

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO DNA DE LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA

GOMES, Fausto Gueths¹; NEDEL, Fernanda³; ANTONELLO, Guilherme Demarco²; SEIXAS, Fabiana Kömmling³; TARQUINIO, Sandra Beatriz Chaves²

¹Faculdade de Biologia, Universidade Federal de Pelotas

²Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas

³Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

faustogomes@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das maiores causas de morte, contabilizando um total aproximado de 7,6 milhões (13%) de óbitos no ano de 2008, sendo destes, aproximadamente, 4.222.842 para homens e 3.349.248 para mulheres. Para o Brasil, foi estimado um total de 489.270 novos casos de câncer em 2010, sendo 236.240 (aproximadamente 48%) e 253.030 (aproximadamente 52%) para homens e mulheres, respectivamente. Com relação ao câncer oral, 10.330 (4,37%) novos casos dessa forma de neoplasia foram estimados para homens e 3.790 (1,5%) para mulheres no Brasil em 2010 (Estimativas INCA, 2010).

Clinicamente, lesões potencialmente malignas e malignas da boca podem apresentar-se na forma de leucoplasias, eritroplasias, leucoeritroplasias, (WAAL, 2009), ou ainda, segundo alguns autores, como líquen plano (sendo esta uma condição que vem sendo discutida na literatura, com relação ao seu real potencial de malignização)(GONZALES-MOLES *et al.*, 2008). Histopatologicamente, diferentes graus de displasias epiteliais (acompanhados ou não de hiperqueratose e/ou acantose), carcinoma *in situ* ou mesmo o carcinoma espinocelular invasivo podem corresponder podem se manifestar com o mesmo aspecto clínico. O líquen plano permanece como um diagnóstico a parte, tanto clínica quanto histopatologicamente.

Conforme o paciente apresente suspeita clínica de alguma das lesões acima citadas, o procedimento que deve ser adotado é a realização de uma biópsia do local lesionado, para posterior confirmação de diagnóstico através de análises histopatológicas. Sendo a biópsia uma técnica com implicações cirúrgicas, eventualmente algumas sequelas podem decorrer desse procedimento (DONNELL *et al.*, 2008). Por tais razões, é importante o desenvolvimento de análises moleculares que possam favorecer o diagnóstico, auxiliando o método de biópsia. O intuito deste trabalho é avaliar a quantidade e qualidade do material genético obtido a partir da coleta de células de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca de pacientes usuários do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB), da Faculdade de Odontologia – UFPEL.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O material foi coletado a partir de usuários do CDDB da Faculdade de Odontologia da UFPEL. As células foram obtidas através do uso de escovas citológicas, com fricção no local da lesão por aproximadamente trinta segundos. Para cada coleta referente ao material genético lesional, foi obtido também material proveniente de mucosa normal de cada indivíduo, num sítio distante da alteração diagnosticada. As escovas foram então colocadas em um tubo de microcentrífuga contendo solução de lise celular. As próximas etapas da extração ocorreram conforme instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits – Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota). Visando análises quantitativas, as amostras foram avaliadas através do equipamento Nanovue (GE Healthcare).

Qualitativamente, o DNA foi avaliado através da genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene da p53 utilizando-se PCR-RFLP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados foram categorizados em grupos, onde os diagnósticos histopatológicos foram agrupados conforme exposto na Tabela 1. Os grupos são: 1(carcinoma espinocelular), 2(líquen plano), 3(displasias epiteliais moderada e severa ou de moderada a severa) e 4(acantose, hiperqueratose e/ou displasia epitelial discreta).

Tabela 1- Dados quantitativos de DNA encontrados a partir das coletas

Grupo diagnóstico	Número de casos por grupo	Média DNA lesão (µg/escova)	DP DNA lesão (µg/escova)	Média DNA controle (µg/escova)	DP DNA controle(µg/escova)
1	15	10,11	12,12	9,40	6,48
2	13	2,39	2,69	4,80	3,37
3	11	1,42	1,36	3,51	3,55
4	13	0,85	1,06	7,07	8,84

Todas as amostras utilizadas no presente trabalho (52), tanto de tecidos lesionados quanto de sadios, foram amplificadas e genotipadas com sucesso. A Figura 1 exemplifica um desses experimentos.

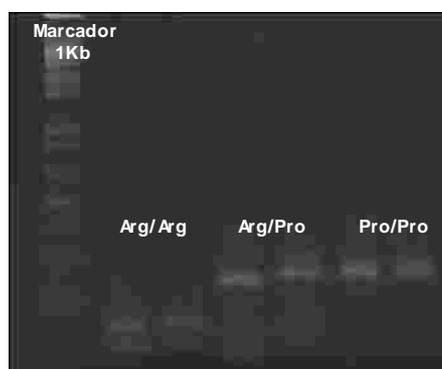


Figura 1- Genotipagem do códon 72, gene da p53

Até o presente momento são escassos os estudos que abordem as análises quantitativas de DNA proveniente de lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular de boca. Assim, não há um parâmetro na literatura para fins de comparação entre os dados do nosso estudo com outros que tenham realizado análise semelhante. Contudo, podem ser feitas algumas especulações sobre alguns resultados do presente estudo. Por exemplo, nos grupos 3 e 4, referentes, respectivamente, aos casos com diagnósticos histopatológicos de displasias moderadas/severas e acantose, hiperqueratose e/ou displasia epitelial discreta, as amostras têm como correspondente diagnóstico clínico mais frequente as leucoplasias, sendo observado um espessamento da camada de queratina, motivo este pelo qual, provavelmente, seja mais difícil de ser obtido DNA viável a partir das células coletadas dessa forma de lesão. Além disso, características próprias de cada paciente, como salivação e descamação do epitélio da mucosa bucal também podem interferir na quantidade de DNA extraído.

Com relação à qualidade do material, muitos estudos acabam mostrando de forma indireta, em seus resultados como as suas amostras se comportaram nos experimentos, por mais que não mencionem obrigatoriamente o termo “análise qualitativa de DNA” (ex: LOW *et al.*, 2000 ;TSUI *et al.*, 2009).

Em tecidos saudáveis, há um maior aporte de estudos relacionando quantidade e qualidade de material obtido a partir de diferentes métodos de coleta, principalmente para análises de cunho epidemiológico. King e colaboradores (2002) perceberam haver diferenças estatisticamente não significativas entre as quantidades de DNA de amostras coletadas por enxágue bucal e escovas citológicas (médias de 15,8 e 12,0µg, respectivamente). A qualidade desse material genético, entretanto, variou bastante, visto que 81% das amostras provenientes do enxágue bucal foram amplificadas por PCR com sucesso, enquanto nenhuma amostra de escova citológica teve o mesmo resultado (KING *et al.*, 2002). Mulot e colaboradores (2005) observaram uma média menor na quantidade de DNA em ambos os métodos (3,5µg por escova e 4µg por enxágue bucal). Foi mostrado, entretanto, que 98,3% (59 de 60 amostras) amplificaram fragmentos de 481 pares de bases (bp) via PCR (MULOT *et al.*, 2005). Diferenças entre as metodologias de coleta entre os estudos, quer sejam as referentes ao método do enxágue bucal ou as da escova citológica podem ser explicadas pelas variações nas técnicas e no tempo de obtenção das amostras. Nessa mesma linha de pensamento, Nedel e colaboradores (2009) observaram diferenças entre as médias quantitativas de DNA presente no fundo de sulco superior (12,2 µg) e inferior (9,4 µg), quando o próprio indivíduo realizava a coleta. Os autores acreditam que tal diferença ocorra em função da maior disposição de saliva no fundo de sulco inferior em relação ao superior (força gravitacional), contribuindo para remoção contínua das células epiteliais localizadas no neste sítio. Ainda o acúmulo de saliva pode reduzir o atrito entre a mucosa jugal e gengival diminuindo o processo de descamação. Com relação às análises qualitativas do material extraído utilizando a eletroforese em gel de agarose e observação do padrão de bandas, como NEDEL *et al.* (2009), também obtivemos resultados exitosos, o que reforça a indicação dessa técnica não invasiva e de simples execução para estudos de material genético obtidos a partir de amostras bucais.

4 CONCLUSÃO

Apesar das variações quantitativas observadas entre os grupos, a metodologia utilizada na coleta e extração de DNA proveniente das lesões estudadas e de seus controles saudáveis, demonstrou quantidade e qualidade de material genético passível de ser utilizado em posteriores análises moleculares.

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.
- DONNELL A., JIN S., ZAVRAS A.I. Delay in the Diagnosis of Oral Cancer. **The Journal of Stomatological Investigation**. v. 2, p. 15-26, 2008.
- ESTIMATIVAS 2010, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>> acesso em: 29 Jul. 2011.
- GLOBOCAN 2008, FAST STATS. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>> acesso em: 29 Jul. 2011.
- GONZALES-MOLES M.A., SCULLY C., GIL-MONTOYA J.A. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. **Oral Diseases**. v. 14, p. 229-243, 2008.
- KING I.B., SATIA-ABOUTA J., THORNQUIST M.D., BIGLER J., PATTERSON R.E., KRISTAL A.R., SHATTUCK A.L., POTTER J.D, WHITE E. Buccal Cell DNA Yield, Quality, and Collection Costs: Comparison of Methods for Large-scale Studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers**. v.11, p. 1130-1133, 2002.
- LOW E.O., JONES A.M., GIBBINS J.R., WALKER D.M. Analysis of the amplification refractory mutation allele-specific polymerase chain reaction system for sensitive and specific detection of p53 mutations in DNA. **Journal of Pathology**. v. 190, p. 512-515, 2000.
- MULOT C., STÜCKER I., CLAVEL J., BEAUNE P., LORIOT M.A. Collection of Human Genomic DNA From Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 3, p. 291-296, 2005.
- 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. **Braz Dent J**. v. 20, n. 4, p. 275-278, 2009.
- TSUI I.F.L., POH C.F., GARNIS C., ROSIN M.P., ZHANG L., LAM W.L. Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias. **Int J. Cancer**. v. 125, p. 2219–2228, 2009.
- WAAL, ISAÄC VAN DER. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**. v. 45, p. 317-323, 2009.