Verificação de alvos moleculares associados à transformação maligna de câncer de boca em fluidos lacrimais por meio de estratégias translacionais.

Verification of molecular targets associated to malignant transformation of oral cancer in tears through translational strategies

Instituição Sede: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materias (CNPEM).

Pesquisador principal responsável: Adriana Franco Paes Leme

Jovem pesquisador responsável (co-orientação): Daniela Campos Granato

Campinas, Abril 2021

1. Introdução

As lesões potencialmente malignas, como as leucoplasias, podem levar ao desenvolvimento do câncer de boca[1]. O carcinoma escamoso celular (CEC) na boca acomete mais homens, acima dos 45 anos, tabagista e etilistas, enquanto a leucoplasia oral (LO) acomete mais após a quarta década de vida, sendo mais frequente em homens e seis vezes mais comum em fumantes[2]. Já a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é diagnosticada mais em pacientes do gênero feminino, acima de 70 anos, e não está associada ao tabagismo ou etilismo, porém apresenta altos índices de recorrência e malignização[3]. Por isso, é essencial compreender sua etipatogenia e desenvolver técnicas para diagnóstico precoce, objetivando intervir em estágios menos agressivos da doença e acompanhar sua evolução[4]. Verificar alterações nos níveis das proteínas comuns aos diferentes estágios dessas doenças e no câncer de boca podem auxiliar na compreensão do seu desenvolvimento. Essas proteínas podem vir a ser marcadores de progressão utilizados no diagnóstico precoce, ao indicar potencial de transformação maligna da lesão[5]. Além disso, os mesmos podem auxiliar a determinação do prognóstico e guiar para melhores estratégias de tratamento da doença que ainda são definidas principalmente a partir da classificação dada pelo TNM[6]. Inclusive, apesar dos esforços na busca de biomarcadores, a presença de metástase linfonodal (N) ainda é o principal marcador de prognóstico para o câncer de boca. Com isso, a identificação de assinaturas biológicas poderá complementar a decisão clínica. Para isso, é fundamental padronizar ensaios de rápida detecção, capazes de quantificar as moléculas com alta robustez, sensibilidade e acessíveis para a prática clínica[7,8]. Dentre as biópsias liquidas de fácil coleta e que tem demonstrado relevância clinica para outros tipos de doenças estão os fuidos lacrimais.

Portanto, o objetivo geral desse estudo é utilizar os fluidos lacrimais de individuos saudáveis (Controle), pacientes com LVP, LO e CEC (com presença e ausência de metástase linfonodal, N0 e N+, respectivamente) e verificar por meio de ensaios de fase sólida modificado e imunoenzimático (ELISA) a abundância de onze marcadores previamente selecionados pelo grupo. Esses onze marcadores foram selecionados a partir de uma primeira fase de Descoberta realizada através de resultados obtidos da proteômica baseada em espectrometria de massas. Nesse estudo foram identificadas 904 proteínas a partir do fluido lacrimal, sendo que destes quarenta e três proteínas se demonstraram diferenciais entre as condições interrogadas (Controle, LO, LVP, N0 e N+, ANOVA $p<0.05$) e somente onze foram capazes também de ter sua abundância associada com importantes caracteristicas clínicas de prognóstico da doença, além de distinguir os grupos de interesse com curva ROC (Característica de Operação do Receptor) acima de 70%.

2. Justificativa e Estado da arte

O diagnóstico diferencial entre algumas lesões benignas, malignas ou inflamatórias se baseia na junção de critérios clínicos e histológicos, porém, além do caráter subjetivo, o aparecimento de uma lesão clínica suspeita muitas vezes já ocorre em estágios intermediários ou avançados de algumas patologias orais, dificultando o tratamento. Atualmente, não há biomarcadores específicos para as lesões orais potencialmente malignas e malignas, sendo assim, a validação de biomarcadores para essas lesões através

dos fluidos lacrimais pode: i) ajudar a antecipar o diagnóstico,ii) torna-lo mais preciso e menos invasivo e assim melhorar o diagnóstico e prognóstico dos pacientes acometidos, iii) averiguar as proteínas envolvidas na suscetibilidade individual à transformação maligna. Para isso, esse projeto visa aplicar a técnica de uso padrão em análises clínicas, denominada ELISA, para detecção de marcadores de transformação maligna e prognóstico identficados por proteômica em fluidos lacrimais[9,10]. Essa transalação de resultados obtidos a partir da proteômica por espectrometria de massas para ensaios que são usados na prática clínica em um coorte independente de pacientes faz parte do estado da arte na validação de biomarcadores[11]. Além disso não há nenhum marcador de lágrima documentado para carcinoma de boca, apenas alguns trabalhos que indicam alterações na composição da lágrima na presença de câncer de mama[12,13], o que torna a abordagem do estudo original e sobretudo relevante considerando que o diagnóstico precoce tem sido visto pela equipe médica como a fase que requer maiores esforços e dedicação na busca por marcadores[14,15]. Para avaliar a viabilidade em desenvolver um ensaio que possa ser facilmente aplicado na prática clínica, analisaremos a capacidade de se transferir os resultados obtidos com a Proteômica para ensaios de *ELISA* e ensaios baseados em citometria de fluxo, como já visto em outros trabalhos.

2. Objetivos

Objetivo geral: Utilizar os fluidos lacrimais para verificar e quantificar a diferença na abundância de onze proteínas ligadas ao potencial de transformação maligna em CEC nos fluidos lacrimais de indivíduos saudáveis (n=20), pacientes com LVP (n=20), LO (n=20) e CEC (N0:n=10, N+, n=10).

Objetivos específicos:

- Padronizar ensaio de fase sólida com fluidos lacrimais para os onze alvos selecionados a partir de dados proteômicos obtidos na Fase de Descoberta;
- Verificar a diferença na abundância relativa dos potenciais marcadores de transformação maligna em ensaios quantitativos e de uso padrão na prática clínica (ELISA).
- Avaliar a presença desses alvos em outros tipos de biofluidos como é o caso da papa leucocitária (*buffy coat*) por citometria de fluxo.

3. Metodologia

Western Blot- A especificidade dos anticorpos utilizados nos ensaios de fase sólida será avaliada por *western blot* usando diferentes extratos totais provindo de linhagens celulares (células originadas de CEC e de não CEC). Anticorpos que apresentarem marcação específica para a proteína alvo serão considerados adequados para serem utilizados nos próximos ensaios.

Ensaio de fase sólida modificado para verificação de biomarcadores em fluidos lacrimais- Para amostras de pacientes usaremos 50 µL de fluido lacrimal diluído em tampão de carbonato de sódio, pH 9.6. Em paralelo será feita a curva de calibração com a proteína alvo de interesse purificada e adquirida comercialmente ou produzida *in house* (eg. 0-2ng). Deixar a placa overnight a 4°C sob agitação lenta. Após período de incubação, lavar os poços 3x com solução de PBST (PBS com 0,05% de Tween 20). Em

seguida, fazer o bloqueio com solução de leite em pó (5%) em PBS por 2h a temperatura ambiente e sob agitação. Após o período de incubação, lavar 3x com PBST. Incubação do anticorpo primário, diluído 1:300 em PBST com 2% de BSA e manter por 1h a temperatura ambiente e sob agitação. Após o período de incubação, lavar 3x com PBST. Incubação com anticorpo secundário dilúido 1:10.000 em 5% de leite em pó por 1h a temperatura ambiente e sob agitação. Após o período, lavar 3x com PBST. Revelar com tampão contendo ABTS em 0,1 M de ácido cítrico pH 4,35 e 0,03% de H2O2. Deixar a placa a temperatura ambiente e overnight. Após esse período, fazer leitura de absorbância em 405 nm de comprimento de onda. Esse experimento será realizado em triplicata técnica.

Ensaio de *ELISA* para detecção de biomarcadores em fluidos lacrimais- Para isso somente os alvos que forem verificados com o ensaio de fase sólida modificado serão interrogados novamente pelo ensaio de ELISA em um coorte independemente e possivelmente maior. Esse experimento será realizado em duplicata técnica.

Ensaio de citometria de fluxo-Para avaliar a presença desses alvos em células circulantes usando outro tipo de metodologia, será feita a marcação por citometria de fluxo utilizando papa leucocitária obtida desses mesmos pacientes de acordo com protocolos já padronizados na literatura[16].

Correlação clínica e curva ROC-A partir dos resultados das proteínas diferencialmente abundantes validadas por ELISA, será realizada a correlação com os dados clínico-patológicos dos pacientes, assim como uma análise da capacidade dessa assinatura distinguir os grupos de interesse através da curva de Característica de Operação do Receptor (curva ROC).

4. Resultados esperados

Ao final do projeto esperamos validar um painel de proteínas em fluidos lacrimais capaz de distinguir pacientes com leucoplasias oral, leucoplasias verrucosa proliferativa e carcinoma de células escamosas oral, que tenha associação com transformação maligna e/ou prognóstico da doença.

5. Cronograma de execução da pesquisa

Atividades	01 – 03 meses	04 – 06 meses	07 – 09 meses	10 – 12 meses
Coleta de fluidos lacrimais	X	X		
Otimização do ensaio de fase sólida para onze alvos em fluidos lacrimais	X	X	X	
ELISA dos marcadores em fluidos lacrimais		X	X	
Citometria de fluxo em papa leucocitária			X	

Correlação clínica com dados clínicos e curva ROC para distinguir os grupos			X	
Escrita do relatório final e artigos científicos				X

6. Referências bibliográficas

1. van der Waal, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* **46**, 423–425 (2010).

2. Warnakulasuriya, S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **125**, 582–590 (2018).

3. Hansen, L. S., Olson, J. A. & Silverman, S. J. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **60**, 285–298 (1985).

4. Spiegel, J. H. & Jalisi, S. Contemporary diagnosis and management of head and neck cancer. *Otolaryngol. Clin. North Am.* **38**, (2005).

5. Müller, S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **125**, 591–602 (2018).

6. Johnson, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **6**, (2020).

7. Brookes, K. *et al.* Issues on fit-for-purpose validation of a panel of ELISAs for application as biomarkers in clinical trials of anti-Angiogenic drugs. *Br. J. Cancer* **102**, 1524–1532 (2010).

8. del Campo, M. *et al.* Facilitating the validation of novel protein biomarkers for dementia: An optimal workflow for the development of sandwich immunoassays. *Front. Neurol.* **6**, 1–10 (2015).

9. Ourradi, K. *et al.* Development and validation of novel biomarker assays for osteoarthritis. *PLoS One* **12**, 1–13 (2017).

10. Valentin, M. A., Ma, S., Zhao, A., Legay, F. & Avrameas, A. Validation of immunoassay for protein biomarkers: Bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55**, 869–877 (2011).

11. Macklin, A., Khan, S. & Kislinger, T. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. *Clin. Proteomics* **17**, 17 (2020).

12. Hanstock, H. G., Edwards, J. P. & Walsh, N. P. Tear Lactoferrin and Lysozyme as Clinically Relevant Biomarkers of Mucosal Immune Competence . *Frontiers in Immunology* vol. 10 1178 (2019).

13. Böhm, D. *et al.* Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach. *Oncol Rep* **28**, 429–438 (2012).

14. Kowalski, L. P. *et al.* Survival trends of patients with oral and oropharyngeal cancer treated at a cancer center in São Paulo, Brazil . *Clinics* vol. 75 (2020).

15. Carreras-Torras, C. & Gay-Escoda, C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **20**, e305–e315 (2015).

16. Meyer, T. P. H. *et al.* Filter Buffy Coats (FBC): A source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. *J. Immunol. Methods* **307**, 150–166 (2005).