METILAÇÃO DO PROMOTOR DE *RASSF1A*: BIOMARCADOR PROMISSOR PARA O DIAGNÓSTICO DE CANCRO ORAL

Beatriz de Correia e Caldas*, Tiago Brito Rocha**, Rui Henrique**, Carmen Jerónimo**, Raquel Cavadinha*

*FMDUP
**Centro de Investigação do IPO Porto

beatrizccaldas@hotmail.com

INTRODUÇÃO

> 90%[1] — Carcinoma de Células Escamosas[1]

5 anos após diagnóstico:

- 20% taxa de sobrevivência[2]
- 80% se detetado precocemente[2]

Médicos Dentistas com papel fundamental[4].

Protocolos eficientes de deteção precoce[3]

Metilação do ADN

- Observado em tumores → possíveis biomarcadores[4]
- Hipermetilação do promotor → evento crucial na carcinogénese oral[4]

Saliva

↓ Contacto direto com mucosa oral[5]

↓ Método de recolha da amostra invasivo[5]

↓ ADN metilado pode ser detetado em biofluidos[5]

↓ Hipermetilação do promotor do *RASSF1A* está significativamente associado a risco de cancro oral[6]

↓ qMSP: PCR quantitativo específico para metilação (amostras pequenas)[7]

OBJETIVO

Neste estudo, pretendemos determinar se a metilação do promotor do gene RASSF1A, detetada em ácido desoxirribonucleico derivado de células colhidas por lavagem oral é eficaz na deteção precoce de cancro oral e orofaríngeo.

MATERIAIS E MÉTODOS

01 Seleção e Recolha da Amostra de Saliva (lavagem oral – solução salina)

02 Extração ADN

03 Quantificação do ADN

04 Modificação Sódio-Bissulfito

05 qMSP (*RASSF1A* e *β-actina*)

Figura 1, Figura 2, Figura 3, Figura 4 – Material utilizado para extração e quantificação do ADN e modificação sódio-bissulfito;

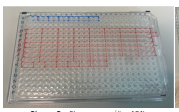

Figura 5 – Placa para análise ADN extraído;

Figura 6 – QuantStudio™ 12k Flex Real-Time PCR System;

RESULTADOS

52 participantes (Clínica FMDUP)	
Género	28 ♀
	24 ♂
Média Idade	41,5 anos
Hábitos Tabágicos	9 Fumadores
Hábitos Alcoólicos	10 Consumo diário
Motivo da Consulta FMDUP	25 por Cárie

52 amostras

Média ADN: 590,43 nanogramas/microlitro

Rácio A260/A280: ADN com elevada qualidade

Grupo de Epigenética e Biologia do Cancro do Centro de Investigação do IPO Porto

Resultados *ACTB :* é possível isolar e detetar ADN facilmente nas quantidades necessárias

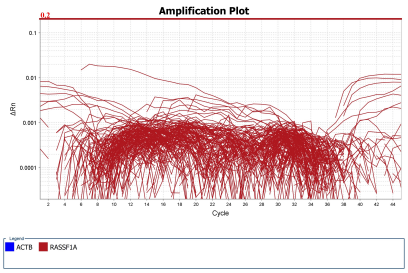

Figura 7 - *RASSF1A* não tem amplificação quando comparado com a referência (*ACTB)*

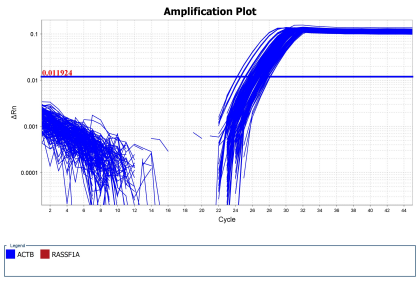

Figura 8 - Não há metilação do promotor do *RASSF1A* nas amostras

CONCLUSÕES

⇒ **Marcadores baseados na metilação do ADN, tais como o *RASSF1A*, têm o potencial para permitir a deteção precoce de cancro oral;**

⇒ **Lavado oral permite a extração de grande quantidade de ADN genómico com grande pureza, permitindo análises subsequentes;**

⇒ **Não foi detetado, nas amostras controlo, promotor do gene *RASSF1A* metilado, sugerindo elevada especificidade para deteção de cancro oral.**

1. Warnakulasuriya S, Kerr A.R. Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. J Dent Res. 2021 Nov;100(12):1313-1320. doi:10.1177/00220345211014795. Epub 2021 May 26. PMID:34036828;PMCID: PMC8529297.
2. Jin LJ, Lamster IB, Greenspan JS, Pitts NB, Scully C, Warnakulasuriya S. Global burden of oral diseases: emerging concepts, management and interplay with systemic health. Oral Dis. 2016 Oct;22(7):609-19. doi: 10.1111/odi.12428. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26704694.
3. Piyarathne NS, Rasnayake RMSGK, Angammana R, Chandrasekera P, Ramachandra S, Weerasekera M, Yasawardene S, Abu-Eid R, Jayasinghe JAP, Gupta E. Diagnostic salivary biomarkers in oral cancer and oral potentially malignant disorders and their relationships to risk factors - A systematic review. Expert Rev Mol Diagn. 2021 Aug;21(8):789-807. doi: 10.1080/14737159.2021.1944106. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34148471.
4. Viet CT, Jordan RC, Schmidt BL. DNA promoter hypermethylation in saliva for the early diagnosis of oral cancer. J Calif Dent Assoc. 2007 Dec;35(12):844-9. PMID: 18240747.
5. Liyanage C, Wathupola A, Muraleetharan S, Perera K, Punyadeera C, Udagama P. Promoter Hypermethylation of Tumor-Suppressor Genes *p16INK4a,RASSF1A,TIMP3*, and *PCQAP/MED15* in Salivary DNA as a Quadruple Biomarker Panel for Early Detection of Oral and Oropharyngeal Cancers. Biomolecules. 2019 Apr 12;9(4):148. doi: 10.3390/biom9040148. PMID: 31013839; PMCID: PMC6523930.
6. Wen G, Wang H, Zhong Z. Associations of RASSF1A, RARβ, and CDH1 promoter hypermethylation with oral cancer risk: A PRISMA-compliant meta- analysis. Medicine (Baltimore). 2018 Mar; 97(11):e9971. doi: 10.1097/MD.0000000000009971. PMID:29538221; PMC5882397
7. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. Cancer Lett. 2007 Jun 28;251(2):187-98. doi: 10.1016/j.canlet.2006.10.014. Epub 2006 Dec 12. PMID: 17166656.