

## **Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA e RNA extraídos de escovas citológicas em lesões potencialmente malignas e cancerígenas da mucosa oral: estudo piloto**

GOMES, Fausto Gueths<sup>1</sup>; NEDEL, Fernanda<sup>2</sup>; CAMPOS, Vinicius Farias<sup>2</sup>;  
SEIXAS, Fabiana Kömmling<sup>2</sup>

TARQUINIO, Sandra Beatriz Chaves<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biologia; <sup>2</sup> Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec);

<sup>3</sup>Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

### **1 INTRODUÇÃO**

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2005, publicou a informação de que o câncer oral é a décima primeira neoplasia mais frequente no mundo, com certas particularidades entre os diferentes países. Por exemplo, na Índia, o câncer oral é a forma de lesão maligna mais presente na população (MEHROTRA *et al.*, 2003). Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA) publicou em 2008, no Brasil, tal forma de câncer é a sétima lesão maligna mais presente em homens e a nona em mulheres.

O câncer oral é a neoplasia mais frequente dentre as lesões malignas da região de cabeça e pescoço, sendo que a maioria destas são carcinomas epiteliais de células escamosas (ACHA *et al.*, 2004). Sabe-se que estes carcinomas podem surgir de lesões previamente identificáveis, porém não invasivas como, por exemplo, leucoplasia (WAAL, 2009) e líquen plano (HSUE *et al.*, 2007).

Exames clínicos e estudos histopatológicos de material biopsiado ainda são os procedimentos-padrão que são utilizados visando o diagnóstico de lesões cancerígenas e/ou potencialmente malignas da cavidade oral (ACHA *et al.*, 2004; DRIEMEL *et al.*, 2007). A biópsia de mucosa oral é uma técnica invasiva, com implicações cirúrgicas e que pode causar danos aos pacientes. Além de apresentar limitações como, por exemplo, em lesões relativamente grandes onde o local a ser biopsiado pode não ser representativo da lesão acarretando em erros ou dificuldades no diagnóstico e possivelmente na terapia do paciente (EPSTEIN *et al.*, 2002).

A citologia exfoliativa é uma técnica na qual há um crescente interesse em utilizá-la como uma ferramenta de auxílio ao diagnóstico de lesões cancerígenas da mucosa oral, além do fato dessa técnica propiciar a obtenção de material celular para futuras análises moleculares (DRIEMEL *et al.*, 2007). Por ser uma técnica pouco invasiva, a citologia exfoliativa é bem aceita pelo paciente e conseqüentemente pode vir a se tornar uma forma eficaz de diagnóstico de lesões malignas em estágios iniciais, porém ainda não há uma especificidade ideal para essa forma de prática (MEHROTRA *et al.*, 2006).

O presente trabalho tem como finalidade avaliar quantitativo e qualitativamente o DNA e RNA obtidos, com escovas citológicas, de lesões pré-malignas e malignas da mucosa oral.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O material foi coletado a partir de usuários do centro de diagnóstico das Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia, UFPEL. As células foram obtidas através do uso de escovas citológicas, com fricção no local da lesão por aproximadamente trinta segundos, e coletas individualizadas para DNA (n=20) e RNA (n=3). Após o material ter sido coletado, as escovas foram colocadas em um tubo de microcentrífuga.

Para a extração de DNA, as escovas foram postas em tubos contendo solução de lise celular, sendo que as próximas etapas da extração ocorreram conforme instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits – Genra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota). O RNA celular foi obtido através da utilização de TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). Visando análises quantitativas, as amostras foram avaliadas através do uso de fluorômetro (Qubit fluorometer, Invitrogen).

Qualitativamente, o DNA foi avaliado através da genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene da p53 utilizando-se PCR-RFLP. E o RNA foi avaliado por meio da expressão de GAPDH, utilizando para isso o PCR em tempo real (Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master Kit, Roche; LightCycler<sup>®</sup> 480 Real Time PCR System, Roche), onde o cDNA foi preparado através do kit Superscript II first-strand cDNA synthesis, Invitrogen.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quantitativamente, a média de concentração de DNA foi de (0,97 µg/escova) em leucoplasia, (0,65 µg/escova) em líquen plano e (0,62 µg/escova) em carcinoma espinocelular. Segundo Saftlas e colaboradores (2004), a coleta de células epiteliais bucais tem fornecido, em média, de 1 a 7,5 µg/escova. Conforme Nedel e colaboradores (2009), a concentração de DNA considerada adequada para estudos epidemiológicos é entre 1 e 2 µg/escova. O fabricante (Puregene DNA Tissue Kits – Genra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) preconiza, em extração de DNA, uma quantidade entre 0,2 e 2 µg/escova, portanto, mesmo sendo o valores encontrados não presentes entre o intervalo considerado ideal para estudos epidemiológicos, a concentração obtida no experimento está bem estabelecida entre os valores previstos pelo fabricante e suficientes para o uso em análises moleculares a partir desse material. Com relação ao RNA, sua quantidade, em carcinoma espinocelular, foi de 0,285 µg/escova.

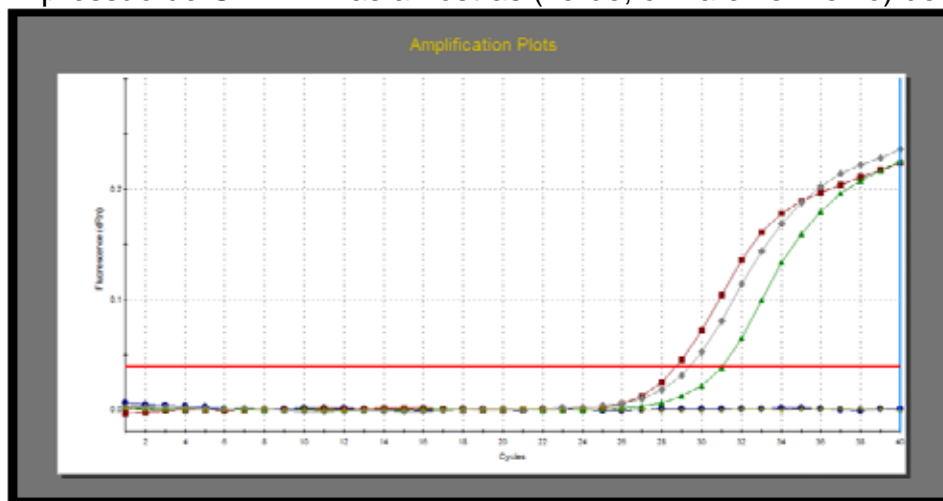
Qualitativamente, todas as amostras, tanto de DNA quanto de RNA, apresentaram amplificação dos fragmentos estudados (Figura 1 e 2). O gene GAPDH é considerado um gene controle de qualidade de DNA e RNA. Ele

codifica uma enzima chamada gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a qual participa do metabolismo de glicose na respiração celular. Portanto, é utilizado como um gene controle por apresentar uma expressão constante no interior da célula sob diferentes condições experimentais (ZHONG & SIMONS, 1999). Além do fato de que evidências apontam ao GAPDH como participante no processo de carcinogênese (COLELL *et al.*, 2009). A presença do gene TP53 e da integridade de seus fragmentos é essencial ao estudo do material genético proveniente de células de lesões potencialmente malignas e/ou malignas da boca. Sabe-se que mutações existentes nesse gene significam elevados riscos de surgimento de tais lesões (MISRA *et al.*, 2009; NYLANDER *et al.*, 2000). Sendo, portanto, relevante a análise de ambos os genes para se avaliar a qualidade do material genético obtido a partir de lesões potencialmente malignas e malignas da cavidade oral.

Figura 1: Genótipos do polimorfismo do códon 72 do gene da p53



Figura 2: Expressão de GAPDH nas amostras (verde, cinza e vermelho) de RNA.



#### 4 CONCLUSÕES

É possível inferir, que as técnicas utilizadas tanto na obtenção das células epiteliais da mucosa oral dos pacientes quanto de extração proporcionam DNA e RNA de boas quantidade e qualidade.

#### 5 REFERÊNCIAS

- ACHA, A., RUESGA, M.T., RODRÍGUEZ, M.J., PANCORBO, M.A.M., AGUIRRE, J.M., Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** v. 10, p. 95-102, 2005.
- COLELL, A., GREEN, D.R., RICCI, J.E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. **Cell Death Differ.** n. 16, v. 12, p. 1573-1581, 2009.
- DRIEMEL, O., KUNKEL, M., HULLMAN, M., EGGELING, F., URS, M.R., KOSMEHL, H., REICHERT, T.E. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. **JDDG.** n. 12, v.5, p. 1095-1100, 2007.
- EPSTEIN, J.B., ZHANG, L., ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **Can Dent Assoc.** n. 68, v. 10, p. 617-621, 2002.
- ESTIMATIVAS INCA 2008, Incidência de câncer no Brasil  
<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> acesso em: 20 ago. 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. **J Oral Pathol Med.** n. 36, p. 25-29, 2007.
- MEHROTRA, R., GUPTA, A., SINGH, M., IBRAHIM, R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant lesions. **Mol Cancer.** v. 5, p. 5-11, 2006.
- MEHROTRA, R., SINGH, M., KUMAR, D., PANDEY, A.N., GUPTA, R.K., SINHA, U.S. Age specific incidence rate and pathological spectrum of oral cancer in Allahabad. **Indian Journal of Medical Sciences.** n. 9, v. 57, p. 400-404, 2003.
- MISRA, C., MAJUMDER, M., BAJAJ, S., GHOSH, S., ROY, B., ROYCHOUDHURY, S. Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 Loci modulate the risk of tobacco associated leukoplakia and oral cancer. **Molecular Carcinogenesis.** n. 48, p. 790-800, 2009.
- NEDEL, F., CONDE, M.C., OLIVEIRA, L.O., TARQUINIO, S.B., DEMARCO, F.F. Comparison between DNA obtained from buccal cells of the upper and lower gutter area. **Braz Dent J.** n. 20, v.4, p. 275-278, 2009.
- NYLANDER, K., DABELSTEEN, E., HALL, P. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Journal of Oral Pathology & Medicine.** v. 29, n. 9, p. 413-425, 2000.
- SAFTLAS, A.F., WALDSCHMIDT, M., LONGSDEN-SACKET, N., TRICHE, E., FIELD, E. Optimizing buccal cell DNA yields in mothers and infants for human leukocyte antigen genotyping. **American Journal of Epidemiology.** n. 160, v.1, p. 77-84, 2004.
- WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology.** n. 45, p. 317-323, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, ORAL HEALTH PROGRAMME. 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
- ZHONG, H., SIMONS, J.W. Direct Comparison of GAPDH, b-Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** n. 259, p. 523-526, 1999.

