

AVALIAÇÃO DO RISCO ONCOGÊNICO DO SNP *MDM2 T309G* EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE BOCA

PINTO, JÚLIA¹; RODRIGUES, FERNANDA¹; COLLARES, TIAGO¹; KÖMMLING,
FABIANA¹; NEDEL, FERNANDA²; TARQUÍNIO, SANDRA³

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas –
juhsallaberry@gmail.com

²Universidade Católica de Pelotas – *fernanda.nedel@gmail.com*

³Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas – *sbtarquinio@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O câncer de boca é uma das dez neoplasias mais comuns em todo o mundo, apresentando índices de frequência entre 3 e 5% com relação as demais, se tornando importante problema de saúde pública. 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). O estabelecimento do CEC na maioria das vezes consiste em um processo gradual de múltiplas etapas, onde ocorre um aumento da instabilidade genética, em que na maioria dos casos inicialmente ocorre o aparecimento de lesões hiperplásicas, que evoluem para displasias, para carcinomas *in situ* e por fim chegam ao câncer bucal invasivo (Khan *et al.*, 2009).

Conforme o INCA – Ministério da Saúde (2008), ocorrem lesões hiperplásicas em casos onde o aumento do número de células de um órgão ou tecido é localizado e autolimitado, porém estas encontram-se em estado normal tanto na sua forma quanto ao realizar sua função. Já o termo displasia é utilizado para conceituar diversos processos patológicos. Em casos de lesão pré-neoplásicas defini-se como displasia situações em que ocorre proliferação celular caracterizada pela perda de polaridade, alterações de forma e tamanho como também a presença freqüente de mitoses.

A diferença encontrada entre as expressões carcinoma *in situ* e invasor é que na primeira a neoplasia se desenvolve no tecido de origem sem ultrapassar a membrana basal, e na segunda verifica-se invasão mais profunda em tecidos adjacentes. Além disso, algumas lesões orais são consideradas de extrema importância para o carcinoma de boca, entre elas o líquen plano. Esta é uma doença dermatológica que frequentemente afeta a mucosa oral, de origem inflamatória e de etiologia desconhecida. Em 1% a 4% dos casos ocorre malignização, mas a forma pelo qual ocorre este processo ainda é desconhecida (Anand *et al.*, 2008).

Apesar da causa desconhecida 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. Segundo Choi & Myers (2008), um dos eventos essenciais para o estabelecimento do carcinoma é a predisposição genética em conjunto com outros fatores. Neste sentido o polimorfismo *MDM2 T309G* vem sendo sugerido como um fator de risco para uma série de tipos de câncer (Liu *et al.*, 2007).

As proteínas MDM2 e MDM4 são reguladoras chave da p53, já demonstrou-se que estas proteínas atuam como inibidoras essenciais e específicas de p53 (Hoffman *et al.*, 2014), esta por sua vez, possuem importante papel como supressora tumoral no controle do ciclo celular e apoptose, atuando de maneira efetiva na resposta ao estresse celular. Mutações neste gene são observadas em

mais de 50 tipos de tumores. Porém, estudos atuais demonstram controvérsias em relação a variação na incidência de expressão do MDM2 em CECs, e outros carcinomas de cabeça e pescoço (CECPs). A alta expressão de MDM2, foi identificada em uma percentagem elevada (69-78%) de casos de CEC. No entanto, outros estudos demonstram a frequente (90%) perda de expressão MDM2 em CECPs (Liu et al., 2007).

Assim, ainda que existam poucos estudos relacionando o polimorfismo do MDM2 com alguns tipos de tumores, os resultados obtidos até então são conflitantes. Isso se deve, em parte, devido às 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 *MDM2 T309G* em lesões malignas e potencialmente malignas avaliando o risco oncogênico deste SNP em uma população da região sul do Brasil.

2. METODOLOGIA

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 143 pacientes com lesões de boca.

As amostras foram coletadas 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 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 da *MDM2 T309G* 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 *MspA1I* 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'-CGCGGGAGTTCAGGGTAAAG-3' e primer reverse 5'-CTGAGTCAACCTGCCCACTG-3'. Essa solução de 25µL foi composta por: DNA template (0,6 µL), Primer forward (0,3 µL), Primer reverse (0,3 µL), TaqGold polimerase (0,06 µL), Magnésio (0,9µL), 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	94°C	10 min
35	94°C	30 seg
	62°C	30 seg
	72°C	1 seg
	72°C	10 min

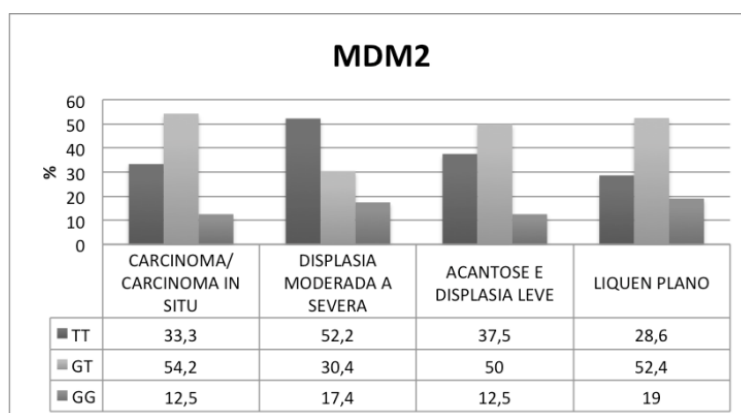
Após, os fragmentos resultantes da PCR passaram por uma digestão com a enzima *MspA1I* em uma encubadora a 37°C over night. Esta enzima gerou fragmentos de 157pb correspondente ao genótipo T/T; três fragmentos de 157pb, 109pb e 48pb correspondente ao genótipo T/G; e dois fragmentos de 109pb e 48pb correspondente ao genótipo G/G. Estes fragmentos foram observados em gel de agarose 3,0%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genótipos observados para o polimorfismo do *MDM2 T309G* em pacientes com CEC de boca pode ser analisado na Figura 1. Através da média geral dos resultados encontrou-se para o grupo de pacientes diagnosticados com lesões de boca as seguintes frequências por genótipo: 15,3% (G/G), 46,7% (G/T) e 39,7% (T/T). Estas foram agrupadas em carcinoma/carcinoma *in situ*, displasia moderada a severa, acantose e displasia leve e líquen plano.

Conforme a Figura 1 os genótipos correspondentes a pacientes diagnosticados com líquen plano estudados foram de: 19% (G/G), 52,4% (G/T) e 28,6% (T/T). Já para acantose e displasia leve observou-se: 12,5% (G/G), 50% (G/T) e 37,5% (T/T) e displasia moderado a severa 17,4% (G/G), 30,4% (G/T) e 52,2% (T/T). Por fim, em pacientes apresentando carcinoma/carcinoma *in situ* verificou-se: 12,5% (G/G), 54,2% (G/T) e 33,3% (T/T).

Figura1 - Associação entre o genótipo *MDM2* polimorfismo *T309G* em pacientes com carcinomas espinocelulares (CECs)



Conforme estes dados pode-se analisar que o genótipo G/T encontra-se mais frequente em quase todos pacientes analisados, porém este fato não se confirma em casos diagnosticados com displasia moderada a severa em que se verifica uma maior percentagem do genótipo T/T. Além disso, em ambos os grupos destaca-se a menor prevalência do genótipo G/G apresentando valores significativamente baixos, sugerindo que possivelmente pessoas que possuem este genótipo podem possuir uma menor probabilidade de desenvolver as patologias de boca em questão. Porém, para confirmar e refinar os dados apresentados neste estudo se faz necessário durante o prosseguimento das análises que haja umaumento do número amostral e comparações com grupo controle visando que as correlações aqui citadas sejam efetivamente confirmadas.

CONCLUSÕES

Portanto, neste estudo observou-se uma maior prevalência do genótipo G/T, com exceção das displasias moderadas a severa, onde o genótipo mais frequente foi o T/T, nas lesões malignas e potencialmente malignas. Ainda o genótipo G/G mostrou-se o menos prevalente em todas as lesões estudadas. Todavia, verifica-se a necessidade da continuidade das análises em outros aspectos e a realização de mais pesquisas visando este assunto para, assim, esclarecer as divergências encontradas até então sobre o tema.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANDA, P.; KUNNUMAKKARA, A.B; SUNDARAN. B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm.Res.**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

CHOI, S. & MYERS, J.N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **J Dent Res**, 87, 14-32, 2008.

HAMANA, K., UZAWA, K., OGAWARA, K., SHIIBA, M., BUKAWA, H., YOKOE, H. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, 92, 2181-4, 2005.

HOFFMAN, Y; PIELPEN, Y; OREN, M. MicroRNAs and Alu elements in the p53–Mdm2–Mdm4 regulatory network. **Journal of Molecular Cell Biology**, 6, 192–197, 2014.

KURODA, Y., NAKAO, H., IKEMURA, K. & KATOH. Association between the TP53 codon72 polymorphism and oral cancer risk and prognosis. **Oral Oncol**, 43, 1043-8, 2007.

LASKARIS, G. Atlas Colorido de doenças de boca, 3ª edição, Porto Alegre: **Artmed** 2004.

LIU, C.; Chang, C.; CHAO, S. The molecular markers for prognostic evaluation of areca-associated buccal squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 33: 327–34, 2004.