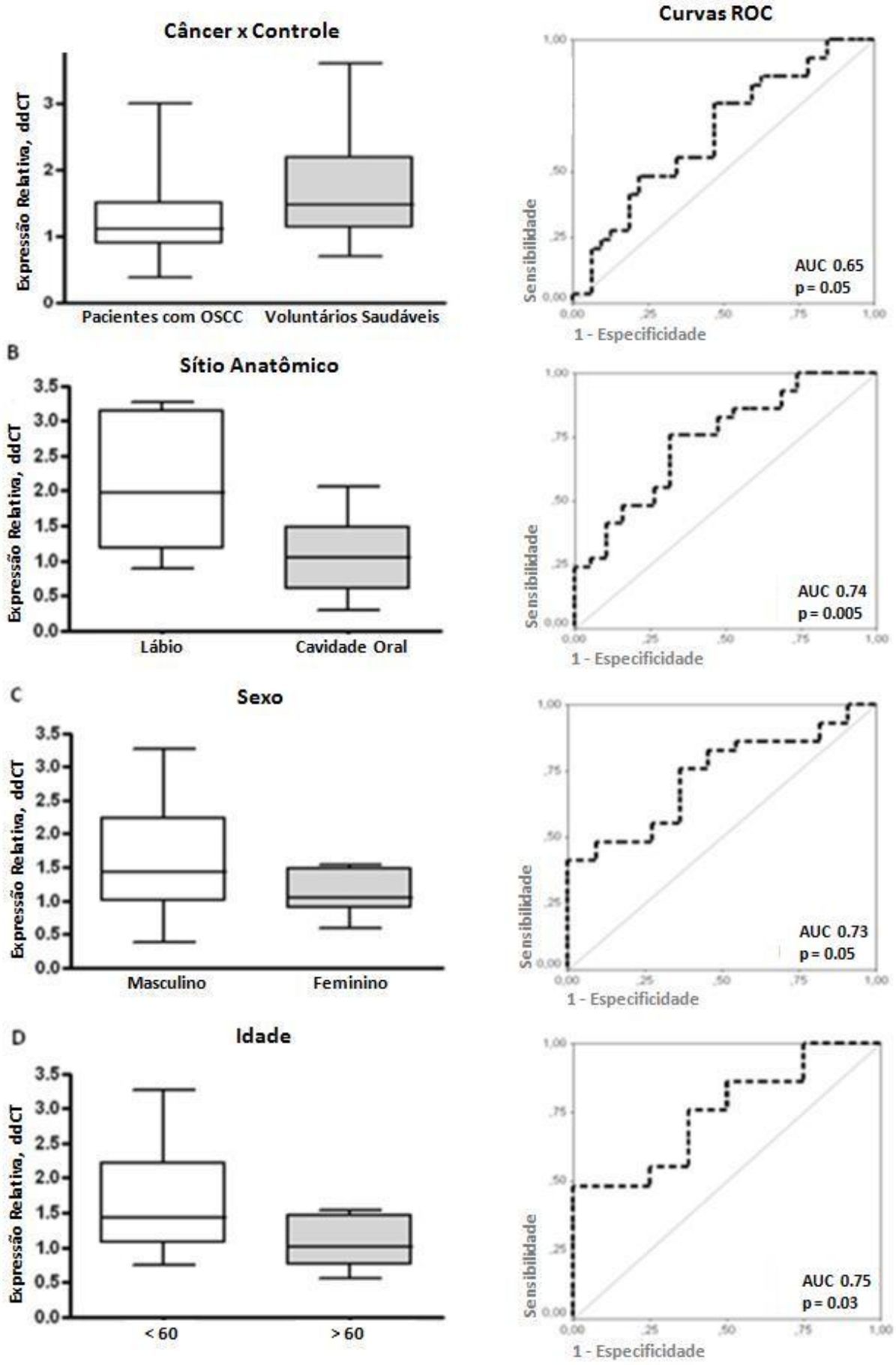
Câncer x Controle
Expressão Relativa, ddCT
Pacientes com OSCC
Voluntários Saudáveis
Curvas ROC
Sensibilidade
1 - Especificidade
AUC 0.65
p = 0.05
B
Sítio Anatômico
Lábio
Cavidade Oral
AUC 0.74
p = 0.005
C
Sexo
Masculino
Feminino
AUC 0.73
p = 0.05
D
Idade
< 60
> 60
AUC 0.75
p = 0.03

Figura 2. Expressão da *ANXA1* no sangue periférico como biomarcador para o carcinoma oral. (A) O diagrama *box-plot* mostra diminuição estatisticamente significativa da expressão gênica da *ANXA1* em sangue periférico de pacientes com OSCC em relação a indivíduos saudáveis. (B, C and D) Diagramas *box-plot* das medianas para os níveis relativos de expressão do gene alvo nos subgrupos de acordo os parâmetros clínicos dos pacientes com carcinoma oral. A variação é mostrada como uma linha vertical e valores extremos foram excluídos. (A-D) Curvas ROC combinadas aos diagramas *box-plot* representativos da PCR quantitativa, indicando a eficiência do diagnóstico por meio de AUC e respectivos valores de p. As linhas pontilhada e sólida ilustram a expressão da *ANXA1* e o valor de referência, respectivamente.

3.2. Expressão diferencial da anexina A1 de acordo com os parâmetros clínicos

Dentre os pacientes com OSCC, a maioria apresentou lesões nas regiões intra-orais, principalmente na língua (n = 8), seguido por mucosa jugal (n=7). De forma geral, o carcinoma oral foi detectado em indivíduos do sexo masculino (n=14) e abaixo de 60 anos (n=14). Além disso, os hábitos de tabagismo (n=24) e etilismo (n=19) são características notáveis desses pacientes. Ademais, tratamentos com quimioterapia e radioterapia foram administrados na maior parte dos indivíduos com OSCC investigados. Os graus de diferenciação tumoral e estadiamento TN não apresentaram diferenças entre os pacientes.

O perfil clínico e histopatológico dos pacientes com carcinoma oral e suas associações com a expressão gênica da *ANXA1* encontram-se descritos na Tabela 1, e os achados estatisticamente relevantes na Fig. 2B-D. Análises comparativas detectaram significativa diminuição da expressão da anexina A1 no grupo de pacientes com lesões no interior da cavidade oral (língua, mucosa jugal, assoalho e palato) em relação àqueles que apresentavam tumores nos lábios superior e inferior (p = 0.043). A expressão dos transcritos relacionou-se também ao sexo, sendo que menores níveis foram encontrados em mulheres (p = 0.009). Além disso, pacientes acima de 60 anos de idade apresentaram diminuição na expressão da *ANXA1* em relação aos indivíduos mais jovens (p = 0.04).

Foram também analisados os valores das áreas abaixo das curvas ROC ou índices de AUC para a expressão da *ANXA1* em relação ao sítio anatômico das lesões (cavidade oral) e em pacientes mulheres e/ou mais idosas (acima de 60 anos de idade), os quais foram significativamente diferentes dos AUCs encontrados para os indivíduos controles (Figuras 2B, C e D; $p = 0.005$, $p = 0.05$, $p = 0.03$, respectivamente, com 95% IC).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de pacientes com OSCC em relação à recorrência, etilismo, tabagismo, estadiamento TNM, grau de diferenciação histopatológica ou terapias. Entre os pacientes controles, não foram observadas diferenças significativas em relação à idade e sexo.

Tabela 1: Correlação entre os níveis de expressão da *ANXA1* em sangue periférico e o perfil clínico e histopatológico dos pacientes com carcinoma oral de células escamosas.

Classificação	Número de Casos %	Expressão Relativa do RNAm	Valor de p
Sítio Anatômico			
Lábio	26	2.09 ± 0.38	
Cavidade Oral	74	1.06 ± 0.11	0.02[a]
Idade			
Abaixo 60	52	1.33 ± 0.24	
Acima 60	48	1.05 ± 0.14	0.04[a]
Sexo			
Masculino	52	1.64 ± 0.27	
Feminino	48	1.10 ± 0.10	0.04[a]
Tabagismo			
Sim	89	1.26 ± 0.18	
Não	11	1.17 ± 0.17	0.29
Etilismo			
Sim	70	1.28 ± 0.22	
Não	30	1.18 ± 0.13	0.17

Estadiamento T			
T1	29.6	1.189 ± 0.24	
T2	26	1.755 ± 0.32	
T3	18.4	1.309 ± 0.26	
T4	26	1.426 ± 0.38	0.51
N			
N0	78	1.332 ± 0.21	
N+	22	1.339 ± 0.24	0.44
Grau de Diferenciação			
Bem	48	1.395 ± 0.22	
Moderadamente	52	1.364 ± 0.23	
Pouco	0	-	0.46
Quimioterapia			
Sim	33	1.505 ± 0.52	
Não	67	1.32 ± 0.16	0.33
Radioterapia			
Sim	37	1.636 ± 0.48	
Não	73	1.291 ± 0.17	0.20
Recorrência			
Sim	37	0.89 ± 0.18	
Não	73	1.31 ± 0.18	0.10

[a] valor de p significativo com um nível de probabilidade de 0.05.

4. Discussão

O aumento global na frequência e mortalidade do câncer bucal tem intensificado os esforços no sentido de atingir uma melhor prevenção e detecção precoce da doença. Portanto, observa-se extensiva busca por abordagens alternativas às biópsias e diagnósticos baseados em uma série de marcadores moleculares para detectar a presença de carcinoma oral.[4] Pela primeira vez, a *ANXA1* foi identificada no sangue periférico por PCR em tempo real e sugerida como um potencial biomarcador para diagnóstico. O presente estudo revelou a

ANXA1 como um novo transcrito biomarcador para a detecção precoce do câncer bucal no sangue periférico, abordagem muito diferente das utilizadas por outros investigadores. Estes têm apenas relatado a expressão protéica diferencial anexina A1 por imuno-histoquímica em tecidos de OSCC de acordo com a classificação histopatológica.[2]

No nível de RNAm, os ensaios de PCR em tempo real revelaram menores níveis expressão da *ANXA1* no sangue periférico de pacientes OSCC em qualquer estágio clínico (classificação histopatológica e sistema TN), quando comparado aos indivíduos controles sem histórico de câncer. Estudos anteriores indicaram que esta proteína está presente intracelularmente em uma variedade de tecidos, incluindo leucócitos do sangue periférico humano.[9] A anexina A1 está presente em todos os subgrupos de leucócitos, exceto os linfócitos B, sendo que apresenta níveis máximos em monócitos e neutrófilos polimorfonucleares e mínimos em linfócitos,[22] exercendo diversas e antagônicas funções imunes.[23] De fato, é sabido que os principais tipos celulares no sangue periférico de pacientes com câncer são linfócitos, sendo assim, pode ser que os baixos níveis de RNAm da *ANXA1* nas células cancerosas do sangue seja proporcional à quantidade de células T durante a vigilância imunológica tumoral.

Um achado importante foi a regulação transcricional da *ANXA1* dependente da localização anatômica, apresentando maior expressão no sangue periférico de pacientes portadores de lesões nos lábios, enquanto menores níveis de RNAm foram detectados naqueles pacientes com tumores na cavidade oral. Desta forma, sabe-se que tumores originados nos diversos locais na boca, como língua, assoalho da boca e mucosa jugal, têm características diferentes de desenvolvimento.[17] De acordo com esses dados, um estudo recente revelou o envolvimento entre a superexpressão de anexina A1 e a disseminação do melanoma, o que pode explicar o perfil transcricional mais elevado desse marcador no sangue de pacientes com tumores de lábio.[24] Pacientes com mais de 60 anos de idade também apresentaram regulação substancialmente menor da *ANXA1* e esta observação corrobora com os dados encontrados em trabalho epidemiológico que revelou uma pior sobrevida em pacientes idosos.[25] Além disso, a menor expressão da *ANXA1* em pacientes do sexo feminino pode estar envolvida não somente com as diferenças do gênero, mas também com aumento

da incidência de OSCC em mulheres.[26] As análises das curvas ROC demonstraram o poder discriminativo do teste diagnóstico dos níveis de RNAm da anexina A1 no sangue periférico e estão de acordo com os dados clínicos, indicando que este gene pode estar envolvido na progressão do câncer em pacientes específicos com OSCC e representa um bom marcador para diagnosticar o câncer previamente em pessoas que apresentam essas características clínicas.

O desenvolvimento do câncer oral, um subgrupo dos tumores de cabeça e pescoço, tem sido associado ao uso prolongado do tabaco e álcool,[27] no entanto, nossos resultados não mostraram diferenças na expressão *ANXA1* nas amostras de sangue periférico dos pacientes com OSCC que apresentavam os hábitos de fumar e beber. Este dado é consistente com uma investigação anterior, realizada em tecido tumoral em nível de RNAm e proteína.[2] O pequeno tamanho da amostra total (*N*=27) foi fator limitante da nossa investigação. Assim, não foi possível gerar importantes dados adicionais a fim de verificar se os resultados obtidos por PCR em tempo real podem segregar características clínicas, tais como estadiamento TNM, grau de diferenciação histopatológica, tratamento e recorrência.

Desta forma, embora o mecanismo exato ainda não esteja claro, os já descritos papéis pró-apoptótico[28] e anti-proliferativo[29] da ANXA1 sugerem que há uma via de regulação para a sua expressão em condições tumorais, especialmente em tecidos e fluidos corporais, que leva a uma diminuição crítica nos níveis de RNAm que estão associados ao fenótipo maligno. Propomos que a *ANXA1* desempenhe uma importante função como um gene supressor de tumor. Por outro lado, um estudo demonstrou que a menor regulação de uma proteína homóloga à anexina A1 impede a fagocitose eficiente de determinadas células de *Caenorhabditis elegans.*[30] Esses dados sugerem um sinal de "*eat me*" gerado pela anexina A1 em células tumorais, como mostrado anteriormente em neutrófilos,[31] aliando a sua expressão diminuída à conhecida evasão imune descrita na biologia dos tumores.

Biomarcadores em fluidos não-invasivos são a alternativa mais amplamente utilizada para as biópsias e têm recentemente emergido como testes diagnósticos inovadores e soluções avançadas biotecnológicas que ajudam a

melhorar os cuidados com o paciente. Comparado às biópsias de tecidos, o sangue é um fluido de fácil acesso e nossos resultados demonstraram que *ANXA1* pode ser usada como um biomarcador sanguíneo não-invasivo para o carcinoma epidermóide oral. Portanto, investigar a presença ou ausência de qualquer RNAm marcador em sangue periférico, incluindo a *ANXA1*, já é reconhecido como uma poderosa ferramenta diagnóstica e de compreensão da biologia, devido à localização das moléculas de RNAm,[32] que estão localizados nas células como transcritos que podem ser traduzidos ou não sob estímulos específicos.

Outra área potencialmente interessante para futuras investigações pode ser examinar a expressão *ANXA1* na saliva destes pacientes. O proteoma salivar pode ser explorado para a detecção precoce de cânceres humanos, predizendo a agressividade e as chances de recorrência do tumor, o que pode eventualmente levar ao desenvolvimento de simples ferramentas clínicas para a detecção precoce e acompanhamento de vários tipos de carcinomas, como o epidermóide bucal. Além disso, a saliva representa um fluido biológico facilmente acessível que pode ser repetidamente obtido para avaliação *in vivo* da eficácia e toxicidade de drogas anti-câncer.

Acreditamos que novas descobertas e avanços tecnológicos em conjunto com a capacidade de diagnosticar uma doença por meio de uma seleção de biofluidos não-invasivos, como o sangue periférico, irá fomentar uma mudança revolucionária na medicina. O uso da *ANXA1* como biomarcador para o OSCC abre uma nova perspectiva para o diagnóstico do câncer, demonstrando sua importante associação com características tumorais específicas e poderá tornar-se de grande relevância quando adequadamente empregado para o diagnóstico diferencial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khanna SS, Karjodkar FR. Circulating immune complexes and trace elements (Copper, Iron and Selenium) as markers in oral precancer and cancer: a randomised, controlled clinical trial. *Head Face Med* 2006;**2**:33.

2. Zhang L, Yang X, Zhong LP, Zhou XJ, Pan HY, Wei KJ, *et al*. Decreased expression of Annexin A1 correlates with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009;**38**(4):362-370.

3. Kesting MR, Sudhoff H, Hasler RJ, Nieberler M, Pautke C, Wolff KD, *et al*. Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features. *Oral Oncol* 2009;**45**(8):731-6.

4. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 2009*;* **45**(4-5):301-308*.*

5. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JV, Jetly DH, Shukla SN, *et al*. Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis. *Head Neck* 2009. “in press”

6. Hassan NM, Tada M, Hamada J, Kashiwazaki H, Kameyama T, Akhter R, *et al*. Presence of dominant negative mutation of TP53 is a risk of early recurrence in oral cancer. *Cancer Lett* 2008;**270**(1):108-119.

7. Vishwanatha JK, Swinney R, Banerjee AG. Modulation of annexin I and cyclooxygenase-2 in smokeless tobacco-induced inflammation and oral cancer. *Mol Cell Biochem* 2003;**248**(1-2):67-75.

8. Perretti M, Flower RJ. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J Leukoc Biol* 2004;**76**(1):25-29.

9. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100**(1):39-48.

10. Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J* 2007;**21**(4):968-975.

11. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009;**9**(1):62-70.

12. Kang JS, Calvo BF, Maygarden SJ, Caskey LS, Mohler JL, Ornstein DK. Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;**8**(1):117-123.

13. Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;**322**(4):1166-1170.

14. Sena AA, Provazzi PJ, Fernandes AM, Cury PM, Rahal P, Oliani SM. Spatial expression of two anti-inflammatory mediators, annexin 1 and galectin-1, in nasal polyposis. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**(10):1260-1267.

15. Sawmynaden P, Perretti M. Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**349**(4):1351-1355.

16 . Silistino-Souza R, Rodrigues-Lisoni FC, Cury PM, Maniglia JV, Raposo LS, Tajara EH, *et al*. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *Int J Cancer* 2007;**120**(12):2582-2589.

17. Li Y, Elashoff D, Oh M, Sinha U, St John MA, Zhou X, *et al*. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol* 2006;**24**(11):1754-1760.

18. Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1997;**278**(5340):1054-1059.

19. Sobin LH, Wittekind CH. International union against cancer (UICC) TNM classification of malignant tumours. 6th edition New York: Wiley, 2002. p. 22–26.

20. Barnes L, Everson JW, Reichart P. World health organisation classification of tumours pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: JARC Press, 2005. p. 168–175.

21. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987,**162**(1):156–159.

22. Morand EF, Hutchinson P, Hargreaves A, Goulding NJ, Boyce NW, Holdsworth SR. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;**76**(2):195-202.

23. D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD, Flower RJ, Perretti M. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* 2007;**109**(3):1095-1102.

24. Rondepierre F, Bouchon B, Papon J, Bonnet-Duquennoy M, Kintossou R, Moins N, *et al*. Proteomic studies of B16 lines: involvement of annexin A1 in melanoma dissemination. *Biochim Biophys Acta* 2009;**1794**(1):61-69.

25. Goldenberg D, Brooksby C, Hollenbeak CS. Age as a determinant of outcomes for patients with oral cancer. *Oral Oncol* 2009;**45**(8):e57-61.

26. Papageorge M. Etiology of Oral Cancer in the Young Patient: Is Tongue Cancer Becoming the Other Cancer in Women? *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2007;**19**(2):163-171.

27. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 2009;**21**(3):194-200.

28. Hsiang CH, Tunoda T, Whang YE, Tyson DR, Ornstein DK. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. *Prostate* 2006;**66**(13):1413-1424.

29. Alldridge LC, Bryant CE. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. *Exp Cell Res* 2003;**290**(1):93-107.

30. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, *et al*. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 2003;**4**(4):587-598.

31. Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, Wynne KJ, Cagney G, Godson C, *et al*. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 2007;**178**(7):4595-4605.

32. Besse F, Ephrussi A. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;**9**(12):971-980.

"Não me dêem fórmulas certas, porque eu não espero acertar sempre.

Não me mostrem o que esperam de mim, porque vou seguir meu coração!

Não me façam ser o que não sou, não me convidem a ser igual, porque sinceramente sou diferente!"

Clarice Lispector