

**FLÁVIO JULIANO GARCIA SANTOS PIMENTA**

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE WWOX EM  
LEUCOPLASIA BUCAL**

**BELO HORIZONTE**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FLÁVIO JULIANO GARCIA SANTOS PIMENTA**

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE WWOX EM  
LEUCOPLASIA BUCAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Farmacologia Bioquímica e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

**BELO HORIZONTE**

**2008**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, porque dele, para ele, por ele e são todas as coisas.

À minha esposa Marcela, pelo amor, compreensão, apoio e incentivo em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus pais Luiz e Carolina, exemplos de vida e espelhos da minha vida, responsáveis pela minha educação e formação como pessoa.

Ao professor Ricardo Gomez, responsável direto pela minha formação profissional, exemplo de profissional e pessoa.

Aos meus irmãos André, Gui e Gu, por serem meus irmãos e pelo carinho que cada um tem por mim.

Ao prof. Luiz Armando pela atenção e ensinamentos.

À prof. Wolfanga, pelo carinho, atenção e disponibilidade para me ajudar.

Aos professores da patologia Cássia, Dorinha e Ricardo Mesquita.

Aos professores da Neurofarmacologia, Prof. Marcus Vinícius e Prof. Marco Aurélio.

Aos colegas do laboratório de patologia.

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>adWWOX</b>	Adenovírus com inserção do gene <i>WWOX</i>
<b>Apc</b>	Afidicolina
<b>BAC</b>	Cromossomo Artificial de Fungo
<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico clonado
<b>CpG</b>	Ilhas de dinucleotídeos CG
<b>C-Terminal</b>	Carboxi-terminal
<b>DEPC</b>	Dietil-pirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNase</b>	Desoxirribonuclease
<b>dNTPs</b>	Desoxi-nucleotídeos trifosfatados
<b>dTTP</b>	Desoxi timidilato trifosfatado
<b>EDTA</b>	Ácido tetra etileno diamino
<b><i>FHIT</i></b>	Gene fragile histidine triad
<b>FRA16D</b>	Sítio de fragilidade comum 16D
<b>FRA3B</b>	Sítio de fragilidade comum 3B
<b>FRA6E</b>	Sítio de fragilidade comum 6E
<b>g</b>	Gravidade
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído desidrogenase
<b>GLB</b>	Tampão de corrida do gel
<b>Kb</b>	Quilo base
<b>Leu</b>	Leucina
<b>LSAB</b>	Complexo streptavidina biotina peroxidase
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>Mb</b>	Mega base

<b>mg</b>	Miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>N-Terminal</b>	Amino-terminal
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pmol</b>	Picomol
<b>Pro</b>	Prolina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RT-PCR</b>	PCR da transcrição reversa
<b>SDR</b>	Cadeia curta desidrogenase/reductase
<b>STS</b>	Sítio de seqüência marcada
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAE</b>	Tampão TRIS-ACETADO-EDTA
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	TRIS-BORATO-EDTA
<b>UTR3'</b>	Região não traduzida 3
<b>YAC</b>	Cromossomo artificial de bactéria
<b>V</b>	Voltagem
<b>WW</b>	Domínios de resíduos de triptofano conservados
<b>WWOX</b>	Gene contendo domínios WW e oxidoreductase

## CÓDIGOS DOS NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

### Nucleotídeos

<b>A</b>	Adenina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>T</b>	Timina

### Aminoácidos

<b>A</b>	Alanina	<b>C</b>	Cisteína
<b>D</b>	Ácido Aspártico	<b>E</b>	Ácido Glutâmico
<b>F</b>	Fenilalanina	<b>G</b>	Glicina
<b>H</b>	Histidina	<b>I</b>	Isoleucina
<b>K</b>	Lisina	<b>L</b>	Leucina
<b>M</b>	Metionina	<b>N</b>	Asparigina
<b>P</b>	Prolina	<b>Q</b>	Glutamina
<b>R</b>	Arginina	<b>S</b>	Serina
<b>T</b>	Treonina	<b>V</b>	Valina
<b>W</b>	Triptofano	<b>Y</b>	Tirosina

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> - Sumário dos Resultados do RT-PCR e Imunoistoquímica do WWOX em Leucoplasia Bucal	29



## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1-</b> Resultados obtidos pela amplificação e seqüenciamento do cDNA do gene <i>WWOX</i> em Leucoplasia Bucal.	31
<b>Figura 2-</b> Ilustração dos resultados obtidos através da imunolocalização da proteína <i>Wwox</i> em Leucoplasia Bucal.	31

## RESUMO

Leucoplasia bucal é a lesão cancerizável mais comum da cavidade bucal com índice de transformação maligna variando de 1 a 18%. Atualmente, os principais parâmetros para predição de malignização em leucoplasias são as características clínicas associadas com os achados histopatológicos. Contudo, esses indicadores não conseguem determinar com precisão quais lesões irão sofrer transformação maligna, sendo necessária a descoberta de marcadores biológicos com essa função. Estudos recentes têm demonstrado que alterações moleculares no gene supressor de tumor *WWOX*, localizado no cromossomo 16, na região q23.3–q24.1, associado ao sítio de fragilidade FRA16D, estão presentes em diversas neoplasias malignas, incluindo o carcinoma de células escamosas. No presente trabalho, foi realizada uma análise molecular do gene *WWOX* em 23 casos de leucoplasias da cavidade bucal. Através da técnica de nested RT-PCR, a transcrição do RNA mensageiro estava alterada em 26% dessas lesões. Pela técnica de imunohistoquímica, uma redução da expressão da proteína *Wwox* foi observada em 26% dos casos em relação ao controle. Todas as lesões que mostraram alteração do *WWOX* apresentavam displasia epitelial, sendo 5 amostras com displasia moderada/acentuada e 3 com displasia discreta. Esses resultados mostram que alteração no gene *WWOX* é um evento genético inicial e pode contribuir para o processo de carcinogênese na boca.

## SUMÁRIO

	<b>PÁGINA</b>
1 – INTRODUÇÃO	12
1.1– LEUCOPLASIA BUCAL	13
1.2 – O GENE <i>WWOX</i>	17
1.3 – <i>WWOX</i> E SÍTIO DE FRAGILIDADE COMUM FRA16D	19
1.4 – <i>WWOX</i> E FUNÇÃO	20
1.5 – <i>WWOX</i> E CÂNCER	21
2 – OBJETIVOS	25
3 – ARTIGO	27
4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
5 – CONCLUSÕES	40
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7 – ANEXOS	56

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - LEUCOPLASIA BUCAL

A cavidade bucal é acometida por diversas lesões cancerizáveis que apresentam um potencial de transformação maligna, principalmente para o carcinoma de células escamosas (CCE) que é a principal lesão maligna da boca. Dentre as lesões cancerizáveis, a mais comum, na cavidade bucal, é a leucoplasia. A leucoplasia bucal é definida pela Organização Mundial de Saúde como “uma placa predominantemente branca na mucosa bucal que não pode ser caracterizada clínica ou patologicamente como nenhuma outra doença” (KRAMER *et al.*, 1978; VAN DER WAAL & AXÉLL, 2002). O diagnóstico de leucoplasia é exclusivamente clínico feito a partir da exclusão de outras desordens - nevus esponjoso branco, queratose friccional, injúrias clínicas, candidíase pseudomembranosa aguda, candidíase hiperplásica crônica, leucoedema, líquen plano, reação liquenóide, doença do enxerto versus hospedeiro - que apresentam características clínicas, histopatológicas e etiológicas e bem definidas. O diagnóstico final dessa doença somente pode ser fechado após avaliação histológica e, quando necessário, com auxílio de exames laboratoriais complementares (WARNAKULASURYIA, *et al.*, 2007).

A leucoplasia bucal apresenta uma predileção por pacientes do sexo masculino acima de 40 anos de idade, havendo um aumento de prevalência com a idade (MEHTA *et al.*, 1981, BOUQUOT & GORLIN, 1986). Menos de 1% dos homens abaixo de 30 anos são acometidos, mas essa porcentagem sobe para

8% naqueles com idade acima de 70 anos. Em mulheres com mais de 70 anos, a prevalência é de aproximadamente 2% (BOUQUOT & GORLIN, 1986). Essa lesão pode ocorrer em qualquer mucosa de revestimento da cavidade bucal, sendo mais comum na gengiva e mucosa bucal. Clinicamente pode ter aspecto homogêneo - apresentando-se como uma lesão branca, uniforme, superfície plana, aparência fina podendo exibir fendas rasas ou possuir um padrão não-homogêneo, caracterizado por uma lesão branca ou branca-vermelha, podendo assumir a forma nodular ou verrugosa (AXÉLL *et al.*,1996). As leucoplasias podem ser únicas ou múltiplas na mucosa bucal (VAN DER WALL & AXÉLL, 2002).

Os aspectos histológicos da leucoplasia bucal são caracterizados pela presença de uma espessa camada de queratina na superfície do epitélio (hiperqueratose) e/ou espessamento da camada espinhosa (acantose). Frequentemente, células inflamatórias crônicas estão presentes no tecido conjuntivo subjacente. A presença de epitélio displásico ou carcinoma invasivo é encontrado em 5% a 25% dos casos (VAN DER WAAL & AXÉLL, 2002). As alterações histopatológicas das células displásicas são caracterizadas por pleomorfismo nuclear e celular, hipercromatismo nuclear, nucléolos proeminentes e irregulares, alteração na relação núcleo-citoplasma, aumento do número de figuras de mitose, figuras de mitoses atípicas, alteração na polarização da camada basal, queratose intra-epitelial, perda de estratificação e projeções epiteliais em forma de gota. A partir da presença dessas alterações morfológicas, do nível de acometimento das camadas epiteliais e da presença ou não de projeções epiteliais em forma de gota, as lesões podem ser graduadas em hiperqueratose com ou sem displasia epitelial. A intensidade da displasia epitelial

pode ser dividida em três tipos: discreta, moderada ou acentuada. As lesões de hiperqueratose sem displasia epitelial não apresentam alterações morfo-citológicas. Nas lesões com displasia discreta, nota-se a presença de uma ou mais alterações morfo-citológicas no terço inferior do epitélio, mas sem projeções epiteliais em gota. Em lesões com displasia epitelial moderada observa-se a presença de uma ou mais alterações morfo-citológicas acometendo até a metade da espessura do epitélio além de projeções epiteliais em gota. As lesões com displasia epitelial acentuada possuem uma ou mais alterações morfo-citológicas acometendo mais da metade da espessura do epitélio e projeções epiteliais em gota (PAULA & GOMEZ, 2001).

O maior fator de risco para leucoplasia bucal é o consumo de tabaco em suas várias formas (cigarro, tabaco mascado) e o uso de pasta de betel (JOHNSON *et al.*, 1996; NEVILLE & DAY, 2002). Numerosos estudos têm demonstrado uma forte associação entre leucoplasia bucal e o tabaco, confirmada pela relação dose-resposta (GUPTA, 1984; EVSTIFEEVA & ZARIDZE, 1992; LEE *et al.*, 2003).

A leucoplasia bucal é a lesão cancerizável mais comum da cavidade bucal, apresentando um índice de transformação maligna para CCE que varia de 1 a 28% (SILVERMAN *et al.*, 1984; SCHEPMAN *et al.*, 1998), sendo a lesão cancerizável mais comum da cavidade bucal. Algumas características como a presença de displasia epitelial, aparência clínica e localização da lesão aumentam esse risco (VAN DER WAAL & AXÉLL, 2002). Leucoplasias com displasia acentuada apresentam maior risco de transformação maligna (43%), do que lesões com displasia discreta (3%) e moderada (4%) (Lee *et al.*, 2000). Contudo,

é importante enfatizar que embora lesões com displasia epitelial apresentem maior susceptibilidade à malignização, alguns CCE's originam-se de lesões que não apresentam displasias (PINDBORG *et al.*, 1977). A transformação maligna é mais comum em lesões leucoplásicas de assoalho de boca, superfície ventral de língua e palato mole (KRAMER *et al.*, 1978). A explicação para isso ainda é incerta; mas, uma possível explicação seria o fato de alguns desses lugares estarem mais em contato com as substâncias carcinogênicas presentes na saliva (LESCH *et al.*, 1989). Com relação aos aspectos clínicos dessas lesões, a chance de surgimento de carcinoma de células escamosas em lesões classificadas como não-homogêneas é de 4 a 5 vezes maior do que em lesões homogêneas (SILVERMAN *et al.*, 1984).

Leucoplasias bucais são lesões que podem ser encontradas associadas com ou precedendo o CCE. Estudos têm demonstrado a presença de áreas leucoplásicas adjacentes a CCE em mais de 60% dos casos (REIBEL, 2003). O CCE é freqüentemente o estágio final de alterações no epitélio escamoso estratificado, que começa como uma displasia epitelial e vai progredindo até que as células do epitélio displásico rompam a membrana basal e invadam o tecido conjuntivo adjacente (SAPP *et al.*, 1997). O desenvolvimento de CCE é geralmente um processo multi-fatorial, caracterizado por alterações genéticas, epigenéticas e fenotípicas. Muitas dessas alterações envolvem a ativação de vias de sinalização ou metabólica que favorecem o crescimento celular e aumentam a sobrevivência das células (SUDBO *et al.*, 2003). Diversos trabalhos têm mostrado que leucoplasias bucais apresentam muitas das alterações genéticas presentes no CCE (HA & CALIFANO, 2003). A desregulação de oncogenes e genes supressores de tumor, alterações citogenéticas e mutações mitocondriais têm



sido implicadas no desenvolvimento do CCE de boca; mas, essas alterações, também, estão presentes em graus diferentes em leucoplasias bucais, principalmente em lesões que apresentam alterações displásicas (MITHANI *et al.*, 2007). Apesar desses achados, ainda não foi descrito nenhum marcador biológico preditivo de possível transformação maligna dessas lesões, sendo ainda os mais utilizados para a identificação de potencial de malignização os aspectos histológicos (presença e a gradação de displasia) associados aos clínicos.

## 1.2 - O GENE *WWOX*

O gene *WWOX* começou a ser estudado no início da década de 90, quando DUTRILLAUX *et al.* (1990) relataram alterações citogenéticas no braço longo do cromossomo 16 (16q) em câncer de mama. PANDIS *et al.* (1992) mostraram que o braço longo do cromossomo 16 estava envolvido sistematicamente em translocações não balanceadas com o cromossomo 1. CHEN *et al.*, (1996) em um estudo com carcinoma ductal *in situ* de mama identificaram, utilizando marcadores de regiões microsátélites, perda de heterozigosidade em mais de 70% dos casos na região do braço longo do cromossomo 16 (região q23.3-q24.1), sugerindo fortemente a presença de um gene supressor de tumor nessa região ou próxima a ela. Outros trabalhos de pesquisa mostraram que o braço longo do cromossomo 16, em particular a região 16q23.3-q24.1, estava afetada em inúmeras outras neoplasias epiteliais tais como câncer de próstata (CHER *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1996; ELO *et al.*, 1999; LI *et al.*, 1999), câncer de ovário (IWABUCHI *et al.*, 1995; KAWAKAMI *et al.*, 1999),

carcinoma hepatocelular (NISHIDA *et al.*, 1992) e no tumor de Wilm's (SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2000).

BEDNAREK *et al.* (2000) foram os primeiros a identificar o gene supressor de tumor *WWOX*. Usando marcadores altamente polimórficos em linhagens de células de câncer de mama, foram identificadas três regiões distintas de alta perda de heterozigosidade, sendo a região q23.3-q24.1 a mais afetada. Na tentativa de identificar possíveis genes candidatos na região 16q23.3-q24.1, eles utilizaram seqüências obtidas de clones de YAC e BAC e geraram novos STS's. Além disso, cDNAs da área de interesse foram isolados de BAC e de glândula mamária humana, obtidas da biblioteca de cDNA. Depois de sequenciar e analisar mais de 35 cDNA's candidatos, foi identificado apenas 1 cDNA da região de interesse que apresentava uma estrutura do tipo exon-intron. O gene foi nomeado *WWOX* por apresentar os domínios WW e Oxidoreductase. Simultaneamente, RIED *et al.*, (2000) com o propósito de identificar o gene situado na região do sítio de fragilidade FRA16D, no braço longo do cromossomo 16, que poderia mediar os efeitos biológicos da instabilidade do DNA associado ao FRA16D em câncer, clonou o mesmo gene e o chamou de FOR (Sítio de Fragilidade Oxidoreductase - FRA16D). O gene identificado é composto de nove exons e possui um tamanho de 1.113.822 pb. A região codificadora é muito pequena considerando o tamanho do gene. Os introns 5 e 8 são muito longos, com o intron 8 apresentando 779,639 bp (BEDNAREK *et al.*, 2000; RIED *et al.*, 2000).

### 1.3 - WWOX E SÍTIO DE FRAGILIDADE COMUM FRA16D

KRUMMEL *et al.* (2000) associaram o gene *WWOX* ao sítio de fragilidade comum FRAD16, ao realizar um mapeamento físico mais detalhado da região 16q23.3-24.1, demonstrando que o sítio de fragilidade comum FRA16D se encontrava na região do gene *WWOX* situado, possivelmente, na região do intron e exon 8 do gene.

Sítios de fragilidade são regiões que freqüentemente ocorrem troca de material genético entre cromátides irmãs, translocações cromossômicas, deleções, ampliações de genes e a integração de vírus oncogênicos (POPESCU, 2003). A maioria, senão toda a população apresenta sítios de fragilidade cromossômica do tipo comum, ao passo que aproximadamente 5% dos indivíduos apresentam sítios de fragilidade do tipo raro (hereditária). Existem aproximadamente 104 tipos diferentes de sítios de fragilidade cromossômica, sendo 24 do tipo raro e 80 do tipo comum, ocupando cerca de 100 Mb do DNA (POPESCU, 2003).

Regiões que apresentam sítios de fragilidade cromossômica possuem a tendência de se duplicarem tardiamente durante o ciclo celular, fornecendo um longo alvo para rupturas e recombinações (RICHARDS, 2001). O fato de os sítios de fragilidade comum estar relacionados com genes funcionais foi primeiramente demonstrado pela clonagem do gene *FHIT*, que se encontra na região do sítio de fragilidade comum FRA3B (OHTA *et al.*, 1996). Desde então o gene *WWOX* que se encontra na região FRA16D, e o gene *Parkin*, na região FRA6E, (WANG *et al.*,

2004) foram clonados e caracterizados. Todos eles mostram características semelhantes como: ocupam grandes áreas genômicas, são afetados por translocações e deleções homozigóticas, em particular, afetando regiões intrônicas e exônicas que levam a perda da expressão da proteína em tumores e linhagens celulares de câncer (CROCE *et al.*, 1999). Em muitos casos de deleções hemizigóticas, pontos de mutações não são encontrados no alelo remanescente. Os três mais conhecidos genes que se encontram em regiões de fragilidade comum (*WWOX/FRA16D*, *FHIT/FRA3B* e *Parkin/FRA6E*) estão desregulados em múltiplos tipos de câncer, o que sugere o envolvimento dos sítios de fragilidade no processo de carcinogênese (LUDES-MEYERS *et al.*, 2004).

#### 1.4 - *WWOX* E FUNÇÃO

O gene supressor de tumor *WWOX* apresenta um mRNA de comprimento total de 2264pb com uma abertura de fragmento de leitura de 1245pb. Codifica uma proteína de 414 aminoácidos com duas porções distintas em sua estrutura. Uma porção N-terminal de 88 aminoácidos com uma seqüência altamente conservada da família de proteínas do domínio WW e uma porção C-terminal, de 326 aminoácidos, homóloga às superfamílias de proteínas com cadeia curta desidrogenase/redutase (SDR), relacionada com metabolismo de esteróides (BEDNAREK *et al.*, 2000).

Wwox é uma proteína citoplasmática contendo dois domínios WW na extremidade N-terminal, relacionados com a interação entre proteínas, associados com vias de sinalização em uma variedade de processos celulares tais como regulação transcricional e estabilidade protéica. Estudos têm demonstrado que os domínios WW ligam-se em seqüências PPxY encontradas em um grande número de fatores de transcrição tais como o p73, AP2 $\gamma$  e c-Jun. A proteína Wwox liga-se a eles no citoplasma da célula, impedindo a translocação desses fatores para o núcleo e, conseqüentemente, regulando a atividade transcricional deles (AQUEILAN *et al.*, 2004a,b GAUDIO *et al.*, 2006). Além disso, foi determinada a interação entre a proteína p53 e o domínio WW da proteína WOX1 de camundongos (ortólogo da proteína WWOX de humanos). Segundo os autores, a proteína WOX1 induz apoptose quando superexpressa, levando ao aumento da expressão da proteína p53 que, por sua vez, eleva a capacidade da proteína WOX1 em induzir apoptose. Os autores demonstraram ainda que a proteína WOX1 consegue induzir apoptose sem a presença da p53, porém esta, necessita da proteína WOX1 para levar a célula a apoptose CHANG *et al.* (2001)

### 1.5 - WWOX E CÂNCER

Alterações genéticas são comuns em genes localizados em regiões de fragilidade comum, que são regiões de alta instabilidade no DNA. O gene WWOX, associado ao sítio de fragilidade comum FRA16D, apresenta várias alterações genéticas e epigenéticas no câncer. Interessante é o fato de que todos os tipos de neoplasias malignas estudados de vários tecidos e órgãos apresentavam alguma

alteração nesse gene. Em nenhum caso de tecido normal foram detectadas modificações nesse gene, o que mostra a sua importância no processo de carcinogênese (AQEILAN & CROCE, 2007).

Um dos mecanismos de desregulação da expressão do gene *WWOX* ocorre através da produção de transcritos alternativos de mRNA com deleção total ou parcial do domínio SDR. Vários transcritos alternativos do gene *WWOX* têm sido detectados em diversos tipos de câncer. Em tecido normal, somente o transcrito completo mRNA (wild-type) é expresso e codifica a proteína contendo os domínios WW e o SDR. Em tumores malignos, podem ser encontrados o transcrito normal e vários tipos de transcritos alternativos. Como os transcritos alternativos são expressos somente em câncer, eles foram denominados transcritos aberrantes (BEDNAREK *et al.*, 2001).

BEDNAREK *et al.*, (2001) detectaram a ocorrência de transcritos aberrantes em linhagens de células de mieloma múltiplo, de células de adenocarcinoma de cólon, de estômago e carcinoma de mama. Além disso, os transcritos aberrantes foram produzidos por células que não apresentavam deleções genômicas de exons do gene *WWOX*. Portanto, as formas aberrantes de transcrição poderiam ser formadas por splices alternativos do mRNA ou deleção de um alelo do gene *WWOX*. Outros autores encontraram novos transcritos aberrantes em linhagens de células de adenocarcinoma gástrico, carcinoma de mama e de ovário (RIED *et al.*, 2000; PAIGE *et al.*, 2001; DRIOUCH *et al.*, 2002). Em nenhum desses trabalhos, os transcritos aberrantes foram encontrados em tecido normal (RIED *et al.*, 2000; BEDNAREK *et al.*, 2001; DRIOUCH *et al.*, 2002 AQEILAN, *et al.*, 2004a, PARK, *et al.*, 2004).

Freqüentemente o silenciamento da expressão de um gene supressor de tumor ocorre como resultado da metilação de resíduos de citosina CpG dentro da área promotora do gene. KUROKI, *et al.* (2004) encontraram ilhas de CpG metiladas na região promotora do gene *WWOX* em 2 das 4 linhagens celulares de câncer de pâncreas e 2 de 7 pacientes com câncer de pâncreas. Metilação da região promotora e desacetilação de histona também foram determinados como um dos mecanismos que levam a baixa expressão protéica do gene *WWOX* em neoplasias hematopoiéticas (ISHII *et al.*, 2003). Recentemente, ILIOUPOULOS *et al.* (2005) estudaram uma região de 406 pb que apresenta 66% de resíduos de nucleotídeos CpG, “upstream” ao sítio de início da transcrição do gene *WWOX* em câncer de pulmão, mama e bexiga e demonstraram que a expressão desse gene estava reduzida em câncer de pulmão e bexiga devido a hipermetilação do gene *WWOX*.

Expressão da proteína *Wwox* tem sido examinada em uma variedade de tecidos normais e tumorais usando imunoistoquímica. Diversos estudos têm encontrado que a expressão da proteína *Wwox* está associada com múltiplos tipos de câncer, como o de mama, ovário, próstata e tireóide (LUDES-MEYERS *et al.*, 2003; NUNEZ *et al.*, 2005a; QIN *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007). A expressão da proteína *WWOX* foi reduzida em 54,6% e 60% dos tumores de mama, através da imunoistoquímica (GULER *et al.*, 2004; NUNEZ *et al.*, 2005b). Além disso, 65% dos adenocarcinomas gástricos foram negativos para expressão da proteína *Wwox* (AQEILAN *et al.*, 2004a). Redução dos níveis de *Wwox* foi correlacionada com o tipo histológico e metástase cervical (AQEILAN *et al.*, 2004a; GULER, *et al.*, 2004). NUNEZ *et al.*, (2005a) observaram que 30% dos carcinomas de ovário tinham expressão da proteína *Wwox* reduzida e que esta foi correlacionada com o

estágio avançado da doença e com os subtipos mucinoso e de células claras que são mais resistentes a quimioterapia.

Recentemente, um trabalho realizado em nosso laboratório com carcinomas de células escamosas primários demonstrou alterações no gene *WWOX* em 50% desses casos. Análise do mRNA via RT-PCR detectou alteração da transcrição em 35% dos casos estudados. Redução na expressão da proteína *Wwox* através da técnica de imunistoquímica foi observada em 40% dos tumores. Além disso, o seqüenciamento genético revelou uma nova mutação somática do tipo missense, com a transição de um C para T no segundo nucleotídeo do códon 329 (exon 8) que resultou na substituição de uma Serina para Fenilalanina (PIMENTA *et al.*, 2006).

Uma importante questão permanece para ser respondida. As alterações no gene *WWOX* associado ao FRA16D são causa ou consequência da progressão das neoplasias malignas? Alguns autores acham que essas alterações ocorrem devido à presença do sítio de fragilidade associado ao gene. LE BEAU *et al.*, (1998) estudando o gene *FHIT*, associado ao sítio de fragilidade comum FRA3B, concluíram que as anormalidades afetando esse gene poderiam ser consequência da localização do gene em uma região comumente afetada por rearranjos cromossômicos do que propriamente relacionado com a origem de neoplasia maligna. Contudo, CHEN *et al.*, (1996) e Guler *et al.*, (2005) detectaram alterações no gene *WWOX* (perda de heterozigosidade e da expressão da proteína) em carcinoma ductal *in situ* de mama que representa um estágio inicial do desenvolvimento do câncer de mama, mostrando que essas alterações podem ser, sim, passos iniciais para que o tecido sofra transformação maligna.



## **2. OBJETIVOS**

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo Geral**

- Realizar a análise molecular do gene *WWOX* em leucoplasias bucais.

### **2.2 - Objetivos Específicos**

- Investigar a presença de transcritos aberrantes no mRNA;
- Investigar a expressão da proteína *Wwox*;
- Investigar se as possíveis alterações no *WWOX* estão relacionadas com o grau de displasia das leucoplasias;

### **3. ARTIGO**



## Molecular alterations in the tumor suppressor gene *WWOX* in oral leukoplakias

Flávio Juliano Pimenta <sup>a</sup>, Gabriela Tavares Cordeiro <sup>d</sup>,  
Luiz Gustavo Garcia Santos Pimenta <sup>b</sup>, Michelle Beatriz Viana <sup>a</sup>,  
Joyce Lopes <sup>a</sup>, Marcus Vinicius Gomez <sup>d</sup>, C. Marcelo Aldaz <sup>c</sup>,  
Luiz De Marco <sup>d</sup>, Ricardo Santiago Gomez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>b</sup> School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>c</sup> Department of Carcinogenesis, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Smithville, TX 78957, USA

<sup>d</sup> Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Received 9 May 2007; received in revised form 28 August 2007; accepted 29 August 2007

### KEYWORDS

*WWOX* gene;  
Tumor suppressor gene;  
Oral leukoplakia;  
Oral premalignant  
lesion;  
Oral carcinogenesis

**Summary** Oral leukoplakia is the most prevalent and potentially malignant disorder of the oral mucosa. Previous studies have demonstrated that molecular changes of the *WWOX* gene (WW-domain containing oxidoreductase), a candidate tumor suppressor gene located at 16q23.3–24.1 that spans FRA16D, the second most common fragile site, are present in several malignant neoplasias, including oral squamous cell carcinoma. In this report, the role of the *WWOX* gene was investigated in 23 cases of oral leukoplakias. Using nested RT-PCR and immunohistochemistry, altered mRNA transcription and/or reduced Wwox protein expression was observed in 35% of the lesions when compared with normal mucosa. The majority of lesions (4/6) with altered transcripts had a reduction in the expression of Wwox protein. Although normal *WWOX* expression was found in some lesions with dysplasia, all lesions with *WWOX* mRNA and/or protein expression showed histological evidence of dysplasia and none of the cases without dysplasia presented this alteration. These results show that the *WWOX* gene alteration is an early genetic alteration and may contribute to oral carcinogenesis.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Oral leukoplakia (OL) is defined as a "predominantly white patch or plaque that cannot be characterized clinically or pathologically as any other disease and is not associated

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 34992477; fax: +55 31 34992472.

E-mail address: [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br) (R.S. Gomez).

with any physical or chemical causative agent except the use of tobacco".<sup>1,2</sup> The development of OL is strongly associated with the exogenous exposure to carcinogens, mainly smoking, chewing tobacco and betel nut. Of these, tobacco use is the most important etiological factor and is present in 80% of all cases.<sup>3,4</sup> OL may show histologically the presence of dysplasia which often undergoes malignant transformation to oral squamous cell carcinoma (OSCC) ranging from 1% to 28% and approximately 80% of oral cancers progresses from precancerous lesions.<sup>5-7</sup> According to the degree of dysplasia, the lesions are classified as mild, moderate or severe, based on histopathological findings.<sup>1</sup> Although these designations are thought to be sequential phases of oral carcinogenesis, transformation is found in lesions with mild dysplasia.<sup>8</sup> In addition, many studies have demonstrated that susceptibility to oral cancer is associated with phase I and phase II metabolic enzymes.<sup>9-11</sup> It has also been suggested that the detection of genetic changes such as DNA aneuploidy and loss of heterozygosity could improve the possibilities for predicting malignant development from precursor lesions.<sup>12</sup> However, there are no reliable biomarkers to predict which oral leukoplakias will be quiescent or will rapidly become invasive squamous cell carcinoma.<sup>12</sup>

WWOX (WW-domain containing oxidoreductase) is a candidate tumor suppressor gene that was identified in chromo-

some 16q23.3-24.1. It was determined that the WWOX gene spans the common fragile site region FRA16D.<sup>13-15</sup> Chromosomal fragile sites are often hot spots for translocations, deletions, gene amplification and integration of oncogenic viruses. These fragile sites are chromosomal regions that frequently exhibit DNA strand breaks, often following exposure to chemicals that delay DNA replication.<sup>16</sup> Of the common chromosomal fragile site loci, FRA3B and FRA16D are the most frequently expressed.<sup>17</sup> The tumor suppressor gene fragile histidine triad (FHIT) spans the FRA3B fragile site,<sup>18</sup> and abnormal FHIT transcription and low FHIT expression were detected in various human cancers, including oral squamous cell carcinomas.<sup>19,20</sup> Studies of the two most frequently affected common fragile site loci, FRA3B and FRA16D, have provided compelling evidence that these regions are indeed prone to DNA instability in cancer cells.<sup>21</sup> It has also been shown that exposure to environmental carcinogens such as smoking and alcohol consumption increases the potential for chromosome breakage at fragile sites FRA3B and FRA16D in esophageal, non-small-cell lung and cutaneous squamous cancer.<sup>21-25</sup> Furthermore, we have recently described alterations on WWOX gene in 50% of oral squamous cell carcinomas.<sup>26</sup> Therefore, given that OLs have been associated with squamous carcinomas, we investigated whether molecular changes of the WWOX gene were present in these potentially malignant disorders.

**Table 1** Summary of the RT-PCR and Immunohistochemistry results

Lesions	RT-PCR <sup>a</sup>	Aberrant product	IH score <sup>b</sup>	Histology <sup>c</sup>
#OL1	N	—	3	1
# OL2	N and aberrant	Exons 2 <sup>d</sup> – 7 <sup>d</sup> deletion	1	2
#OL3	N	—	3	1
#OL4	N	—	2	2
#OL5	N	—	3	2
#OL6	N	—	2	4
#OL7	N	—	3	2
#OL8	N	—	3	3
#OL9	N	—	3	3
#OL10	N	—	3	2
#OL11	N	—	3	3
#OL12	N	—	3	2
#OL13	N	—	3	1
#OL14	N and aberrant	Exons 1 <sup>d</sup> – 7 <sup>d</sup> deletion	2	2
#OL15	N	—	3	4
#OL16	N and aberrant	NS	2	4
#OL17	N	—	3	3
#OL18	N and aberrant	Exons 2 <sup>d</sup> – 8 <sup>d</sup> deletion	3	3
#OL19	N	—	3	2
#OL20	N	—	3	3
#OL21	N	—	3	1
#OL22	A	—	3	4
#OL23	N and aberrant	Exons 1 <sup>d</sup> – 8 <sup>d</sup> deletion Exons 6 – 8 deletion	2	3

<sup>a</sup> RT-PCR: N: wild type transcript; A: absence of transcript; NS: not sequenced.

<sup>b</sup> Immunohistochemistry scores; +1, 0–50% positive cells; +2, 51–75% positive cells; +3, >76% positive cells. Normal mucosae were used as positive controls and all were score +3.

<sup>c</sup> Histological grading (1): 1 – without dysplasia; 2 – mild dysplasia; 3 – moderate dysplasia; 4 – severe dysplasia.

<sup>d</sup> Partial exon deletion.

## Materials and methods

### Human tissue

Fresh tissue samples were consecutively obtained from 23 patients (14 males and nine females; age ranged from 29 to 67 years, mean 47 years; smoking status<sup>27</sup>: four non-smokers and 19 smokers) undergoing therapeutic surgical resection for OL at the Oral Diagnosis Clinic at School of Dentistry between March 2005 and June 2006. The cases were submitted to histological grade accord World Health Organization Classification of Tumors Pathology & Genetic of Head Neck Tumors, 2005<sup>1</sup> and are shown in Table 1. Normal oral mucosa was obtained from volunteers without leukoplakia during non-neoplastic or preprosthetic surgical procedures (control samples). Age, sex and smoking habits of the healthy volunteers matched that from patients. The present study was approved by the local Ethics Committee and a signed informed consent was obtained from all patients as well as healthy volunteers. In each case, a portion of the lesion was resected, immediately snap frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For immunohistochemistry, a portion of the tissue was fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded.

### Reverse transcription-PCR analysis

Total RNA was extracted from cells of the OL lesions with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendations and treated with DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), after microdissection. First-strand cDNA was prepared from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA treated with DNase, using the Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen Life Technologies). After reverse transcription, the cDNA was used as a template for PCR amplification of the human *WWOX* cDNA. The first and second amplifications were performed with nested primers as previously described.<sup>28</sup> Both reactions were carried out in a volume of 25  $\mu\text{l}$  containing 10 pmol of each primer, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 mM dNTP mix, 1 $\times$  PCR buffer, and 1.25 unit of Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen Life Technologies). Amplifications were carried out in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf AG) as follows: an initial denaturation for 8 min at  $95^{\circ}\text{C}$  followed by 35 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $57^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and a final extension for 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . One microliter of the amplification product from the first reaction was used for the second reaction under the same conditions stated earlier. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA was amplified as a control for cDNA quality.<sup>29</sup> The amplified products were subjected to electrophoresis on a 6.5% polyacrylamide gel, followed by silver staining. DNA bands corresponding to the normal and abnormal size transcripts were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), and sequenced on the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The two primer sets of the second PCR amplification that amplify the whole open reading frame and two other primers designed to facilitate sequencing of the open reading frame (WW1FOR 5'-CGGCAAAGATACGACGGCAG-3', exon 4 and

WW2FOR 5'-ACTTTTGCTCTACCCTGG-3', exon 7) were used. To each case, two different amplified products were sequenced.

### WWOX immunohistochemistry

Tissue sections from OLs and oral normal mucosas were stained with Wwox antiserum.<sup>30</sup> Briefly, 4  $\mu\text{m}$  paraffin-embedded sections were dewaxed in xylene and hydrated with graded ethanol. Heat-induced epitope retrieval was performed with 1 mM EDTA buffer pH 8.0 for 30 min in a steamer at  $94^{\circ}\text{C}$ . Endogenous peroxidase activity was blocked with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in water for 10 min. Primary polyclonal rabbit antiWwox antiserum (140  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was used at a 1:100 dilution (in BSA 0.5%) for 18 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . This was followed by incubation with the labeled streptavidin-biotin (LSAB) Kit (DakoCytomation California Inc., Carpinteria, CA). Peroxidase activity was developed with DAB (Sigma, St Louis, MI) with timed monitoring using a positive control sample. The sections were then counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. Two experienced independent pathologists examined multiple fields and scored tissue sections for extent of staining, regardless of staining intensity (+1, 0–50% positive cells; +2, 51–75% positive cells; +3, greater than 76% positive cells). OL scored as +3 were considered as having normal expression to Wwox (oral normal mucosas were all +3).

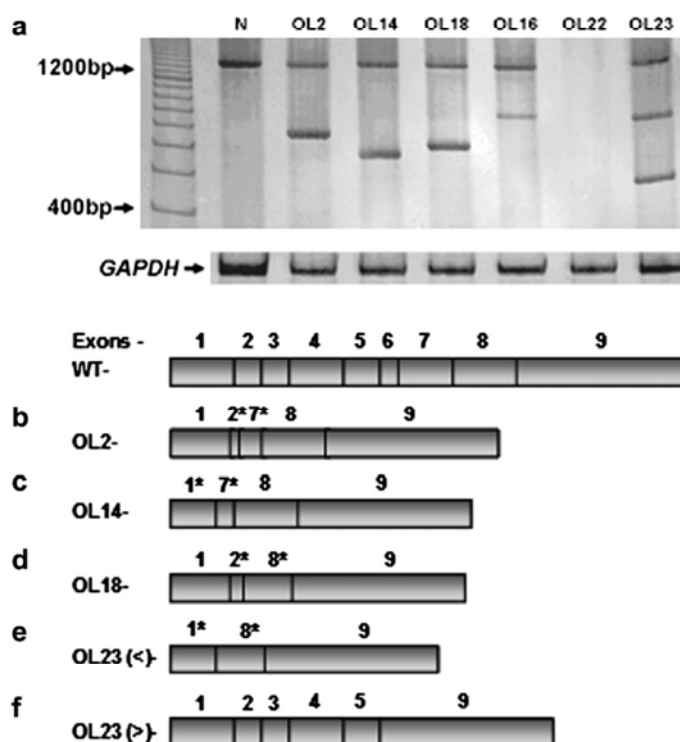
## Results

### Aberrant WWOX gene transcripts

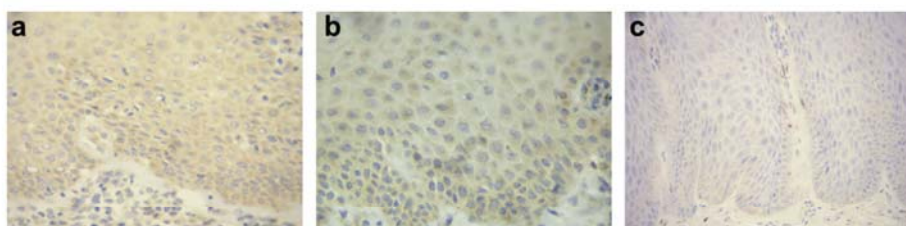
Aberrant *WWOX* gene transcript RT-PCR amplification was performed to analyze *WWOX* mRNA expression and six of 23 cases (26%) showed altered or absent expression of *WWOX* gene transcription. Of these six lesions, five showed transcripts with total or partial loss of exons. In one lesion (#OL22) no transcript was detected. This sample was positive for Cytokeratin 19 that was used as a marker of epithelial cells.<sup>31</sup> All normal mucosa had normal size transcripts without aberrant transcripts (Fig. 1a). Sequence analyses of the RT-PCR products showed partial loss of exon 2, total loss of exons 3–6 and partial loss of exon 7 (#OL2) (Fig. 1b); partial loss of exon 1, total loss of exons 3–6 and partial loss of exon 7(#OL14) (Fig. 1c); partial loss of exon 2, total loss of exons 3–7 and partial loss of exon 8 (#OL18) (Fig. 1d). Interestingly, two transcript variants were present in lesion #OL23, one with partial loss of exon 1, total loss of exons 2–7 and partial loss of 8 in one (Fig. 1e) and the other with loss of exons 6–8 (Fig. 1f). In case #OL16 we detected a band of abnormal size and we sequenced the exons 1–6 and part of exon 7 but the aberrant transcript was not possible detected because of minute sample amount. The remaining 17 OLs samples showed only the normal size transcript. Representative results of nested RT-PCR analysis are shown in Figure 1.

### Expression of Wwox protein

Wwox expression in normal oral mucosa and OL was also confirmed by immunohistochemistry. Epithelial cells in



**Figure 1** RT-PCR amplifications of the WWOX cDNA of oral leukoplakia (OL) cases. (a) Electrophoresis in polyacrylamide gel 6.5% was used to detect wild-type transcript (1284 bp) and alterations in the WWOX mRNA transcripts. Absence of transcript was seen in 1 lesion (#OL22). Representative sequences from the OLs showing five different types of aberrant transcripts: #OL2 (b); #OL14 (c); #OL18 (d); two in #OL23 – < (e) and > (f) bands. \* represents a partial loss of the exon. In case #OL16 we detected a band of abnormal size and we sequenced the exons 1–6 and part of exon 7 but the aberrant transcript was not possible detected because of minute sample amount. WT – Normal WWOX transcription RNA with 9 exons.



**Figure 2** Immunohistochemical detection of Wwox protein in normal oral mucosa and oral leukoplakia (OL). (a) Normal oral mucosa showing (strong) cytoplasmic staining in all layers of the epithelium (score +3). (b) OL showing normal expression (score +3) of Wwox protein (#OL10). (c) OL with reduced expression (score +1) of Wwox protein (#OL2) (streptavidin–biotin complex stain, 400x).

normal oral mucosa displayed a cytoplasmic staining for Wwox protein as shown in Figure 2a and b. All normal tissue showed a score +3 for Wwox (Fig. 2a). Of the 23 OLs, six lesions (26%) showed a reduced expression to Wwox. Five of these (#OL4, #OL6, #OL14, #OL16, #OL23) were scored +2 and one lesion (#OL2) scored +1 (Fig. 2c). Taken together, the results obtained by RT-PCR and immunohistochemistry showed that 35% of the lesions presented mRNA and/or protein alteration and the majority of lesions (4/6) with altered

transcripts had a significant reduction in the expression of Wwox protein (Table 1).

#### Correlation between the presence of dysplasia and WWOX alteration

All lesions with altered WWOX mRNA and/or protein expression showed histological evidence of dysplasia. While five out of the 11 samples with moderate or severe dysplasia

showed *WWOX* alteration, three out of eight lesions with mild dysplasia and none of the four cases without dysplasia presented this alteration.

## Discussion

Most of earlier studies have shown a risk of malignant transformation of OL in the range of 3.6–6%.<sup>6</sup> However, this data has changed as recent studies have demonstrated an increase in malignant transformation rates now ranging from 8.9% to 17.5%.<sup>32,33</sup> However, there are no genetic biomarkers to predict which OLs will be quiescent or will rapidly become invasive squamous cell carcinoma.<sup>12</sup>

In this study, we demonstrated an altered *WWOX* mRNA and/or protein expression in eight of 23 samples (35%) of OL. Among these samples, RT-PCR showed loss or aberrant transcripts in 26% of them. By immunohistochemistry, *Wwox* protein expression was reduced in 26%. We have recently investigated the *WWOX* gene in OSCCs and we showed molecular changes in 50% of primary tumors by either genomic DNA, RT-PCR or protein expression. The current findings suggest that *WWOX* changes are early events during OSCC development, a finding previously reported in breast carcinogenesis.<sup>34,35</sup>

*WWOX* gene underexpression in human cancers could result from distinct events such as allelic losses, point mutations, promoter hypermethylation, aberrant mRNA transcription, or a combination of two or more events resulting in a loss of tumor suppressor activity.<sup>36</sup> Point mutations are rare in *WWOX* gene<sup>28</sup> but loss of heterozygosity of *WWOX* allele is observed in a variety of cancers.<sup>15,28,37</sup> The expression of some tumor suppressor genes is down-regulated in many cancers by epigenetic mechanisms. CpG rich areas of gene promoter regions are frequently methylated in cancer.<sup>38</sup> *WWOX* hypermethylation was previously reported in breast and lung cancers.<sup>38,39</sup>

The *WWOX* aberrant forms can be generated by alternative splicing of *WWOX* mRNA as well as by exon deletions of the *WWOX* allele in cancer. Alternative splicing has been associated with various diseases.<sup>40</sup> Splicing abnormalities occur frequently in cancer, perhaps due to increased cellular proliferation or other uncommon abnormalities in the splicing machinery. Furthermore, the splicing abnormalities would more often affect genes that have very long transcripts such as *WWOX*.<sup>30</sup>

The pattern of aberrations affecting *WWOX* is similar to that of *FHIT* gene in human tumors<sup>41</sup> and could be caused by its location at a fragile site in the human genome.<sup>21</sup> It has been known that a fragile site replicates late during the cell cycle and common fragile sites are susceptible to and preferentially targeted by the same carcinogenic agents.<sup>42</sup> It is conceivable that breakage at *WWOX*/*FRA16D* and *FHIT*/*FRA3B* loci could be inflicted concomitantly.<sup>43</sup>

Four lesions with *WWOX* mRNA alteration had reduced expression of the protein. Interestingly, in two lesions the molecular changes of the mRNA were not followed by reduced protein expression. One them (#OL22) showed normal protein expression but no transcript was detected by RT-PCR. The other sample (#OL18) had normal protein expression associated with partial loss of exon 2, total loss of exons 3–7 and partial loss of exon 8. As the molecular and

immunohistochemical analysis were performed on separate areas of the lesion, this discrepancy may be due to the occurrence of heterogeneous expression. Furthermore, two lesions with reduced protein expression (#OL4 and #OL6) did not exhibit any abnormality at genetic level, thus the possibility of *WWOX* hypermethylation or deletion of one allele cannot also be excluded.<sup>36,39</sup> In addition, despite we have performed microdissection, the possibility of contamination with non-epithelial cells should not be discarded.

The presence of dysplasia in OLs ranges from 15.6% to 39.2%.<sup>33</sup> While lesions with severe dysplasia are prone to malignant transformation, this alteration is also found in OLs with mild dysplasia. Up to now, no molecular markers have been demonstrated as good prognostic predictors of potentially malignant oral lesions. Therefore, dysplasia recording continues to be the most reliable method for prognostic evaluation. Although we found *WWOX* expression in some lesions with dysplasia, all lesions with *WWOX* mRNA and/or protein expression showed histological evidence of dysplasia and none of the cases without dysplasia presented this alteration.

In summary, in this report, we demonstrate a reduction in the expression of *WWOX* gene in 35% of the OL lesions. These results show that the *WWOX* gene alteration is an early genetic alteration that could contribute to oral carcinogenesis and further studies on differential gene expression are required to help clarify the molecular changes associated with the transformation of OL to OSCC.

## Conflict of Interest Statement

None declared.

## Acknowledgements

Grant sponsor: Milênio CNPq/MCT, PRONEX and FAPEMIG, Brazil; Grant sponsor: NCI R01 CA102444. Dr. M.V. Gomez, L. De Marco and R.S. Gomez are research fellows of CNPq.

## References

- Gale N, Pilch BZ, Sedransky D, El Nagzar A, Westra W, Califano J, et al. Precursor Lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sedransky D, editors. World Health Organization classification of tumors pathology & genetic of head neck tumors, Lyon; 2005. p. 177–9.
- Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. An International Collaborative Group on oral white lesions. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18–21, 1994. *J Oral Pathol Med* 1996;25(2):25–49.
- Johnson NW, Warnakulasuriya S, Tavassoli M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer* 1996;5(1):5–17.
- Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002;52(4):195–215.
- Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study



- of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol* 1998;**34**(4):270–5.
6. Silverman Jr S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984;**53**(3):563–8.
  7. Shiu MN, Chen TH. Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004;**13**(1):39–45.
  8. Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med* 2003;**32**(5):251–6.
  9. Drummond SN, De Marco L, Noronha JC, Gomez RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;**40**(1):52–5.
  10. Drummond SN, Gomez RS, Motta Noronha JC, Pordeus IA, Barbosa AA, De Marco L. Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol* 2005;**41**(5):515–9.
  11. Majumder M, Sikdar N, Paul RR, Roy B. Increased risk of oral leukoplakia and cancer among mixed tobacco users carrying XRCC1 variant Haplotypes and cancer among smokers carrying two risk genotypes: one on each of two loci, GSTM3 and XRCC1 (Codon 280). *Cancer Epidem Biomark Prev* 2005;**14**(9):2106–12.
  12. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics: review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;**14**(1):47–62.
  13. Thavathiru E, Ludes-Meyers JH, MacLeod MC, Aldaz CM. Expression of common chromosomal fragile site genes, WWOX/FRA16D and FHIT/FRA3B is downregulated by exposure to environmental carcinogens, UV, and BPDE but not by IR. *Mol Carcinogen* 2005;**44**(3):174–82.
  14. Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3–24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 2000;**60**(8):2140–5.
  15. Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, Laflin KJ, Bergsagel PL, Kiguchi K, et al. WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res* 2001;**61**(22):8068–73.
  16. Popescu NC. Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Lett* 2003;**192**(1):1–17.
  17. Glover TW. Common fragile sites: review. *Cancer Lett* 2006;**232**(1):4–12.
  18. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996;**84**(4):587–97.
  19. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, Suzuki I, et al. Low expression of fragile histidine triad gene correlates with high proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;**39**(1):56–63.
  20. Tai SK, Lee JI, Ang KK, El-Naggar AK, Hassan KA, Liu D, et al. Loss of Fhit expression in head and neck squamous cell carcinoma and its potential clinical implication. *Clin Cancer Res* 2004;**10**(16):5554–7.
  21. O'Keefe LV, Richards RI. Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Lett* 2006;**232**(1):37–47.
  22. Sozzi G, Sard L, De Gregorio L, Marchetti A, Musso K, Buttitta F, et al. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res* 1997;**57**(11):2121–3.
  23. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Alder H, Inoue H, Tanaka Y, et al. Altered expression of FHIT in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. *Cancer Res* 2000;**60**(5):1177–82.
  24. Stein CK, Glover TW, Palmer JL, Glisson BS. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Gene Chromosome Cancer* 2002;**34**(3):333–40.
  25. Lai FJ, Cheng CL, Chen ST, Wu CH, Hsu LJ, Lee JY, et al. WOX1 is essential for UVB irradiation-induced apoptosis and down-regulated via translational blockade in UVB-induced cutaneous squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res* 2005;**11**(16):5769–77.
  26. Pimenta FJ, Gomes DA, Perdigo PF, Barbosa AA, Romano-Silva MV, Gomez MV, et al. Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2006;**118**(5):1154–8.
  27. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000;**36**(2):170–4.
  28. Kuroki T, Trapasso F, Shiraishi T, Alder H, Mimori K, Mori M, et al. Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;**62**(8):2258–60.
  29. Maier JA, Voulalas P, Roeder D, Maciag T. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 antisense oligomer. *Science* 1990;**249**(4976):1570–4.
  30. Ludes-Meyers JH, Bednarek AK, Popescu NC, Bedford M, Aldaz CM. WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenet Genome Res* 2003;**100**(1–4):101–10.
  31. Aihara T, Noguchi S, Ishikawa O, Furukawa H, Hiratsuka M, Ohigashi H, et al. Detection of pancreatic and gastric cancer cells in peripheral and portal blood by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1997;**72**(3):408–11.
  32. Bouquot JE, Whitaker SB. Oral leukoplakia – rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or “phases”. *Quintessence Int* 1994;**25**(2):133–40.
  33. Bouquot JE, Speight PM, Farthing PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa-Diagnostic problems and prognostic features. *Current Diagn Pathol* 2006;**12**(1):11–21.
  34. Chen T, Sahin A, Aldaz C. Deletion map of chromosome 16q in ductal carcinoma in situ of the breast: refining a putative tumor suppressor gene region. *Cancer Res* 1996;**56**(24):5605–9.
  35. Guler G, Uner A, Guler N, Han SY, Iliopoulos D, McCue P, et al. Concordant loss of fragile gene expression early in breast cancer development. *Pathol Int* 2005;**55**(8):471–8.
  36. Mahajan NP, Whang YE, Mohler JL, Earp HS. Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer Res* 2005;**65**(22):10514–23.
  37. Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, et al. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003;**63**(4):878–81.
  38. Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Druck T, Ottey M, McCorkell KA, et al. Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. *Cancer Lett* 2006;**232**(1):27–36.
  39. Iliopoulos D, Guler G, Han SY, Johnston D, Druck T, McCorkell KA, et al. Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* 2005;**24**(9):1625–33.
  40. Venables JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res* 2004;**64**(21):7647–54.
  41. Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, Baffa R, et al. Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;**10**(9):3053–8.
  42. Park SW, Ludes-Meyers J, Zimonjic DB, Durkin ME, Popescu NC, Aldaz CM. Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Brit J Cancer* 2004;**91**(4):753–9.
  43. Guler G, Uner A, Guler N, Han S, Iliopoulos D, Hauck WW, et al. The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer* 2004;**100**(8):1605–14.

## **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

#### 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leucoplasia bucal é a lesão cancerizável mais comum, representando 85% de todas as lesões com potencial de malignização da cavidade bucal (BOUQUOT & GORLIN, 1986; NEVILLE & DAY, 2002). A incidência de transformação maligna dessas lesões varia de 3,6 a 6% (SILVERMAN *et al.*, 1984). Contudo estudos recentes mostram um aumento desse índice oscilando entre 8,9 a 17,5% (BOUQUOT & WHITAKER, 1994; BOUQUOT *et al.*, 2006).

Ainda hoje, os aspectos clínicos (como leucoplasia homogênea/não-homogênea) associados com os achados histopatológicos (presença ou ausência de displasia celular) são os principais parâmetros usados para a indicação de possibilidade de transformação maligna em lesões cancerígenas (REIBEL, 2003). Contudo, nem todas as leucoplasias com presença de displasia irão sofrer transformação maligna e cerca de 15% de lesões leucoplásicas sem atipia celular sofrem malignização (SILVERMAN. *et al.*, 1984).

O uso de marcadores biológicos preditivos para a transformação maligna das leucoplasias seria essencial para a melhor determinação da evolução de algumas dessas lesões para o CCE de boca. Diversos estudos têm demonstrado alterações genéticas e epigenéticas nessas lesões, sendo também encontradas no CCE de boca. A perda de heterozigossidade é um exemplo, no qual a perda no braço curto dos cromossomos 3 e 9 aumenta o risco de transformação maligna em 3,8 vezes e uma adicional perda no braço curto dos cromossomos 8 e 17 e no braço longo dos cromossomos 4, 11 e 13 elevam a chance em 33 vezes (ROSIN *et al.*, 2000). Hibridização *in situ* de cromossomos tem sido utilizada para detecção

de replicação anormal de cromossomos em leucoplasias. Estudos indicam que um número anormal dos cromossomos 7 e 17 (LEE *et al.*, 1993) e lesões com uma proporção acima de 3% de células com trissomia do cromossomo 9 tem uma chance de transformação maligna bem maior. (LEE *et al.*, 1993). A perda da função do gene *p53* é também encontrada nessas lesões devido a mutações, perda de heterozigiosidade e alterações na região promotora. A função do *p53* como um gene supressor de tumor faz das mutações ou alteração de sua expressão um poderoso mecanismo na carcinogênese (PARTRIDGE *et al.*, 1998). Hipermetilação da região promotora de genes como *RAR-β2*, *p16*, *MGMT* e *p53* também já foram descritas em lesões leucoplásicas (LOPES *et al.*, 2003; YOUSSEF *et al.*, 2004). Apesar das alterações moleculares encontradas nas leucoplasias bucais, nenhum dos estudos demonstrou o efetivo uso dessas modificações como método de identificação das lesões que podem sofrer ou não transformação maligna (REIBEL, 2003). Futuros estudos são importantes para descoberta de novos marcadores para a determinação do progresso dessas lesões para CCE (ODANI *et al.*, 2006).

No presente trabalho, demonstramos que a expressão do gene *WWOX* está comumente alterada na leucoplasia bucal. Análise dos dados obtidos com o estudo de RNA e proteína mostrou que o *WWOX* está alterado em 35% das leucoplasias estudadas, com 26% dos casos mostrando transcritos aberrantes ou ausência de mRNA e 26% dos casos com redução da expressão da proteína *Wwox*. Relacionando esses achados com a presença de alterações no *WWOX* em 50% dos casos de carcinomas de células escamosas, no trabalho de PIMENTA *et al.* (2005) pode-se sugerir o envolvimento do gene *WWOX* no processo inicial da carcinogênese do epitélio de revestimento da cavidade bucal.

Apesar de alguns autores acreditarem que as alterações nesse gene estão relacionadas com a progressão das neoplasias malignas, alguns achados corroboram com nossa opinião. Primeiro, o fato de que alterações no gene *WWOX* foram descritas em lesões pré-câncer de mama (CHEN *et al.*, 1996; GULER *et al.*, 2005); segundo, linhagens de células de câncer de mama com expressão reduzida ou ausente do gene *WWOX* perdiam a sua capacidade de proliferar quando os níveis de expressão do gene *WWOX* eram restabelecidos via reposição do gene por infecção por Ad*WWOX* (BEDNAREK *et al.*, 2001).

Evidências têm demonstrado que o gene supressor de tumor *WWOX* participa do processo de carcinogênese em inúmeros tipos diferentes de tumores malignos. O gene *WWOX* está localizado no braço longo do cromossomo 16 (região 23.3-q24.1) associado a região do sítio de fragilidade comum FRA16D. Sítios de fragilidade são regiões cromossômicas que apresentam atraso na duplicação do material genético, levando ao surgimento de quebras ou rupturas na região do cromossomo em decorrência da duplicação incompleta do DNA. Esse atraso pode ser acentuado sob ação de agentes externos como, por exemplo, a afidicolina, que é um inibidor das DNA polimerases do tipo  $\alpha$  e  $\delta$ . Trabalhos têm demonstrado uma alta frequência de seqüências recombinantes geradas de rearranjos, em lesões malignas, nas regiões cromossômicas onde se encontram os sítios de fragilidade (POPESCU, 2003).

Sítios de fragilidade do tipo comum são regiões susceptíveis e preferencialmente alvos de agentes carcinogênicos, podendo ocorrer alterações em mais de um sítio de fragilidade, concomitantemente. Resultados com carcinoma hepatocelular sustentam fortemente a noção que, alterações de genes

associados a sítios de fragilidade são consequência da exposição a agentes carcinogênicos (CROCE *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2004). Alterações no gene *WWOX* também poderiam ser comuns em cânceres causados primariamente por exposição a agentes carcinogênicos. Isto é sustentado por trabalhos prévios em carcinoma de células escamosas de esôfago, pulmão e boca, que são tumores fortemente associados à exposição a agentes carcinógenos, como o tabaco e o álcool (KUROKI *et al.*, 2002; YENDAMURI *et al.*, 2003, DONATI *et al.*, 2007). Outros trabalhos reforçam essa relação entre genes que expandem sítios de fragilidade e agentes carcinogênicos, como LAI *et al.* (2005) e ISHII *et al.*, (2005) em carcinoma de células escamosas de pele, associado à radiação ultravioleta e AQEILAN *et al.* (2004a) em adenocarcinoma gástrico associado ao *H. pylori* e tabaco.

Presença de alterações displásicas na leucoplasia, ao exame histopatológico, varia de 5 a 25% (VAN DER WAAL & AXÉLL, 2002). Enquanto lesões com displasia acentuada são mais susceptíveis a transformação maligna, esse processo é também encontrado em lesões com grau discreto, moderado ou ausente. No nosso estudo, todos os casos com alteração no gene *WWOX* apresentavam displasia epitelial (5 dos 11 casos com displasia moderada/acentuada e 3 dos 8 casos com displasia discreta), mostrando uma associação entre presença de displasia e alterações no gene *WWOX*.

Transcritos alternativos têm sido encontrados associados a várias doenças (VENABLES, 2004). Transcritos aberrantes ocorrem com maior frequência em câncer devido ao aumento da atividade da proliferação celular ou outros problemas na maquinaria da transcrição do mRNA. Além disso, anormalidades da

transcrição geralmente afetam genes que apresentam transcritos longos tais como o gene *WWOX* (LUDES-MEYERS *et al.*, 2003).

Embora 4 das 6 lesões com transcritos alterados/ausente do mRNA do *WWOX* apresentaram redução da expressão da proteína, em 2 casos, foram detectadas apenas alterações no mRNA com expressão normal da proteína *Wwox*. Por outro lado, 2 casos apresentaram redução da imunolocalização dessa proteína, sem qualquer alteração na transcrição do mRNA. Como as duas técnicas de análise foram realizadas em fragmentos distintos da lesão, essa discrepância provavelmente ocorreu devido à heterogeneidade da expressão do *WWOX*. Além disso, em todos os casos que foram detectados transcritos aberrantes do mRNA, havia também a presença do transcrito normal. A presença do transcrito normal pode ser em decorrência de sua expressão pelas células leucoplásicas, mas também de contaminação de tecido adjacente normal ou conjuntivo. Por mais que se tenha cuidado de fazer a microdissecção algumas vezes, uma pequena quantidade de células normais pode contaminar a amostra e ser suficiente para a sua expressão, devido à alta sensibilidade da técnica de RT-PCR.

## **5. CONCLUSÕES**



## 5 - CONCLUSÕES

Através desse estudo podemos concluir:

- O gene *WWOX* está alterado em 35% dos casos de leucoplasia bucal analisados, sugerindo a participação desse gene no processo de carcinogênese do CCE de boca;
- Existem transcritos aberrantes do gene *WWOX* em leucoplasia bucal;
- Redução da expressão da proteína *WWOX* ocorreu em 26% dos casos de CCE de boca;
- Alterações no gene *WWOX* foram encontradas principalmente em lesões apresentando displasia epitelial;
- Alterações no gene *WWOX* podem estar relacionadas com o início do processo de carcinogênese do CCE de boca;

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AIHARA T, NOGUCHI S, ISHIKAWA O, *et al.* Detection of pancreatic and gastric cancer cells in peripheral and portal blood by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1997; 72(3):408-11.
- 2- AQEILAN RI, PEKARSKY Y, HERRERO JJ, *et al.* Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004(a); 101(13):4401-6.
- 3- AQEILAN RI, KUROKI T, PEKARSKY Y, *et al.* Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2004(b); 10(9):3053-8.
- 4- AQEILAN RI & CROCE CM. WWOX in biological control and tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2007; 212(2):307-10.
- 5- AXÉLL T, PINDBORG JJ, SMITH CJ, VAN DER WALL I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tabacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21,1994 An International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med* 1996; 25(2):25-49.
- 6- BEDNAREK AK, LAFLIN KJ, DANIEL RL, *et al.* WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60(8):2140-5.

- 7- BEDNAREK AK, KECK-WAGGONER CL, DANIEL RL, *et al.* WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res* 2001 61(22):8068-73.
- 8- BOUQUOT JE, GORLIN RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 61(4):373-81.
- 9- BOUQUOT JE, WHITAKER SB. Oral leukoplakia—Rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or “phases.” *Quintessence Int* 1994; 25(2):133-40.
- 10- BOUQUOT JE, SPEIGHT PM, FARTHING PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa-Diagnostic problems and prognostic features. *Current Diag Pathol* 2006; 12(1):11-21.
- 11- CHANG NS, PRATT N, HEATH J, *et al.* Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* 2001; 276 (5):3361-70.
- 12- CHEN T, SAHIN A, ALDAZ CM. Deletion map of chromosome 16q in ductal carcinoma *in situ* of the breast: refining a putative tumor suppressor gene region. *Cancer Res* 1996; 56(24):5605-9.
- 13- CHER ML, ITO T, WEIDNER N, CARROLL PR, JENSEN RH. Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Urol* 1995; 153(1):249-54.
- 14- CROCE CM, SOZZI G, HUEBNER K. Role of *FHIT* in human cancer. *J. Clin. Oncol* 1999; 17(5):1618-24.

- 15- DIAS EP, PIMENTA FJ, SARQUIS MS, *et al.* Association between decreased WWOX protein expression and thyroid cancer development. *Thyroid*; 2007; 17(11):1055-9.
- 16- DONATI V, FONTANINI G, DELL'OMODARME M, *et al.*, WWOX expression in different histologic types and subtypes of non – small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3):884-91.
- 17- DRIOUCH K, PRYDZ H, MONESE R, JOHANSEN H, LIDEREAU R, FRENGEN E. Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene* 2002; 21(12):1832-40.
- 18- DRUMMOND SN, DE MARCO L, NORONHA JC, GOMEZ RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40(1):52-5.
- 19- DRUMMOND SN, NORONHA JC, GOMEZ RS, *et al.* Association between GSTT-1 gene deletion and the susceptibility to oral squamous cell carcinoma in cigarette-smoking subjects. *Oral Oncol* 2005; 41(5):515-9.
- 20- DUTRILLAUX B, GERBAULT-SEUREAU M, ZAFRANI, B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer: a comparison of 30 paradiploid cases with few chromosome changes. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 49(2):203-17.
- 21- ELO JP, HÄRKÖNEN P, KYLLÖNEN AP, LUKKARINEN O, VIHKO P. Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive

- behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumor and poor prognosis for the patient. *Br. J. Cancer* 1999; 79(1):156-60.
- 22- EVSTIFEEVA TV, ZARIDE DG. Nass use, cigarette smoking, alcohol consumption and risk of oral and esophageal precancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992; 28B(1):29-35.
- 23- GALE N, *et al.* Ephetelial Precursor Lesions. In. BARNES L, EVESON JW, REICHART P, SEDRANSKY D. World Health Organization Classification of Tumors Pathology & Genetic of Head Neck Tumors. p. 177-179 , Lyon 2005.
- 24- GAUDIO E, PALAMARCHUK A, PALUMBO T, *et al.* Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer Res* 2006; 66(24):11585-9.
- 25- GLOVER TW. Common fragile sites: review. *Cancer Lett* 2006; 232(1):4-12.
- 26- GULER G, UNER A, GULER N, *et al.* The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer* 2004; 100(8):1605-14.
- 27- GULER G, UNER A, GULER N, *et al.* Concordant loss of fragile gene expression early in breast cancer development. *Pathol Int* 2005; 55(8):471-8.
- 28- GUPTA PC. A study of dose-response relationship between tobacco habits and oral leukoplakia. *Br J Cancer* 1984; 50(4):527-31.
- 29- HA PK, CALIFANO JA. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(1):363-9.

- 30- ILIOPOULOS D, GULER G, HAN SY, *et al.* Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* 2005; 24(9):1625-33.
- 31- ILIOPOULOS D, GULER G, HAN SY, *et al.* Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. *Cancer Lett* 2006; 232(1):27-36.
- 32- ISHI H, VECCHIONE A, FURUKAWA Y, *et al.* Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies. *Mol Cancer Res* 2003; 1(13):940-7.
- 33- ISHII H, MIMORI K, INAGETA T, *et al.* Components of DNA damage checkpoint pathway regulate UV exposure – dependent alterations of gene expression of *FHIT* and *WWOX* at chromosome fragile sites. *Mol Cancer Res* 2005; 3(3):130-8.
- 34- IWABUCHI H, SAKAMOTO M, SAKUNAGA H, *et al.* Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res* 1995; 55(24):6172-80.
- 35- JOHNSON NW, WARNAKULASURIYA S, TAVASSOLI M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer* 1996; 5(1):5-17.
- 36- KAWAKAMI M, STAUB J, CLIBY W, *et al.* Involvement of H-cadherin (CDH13) on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer. *Int. J. Oncol* 1999; 15(4):715-20.
- 37- KRAMER IRH, LUCAS RB, PINDBORG JJ, SOBIN LH. Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related

- lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46(4):518-39.
- 38- KRUMMEL KA, ROBERTS LR, KAWAKAMI M, GLOVER TW, SMITH DI. The characterization of the common fragile site FRA16D and its involvement in multiple myeloma translocations. *Genomics* 2000; 69(1):37-46.
- 39- KUROKI T, TRAPASSO F, SHIRAIISHI T, *et al.* Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62(8):2258-2260.
- 40- KUROKI T, YENDAMURI S, TRAPASSO F, *et al.* The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10(9):2459-65.
- 41- LAI FJ, CHENG CL, CHEN ST, *et al.* WOX1 is essential for UVB irradiation-induced apoptosis and down-regulated via translational blockade in UVB-induced cutaneous squamous cell carcinoma in vivo. *Clin Cancer Res* 2005; 11(16):5769-77.
- 42- LE BEAU MM, RASSOOL FV, NEILLY ME, *et al.* Replication of a common fragile site, FRA3B, occur late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum Mol Genet* 1998; 7(4):755-61.
- 43- LEE CH, KO YC, HUANG HL, *et al.* The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral sbmucous fibrosis in southern Taiwan. *Br J Cancer* 2003; 88(3):366-72.



- 44- LEE JJ, HONG WK, HITTELMAN WN, *et al.* Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research Clin Cancer Res 2000; 6(5):1702-10.
- 45- LEE JS, KIM SH, HONG WK, *et al.* Detection of chromosomal polysomy in oral leukoplakia, a premalignant lesion. J Natl Cancer Inst 1993; 85(23):1951-4.
- 46- LESCH CA, SQUIER CA, CRUCHLEY A, WILLIAMS DM, SPEIGHT PM. The permeability of human oral mucosa and skin to water. J Dent Res 1989; 68(9):1345-49.
- 47- LI C, BERX G, LARSSON C, *et al.* Distinct deleted regions on chromosome segment 16q23-q24 associated with metastases in prostate cancer. Genes Chrom Cancer 1999; 24(3):175-82.
- 48- LOPEZ M, AGUIRRE JM, CUEVAS N, *et al.* Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients – a diagnostic and/or prognostic tool? Eur J Cancer 2003; 39(16):2306-09.
- 49- LUDS-MEYERS JH, BEDNAREK AK, POPESCU NC, BEDFORD M, ALDAZ CM. WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. Cytogenet Genome Res 2003; 100(1-4):101-10.
- 50- LUDS-MEYERS JH, KIL H, BEDNAREK AK, *et al.* WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: identification of candidate interacting proteins. Oncogene 2004; 23(29):5049-55.
- 51- MAIER JA, VOULALAS P, ROEDER D, MACIAG T. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1  $\alpha$  antisense oligomer. Science 1990; 249(4976):1570-4.

- 52- MAJUMDER M, SIKDAR N, PAUL RR, ROY B. Increased Risk of Oral Leukoplakia and Cancer Among Mixed Tobacco Users Carrying *XRCC1* Variant Haplotypes and Cancer Among Smokers Carrying Two Risk Genotypes: One on Each of Two Loci, *GSTM3* and *XRCC1* (Codon 280). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(9): 2106-12.
- 53- MAHAJAN NP, WHANG YE, MOHLER JL, EARP HS. Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer Res* 2005; 65(22):10514-23.
- 54- MEHTA FS, GUPTA PC, PINDBORG JJ. Chewing and smoking habits in relation to precancerous and oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1981; 99(1-2):35-9.
- 55- MINETA H, MIURA K, TAKEBAYASHI S, MISAWA K, UEDA Y, *et al.* Low expression of fragile histidine triad gene correlates with high proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002; 39(1):56–63.
- 56- MITHANI SK, MYDLARZ WK, GRUMBINE FL, SMITH IM, CALIFANO JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis* 2007;13(2):126-33.
- 57- MORENO-LÓPEZ LA, ESPARZA-GÓMEZ GC, GONZÁLEZ-NAVARRO A, CERERO-LAPIEDRA R, GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ MJ, *et al.* Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncology* 2000; 36(2):170-4.
- 58- MORI M, MIMORI K, SHIRAISHI T, ALDER H, INOUE H, *et al.* Altered expression of FHIT in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. *Cancer Res* 2000; 60(5):1177–82.

- 59- NEVILLE BW, DAY TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52(4):195-215.
- 60- NISHIDA N, FUKUDA Y, KOKURYU H, *et al.* Accumulation of allelic loss on arms of chromosomes 13q, 16q and 17q in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 1992; 51(6):862-8.
- 61- NUNEZ MI, ROSEN DG, LUDES-MEYERS JH, ABBA MC, KIL H, *et al.* WWOX protein expression varies among ovarian carcinoma histotypes and correlates with less favorable outcome. *BMC Cancer* 2005(a); 5(1):1-10.
- 62- NUNEZ MI, LUDES-MEYERS J, ABBA MC, KIL H, ABBEY NW, *et al.* Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status. *Breast Cancer Res Treat* 2005 (b); 89(2):99-105.
- 63- ODANI T, ITO D, LI MH, KAWAMATA A, ISOBE T, *et al.* Gene expression profiles of oral leukoplakia and carcinoma: genome-wide comparison analysis using oligonucleotide microarray technology. *Int J Oncol* 2006; 28(3):619-24.
- 64- O'KEEFE LV, RICHARDS RI. Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D. *Cancer Lett* 2006; 232(1):37-47.
- 65- OHTA M, INOUE H, COTTICELLI MG, KASTURY K, BAFFA R, *et al.* The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84(4):587-97.

- 66- PAIGE AJ, TAYLOR KJ, TAYLOR C, *et al.* WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(20):11417-22.
- 67- PANDIS N, HEIM S, BARDI G, *et al.* Whole-arm t(1;16) and I (1q) as sole anomalies identify gain of 1q as a primary chromosomal abnormality in breast cancer. Genes Chrom Cancer 1992; 5(3):235-38.
- 68- PARK SW, LUDER-MEYERS J, ZIMONJIC DB, *et al.* Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. Br J Cancer 2004; 91(4):753-9.
- 69- PARTRIDGE M, EMILION G, PATEROMICHELAKIS S, *et al.* Allelic imbalance at chromosomal loci implicated in the pathogenesis of oral precancer, cumulative loss and its relationship with progression to cancer. Oral Oncol 1998; 34(2):77-83.
- 70- PAULA AMB, GOMEZ RS. Immunolocalization of p53, Glutathione S transferase  $\pi$  and CD57 Antigens in Oral Leukoplakia. Antic Res 2001; 21(1A):379-86.
- 71- PIMENTA FJ, GOMES DA, PERDIGÃO PF, *et al.* Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas. Int J Cancer 2006; 118(5):1154-8.
- 72- PINDBORG JJ, DAFTARY DK, MEHTA FS. A Follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod 1977; 43(3):383-90.

- 73- POPESCU NC. Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Let* 2003; 192(1):1-17.
- 74- QIN HR, ILIOPOULOS D, SEMBA S, *et al.* A role for the *WWOX* gene in prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66(13):6477-81.
- 75- REIBEL J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics: review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(1):47-62.
- 76- RICHARDS RI. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends in Genetics* 2001; (6):339-45.
- 77- RIED K, FINNIS M, HOBSON L, *et al.* Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Human Mol Gen* 2000; 9(11):1651-63.
- 78- ROSIN MP, CHENG X, POH C, *et al.* Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):357-62.
- 79- SAPP JP, EVERSOLE LR, WYSOCKI GP. Epithelial disorders. In: *Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology*. 1.ed. St. Louis: Mosby, 1997. p.174-182.
- 80- SCHEPMAN KP, VAN DER MEIJ EH, SMEELE LE, VAN DER WAAL I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol* 1998; 34(4):270-5.

- 81- SCULLY C, SUDBO J, SPEIGHT PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(5):251-26.
- 82- SHIU MN, CHEN TH. Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13(1):39-45.
- 83- SILVERMAN JR S, GORSKY M, LOZADA F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53(3): 563-8.
- 84- SOZZI G, TORNIELLI S, TAGLIABUE E, *et al.* Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res* 1997;57(23):2121-3.
- 85- SKOTNICKA-KLONOWICZ G, RIESKE P, BARTKOWIAK J, *et al.* 16q heterozygosity loss in Wilm's tumor in children and its clinical importance. *Eur. J. Surg. Oncol* 2000; 26(1):61-6.
- 86- STEIN CK, GLOVER TW, PALMER JL, GLISSON BS. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34(3):333-40.
- 87- SUDBO J, BRYNE M, MAO L, *et al.* Molecular based treatment of oral cancer: review. *Oral Oncol* 2003; 39(8):749-58.
- 88- SUZUKI H, KOMIYA A, EMI M, *et al.* Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers. *Genes Chrom Cancer* 1996; 17(4):225-33.
- 89- TAI SK, LEE JI, ANG KK, *et al.* Loss of Fhit expression in head and neck squamous cell carcinoma and its potential clinical implication. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16):5554-7.

- 90- THAVATHIRU E, LUDES-MEYERS JH, MACLEOD MC, ALDAZ CM. Expression of common chromosomal fragile site genes, WWOX/FRA16D and FHIT/FRA3B is downregulated by exposure to environmental carcinogens, UV, and BPDE but not by IR. *Mol Carcinog* 2005;44(3):174-82.
- 91- VAN DER WAAL I, AXÉLL T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol* 2002; 38(6):521-6.
- 92- ENABLES JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7647-54.
- 93- WANG F, DENISON S, LAI JP, *et al.* Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma *Genes Chromo Cancer* 2004; 40(2):85-96.
- 94- WARNAKULASURIYA S, JOHNSON NW, VAN DER WAAL I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(10):575-80.
- 95- YENDAMURI S, KUROKI T, TRAPASSO F, *et al.* WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63(4): 878-81.
- 96- YOUSSEF EM, LOTAN D, ISSA JP, *et al.* Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta (2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10(5):1733-42.

## **7. ANEXOS**



**ANEXO A**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “Análise Molecular do Gene Supressor de Tumor *WVVOX* em Leucoplasias Bucais”. A leucoplasia bucal é a lesão cancerizável mais comum da cavidade bucal. Apresenta uma incidência de transformação que varia em torno de 1 a 30% dos casos. Como se tem estabelecido que cigarro e álcool são as principais causas do câncer de boca e que estes hábitos podem levar a alterações genéticas no gene *WVVOX*, este projeto de pesquisa tem como objetivo, estabelecer uma relação entre alterações no gene *WVVOX* e leucoplasia bucal. Para esse estudo, preciso coletar um fragmento da lesão, durante o procedimento de biópsia que é necessária para o diagnóstico do tumor. Este estudo não é necessário para o diagnóstico, mas é de fundamental importância para a realização desta pesquisa. Além disso, não oferecerá riscos adicionais à sua saúde. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor essa patologia e isso será muito importante para que num futuro próximo possamos tratá-la melhor.

Mesmo não concordando em participar desta pesquisa, o seu tratamento odontológico será realizado normalmente. Se houver algum problema durante o mesmo, você deve seguir os procedimentos normais da clínica, ou seja, ligar para o profissional que o atender.

**TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a coleta do fragmento da lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ No. \_\_\_\_\_

Pesquisador: **Flávio Juliano Garcia Santos Pimenta**. Telefone: (31) 9195-0339/(31) 3335-8527.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (**COEP**). Em caso de dúvida, você pode ligar para o **COEP** através do número (31) 3248-9364.

**ANEXO B****FICHA CLÍNICA**

Nº \_\_\_\_\_

1- Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

2- Local de Coleta: \_\_\_\_\_

3- Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

4- Endereço: \_\_\_\_\_

5- Profissão: \_\_\_\_\_

6- Hábitos:

## Tabagismo

- Tipo: \_\_\_\_\_
- Frequência: \_\_\_\_\_
- Tempo: \_\_\_\_\_

## Etilismo

- Tipo: \_\_\_\_\_
- Frequência: \_\_\_\_\_
- Tempo: \_\_\_\_\_

7- Localização da lesão: \_\_\_\_\_

8- Diagnóstico Histopatológico: \_\_\_\_\_

**ANEXO C****SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE RNA****- Água DEPC**

DEPC	10 mg
------	-------

Água Deionizada q.s.p	100 ml
-----------------------	--------

Autoclavar para inativar o DEPC.

**ANEXO D****SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA PAGE****- Solução de Acrilamida/Bisacrilamida 30%**

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

**- Tampão TBE 10x pH 8,3**

Tris base	60,50 g
Ácido bórico	30,85 g
EDTA dissódico bi-hidratado	3,72 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

**- Gel de poliacrilamida a 6,5%**

Solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1)	1,079 ml
TBE 10x	0,65 ml
Água destilada	3,22 ml
Persulfato de amônio 10%	40 µl
TEMED	4,0 µl

**- Tampão TBE 1x**

TBE 10x	10 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml

**- Tampão de amostra (*Gel loading buffer*)**

Azul de bromofenol	0,25%
Xileno cianol	0,25%
Glicerol	30%
Água destilada q.s.p.	100 ml

**ANEXO E****SOLUÇÕES UTILIZADAS NA COLORAÇÃO PELA PRATA****- Solução de prata (estoque)**

Nitrato de prata	20,38 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

**- Solução de prata (uso)**

Solução de estoque	8 ml
Água destilada	100 ml
Formaldeído 37%	150 µl

**- Revelador**

Carbonato de sódio	2,97 g
Água destilada q.s.p.	100 ml
Formaldeído 37%	150µl
Tiosulfato de sódio 10mg/ml	40 µl

Deve ser utilizado quando em temperatura entre 10 e 18°C

**- Solução Fixadora**

Ácido acético glacial	100 ml
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

**- Solução de Tiosulfato de sódio**

Tiosulfato de sódio	10 mg
Água destilada q.s.p.	1 ml

**ANEXO F****SOLUÇÕES UTILIZADAS NA PURIFICAÇÃO PELA COLUNA****- Tampão TAE 40x**

Tris base	193,6 g
Acetato de sódio trihidratado	108,9 g
EDTA dissódico bihidratado	15,2 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

**- Tampão TAE 10x**

Tampão TAE 40 x	250 ml
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

**- Tampão TAE 1x**

Tampão TAE 40x	25 ml
Água destilada	1.000 ml

**- Gel de Agarose**

Agarose	2.0 g
TAE 1x	100 ml

**- Solução de Brometo de etídeo**

Brometo de etídeo	20 µl
Água destilada	200 ml



## ANEXO G

### SOLUÇÕES UTILIZADAS NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

#### - Terminator Ready Reaction Mix

- “ A- Dye Terminator, marcado com dicloro[R6G]” ;
- “ C- Dye Terminator marcado com dicloro[ROX]”;
- “ G- Dye Terminator marcado com dicloro[R110]”;
- “ T- Dye Terminator marcado com dicloro[TAMPRA]”.
- Deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
- AmpliTaq DNA polymerase, FS, com estabilizador térmico
- MgCl<sub>2</sub>
- Tris-HCl buffer, pH9.0

#### - Tampão de diluição:

- 400mM de Tris-HCl pH 9, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>

#### - *ABI PRISM 310 Genetic Analyser Buffer with EDTA*

#### - Template Supression Reagent (TSR)

**ANEXO H****SOLUÇÕES UTILIZADAS NA IMUNOISTOQUÍMICA****- Tampão TRIS-HCL 20 mM**

TRIS-HCL	2,42 g
NaCl	8,5 g

Acertar o pH para 7.4 e completar o volume para 1.000 ml com água destilada.

**- Solução para Recuperação Antigênica (EDTA 1 mM)**

EDTA	0,37 g
------	--------

Acertar o pH para 8.0 e completar o volume para 1.000 ml com água destilada.

**- Solução de Hidróxido de Amônio 10%**

Hidróxido de Amônio	30 ml
Álcool Etílico Absoluto	270 ml

**- Solução Reveladora**

Diaminobenzidina (DAB)	25 mg
Tampão TRIS-HCL 20 mM	120 ml
Peróxido de Hidrogênio 10 volumes	1,2 ml

## ANEXO I

## SEQUÊNCIA DO cDNA DO GENE WWOX

1 gcagtgcgca ggcgtgagcg gtcggggcccc gacgcgcgcg ggtctcgttt ggagcgggag  
 61 tgagttcctg agcgagtgga cccggcagcg ggcgataggg gggccagggtg cctccacagt  
 121 cagccatggc agcgtcgcgc tacgcggggc tggacgacac ggacagtgag gacgagctgc  
 181 ctccgggctg ggaggagaga accaccaagg acggctgggt ttactacgcc aatcacaccg  
 241 aggagaagac tcagtgggaa catccaaaaa ctggaaaaag aaaacgagtg gcaggagatt  
 301 tgccatacgg atgggaacaa gaaactgatg agaacggaca agtgtttttt gttgaccata  
 361 taaataaaag aaccacctac ttggacccaa gactggcgtt tactgtggat gataatccga  
 421 ccaagccaac caccgggcaa agatacgacg gcagcaccac tgccatggaa attctccagg  
 481 gccgggattt cactggcaaa gtggttggg tctactggagc taattcagga atagggttcg  
 541 aaaccgcaa gtctttgcc ctccatggtg cacatgtgat cttggcctgc aggaacatgg  
 601 caaggcgag tgaagcagtg tcacgcattt tagaagaatg gcataaagcc aaggtagaag  
 661 caatgacctt ggacctcgtc ctgctccgta gcgtgcagca tttgctgaa gcattcaagg  
 721 ccaagaatgt gcctttcat gtgcttggg gcaacgcagc aacttttct ctaccctgga  
 781 gtctaccaa agatggcctg gagaccacct ttcaagtga tcatctgggg cactctacc  
 841 ttgtccagct ctccaggat gttttgtgcc gctcagctcc tgcccgtgc attgtgtct  
 901 cctcagagtc ccatcgattt acagatatta acgactcctt gggaaaactg gacttcagtc  
 961 gcctctctcc acaaaaaaac gactattggg cgatgctggc ttataacagg tccaagctct  
 1021 gcaacatcct ctctccaac gagctgcacc gtcgctctc cccacgcggg gtcacgtcga  
 1081 acgcagtgca tcttggaat atgatgtact ccaacattca tcgcagctgg tgggtgtaca  
 1141 cactgctgtt tacctggcg aggccttca ccaagtccat gcaacaggga gctgccacca  
 1201 ccgtgtactg tgctgctgc ccagaactgg agggctctggg aggggatgtac ttcaacaact  
 1261 gctgccgctg catgccctca ccagaagctc agagcgaaga gacggcccgg accctgtggg  
 1321 cgctcagcga gaggctgac caagaacggc ttggcagcca gtccggctaa gtggagctca  
 1381 gagcggatgg gcacacacac ccgccctgtg tgtgtcccct cagcaagtg ccagggtctg  
 1441 gcccttcca aatgtccctc caacacagat ccgcaagagt aaaggaaata agagcagta  
 1501 caacagagtg aaaaatctta agtaccatg ggaagcaggg aattctggg gtaaagtac  
 1561 acttttctgg ggctgggcta ggcataagtc tctttgctt ctggtgggtg cctgtttgaa  
 1621 agtaaaaaac tgcttgggtg gtaggttccg tatctcctg gagaagcacc agcaattctc  
 1681 tttcttttac tgttatagaa tagcctgagg tccctctgc ccatccagct accaccacgg  
 1741 ccaccactgc agccgggggc tggcctctc ctacttaggg aagaaaaagc aagtgttcc  
 1801 tgctccttgc tgcattgac caggagataa ttgttctt catcctgacc aagactgagc  
 1861 cagcttagca actgctgggg agacaaatct cagaacctt tcccagccag tgaggatgac  
 1921 agtgacacc agaggagta gaatacgag aactaccagg tggcaaagta cttgtcatg  
 1981 actcctttgc taatgctatg caaaaaatc tttagagatt ataacaaatt tttcaatca  
 2041 ttcttagat acctgaaag gcaggaaggg aagcgtatat acttaagaat acacaggata  
 2101 tttgggggg cagagaataa aacgttagt atccctttg tctgtcaatc acagtctcag  
 2161 ttctcttctt acattgt acttaacct cctgctgtc ctgcatect atgcttaata  
 2221 aaagaacatg ctggaatc aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaa

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)