

**ESTUDIO PROTEÓMICO DE  
BIOMARCADORES SALIVALES EN  
DESÓRDENES POTENCIALMENTE  
MALIGNOS DE LA CAVIDAD BUCAL.**

**PROTEOMIC STUDY OF SALIVARY  
BIOMARKERS IN POTENTIALLY  
MALIGNANT ORAL CAVITY DISORDERS.**

Facultad de Odontología - UNLP  
Calle 50 e/ Av. 1 y 115 La Plata (1900). Bs. As. Argentina.  
drabaudo@yahoo.com.ar  
Financiamiento: Universidad Nacional de La Plata

• Baudo, JE; Coscarelli, NY; Barilaro, HL; Giménez, J; Arcuri, A; Arcuri, M; Fernández, M; Pita, D; García, E •

**RESUMEN** Los desórdenes potencialmente malignos (DPM) se caracterizan por presentar riesgo mayor de transformación maligna a carcinoma. *Objetivos:* Estudiar la expresión proteómica de las proteínas CD44, Ciclina D1 y Galectina 9 en fluido salival de pacientes con DPM respecto de un grupo control; correlacionar la concentración de estos biomarcadores con parámetros clínicos y anatomopatológicos; averiguar si su sobreexpresión es útil como indicador de riesgo de progresión a malignidad. Se realizará un estudio transversal con una muestra por conveniencia de pacientes con DPM y un grupo control de 20 pacientes sanos. Se realizará una historia clínica completa, muestra de saliva, analizada posteriormente por espectrometría de masa. Se compararán los niveles de la expresión de las proteínas entre la muestra de pacientes con DPM y el grupo control. Se correlacionarán los niveles de expresión de las proteínas y el grado de displasia epitelial en pacientes sometidos a biopsia por no responder al tratamiento convencional.

**Palabras clave:** BIOMARCADORES - PRECÁNCER - CÁNCER - MUCOSA BUCAL

**SUMMARY** Potentially malignant disorders (MPD) are characterized by a higher risk of malignant transformation to carcinoma. *Objectives:* To study the proteomic expression of the proteins CD44, cyclin D1 and galectin 9 in the salivary use of patients with MPD with respect to a control group; correlate the concentration of these biomarkers with clinical and anatomopathological parameters; Find out if overexpression is useful as an indicator of the risk of progression to malignancy. A transverse study was performed with a convenience sample of patients with MPD and a control group of 20 healthy patients. A complete clinical history was made, saliva sample, analyzed later by mass spectrometry. The expression levels of the proteins are compared between the sample of patients with MPD and the control group. The expression levels of the proteins and the degree of epithelial dysplasia will be correlated in patients undergoing a non-responder biopsy to conventional conventionalism.

**Palabras clave:** BIOMARKERS - PRECANCER - CANCER - BUCCAL MUCOSA

## INTRODUCCIÓN

El cáncer oral es un serio problema que está aumentando en prácticamente todo el mundo. El 90% de los tumores malignos primarios son carcinomas orales de células escamosas, siendo más frecuente en borde lateral de la lengua. En el crecimiento normal de una célula se distingue la Interfase, en la que la célula crece hasta alcanzar un tamaño determinado para luego prepararse para su posterior división. La división celular está mediada por varios puntos de control que a su vez están regulados por proteínas reguladoras. La carcinogénesis es el mecanismo por el cual se desarrolla una neoplasia maligna. Las alteraciones en las proteínas sumadas a los desórdenes potencialmente malignos crean estados celulares de hiperproliferación que favorecen la adquisición de errores oncogénicos confiriendo capacidad invasiva. Las células están bajo la amenaza constante de varios factores citotóxicos y mutagénicos que dañan al ADN, éstos pueden ser endógenos o exógenos. Esta mutagenicidad se adquiere cuando los genes y proteínas que detectan y reparan el ADN son inactivados dando como resultado células mutagénicas y el posible sobrecrecimiento de los descendientes mutados, ya que además la apoptosis, proceso por el cual se eliminan las células dañadas, está inactivo. Las células tumorales comparten unos cambios fisiológicos, denominados capacidades adquiridas, suficientes para explicar el comportamiento maligno que caracteriza a las células cancerosas ya que incluyen habilidades como generar sus propias señales mitóticas, evitar apoptosis y capacidad para invadir y metastatizar. La primera etapa del proceso de la carcinogénesis consta de 4 etapas: Iniciación, promoción, transformación y progresión. Hay varios genes encargados de la homeostasis celular, como los oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN. En el desarrollo del cáncer, éstos se encuentran alterados. Las alteraciones en la proteína P53, responsable de detener, temporalmente, el ciclo celular para reparar daños moleculares y bioquímicos en las células dañadas, así como de otras alteraciones que lleven a la inactivación de la maquinaria apoptótica, suelen llevar a una transformación maligna. <sup>(1)(2)</sup> CD44 es una glicoproteína de transmembrana que tiene varias funciones en la división celular, migración, adhesión y señalización. La prevalencia de CD44 en células cancerígenas atrae nuestra atención para centrarse en su relación con el inicio molecular de la progresión tumoral. El comportamiento tumorigénico de las células que expresan altamente CD44 puede considerarse como un marcador temprano para la proliferación de células madre neoplásicas. (Fig. 2) Las ciclinas son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. La amplificación y sobreexpresión de la ciclina D1 es importante en el desarrollo de diversos tipos de cáncer, en el oral se correlaciona con la progresión celular de la proliferación tumoral, la metástasis y los pobres pronósticos. (Fig. 3) Las galectinas constituyen una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución. La expresión de galectina-9 se encuentra aumentada, en cáncer oral, páncreas, de ovario y hematológicos. Además de la participación de galectina-9 en apoptosis y en adhesión celular, existen reportes sobre su participación en eventos celulares característicos de la metástasis. (Fig. 4) <sup>(3)</sup> El desarrollo de la proteómica ha abierto grandes expectativas para la identificación de biomarcadores, toda vez que la espectrometría de masa puede identificar proteínas en muy baja concentración. El biomarcador puede ser una molécula secretada por un tumor o puede ser una respuesta específica del cuerpo a la presencia de cáncer. Los líquidos huma-

nos son la principal fuente de biomarcadores, en particular por su bajo costo, fácil recolección, procesamiento y el carácter no invasivo de sus muestras. <sup>(4)(5)</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

Se está realizando un estudio transversal con pacientes que concurren a la Asignatura de Patología y Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata, con una muestra por conveniencia de pacientes con desórdenes potencialmente malignos durante los tres primeros años del proyecto y un grupo control de 20 pacientes sanos. Los criterios de inclusión de los pacientes con desórdenes potencialmente malignos fueron: ser mayores de 18 años, tener un diagnóstico clínico de desorden potencialmente maligno, no haber recibido tratamiento previo, firma del consentimiento informado escrito. Los criterios de exclusión fueron: pacientes con antecedentes de malignidad de cabeza y cuello, pacientes con antecedentes de radioterapia en la cabeza y el cuello, embarazo o lactancia, enfermedad periodontal, no firmar el consentimiento informado. Para el grupo control los criterios de inclusión fueron: mayores de 18 años, sin antecedentes de desórdenes potencialmente malignos, sin hábitos tóxicos (tabaco, alcohol, etc.), firma del consentimiento informado. (Fig. 1). Los de exclusión fueron: pacientes que toman cualquier medicamento o con hábitos que podrían potencialmente interferir en el estudio, enfermedad sistémica significativa, embarazadas o lactantes.

En todos los pacientes se está completando antecedentes personales y familiares, anamnesis y exploración clínica. A todos los pacientes se les está realizando una historia clínica completa y exploración de la cavidad oral para determinar la presencia de desórdenes potencialmente malignos. Muestra de saliva para el estudio de la expresión de las proteínas CD44, ciclina D1 y galectina 9 por espectrometría de masa. Los pacientes con desórdenes potencialmente malignos se tratan en la clínica de la Asignatura. A los pacientes que no responden al tratamiento, sea este la eliminación de factores de irritativos, tópicos locales o médicos sistémicos, se les indicarán pruebas de laboratorio, riesgo quirúrgico, para la realización de la biopsia escisional o incisional, de acuerdo al tamaño de la lesión. El procesamiento de las muestras se realizará en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad. En las próximas etapas se compararán los niveles de la expresión de las proteínas del estudio entre la muestra de pacientes con desórdenes potencialmente malignos y el grupo control. Se correlacionarán los niveles de expresión de las proteínas y el grado de displasia epitelial en los pacientes que sean sometidos a biopsia. En los que no presenten displasia se les hará vigilancia anual. Los que presenten displasia leve o moderada, si la biopsia fue incisional se realizará la escisional con margen de seguridad, la vigilancia será en el primer año semestral y luego anual. Los que presenten displasia severa (carcinoma in situ) o carcinoma escamoso serán derivados a oncología.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Estudio proteómico de CD44, ciclina D1 y galectina 9 como biomarcadores salivales en desórdenes potencialmente malignos de la cavidad bucal.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

Este formulario de consentimiento puede contener algunas palabras que usted probablemente no entienda. Por favor pida explicación a uno de los integrantes del grupo de investigación para que lo asesore.

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, los cuidadosamente este formulario de consentimiento y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión.

La invitación a participar en la investigación no necesariamente implica que usted u otros miembros de su familia sufran de una enfermedad particular o tengan riesgo genético para esa enfermedad.

1. El propósito de esta investigación es:

- ✓ Estudiar la expresión proteómica de las proteínas CD44, ciclina D1 y galectina 9 en fluido salival de pacientes con desórdenes potencialmente malignos respecto de un grupo control.
- ✓ Correlacionar la concentración de saliva de estos biomarcadores con parámetros clínicos y anatomopatológicos
- ✓ Averiguar si su sobreexpresión es útil como indicador de riesgo de progresión a malignidad.

2. Su participación incluye:

- a) Tomar entre 2 a 3 ml de saliva, que se recolectará en un tubo de poliestireno. Esta saliva se recolectará por drenaje, por bato, por escupir o por succión. Las muestras de saliva recolectadas se llevarán al Laboratorio de Estudio de Compuestos Orgánicos (LADCCO), para el estudio de las proteínas CD44, ciclina D1 y galectina 9 por espectrometría de masas. El mismo laboratorio se encargará de la eliminación de los residuos biológicos. Esta muestra es sólo para propósitos de investigación y los resultados no serán reportados a usted.
- b) Todas las muestras serán codificadas para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos y nunca serán mostrados (sin su consentimiento) a nadie fuera del proyecto de investigación.

3. Riesgo y efectos adversos que pueden estar asociados a la investigación:

- a) Las preguntas personales para conocer su estado de salud actual e historia clínica pueden ser tediosas y embarazosas. Usted puede discutir con el entrevistador, y puede decidir no responder a determinadas preguntas o no continuar con su participación. Tanto las respuestas como la información que usted suministre son confidenciales.
- b) Los resultados de la investigación son estrictamente confidenciales. No se entregará información de las evaluaciones clínicas realizadas durante la investigación a compañías de seguros ni otras personas o instituciones sin su previa autorización.
- c) A su muestra se le asignará un código numérico. Esto prevendrá que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del paciente. Las personas fuera del proyecto de investigación nunca podrán relacionar los resultados de la investigación con los pacientes en el estudio.

4. Beneficios para usted/socios/as: Usted no recibirá ningún beneficio médico o económico por la participación en este proyecto.

5. La participación es voluntaria y usted puede rehusarse de participar o retirarse de la investigación en cualquier momento sin ninguna penalidad. Si una vez realizada la donación de su muestra usted desea retirarse del proyecto de investigación, este material será desechado a petición suya. Sin embargo, una vez procesada su muestra, los resultados derivados de la investigación no podrán ser eliminados de aquellos trabajos científicos derivados de este estudio y que ya están publicados.

- a) El investigador tomará medidas para proteger la confidencialidad de su registro médico y su identidad no será divulgada en ninguna publicación que resulte de este estudio. Para proteger sus derechos, el administrador de los fondos para este proyecto podrá en algún momento inspeccionar los registros suministrados por usted para este proyecto (no por nombres, sino utilizando solamente códigos numéricos). Esto con el fin de asegurarse de que sus derechos han sido protegidos en este proyecto.
- b) Este proyecto de investigación no está destinado a proveer diagnóstico ni tratamiento de aquellos problemas médicos no mencionados explícitamente.
- c) Usted será informado de cualquier hallazgo derivado de su participación en la investigación, que pueda cambiar su decisión de continuar en este estudio. El investigador puede retirarse de esta investigación, si entiende que existen circunstancias médicas que lo aconsejen.

He leído este formulario de aprobación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación.

Nombre del participante: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del Investigador o profesional designado: \_\_\_\_\_  
Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Figura 1. Consentimiento informado

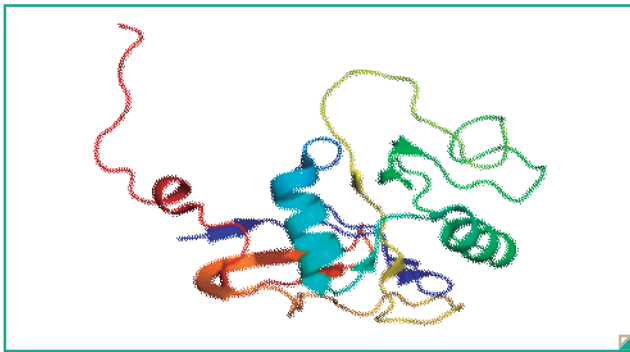


Figura 2. CD44

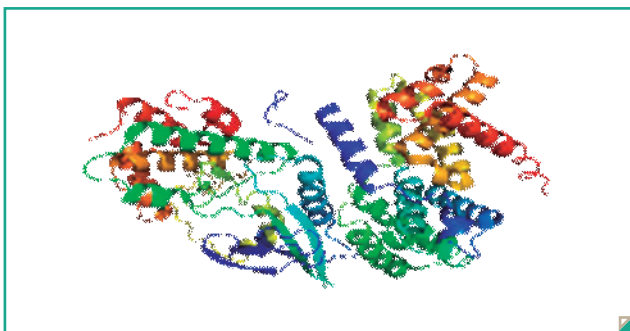


Figura 3. Ciclina D1

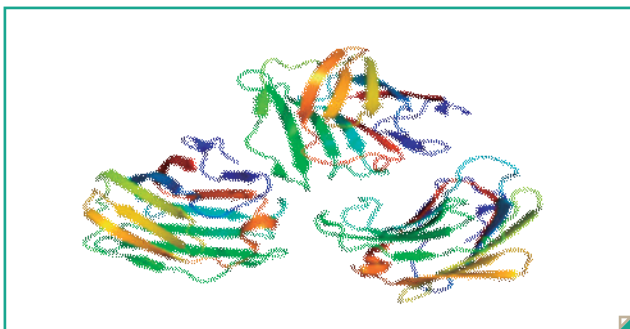


Figura 4. Galectina 9

## RESULTADOS ESPERADOS

Demostrar que la sobreexpresión de las proteínas CD44, Ciclina D1 y Galectina 9 son biomarcadores eficaces para la detección precoz de alteraciones en el ciclo celular como indicadores de carcinogénesis.

Contribuir para que sea posible el diagnóstico precoz en la carcinogénesis de los desórdenes potencialmente malignos. Aportar nuevos conocimientos acerca del comportamiento de los desórdenes potencialmente malignos y del cáncer oral, con el fin de mejorar su detección inicial y su pronóstico.

## DISCUSIÓN

La proteómica es una herramienta fundamental en salud pública, ya que permite el estudio a nivel poblacional de proteínas que pueden estar alteradas en respuesta a una determinada enfermedad.

La epidemiología molecular a nivel del genoma, proteoma y metaboloma constituye un reto para la investigación en salud pública en el nuevo milenio. Asimismo, el estudio de un sistema biológico en forma integrada, en los planos genómico, proteómico y metabólico, en conjunción con los datos clínicos y epidemiológicos, hará posible caracterizar el sistema en su conjunto y de esta forma incrementar exponencialmente la posibilidad de entender diferentes procesos celulares, la patofisiología de una enfermedad o encontrar un nuevo biomarcador. Respecto al futuro, una vez que conozcamos todas las proteínas humanas, podremos definir cuáles de ellas se alteran y participan en el desarrollo de una enfermedad. Esto significa que, en unos años, se podrán definir biomarcadores de utilidad para conocer quién padece una enfermedad (diagnóstico precoz), cómo será su pronóstico y si responderá o no a un tratamiento determinado para elegir el tratamiento más adecuado en cada caso. En este sentido, la proteómica representa un paso más en los estudios dirigidos a la medicina individualizada o personalizada, en la que se tienen en cuenta las respuestas de cada paciente ante distintas terapias.

En los últimos años existe un creciente interés en el diagnóstico basado en el análisis de la saliva dado que su colección es simple y no invasiva. Estas características hacen que sea posible supervisar diversos biomarcadores en saliva de bebés, niños, adultos mayores y sujetos no colaboradores, y en circunstancias en la cual la sangre y orina de muestreo no están disponibles. El estado de la técnica proteómica salival esta en evolución progresiva y un número creciente de aplicaciones clínicas se han establecido para vigilar las condiciones y enfermedades locales y sistémicas. El campo de investigación más importante de la proteómica salival es la oncología (carcinogénesis). Sin embargo, algunos resultados obtenidos son a veces contradictorios, por lo que se requieren mayores estudios. Como parte de la genómica funcional, la investigación proteómica permite vislumbrar nuevas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. La identificación de las proteínas que intervienen en las diversas etapas de una enfermedad ayudará a comprender las bases moleculares y la naturaleza de dicha anomalía; de igual modo, estas proteínas identificadas pueden utilizarse como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico de la enfermedad. El entendimiento de los procesos moleculares de los trastornos complejos, como el cáncer o las enfermedades autoinmunitarias, contribuirá a instituir políticas de salud más efectivas que repercutan en el bienestar de la población. Asimismo, hará

posible la identificación de nuevos blancos terapéuticos para un mejor diseño de fármacos y la vigilancia de los efectos de una sustancia en el tratamiento de un paciente. <sup>(6)(7)</sup>

## CONCLUSIONES

El desarrollo de un carcinoma escamoso de la mucosa bucal conlleva diferentes alteraciones secuenciales en los mecanismos de regulación celular, cuyo resultado es una proliferación incontrolada. Conocer las alteraciones en las moléculas que intervienen en el control del ciclo celular contribuye a comprender la patogenia de esta enfermedad y a su vez realizar un diagnóstico más precoz, a llevar a cabo una orientación pronóstica con mayor exactitud y a un abordaje terapéutico más adecuado. Los cambios moleculares son más precoces que los cambios histológicos y están fuertemente relacionados con la evolución y el pronóstico de las lesiones orales. Los biomarcadores salivales pueden aportar una información superior sobre la evolución y el pronóstico, tanto en desórdenes potencialmente malignos como en carcinoma escamoso infiltrante.

En la literatura científica no existen estudios específicos que pongan de manifiesto la utilización de biomarcadores proteómicos salivares como método de identificación precoz, ni sus implicaciones como factores pronósticos en desórdenes potencialmente malignos y carcinoma escamoso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Mateo-Sidrón Antón MC, Somacarrera Pérez ML. *Cáncer oral: Genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. Revisión de la literatura. Avances en Odontoestomatología. Vol. 31 - Núm. 4 - 2015.*
- 2- Villa A, Gohel A. *Oral potentially malignant disorders in a large dental population. J Appl Oral Sci [revista en Internet]. 2014 [cited 2015 Sep 01]; 22(6):473-476. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1678-77572014000600473&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572014000600473&lng=en).*
- 3- Martínez-Morales P, et al. *La galectina-9 y sus efectos protectores contra el cáncer. Alianzas y Tendencias-BUAP. 2018, 3 (9): 1-8.*
- 4- Pando-Robles RV; Lanz-Mendoza H. *La importancia de la proteómica en la salud pública. Salud Pública Mex 2009; 51 supl 3: S386-S394.*
- 5- Pérez Brito H de J. *Herramientas invasivas y no invasivas para el diagnóstico de cáncer oral. Revisión de la literatura. Revista ADM 2017; 74 (6): 308-314.*
- 6- Hernández Sánchez ML. Gil García C. *La proteómica, un reto constante en Biomedicina. Encuentros Multidisciplinares. Ed. Universidad Autónoma de Madrid. Vol. 13, Nº 38, 2011, págs. 2-8. ISSN-e 1139-9325.*
- 7- Sacaquispe-Contreras S. *Retos en el cáncer oral. Rev Estomatol Herediana. 2015 Ene-Mar;25(1).*