

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## QUANTIFICAÇÃO DO DNA COLETADO DE LESÕES MALIGNAS E POTENCIALMENTE MALIGNAS DA BOCA: UM ESTUDO PILOTO

**GOMES, Fausto Gueths<sup>1</sup>; NEDEL, Fernanda<sup>2</sup>; OLIVEIRA, Luísa Jardim<sup>2</sup>; TARQUINIO, Sandra Beatriz Chaves<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biologia - UFPel

<sup>2</sup> Acadêmica da Faculdade de Odontologia – UFPel

<sup>3</sup> Departamento de Semiologia e Clínica da Faculdade de Odontologia - UFPel  
Faculdade de Odontologia – Rua Gonçalves Chaves n°457 – CEP 96015-560.  
faustoggomes@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Conforme publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005, o câncer oral é a décima primeira forma de câncer mais frequente no mundo. O consumo excessivo de álcool e o uso de tabaco (incluindo a forma não fumável) são fatores participantes em cerca de 90% das manifestações de câncer oral ao redor do globo. Também nos dados da OMS consta que o índice de mortalidade por câncer oral em homens é maior do que em mulheres, com particularidades específicas entre os diferentes países. No Brasil é a sétima neoplasia mais prevalente nos homens e a nona nas mulheres (estimativas INCA - Brasil, 2008).

Nessa forma de câncer, a progressão clínica que pode vir a culminar no surgimento de um processo invasivo se dá da seguinte forma: hiperplasia benigna, displasia, carcinoma *in situ* e, finalmente, câncer avançado com alterações genéticas acompanhando essas manifestações clínicas (TSANTOULIS *et al.*, 2007).

É importante ressaltar também a presença de condições potencialmente cancerígenas, além de displasia ou hiperplasia, com igual importância no estudo de neoplasias bucais. Leucoplasias e eritroplasias são bastante importantes dentro desse grupo, pois esses quadros clínicos podem disparar a cadeia de progressão tumorigênica citada anteriormente. Portanto, notando-se qualquer uma dessas desordens aconselha-se, se possível, a sua remoção mesmo sem sinais clínicos de malignidade (ISAËC VAN DER WAAL, 2009). O Líquen plano é uma condição patológica oral que está em debate sobre a sua possível evolução a um quadro de displasia, havendo a tendência de acreditar-se que se trata de uma lesão potencialmente maligna, embora seja rara a sua evolução para uma displasia liquenóide e posterior carcinoma espinocelular (HSUE *et al.*, 2007).

Tomando-se como base um workshop da OMS ocorrido em 2005, a terminologia corretamente utilizada para condições como leucoplasia e eritroplasia é de desordens potencialmente malignas, tendo sido abandonada a nomenclatura previamente utilizada de lesões pré-cancerígenas. Esta postura deve-se ao fato de

que essas condições não necessariamente levam a um quadro clínico de tumor oral invasivo (ISAÄC VAN DER WAAL, 2009).

Com isso, muitos estudos foram e estão sendo desenvolvidos com o intuito de avaliar possíveis pontos-chave na progressão tumorigênica em câncer oral, sendo que várias dessas pesquisas utilizam-se do material genético das lesões para fins prognósticos. Assim, este trabalho visa analisar quantitativamente o DNA presente em lesões cancerígenas e potencialmente malignas a partir do uso de escovas citológicas, com posterior espectrofotometria e leitura do material coletado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os pacientes encaminhados ou que procuraram o Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB-UFPel) foram examinados detalhadamente e uma vez identificadas lesões potencialmente malignas ou malignas, os mesmos foram encaminhados para a biópsia. Os pacientes foram informados a respeito do presente estudo e uma vez que se disponibilizaram a participar assinaram termos de consentimento. O presente estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

As amostras foram coletadas no momento da biópsia, no qual o paciente encontrava-se anestesiado, evitando-se assim qualquer desconforto. Foram utilizadas escovas citológicas descartáveis para friccionar as lesões por aproximadamente 30 segundos, realizando-se movimentos de rotação e em direção às regiões anterior e posterior da lesão (vai-e-vem). Foram coletadas duas amostras de DNA diretamente da lesão. Após a coleta, cada escova foi armazenada em um tubo de microcentrífuga contendo solução de lise.

Após 24 horas se procedeu à extração de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits - Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota). As amostras foram acondicionadas em ultra-freezer (-80°C) até o momento da realização da leitura no espectrofotômetro. Para cada uma das amostras foi obtido 20µl de solução e deste volume, 1µl foi retirado e acrescido a 99µl de água Milli-Q para então proceder-se à leitura no espectrofotômetro.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a quantidade de DNA por escova citológica e a sua pureza (260/280), o local da biópsia e o diagnóstico de cada um dos sete pacientes que tiveram o material coletado para o estudo.

**Tabela 1.** Espectrofotometria realizada a partir de amostras coletadas de sete pacientes.

No. PC	Local da biópsia	Diagnóstico	µg/escova	260/280
1	Língua (borda lateral esquerda)	Carcinoma <i>in situ</i>	2.2	1.67
2	Língua (borda lateral esquerda)	Processo inflamatório crônico com ulceração e eosinofilia	1.4	2.37
3	Mucosa labial superior esquerda	Acantose e hiperortoceratose com displasia epitelial de moderada a severa	2.4	2.05
4	Pilar amigdaliano esquerdo	Carcinoma espinocelular	5.0	1.45
5	Mucosa jugal direita	Displasia Liquenóide	5.2	1.51

6	Lábio inferior	Acantose e hiperortoceratose com displasia epitelial discreta	1.8	1.03
7	Mucosa jugal direita	Carcinoma espinocelular	4.4	1.75

Os valores obtidos em todas as leituras condizem com o que é preconizado pelo fabricante, onde a expectativa de DNA por escova citológica deve estar entre 0.2 e 2.0 µg. Ainda, a quantidade obtida é considerada adequada para estudos epidemiológicos (1,0 a 2,0 µg) (Nedel, 2009). Os maiores valores referentes à quantidade total de DNA foram observados nas amostras cinco (5,2 µg/escova) e quatro (5,0 µg/escova), representando displasia liquenóide e carcinoma espinocelular respectivamente. O terceiro maior valor foi o da amostra sete (4,4 µg/escova), um carcinoma espinocelular. Após essas três amostras com média de 4,9 µg/escova, a média das outras quatro diminuiu para aproximadamente 2,0 µg/escova, sem fugir muito desse valor com concentrações extremas de 1,4 e 2,4 µg/escova. A coleta de material a partir de lábio e língua é relativamente mais difícil quando comparada com a coleta em mucosa jugal. Dificuldades decorrentes da coleta como, região de difícil acesso da lesão e/ou em casos de difícil apreensão do tecido (língua) e/ou o tamanhos muito reduzidos de lesão podem interferir na coleta do material e influenciar diretamente na quantidade de DNA obtido. Além disso, as diferenças podem ser atribuídas a variações na descamação da mucosa oral de cada indivíduo (NEDEL et al., 2009).

Entre as três amostras com maior quantidade de DNA, duas eram provenientes de carcinoma espinocelular. Por ser um processo já de tumor maligno, é natural que o carcinoma tenha uma relevante quantidade de material genético por apresentar um alto grau de multiplicação celular. Entre as displasias, a com maior concentração foi à displasia liquenóide, mas o mais interessante entre as amostras com diagnóstico displásico é a comparação entre uma displasia epitelial discreta e uma de moderada a severa. Esta última apresentou maior concentração de DNA. Este fato pode ser explicado por um crescimento de forma mais anormal em comparação com uma displasia discreta. Para ilustrar essa informação é possível se utilizar de pesquisas relacionando a expressão do fator de crescimento de células endoteliais vasculares (VEGF) e o grau de displasia presente na lesão. Pesquisas mostram um aumento significativo da vascularização durante a transição de uma mucosa oral normal, para diferentes graus de displasia, culminando em um quadro de carcinoma invasivo (CARLILE *et al.*, 2001). Essa vascularização foi relacionada com um aumento gradual da presença de VEGF nessas lesões. Porém, existem alguns resultados conflitantes na literatura a respeito da contribuição do VEGF para a displasia e o carcinoma (JOHNSTONE & LOGAN., 2005). Foi sugerido então que a expressão de isoformas de VEGF nos tecidos junto com a reação cruzada de anticorpos pudesse ter interferido nesses resultados (CARLILE *et al.*, 2001; WONG et al., 2003).

Com relação à pureza do DNA (260/280) os valores encontrados foram bastante favoráveis, obtendo-se uma média de 1,69. De acordo com Ahn *et al.* absorvâncias de 1.7-2.0 predizem “DNA limpo”, valores que estão muito próximos aos obtidos no presente estudo. Assim, podemos sugerir que o kit utilizado no estudo apresentou um desempenho adequado.

#### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, observa-se um aumento na quantidade de DNA relacionado ao agravamento do quadro de displasia, podendo o mesmo ser observado em duas amostras. No entanto, estudos com um número maior de amostras devem ser realizado para que observações mais concretas a respeito da quantidade de DNA em lesões malignas e em desordens com potencialidade maligna possam ser afirmadas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NEDEL F., CONDE M.C.M., OLIVEIRA I.O., TARQUINIO S.B.C., DEMARCO F.F. Comparison between DNA obtained from buccal cells of the upper and lower gutter area. **Brazilian Dental Journal** (accepted article 2009).
- AHN S.J., COSTA J., EMANUEL J.R. Picogreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pré- or post- PCR. **Nucleic Acids Research**, V.24, n.13, p.2623-2625, 1996.
- TSANTOULIS P.K., KASTRINAKIS N.G., TOURVAS A.D., LASKARIS G., GORGOULIS V.G. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, v.45, n.43, p.523-534, 2007.
- WAAL I. V. D., Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v.45, n.45, p.317-323, 2009.
- HSUE S.S., WANG W.C., CHEN C.H., LIN C.C., CHEN Y.K., LIN L.M. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow up study based in a Taiwanese hospital. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.38, n.36, p.25-29, 2007.
- CARLILE J., HARADA K., BAILLIE R., MACCLUSKEY M., CHISHOLM D.M. OGDEN G.R., SCHOR S.L., SCHOR A.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.38, n.30, p.449-457, 2001.
- JOHNSTONE S., LOGAN R.M. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.45, n.42, p.337-342, 2006.
- WONG Y.K., LIU C.J., KWAN P.C., CHAO S.Y. Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel-associated oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.67, n.61, p.1257-1262, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, ORAL HEALTH PROGRAME. Global data on incidence of oral cancer. Disponível em: <[http://www.who.int/oral\\_health/publications/oral\\_cancer\\_brochure.pdf](http://www.who.int/oral_health/publications/oral_cancer_brochure.pdf)> acesso em: 20 ago. 2009
- ESTIMATIVAS INCA 2008, Incidência de câncer no Brasil <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> acesso em: 20 ago. 2009