

## **AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR 936 C/T EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES**

**PINTO, Júlia<sup>1</sup>; RODRIGUES, Luiza Paulsen<sup>1</sup>; NEDEL, Fernanda<sup>1</sup>; SEIXAS, Fabiana Kömmling<sup>1</sup>; TARQUINIO, Sandra Beatriz Chaves<sup>2</sup>;**

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas.

<sup>2</sup>Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

juhsallaberry@gmail.com

### **1 INTRODUÇÃO**

Entre os casos de tumores malignos da cavidade bucal os carcinomas espinocelulares (CECs) são os mais encontrados, apresentando uma frequência de 90% (Hamana *et al.*, 2005, Laskaris, 2004). Estudos epidemiológicos sugerem que a etiologia do câncer oral é multifatorial (Kuroda *et al.*, 2007), atuando tanto fatores extrínsecos, onde são incluídos agentes externos, como fatores intrínsecos que incluem estados sistêmicos ou generalizados (Brad *et al.*, 2008). O estabelecimento do CEC pode ser um processo gradual consistindo de múltiplas etapas, onde ocorre um aumento da instabilidade genética. Este progresso, em parte dos casos, consiste primeiramente no aparecimento de lesões hiperplásicas, que evoluem para displasias, para carcinomas *in situ* e por fim chegam ao câncer bucal invasivo (Khan *et al.*, 2009; Tsantoulis *et al.*, 2007).

Sabe-se que durante o desenvolvimento do tumor a angiogênese exerce um papel fundamental. Os vasos sanguíneos neoformados são necessários para permitir a disponibilidade adequada de oxigênio e nutrientes ao tumor viabilizando, assim, o seu crescimento contínuo (Cavazzola, 2009). Dentre os diversos fatores envolvidos na angiogênese tumoral, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o mais estudado, onde diversos estudos demonstram a sua importância na angiogênese do câncer (Yapjakis *et al.*, 2007).

O VEGF é uma glicoproteína de sinalização com 46kDA que tem como principais funções estimular a formação de vasos sanguíneos, promover a regeneração endotelial e aumentar a permeabilidade vascular (Matsuo *et al.*, 2004). Esta glicoproteína é secretada pelas células tumorais, onde o processo é regulado por vários fatores como, a hipóxia, fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas extracelulares (Cavazzola, 2009), sendo regulado por moléculas pró e anti-angiogênicas (Cheng, 2008).

No entanto, existem algumas discordâncias quando se trata da expressão do VEGF e a angiogênese relacionados a carcinomas. Uma possível explicação é o fato de que não necessariamente o VEGF em geral deva ser estudado, mas sim os polimorfismos do gene VEGF que modificam sua produção e atividade (Cheng, 2008). Sabe-se que os polimorfismos são alterações na sequência de DNA que podem adicionar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição, e estão associadas a alterações em uma base nucleotídica apenas. Essas variações podem ocorrer em sequências não codificadoras do gene, onde provavelmente não acarretaram em efeitos na sua função. Em outros casos a presença do polimorfismo pode ser em sequências codificadoras levando a produção de proteínas defeituosas (Lodish *et al.*, 2002).

O gene VEGF está localizado no cromossomo 6p21.3 e o splicing alternativo rende isoformas com 121, 145, 165, 183, 189, ou 206 aminoácidos. Mais de 30 polimorfismos do gene foram identificados e correlacionados com os níveis plasmáticos de VEGF (Cheng, 2008). Entre eles o 936C/T, o qual se encontra na região 3' e tem grande representatividade, visto que diversas pesquisas genéticas indicam uma relação entre este polimorfismo e alguns tipos de câncer, especialmente carcinoma de mama e pulmão (Lee *et al.* 2005; Kataoka *et al.* 2006).

Portanto, embora alguns estudos já tenham relacionado o polimorfismo do VEGF 936C/T com alguns tipos de tumores, os resultados obtidos até então são conflitantes. Isso ocorre, em parte, devido as diferenças genéticas populacionais, logo a conclusão do seu efeito não está elucidado tornando-se necessário a realização de mais pesquisas, especialmente locais, sobre o tema. Assim, este estudo tem como objetivo investigar a correlação entre o polimorfismo do VEGF 936 C/T em lesões bucais de carcinoma espinocelular.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A população-alvo do estudo compreende os usuários do Serviço de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, com idade superior ou igual a 45 anos, portadores de lesões de mucosa bucal com suspeita de malignidade, a qual foi confirmada por exame histopatológico de rotina. No total foram utilizados dois grupos onde um possuía 24 pacientes com lesões de CEC de boca, e um grupo controle com 21 indivíduos, que não eram faziam uso de bebidas alcoólicas e fumo.

As amostras foram coletas utilizando escovas citológicas descartáveis, com os pacientes previamente anestesiados, sendo friccionadas as lesões por aproximadamente 30 segundos, movimentando-as ao longo da porção anterior em direção aos dois lados da cavidade bucal. Após a coleta, as escovas citológicas destinadas à análise de DNA foram imediatamente introduzidas em um tubo de microcentrifuga contendo solução de lise celular, dando-se seguimento à reação após três horas. As amostras foram submetidas ao isolamento de DNA, procedendo-se segundo instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits - Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota).

A detecção molecular do polimorfismo do VEGF 936 C/T foi realizada através da restrição do fragmento de digestão, para isto houve a combinação de dois processos, PCR e digestão com a amplificação através da endonuclease NlaIII seguido por eletroforese em gel de análise. A reação em cadeia (PCR) foi realizada de acordo com um método previamente descrito utilizando a TaqGold polimerase e as seguintes seqüências de primer forward 5'-AAGGAAGAGGAGACTCTGCGC-3' e primer reverse 3'-TATGTGGGTGGGTGTGTCTACAGG-5'. Essa solução de 15µL foi composta por: DNA template (0,6 µL), Primer forward (0,3 µL), Primer reverse (0,3 µL), TaqGold polimerase (0,06 µL), Magnésio (0,9 µL), Nucleotídeos (1,2 µL), Solução catalizadora (1,5 µL), Água destilada (10,14 µL).

O tubo com a reação foi inserido no termociclador durante dez minutos seguindo os ciclos a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	12 min
30	95°C	30 seg

	57°C	40 seg
	72°C	30 seg
1	72°C	10 min

Assim, 198 pares de bases (pb) foram amplificados e posteriormente analisados em gel de agarose 2,0% e gel red. Após, os fragmentos resultantes da PCR passaram por uma digestão com a enzima endonuclease NlaIII em uma incubadora a 37°C over night. Esta enzima fez com que o alelo C permanecesse sem cortes contendo 198pb, enquanto o alelo T foi clivado em dois fragmentos de 114pb e 84pb. Estes fragmentos foram observados em gel de agarose 3,0%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A associação dos genótipos observados para o polimorfismo do VEGF 936C/T em pacientes com CEC de boca e controles pode ser observados na Tabela 1. Encontrou-se para o grupo de pacientes diagnóticos com CEC as seguintes frequências por genótipo: 70,8% (C/C), 12,5% (C/T) e 16,7% (T/T). Já no grupo controle os valores encontrados foram: 76,2% (C/C), 14,3 (C/T) e 9,5 (T/T). A comparação dos genótipos para o polimorfismo VEGF 936C/T entre ambos os grupos (caso e controle) não mostrou diferença estatística significativa ( $p=0.779$ ). Porém, em ambos os grupos pode ser analisada a maior prevalência do genótipo C/C com valores bastante significativos.

Tabela 1 - Associação entre o genótipo VEGF polimorfismo 936C/T em pacientes com carcinomas espinocelulares (CECs) e grupo controle

Polimorfismo do VEGF 936 C/T	Casos (n = 24)		Controles (n = 21)		Valor de P
	Número	(%)	Número	(%)	
C/C	17	(70.8)	16	(76.2)	0.779
C/T	3	(12.5)	3	(14.3)	
T/T	4	(16.7)	2	(9.5)	

Yapjakis e colaboradores, utilizando-se de enzimas de restrição, analisaram o mesmo polimorfismo em pacientes alemães e gregos, onde observaram a associação entre a baixa frequência do alelo T com o aumento do risco do CEC. Apesar da ausência de diferença estatística significativa entre os grupos caso e controle, observa-se uma maior prevalência do genótipo C/C entre os pacientes com CEC e menor prevalência do alelo T. No entanto, torna-se necessário aumentar o número amostral para que correlações mais relevantes possam ser realizadas.

### 4 CONCLUSÃO

Por fim não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos caso e controle, considerando-se os genótipos para o polimorfismo VEGF 936 C/T. Entretanto, observou-se uma maior prevalência do genótipo C/C em ambos. Além disso, pode-se também observar a necessidade da realização de mais

pesquisas sobre o tema para, assim, esclarecer as muitas divergências encontradas até então.

## 5 REFERÊNCIAS

CHENG, Chieh; et al. Vascular endothelial growth factor 936 C/T polymorphism is associated with vascular invasion in oral squamous cell carcinoma. **Oral and Maxillofacil Pathology**, v.106, n.1, 2008.

DIAO, Lan; YO, Xiao; GAO, Yu; LI, Yan; LIU, Hai; LIU, Li; ZHOU, Rong; WANG, Na; WU, Li; WANG, Shi. Association of VEGF genetic polymorphisms with the clinical characteristics of non-Hodgkin's lymphoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, China, v. 135, 1473–1481, 2009.

HAMANA, K. et al. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, 92, 2181-4, 2005.

LEE, Su. Et al. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Risk of Primary Lung Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Coréia, v.14, 571-575, 2005.

LODISH, H.; et al. **Análise genética em biologia molecular**. In: Nader HB, editor. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

K.D. STEFFENSEN, K.; WALDSTROM, M.; BRANDSLUND I.; JAKOBSEN, A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. **Elsevier**, Dinamarca, v. 117, 109-116, 2009.

ZHOU, Yong; ZHUANG, Wen; WU, Xiaoting. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Gene Polymorphisms and Gastric Cancer Risk in a Chinese Han Population. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, 184-188, 2011.

WU, Xianglei; LI, Dongqing; LIU, Zhisu; WAN, Xinyue; WU, Yunhua; JIANG, Congqin; QIAN, Qian. Vascular endothelial growth factor 1498C/T, 936C/T polymorphisms associated with increased risk of colorectal adenoma: a Chinese case–control study. **Mol Biol Rep**, China, v. 38, 1949-1955, 2010.