

Flávio Juliano Garcia Santos Pimenta

Análise molecular do gene *WWOX* no carcinoma de células
escamosas da cavidade bucal

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Armando de Marco

Belo Horizonte
Faculdade de Odontologia da UFMG
2005

AGRADECIMENTOS

A DEUS, porque tudo é para ele, por ele e dele 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 e profissional.

Ao meu pai Luiz, exemplo de profissional e de perseverança.

À minha mãe Carolina, pelo intenso incentivo.

Ao professor Ricardo Gomez, responsável direto pela minha formação profissional, que soube me incentivar e motivar durante todo o mestrado. Você não orientou apenas o meu mestrado, mas sim a minha vida. Agradeço pela atenção e por tudo que me ensinou.

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 meus grandes amigos Sérgio Jr. e Leonardo Gomes, companheiros e incentivadores.

Aos amigos Davidson, Michele, Paolla e Dani, responsáveis diretos pela execução do meu trabalho, pelos ensinamentos, amizade e convivência.

Às minhas novas amigas Paula e Jeane, pelo companheirismo, atenção e conselhos.

Ao prof. Wagner Castro, quem me abriu as portas na patologia.

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, Eliza, Júnia, Luciano, Sérgio, Alessandra, Carolina, André, Marina, Guilherme e Patrícia.

Às minhas colegas de mestrado, Mariela e Soraia, pela convivência e amizade.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Molecular, Guilherme, Letícia, Bia, Juliana, Elizabete.

Aos meus colegas do laboratório de Neurofarmacologia.

Às enfermeiras do Hospital Luxemburgo, pela disponibilidade e atenção.

Ao Dr. Alvimar e Dra. Márcia, pela oportunidade e disponibilidade que possibilitaram a realização do meu trabalho.

RESUMO

Carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade bucal, e representa aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas da boca. Sabe-se que a carcinogênese bucal ocorre como um processo de acumulação de danos genéticos como a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e perda de heterozigidade em vários cromossomos. Contudo, um mecanismo molecular específico envolvido no processo de carcinogênese do CCE ainda não foi completamente descrito.

O gene *WWOX* é um supressor de tumor localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q23.3-24.1). Esse gene expande a região do segundo mais expresso sítio de fragilidade comum, FRA16D. Alterações desse gene têm sido demonstradas em vários tipos de câncer como o carcinoma de células escamosas de esôfago e pulmão, que apresentam os fatores etiológicos semelhantes aos do CCE da cavidade bucal.

Para avaliar o mecanismo do gene *WWOX* no CCE de boca, nós analisamos 20 tumores primários e 10 casos de mucosa bucal normal. A transcrição do mRNA foi alterada em 35% dos tumores, com ausências completa de transcrição de dois casos (#CA3 e #CA18), ausência dos exons 6-8 (#CA2, #CA5, #CA21 e #CA24), do exon 7 (#CA2) e perda parcial dos exons 8 e 9 (#CA12). Com o objetivo de determinar se os transcritos aberrantes foram traduzidos em proteínas, às amostras foram submetidas ao Western blot. Os transcritos alterados presentes nos tumores #CA2, #CA5, #CA12, #CA21 e #CA24 não foram detectados pelo Western Blot, sugerindo que eles não são traduzidos em proteínas. Análise da expressão da proteína através da imunistoquímica revelou uma redução da expressão em 40% dos casos, quando comparado com a mucosa normal. Além disso, uma nova mutação somática (S329F) foi encontrada no

#CA12. A presença de alterações na transcrição do mRNA foi correlacionado com a redução da expressão da proteína WWOX nos tumores. Os resultados demonstram que 50% dos CCE de boca apresentam alterações no gene *WWOX*, que poderia contribuir para o processo de carcinogênese do câncer de boca.

SUMMARY

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity, representing approximately 90% of all oral carcinomas. It is acknowledged that oral carcinogenesis is a multi-step process of accumulated genetic damage, such as activation of oncogenes, tumor suppressor genes inactivation, and loss of heterozygosity at numerous chromosomal locations. However, the specific molecular mechanisms involved in OSCC tumorigenesis have not yet been completely elucidated.

The *WWOX* gene is a candidate tumor suppressor gene located at 16q23.3-24.1, spanning the second most common fragile site, FRA16D. Alterations of this gene have been demonstrated in multiple types of cancer, including lung and esophageal squamous cell carcinoma, which share some predictive factors with OSCCs. To evaluate the role of the *WWOX* gene in OSCC, we analyzed 20 tumors and 10 normal_oral mucosas. RNA transcription was altered in 35% of tumors, with complete absence of transcripts as well as absence of exons 6-8, exon 7, exons 6-8 and partial loss of exons 8 and 9. To determine if the aberrant transcripts were translated, Western blots were carried out; however only the normal protein was detected. Immunohistochemistry showed a reduction in *WWOX* protein expression affecting 40% of tumors when compared with normal mucosa. In addition, a novel somatic mutation (S329F) was found. The presence of alterations in mRNA transcription correlated with the reduced expression of *WWOX* protein in the tumors.

These results show that *WWOX* gene is frequently altered in OSCC and may contribute to the carcinogenesis processes in oral cancer.

LISTA DE TABELAS

	Página
1 – Resultados obtidos do sequenciamento dos produtos do RT-PCR e da imunistoquímica.	86

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
QUADRO 1 – Dados clínicos dos pacientes com CCE de boca do presente estudo.	53
QUADRO 2 - Iniciadores utilizados para a segunda amplificação do Nested RT-PCR.	61
QUADRO 3 – Produtos obtidos pelo Nested RT-PCR.	61
QUADRO 4 – Iniciadores e temperatura de anelamento utilizados para sequenciamento do DNA genômico.	63
QUADRO 5 – Protocolo de coloração pela prata do gel de poliacrilamida.	65
QUADRO 6 – Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.	69
DIAGRAMA 1 – Síntese do cDNA via transcrição reversa.	59
FIGURA 1- Curva padrão de BSA para quantificação de proteína	73
FIGURA 2 - Resultados obtidos pela amplificação e sequenciamento do cDNA e DNA genômico do gene <i>WWOX</i> em CCE de boca.	81
FIGURA 3 – Localização e distribuição da proteína <i>WWOX</i> no CCE e mucosa normal da boca.	82
FIGURA 4 – Investigação da proteína <i>WWOX</i> no CCE de boca através do Western Blot.	83
FIGURA 5 – Imunoistoquímica da proteína <i>WWOX</i> em CCE e mucosa normal da boca.	84

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

aa	Aminoácido
ADH	Aldeído desidrogenase
Ala	Alanina
Apc	Afidicolina
AP-2γ	Proteína de ativação 2 γ
BAC	Cromossomo artificial de fungo
BrdU	Bromo desoxi-uridina
BSA	Soro de albumina bovina
CCE	Carcinoma de células escamosas
cDNA	Ácido desoxirribonucléico clonado
CpG	Ilhas de dinucleotídeos CG
C-Terminal	Carboxi-terminal
16q	Braço longo do cromossomo 16
dATP	Desoxi adenilato trifosfatado
dCTP	Desoxi citidilato trifosfatado
ddNTP	Didesoxiribonucleotídeos trifosfatados
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dGTP	Desoxi guanilato trifosfatado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxi-nucleotídeos trifosfatados
dTTP	Desoxi timidilato trifosfatado
dsDNA	DNA de fita dupla
EDTA	Ácido tetra etileno diamino
E2F-1	Fator de transcrição E2F tipo 1
EVH1	Homólogo da família ENA/VASP
<i>FHIT</i>	Gene fragile histidine triad
FOR	Sítio de fragilidade oxidoreductase
FRA16D	Sítio de fragilidade comum 16D
FRA3B	Sítio de fragilidade comum 3B

FRA7G	Sítio de fragilidade comum 7G
FRA7H	Sítio de fragilidade comum 7H
FRA6E	Sítio de fragilidade comum 6E
FRAXA	Sítio de fragilidade raro XA
FRAXE	Sítio de fragilidade raro XE
FRAXF	Sítio de fragilidade raro XF
FRA16A	Sítio de fragilidade raro 16A
FRA11B	Sítio de fragilidade raro 11B
g	Gravidade
G2	Fase pré-mitótica do ciclo celular
GAPDH	Gliceraldeído desidrogenase
GFP	Proteína de fluorescência verde
GLB	Tampão de corrida do gel
Kb	Quilo base
KDa	Quilo Dalton
Leu	Leucina
LSAB	Complexo streptavidina biotina peroxidase
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
Mb	Mega base
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-Kβ	Fator nuclear Kappa B
ng	Nanograma
NLS	Região de localização nuclear
nm	Nanômetro
N-Terminal	Amino-terminal
pH	Potencial de hidrogênio

PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
Pro	Prolina
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	PCR da transcrição reversa
SDR	Cadeia curta desidrogenase/reductase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SH3	Homólogo proteína quinase tipo 3
STS	Sítio de seqüência marcada
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampão TRIS-ACETADO-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-BORATO-EDTA
Thr	Treonina
TNM	Tumor-Metástase Cervical-Metástase a Distância
UTR3'	Região não traduzida 3
V	Voltagem
YAC	Cromossomo artificial de bactéria
WW	Domínios de resíduos de triptofano conservados
WWOX	Gene contendo domínios WW e oxidoreductase
WOX1	Ortólogo do gene WWOX em ratos

CÓDIGOS PARA NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS**Nucleotídeos**

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Aminoácidos

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

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO	19
2- REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1- CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL	23
2.2- O GENE WWOX	28
2.2.1- WWOX E SÍTIOS DE FRAGILIDADE	31
2.2.2- WWOX E CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	35
2.2.3- WWOX E GENE SUPRESSOR DE TUMOR	39
2.2.4- WWOX E CÂNCER	41
3- OBJETIVOS	47
4- MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1- DESENHO DO ESTUDO	49
4.2- FONTE E CRITÉRIOS DE ELIGIBILIDADE – GRUPO CASO	50
4.3- FONTE E CRITÉRIOS DE ELIGIBILIDADE – GRUPO CONTROLE	51
4.3.1- GRUPO CONTROLE PARA RT-PCR E WESTERN BLOT	51
4.3.2- GRUPO CONTROLE PARA IMUNOISTOQUÍMICA	51
4.4- AMOSTRA	52
4.5- EXTRAÇÃO DE RNA	53
4.6- EXTRAÇÃO DE DNA	54
4.7- QUANTIFICAÇÃO DE DNA E RNA	56
4.7.1- AVALIAÇÃO DA PUREZA DO DNA E RNA EXTRAÍDOS	57
4.8- TRANSCRIÇÃO REVERSA E RT-PCR	58

4.8.1- TRATAMENTO DO RNA COM DNase	58
4.8.2- SÍNTESE DE cDNA- TRANSCRIÇÃO REVERSA	58
4.8.3- RT-PCR	60
4.9- ANÁLISE DE MUTAÇÃO NO GENE <i>WWOX</i>	61
4.10- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	64
4.11- COLORAÇÃO DO GEL PELA PRATA	64
4.12- PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR E RT-PCR PELA COLUNA	66
4.12.1- PURIFICAÇÃO DIRETA DOS PRODUTOS PELA COLUNA	66
4.12.2- PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS PELA COLUNA SUBMETIDOS Á ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	67
4.13- SEQUENCIAMENTO	68
4.14- IMUNOFLUORESCÊNCIA	71
4.15- WESTERN BLOT	71
4.15.1- DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO DE BRADFORD	72
4.15.2- ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM SDS-PAGE	73
4.15.3- IMUNOBLOTS	74
4.16- IMUNOISTOQUÍMICA	75
4.16.1- ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO	76
4.17- ASPECTOS ÉTICOS	77
5- RESULTADOS	79
5.1- INVESTIGAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO mRNA DO GENE <i>WWOX</i>	77
5.2- ANÁLISE DO DNA GENÔMICO DO GENE <i>WWOX</i>	80
5.3- INVESTIGAÇÃO DA PROTEÍNA <i>WWOX</i>	81
6- DISCUSSÃO	88
7- CONCLUSÕES	94

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9- ANEXOS	107
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	107
ANEXO B – FICHA CLÍNICA	108
ANEXO C – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE RNA	109
ANEXO D - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA	110
ANEXO E - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA PAGE	112
ANEXO F - SOLUÇÕES UTILIZADAS NA COLORAÇÃO PELA PRATA	114
ANEXO G - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA PURIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE	115
ANEXO H - SOLUÇÕES UTILIZADAS NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	116
ANEXO I - SOLUÇÕES UTILIZADAS NO WESTERN BLOT	117
ANEXO J - SOLUÇÕES UTILIZADAS NA IMUNOISTOQUÍMICA	119
ANEXO L – SEQUÊNCIA DO cDNA E PROTEÍNA DO GENE <i>WWOX</i>	120

1. INTRODUÇÃO

Carcinoma de células escamosas (CCE) é definido como uma neoplasia maligna derivada de ou exibindo características morfológicas de epitélio escamoso. O CCE é frequentemente o estágio final de alterações no epitélio estratificado escamoso, que culmina no rompimento da membrana basal e invasão do tecido conjuntivo adjacente. Anualmente, mais de 300.000 novos casos de CCE de boca ocorrem em todo o mundo (PARKIN, 2000). CCE é a neoplasia maligna mais comum na cavidade bucal, que representa aproximadamente 90% dos tumores malignos da boca. Embora ocorra em vários locais da cavidade bucal, este é mais comum no lábio inferior, borda lateral da língua e assoalho bucal; possui maior incidência após os 40 anos de idade e é mais freqüente no sexo masculino e de raça branca (WOOD & GOAZ, 1997; SAPP *et al.*, 1997).

A epidemiologia do CCE de boca é complexa devido à natureza multigênica da doença e o número de agentes ambientais que a cavidade bucal é exposta. Contudo, está bem claro a associação estabelecida entre tabaco e álcool como os principais agentes etiológicos (SUDBO *et al.*, 2003). O processo de carcinogênese do CCE de boca ocorre devido à acumulação de danos genéticos, que leva à desregulação celular com alteração da sinalização, do reparo do DNA e ciclo celular. Muitas alterações moleculares têm sido descritas, afetando o genoma do CCE de boca, como as mutações nos genes supressores de tumor *p53*, *p16* e *FHIT* (CHANG *et al.*, 2002; WEINBERGER *et al.*, 2004; TORUNER *et al.*, 2004).

Sítios de fragilidade são regiões que frequentemente ocorrem troca de material genético entre cromátides irmãs, translocação cromossômica, deleções, ampliações

de genes, e a integração de vírus oncogênicos. Estas regiões cromossômicas, frequentemente, exibem rupturas da fita de DNA, principalmente, quando são expostas a agentes químicos (POPESCU, 2003). Recentemente, foi demonstrado que os sítios de fragilidade são áreas de instabilidade genômica e que poderiam contribuir para a carcinogênese. Dos sítios de fragilidade comum existentes, FRA3B e FRA16D são os mais frequentemente expressos. O gene supressor de tumor *FHIT* foi encontrado expandindo a região FRA3B. A transcrição anormal e a baixa expressão do gene *FHIT* foram detectadas em vários tipos de cânceres humanos, incluindo CCE de boca. Estudos nos sítios de fragilidade FRA3B e FRA16D têm mostrado evidências que essas regiões estão relacionadas à instabilidade do DNA em células de câncer (SUTHERLAND, *et al.*, 1998).

A região 16q23.3-24.1, no braço longo do cromossomo 16, tem sido descrita como sítio de localização de um gene supressor de tumor. Isto é devido à alta frequência de perda de heterozigosidade em um grande número de tumores. O gene *WWOX* é um gene candidato a supressor de tumor que expande uma região maior do que 1Mb de DNA nessa região. Foi determinado que o gene *WWOX* expande a região do sítio de fragilidade comum FRA16D (BEDNAREK *et al.*, 2000 e RIED *et al.*, 2000).

Estudos realizados em carcinoma de esôfago e pulmão têm comprovado a hipótese que a exposição a agentes carcinogênicos como tabaco e álcool aumentam o potencial para alterações genéticas nas regiões onde se encontram os sítios de fragilidades (KUROKI *et al.*, 2002; YENDAMURI *et al.*, 2003). Considerando que o tabaco e o álcool são os principais agentes etiológicos do CCE de boca e que estes agentes carcinogênicos são capazes de induzir alterações em regiões de fragilidade, e que alterações do gene *WWOX* foram encontradas no carcinoma de células escamosas

de esôfago, o objetivo do presente trabalho foi o de realizar uma análise molecular desse gene em amostras de CCE de boca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL

Carcinoma de células escamosas (CCE), também conhecido como carcinoma epidermóide, é definido como uma neoplasia maligna derivada de ou exibindo características morfológicas de epitélio escamoso. O CCE é frequentemente o estágio final de alterações no epitélio escamoso estratificado, que começa como uma displasia epitelial e progride até que as células do epitélio displásico rompam a membrana basal e invadam o tecido conjuntivo adjacente. Algumas vezes, o CCE pode originar diretamente (de novo) de um epitélio de revestimento estratificado, não apresentando a fase de lesão pré-maligna (SAPP *et al.*, 1997).

Anualmente, mais de 300.000 novos casos de CCE de boca ocorrem em todo o mundo (PARKIN, 2000). CCE da cavidade bucal é o sexto carcinoma mais comum, representando cerca de 3% de todas as lesões malignas em homens e 2% em mulheres. A cada ano, nos EUA, são diagnosticados aproximadamente 30.000 novos casos e 7.800 óbitos em decorrência do CCE de boca (SAPP *et al.*, 1997; TORUNER *et al.*, 2004). A estimativa de incidência de câncer de boca, incluindo o câncer de lábio, para 2005 no Brasil aponta esse tumor como o 8º mais frequente entre os homens (com 9.985 casos estimados) e o 9º entre as mulheres (com 3.895 casos estimados) (BRASIL, 2005).

CCE é a neoplasia maligna mais comum na cavidade bucal, representando aproximadamente 90% dos tumores malignos da boca. Embora ocorra em vários locais da cavidade bucal, este é mais comum no lábio inferior, borda lateral da língua e assoalho bucal. A incidência de CCE aumenta com a idade, sendo maior após os 40

anos de idade, mais comum no sexo masculino e de raça branca (WOOD & GOAZ, 1997; SAPP *et al.*, 1997). Entretanto, nas últimas décadas, tem sido observado uma tendência para o aumento no número de pacientes jovens e do sexo feminino (KROLLS & HOFFMAN, 1976; JINKUN *et al.*, 1991).

Nos estágios iniciais, o CCE aparece como placas firmes e elevadas ou como áreas irregulares, ásperas ou verrugosas do espessamento da mucosa, possivelmente confundidas com leucoplasia. Ambos os padrões podem se sobrepor a uma base de leucoplasia ou eritroplasia aparente. Com a progressão da lesão, este pode apresentar aspecto nodular ou infiltrativo, este último caracterizado por uma úlcera irregular e áspera, assintomática, com bordas elevadas, firmes e onduladas (COTRAN *et al.*, 1999). CCE de boca tem um crescimento infiltrativo profundo no tecido conjuntivo adjacente, com poucas alterações na superfície do epitélio e pode se apresentar como uma área endurecida com perda da mobilidade do tecido. No assoalho da cavidade bucal, essa lesão comumente causa a fixação da língua ou impedimento da abertura normal da boca. O CCE de gengiva pode invadir o ligamento periodontal, resultando em perda ou mobilidade de dentes ou invadir o tecido ósseo da mandíbula e afetar o nervo alveolar inferior levando a parestesia de dentes e lábio inferior (SAPP *et al.*, 1997).

O CCE de boca é considerado agressivo por estar associado a uma acentuada morbidade e alta taxa de mortalidade, com uma sobrevida menor que 50% em longo prazo. Além disso, nas últimas 4 a 5 décadas não houve melhora no prognóstico em relação ao tratamento dessa lesão, apesar dos avanços na cirurgia, radio e quimioterapia (MORK *et al.*, 1995; MORK, 1998). Uma provável explicação para os resultados sombrios obtidos pelo tratamento ocorre porque o CCE de boca é um processo amplo, que ocorre em toda a cavidade bucal, levando a ineficiência quando se emprega uma

modalidade de tratamento restrito à lesão (SCHWARTZ *et al.*, 2000; XI & GRANDIS, 2003). O conceito de campo de cancerização foi estabelecido por SLAUGHTER *et al.* em 1953 e foi baseado no fato de que a superfície epitelial do trato aerodigestivo é comumente exposta a muitas substâncias carcinogênicas como o cigarro e o álcool e, portanto, possui um risco maior de desenvolvimento de carcinomas, inclusive o CCE de boca. O desenvolvimento de um segundo tumor primário no campo de cancerização ocorre em uma razão de 20 a 30%, apesar do controle local para prevenção de uma nova neoplasia (HONG, 1987).

O diagnóstico do CCE é realizado através de um exame histopatológico com a obtenção de um fragmento representativo do tumor mediante uma biópsia do tecido neoplásico. O CCE é caracterizado histologicamente por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas, que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa (NEVILLE *et al.*, 2002). Surgem como lesões *in situ*, restritas ao epitélio, algumas vezes com áreas circundantes de displasia epitelial (COTRAN *et al.*, 1999). Variam desde neoplasias queratinizadas bem diferenciadas até lesões anaplásicas cujo crescimento pode ser lento ou rápido. Apresentam a tendência de se infiltrarem localmente com o decorrer do tempo antes de metastatizar para outros locais. Os locais preferidos de metástases são os linfonodos cervicais, submandibulares e sublinguais (COTRAN *et al.*, 1999).

As células do CCE podem apresentar alterações morfológicas caracterizadas por nucléolos proeminentes, com hipercromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear, alteração na relação núcleo/citoplasma, eosinofilia citoplasmática, disceratose, pleomorfismo celular, multinucleação, número de mitoses elevado e mitoses atípicas. Quando as células mantêm a capacidade de produção de queratina, formam-se coleções desta

proteína no interior de ilhotas tumorais, denominadas pérolas de queratina. Alterações no estroma como desmoplasia, angiogênese e infiltrado inflamatório de intensidade variada também podem ser observados (COTRAN *et al.*, 1999; NEVILLE *et al.*, 1998; SAPP *et al.*, 1997).

Embora todos os carcinomas possuam alguma capacidade de provocar metástase, existe uma variação no potencial de cada carcinoma de metastatizar. Este potencial está de alguma forma, correlacionado com as variações histológicas encontradas nos CCE da cavidade bucal. A variação histológica está relacionada com o grau de diferenciação exibido pelas células dos tumores e quanto à arquitetura do tecido assemelha-se com a arquitetura normal do epitélio escamoso estratificado. Tumores que produzem quantidade significativa de queratina e exibem algumas características de maturação das células epiteliais são considerados bem diferenciados. Tumores que produzem pouca ou nenhuma queratina, mas o epitélio ainda é reconhecido como estratificado escamoso, apesar das alterações em relação ao epitélio normal, são considerados moderadamente diferenciados. Aqueles tumores que não produzem queratina apresentam poucas semelhanças com o epitélio escamoso de revestimento, exibindo anormalidade celular extensa, uma ausência da arquitetura normal do tecido e de coesividade das células são denominados pobremente diferenciados (SAPP *et al.*, 1997).

O principal determinante para que a doença apresente um alto índice de mortalidade é o estágio avançado quando a doença é diagnosticada (OLIVER *et al.*, 1996). O diagnóstico precoce do câncer é bastante difícil por ser assintomático, no início e as lesões iniciais são raramente identificadas pela maioria dos profissionais de saúde (KRUTCHKOFF *et al.*, 1990).

A carcinogênese bucal é 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 as características de sobrevivência da célula (SUDBO *et al*, 2003).

A patogênese do CCE bucal está relacionada a fatores genéticos, como alterações em oncogenes e genes supressores de tumor, além de fatores de risco como o consumo de tabaco e álcool. Fumantes têm risco aumentado de duas a quatro vezes para o desenvolvimento da doença. Este risco aumenta para seis a quinze vezes se o indivíduo for tabagista e etilista. Outros fatores também podem contribuir para o CCE de boca, como infecção viral e exposição à radiação, este último, relacionado ao CCE labial (COTRAN *et al.*, 1999). Apesar da importância dos fatores causais, a incidência da doença entre pessoas expostas aos fatores de risco é relativamente baixa e o CCE surge após anos de exposição. O CCE de boca também pode se desenvolver na ausência de fatores de risco, o que sugere um papel importante da susceptibilidade do hospedeiro (SCULLY *et al.*, 2000a). De acordo com os mesmos autores, o câncer bucal surge como consequência de múltiplos eventos genéticos moleculares em vários genes, com consequente distúrbio dos mecanismos de sinalização e regulação do ciclo celular e/ou perturbações nos mecanismos de reparo do DNA e eliminação de células alteradas.

Os eventos moleculares mutagênicos geram instabilidade genética e aumentam a probabilidade de transformações neoplásicas. Esses eventos podem surgir em decorrência da ação de agentes químicos (carcinógenos), físicos (radiação ionizante), biológicos (microorganismos) e também, de alterações que surgem espontaneamente (SCULLY *et al.*, 2000a). Alterações genéticas no câncer incluem mutações pontuais, ampliações, rearranjos e deleções em proto-oncogenes e genes supressores de tumor

(TAKES *et al.*, 1998). A consequência desses danos genéticos é a desregulação celular com a ruptura da sinalização, de crescimento e/ou no mecanismo de reparo a danos celulares ou da eliminação de células alteradas (SCULLY *et al.*, 2000a). Aumento da função de oncogenes, inibição da função dos genes supressores de tumor ou seus produtos e aumento da atividade da telomerase estão envolvidos na carcinogênese (SCULLY *et al.*, 2000b).

2.2. 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) no câncer de mama. PANDIS *et al.* (1992) mostraram que o braço longo do cromossomo estava envolvido sistematicamente em translocações não balanceadas com o cromossomo 1, além de apresentar deleções frequentes. Perda de heterozigidade foi observada em algumas regiões do braço longo do cromossomo 16. TSUDA *et al.* (1990) especificaram uma região em carcinoma hepático, onde é comum deleções, situada no cromossomo 16 entre as regiões q22.1 e q23.2. Além disso, mais de 60% dos casos de câncer hepático com perda de heterozigidade foi sugerido ser devido a monossomia de todo o cromossomo 16. SATO *et al.* (1991) identificaram em câncer de mama através de marcadores polimórficos de DNA a região 16q24.2, no cromossomo 16, onde ocorriam comumente deleções.

CHEN *et al.*, (1996) em um estudo com carcinoma ductal *in situ* de mama identificaram, utilizando marcadores de regiões repetidas microsátélites, perda de heterozigidade em mais de 70% dos casos na região do braço longo do cromossomo

16 (região 16q23.3-q24.1), expandindo uma região de 2-3 Mb, sugerindo fortemente a presença de um gene supressor de tumor nessa região ou próxima a ela.

BEDNAREK *et al.*, (2000) usaram marcadores altamente polimórficos ($>0,70$ score de heterozigosidade) em linhagem de células de câncer de mama, na tentativa de identificar regiões de perda de heterozigosidade que poderiam levar a descoberta do gene associado às alterações da região de interesse. Foram identificadas três regiões distintas no braço longo do cromossomo 16, onde havia redução do score de heterozigosidade (de $>0,70$ para $<0,17-0,21$). Os achados confirmaram os resultados de CHEN *et al.*, (1996) sugerindo que essas regiões representem áreas de perda de heterozigosidade. Além do mais, foi observado que muitas das linhagens de células com hemizigosidade apresentavam perda completa ou da maior parte do braço longo do cromossomo 16.

Outros trabalhos que pesquisaram genes alvos da região com perda de heterozigosidade mostraram que o braço longo do cromossomo 16 e, 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). Interessantemente, em muitos desses tipos de tumores, a perda de heterozigosidade específica da região do braço longo do cromossomo 16 está associado com um pior prognóstico e menor sobrevida (ELO *et al.*, 1999; LI *et al.*, 1999; SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2000).

BEDNAREK *et al.* (2000) foram os primeiros a identificar o gene WWOX. 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 STSs. 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 cDNAs 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 um domínio WW e um Oxidoreductase. Simultaneamente, RIED *et al.*, (2000) com o propósito de identificar o gene situado na região do sítio de fragilidade FRA16D que poderia mediar os efeitos biológicos da instabilidade do DNA associado ao FRA16D em câncer, clonou o mesmo gene e colocou o nome de FOR (sítio de fragilidade oxiredutase 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).

Além disso, evidências sugeriam que a região onde se encontra o gene WWOX e, em particular, a região do intron 8 poderia ser uma área de fragilidade cromossômica, denominada sítio de fragilidade comum FRA16D, por causa das mesmas características de fragilidade genômica observadas em outros bem caracterizados sítios de fragilidade comum (BEDNAREK *et al.*, 2000).

Estudos na região 16q23.3-q24.1, baseados em parte na identificação de marcadores STS de perda de heterozigossidade, previamente estudados por CHEN *et al.*, (1996) foram quase simultaneamente reportados, confirmando que essa é de fato a região onde se encontra o FRA16D (MANGELSDORF *et al.*, 2000; PAIGE *et al.*, 2000). Contudo, eles não conseguiram identificar nenhum gene em particular, mas foi observado que várias linhagens de células tumorais (ovário, pulmão, cólon e carcinoma

gástrico) apresentavam deleções homozigóticas e instabilidade nessa área específica. KRUMMEL *et al.* (2000) realizaram um mapeamento físico mais detalhado da região, e demonstraram que o sítio de fragilidade comum FRA16D se encontrava nessa região, apresentando um tamanho aproximado de 260 Kb e situado, possivelmente, na região do intron e exon 8 do gene *WWOX*.

2.2.1. WWOX E SÍTIOS DE FRAGILIDADE

Sítios de fragilidade são regiões nos cromossomos onde ocorrem fendas ou rupturas aleatórias que ocorrem espontaneamente ou são induzidas sob tratamento de agentes químicos ou sob condições de cultura específica. Alguns sítios de fragilidade estão sendo vistos como áreas de instabilidade genômica que poderia contribuir para a carcinogênese (SUTHERLAND *et al.*, 1998).

Sítios de fragilidade são regiões que frequentemente 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). Os sítios de fragilidade ainda podem ser divididos de acordo com as condições que foram induzidos em cultura. O principal grupo de sítios de fragilidade do tipo raro é o sensível ao folato, que inclui o FRAXA, que é responsável pela síndrome do X frágil e o FRAXE, que está associado com retardamento mental não

específico. Outro grupo de sítio de fragilidade do tipo raro é induzido pelo bromodeoxiuridina (BrdU), distamicina A ou ambas. A maioria dos sítios de fragilidade do tipo comum são induzidos pela afidicolina, que é um inibidor específico das DNA polimerases do tipo α e do tipo δ (SUTHERLAND *et al.*, 1998). Além disso, uma minoria dos sítios de fragilidade comum também pode ser induzido através da exposição a 5-azacitidina e BrdU (LUDES-MEYERS *et al.*, 2003)

Todos os sítios de fragilidade do tipo raro que tem sido clonados (FRAXA, FRAXF, FRA16A e FRA11B) exibem expansão instáveis de repetições trinucleotídica CCG e sua expressão resulta de um excessivo número de cópias de tais repetições (KNIGHT *et al.*, 1993; NANCARROW *et al.*, 1994). Os sítios de fragilidade do tipo comum, completamente ou parcialmente seqüenciados (FRA3B, FRA7G, FRA7H e FRA16D) não possuem seqüências repetidas, como ocorre com os sítios de fragilidade do tipo raro. Isto mostra que os sítios de fragilidade são distinguidos não apenas pela sua frequência de expressão dentro da população e sua sensibilidade a vários agentes, mas também pela sua estrutura molecular e os mecanismos que regulam a sua expressão. (SUTHERLAND *et al.*, 1998; INOUE *et al.*, 1997).

Por outro lado, sítios de fragilidade do tipo comum são menos compreendidos, apesar de serem encontrados em regiões específicas em muitos cromossomos humanos e de estarem presentes, provavelmente, em todos os indivíduos. Eles podem ser induzidos por uma variedade de substâncias adicionadas a cultura de tecidos, porém, existem dificuldades em estudar os sítios de fragilidade do tipo comum, uma vez que eles são apenas, usualmente, encontrados em uma baixa (menos que 5%) proporção em culturas preparadas para observação de sítios de fragilidade durante a metáfase celular. Estudos de sítios de fragilidade do tipo comum, mesmo em condições similares para

induzi-los, não conseguem reproduzir o mesmo conjunto de sítios de fragilidade. Existem, contudo, um pequeno número de sítios de fragilidade do tipo comum que podem ser reproduzidos, que inclui o FRA3B e FRA16D, que são, respectivamente, os dois sítios de fragilidade mais comuns (SUTHERLAND *et al.*, 1998).

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). A caracterização da replicação do sítio de fragilidade comum FRA3B indicou que a duplicação incompleta do DNA se manifesta na fase G2 como fendas ou rupturas durante a metáfase (LE BEAU *et al.*, 1998). A aplicação de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) na interfase nuclear tem revelado um padrão descoordenado da replicação do FRA7H, acentuado com a exposição de afidicolina (*apc*). A afidicolina aumenta a diferença existente no tempo de replicação entre o FRA7H e outras regiões genômicas não relacionadas com sítios de fragilidade, acentuando o impacto do retardamento da replicação nos sítios de fragilidade sensíveis à afidicolina (HELLMAN *et al.*, 2000). A organização da cromatina e conformação do DNA são também importantes determinantes da ruptura e recombinação nos sítios de fragilidade (ARNHEIM, 1990).

Um mecanismo potencial dos sítios de fragilidade em câncer foi sugerido por YUNIS & SORENG (1984). As regiões cromossômicas conhecidas como sítios de fragilidade têm sido associadas com câncer. FRA3B ocorre dentro de uma região deletada em múltiplos cânceres, incluindo translocações balanceadas que afetam esses loci em câncer renal familiar t(3:8) (p14.2;q24). O gene que expande a região do FRA3B foi clonado e nomeado *FHIT* (Fragile Histidine Triad protein) (OHTA *et al.*, 1996). FRA6E ocorre dentro de uma região frequentemente afetada em cânceres de

ovário e gástrico e, FRA7H demonstra freqüente perda em cânceres de próstata, mama e pâncreas (SMITH *et al.*, 1998).

Foi hipotetizado que os sítios de fragilidade predisõem o cromossomo a quebra e são regiões altamente recombinantes que geram rearranjos na seqüência e, isso constitui a base de alterações encontradas nessas regiões em vários tipos de câncer. (SMITH *et al.*, 1998). O principal ponto dessa hipótese seria que tais regiões de fragilidade poderiam afetar a função dos genes situados nessas regiões do cromossomo e como conseqüência, alteração ou inativação de tais genes, importantes no desenvolvimento e progressão do câncer (LUDES-MEYERS, *et al.*, 2004).

O fato de que os sítios de fragilidade comum estão relacionados com genes funcionais foi primeiro demonstrado pela clonagem do gene *FHIT*, que expande a região FRA3B (OHTA *et al.*, 1996). Desde então o gene *WWOX* que expande a região FRA16D, e o gene *Parkin*, que expande a 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 que levam a perda da expressão da proteína em tumores e linhagens celulares de câncer. Em muitos casos de deleções hemizigóticas, pontos de mutações não são encontrados no alelo remanescente. Portanto, os três conhecidos genes que expandem regiões de fragilidade comum estão desregulados em múltiplos tipos de câncer, o que sugeri o envolvimento no processo de carcinogênese (LUDES-MEYERS, *et al.*, 2004).

2.2.2. *WWOX*: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

O gene *WWOX* apresenta um mRNA de comprimento total de 2264pb com uma abertura de fragmento de leitura de 1245pb. O gene *WWOX* codifica uma proteína de 414 aminoácidos que apresenta duas porções distintas em sua estrutura. A porção amino terminal de 88 aminoácidos mostra uma seqüência altamente conservada para a família de proteínas com o domínio WW e a porção carboxi terminal, de 326 aminoácidos, homóloga às superfamílias de proteínas com cadeia curta desidrogenase/reductase (SDR). Portanto, o gene foi nomeado *WWOX* por apresentar um domínio WW e um Oxidoreductase (BEDNAREK *et al.*, 2000).

O *WWOX* é uma proteína de 414 aminoácidos que contém dois domínios WW na extremidade N-terminal e uma região de alta homologia com a família de enzimas de curta cadeia desidrogenase/reductase (SDR). Os domínios WW são conhecidos por estarem envolvidos em interações com proteínas. Domínios ricos em prolina são frequentemente alvo de interações entre proteínas, provavelmente devido a propriedades estruturais destas regiões. Domínios que reconhecem regiões ricas em prolina incluem SH3, EVH1 e WW (LUDES-MEYERS *et al.*, 2003). Os domínios WW altamente compactados (de 35 a 45 aa de comprimento) são caracterizados pela presença de um par de resíduos de triptofano, com uma distância de 20 a 22 aa entre eles e apresentam um mecanismo importante na estrutura e função do domínio WW. O primeiro domínio WW (aminoácidos 18 a 47), na proteína *WWOX*, apresenta características típicas dos domínios WW, com dois resíduos altamente conservados de triptofano e um resíduo de prolina. O segundo domínio WW (aminoácidos 59 a 88) apresenta uma troca de um

resíduo de triptofano por uma prolina (BEDNAREK *et al.*, 2000). Domínios WW são conhecidos por interagirem com seqüências ricas em prolina de outras proteínas.

Existem basicamente quatro grupos de domínios WW. Dois principais e mais comuns, Grupo I e II e dois menos comuns, Grupos III e IV. O Grupo I se liga a proteínas que apresentam uma seqüência de consenso mínima Pro-Pro-X-Tyr (PPXY), contendo regiões ricas em prolina que constituem ligantes específicos para esse grupo. O Grupo II de proteínas com domínio WW contém proteínas que se ligam a regiões de consenso Pro-Pro-Leu-Pro (PPLP). O Grupo III contém domínios WW que se ligam a seqüências poliprolinas flanqueadas por Arginina e Lisina e o Grupo IV, que são domínios WW com preferência a ligantes contendo seqüências fosforiladas Ser-Pro ou Thr-Pro (SUDOL & HUNTER, 2000).

A proteína WWOX apresenta uma porção central de alta homologia com as proteínas da família de enzimas SDR. A família das proteínas SDR (ADH) é constituída por mais de 2000 tipos de proteínas e apresentam comprimentos que variam de 250 a 300 aminoácidos. São tipicamente enzimas que metabolizam diferentes álcoois, açúcares, cetoacilas, retinóides, esteróides e outros hidroxí ou ceto substratos. Embora a similaridade das enzimas do grupo SDR seja baixa, oscilando de 15 a 30%, pequenas regiões são altamente conservadas, como um sítio de ligação ao substrato, YXXXX e um sítio de ligação a uma coenzima GXXXGXG (BEDNAREK *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2003). Baseado na alta expressão da proteína WWOX em tecidos hormonalmente regulados (testículo, próstata e ovário) e sua seqüência de aminoácidos homóloga a oxidoreduases específicas, foi postulado que o WWOX estaria envolvido no metabolismo de hormônios esteróides (BEDNAREK *et al.*, 2000). Os domínios WW da proteína WWOX pertencem ao Grupo I de domínios WW que ligam-se especificamente

a peptídeos que contem a região de consenso PPXY (LUDES-MEYERS *et al.*, 2004). Diversas proteínas têm sido identificadas interagindo com a proteína WWOX como: SIMPLE/PIG7, proteína ativadora do clone 120 NF-KB (NF-KB AP), homólogo (rato) do gene supressor de tumor p53 (CHANG *et al.*, 2001), p73 (AQEILAN *et al.*, 2004a), E2F-1 (ISHII *et al.*, 2004) e AP-2 γ (AQEILAN *et al.*, 2004b). Essas proteínas estão envolvidas na regulação transcricional direta (como o p73 e AP-2 γ) ou indiretamente (como o SIMPLE/PIG7, NF-KB AP). Ambas as proteínas SIMPLE/PIG7 e NF-KB AP foram identificadas como ativadoras do fator de transcrição NF-KB (MATSUDA *et al.*, 2003) conhecido por induzir apoptose. AQEILAN *et al.*, 2004(a) estudando a interação entre a proteína WWOX e p73 mostraram que a proteína WWOX sequestrava a p73 do núcleo para o citoplasma reduzindo a sua atividade transcricional, mas por outro lado, aumentando a capacidade da proteína WWOX em induzir apoptose. AQEILAN *et al.* (2004b), demonstraram a inibição da atividade oncogênica do fator de transcrição AP-2 γ por meio da proteína WWOX. Esta proteína sequestra o fator de transcrição AP-2 γ do núcleo para o citoplasma, suprimindo a atividade tumorigênica do fator de transcrição AP-2 γ .

Trabalhos realizados em ratos por CHANG *et al.* (2001) demonstraram a interação entre a proteína p53 e o domínio WW da proteína WOX1 (ortólogo da proteína WWOX de humanos). Segundo os autores, a proteína WOX1 induz apoptose quando super-expressada. Além disso, a proteína WOX1 leva a um aumento na expressão da proteína p53 e esta por sua vez, aumenta 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.*, (2003) demonstraram que a fosforilação da

proteína WOX1 é essencial para a ativação funcional da proteína para induzir apoptose. Um resíduo de tirosina (aminoácido 33) situado no primeiro domínio WW corresponde a um sítio de fosforilação essencial na interação do WWOX com outras proteínas. Além disso, os autores sugerem uma interação física entre a tirosina 33 e regiões ricas em prolina na proteína p53. Contudo, a interação direta entre p53 e WOX1 é controversa, visto que a p53 não apresenta uma região de consenso PPXYI e esta interação não foi observada no trabalho de AQEILAN *et al.* (2004a) em linhagens de células humanas.

Como mencionado recentemente, os domínios WW da proteína WWOX estão envolvidos na interação entre proteínas que ocorrem no citoplasma. A localização da proteína WWOX no complexo de Golgi foi, primeiramente, demonstrada através da transfecção da proteína completa WWOX fusiada com a proteína GFP, seguida de visualização por microscopia confocal (BEDNAREK *et al.*, 2001). As células expressavam o complexo WWOX-GFP com uma fluorescência verde, claramente perinuclear que foi colocalizada com um marcador específico para o complexo de Golgi, mas não com outros marcadores específicos para outras organelas como a mitocôndria (Mitotracker). Contudo, CHANG *et al.* (2001) reportaram que a proteína WWOX encontrava-se, principalmente, na mitocôndria e identificou uma seqüência de 65 aminoácidos como a região de sinalização mitocondrial. Além disso, um sítio de sinalização nuclear NLS (GKRKRV) na proteína WOX1 foi encontrado no domínio WW. Assim, devido a estas discrepâncias a localização da proteína WWOX não foi ainda determinada.

2.2.3. WWOX E GENE SUPRESSOR DE TUMOR

O gene *WWOX* possui as mesmas características apresentadas por outros genes supressores de tumor que expandem a região de outros sítios de fragilidade do tipo comum. *FHIT* é um gene supressor de tumor que expande a região do sítio de fragilidade comum mais expresso, FRA3B. O gene *WWOX* apresenta algumas similaridades com o gene *FHIT*, por exemplo: ambos genes apresentam um tamanho superior a 1 Mb e estão relacionados com sítios de fragilidade; ambos genes apresentam frequente perda alélica em vários cânceres humanos; ambos se encontram associados a regiões de freqüente deleção homozigótica em múltiplos cânceres (CROCE, *et al.*, 1999). Apesar disso houve certa cautela em identificar o gene *WWOX* como um gene supressor de tumor, chamando-o de um gene candidato a supressor de tumor.

BEDNAREK *et al.*, (2000), investigando linhagens de células de câncer de mama, algumas hemizigóticas para o *WWOX*, não encontraram nenhuma mutação na área codificadora do gene *WWOX*. Além disso, foi observado níveis variáveis de expressão deste gene nas linhagens de células de câncer de mama detectados via Northern blot e RT-PCR. Algumas linhagens de células, como a MCF7 (câncer de mama) apresentaram uma super-expressão do gene *WWOX*. Esta linhagem apresenta uma alta dependência ao estradiol para o crescimento. Tudo isso levou a especulação de que o gene *WWOX* estivesse relacionado à regulação da interação estradiol-estrógeno. Contudo, PAIGE *et al.*, 2001 estudando carcinomas e linhagens celulares de câncer de ovário e coloretal detectaram perda homozigótica na mesma região (16q23.3-24.1), e mais importante, algumas afetando áreas codificadoras (exons 4, 5, 6, 7 e 8) do gene *WWOX*. Tais deleções genômicas afetavam porções enzimáticas da proteína *WWOX*.

BEDNAREK *et al.* (2001) foram os primeiros a demonstrar que o gene *WWOX* apresentava um comportamento de gene supressor de tumor. Para determinar se o aumento da expressão do gene *WWOX* poderia alterar o fenótipo de linhagens de células expressando baixos níveis de mRNA de *WWOX*, foi usado retrovírus recombinantes portadores de DNA clonado (cDNA) do gene *WWOX* e transfectados nas linhagens de células de câncer de mama MDA-MB-435 e T47D e avaliado o seu crescimento *in vitro*, em ágar. Foi encontrado que o aumento da expressão do mRNA do *WWOX* fortemente inibiu a habilidade de crescimento das duas linhagens de células. Em síntese, células de câncer de mama expressando ectopicamente *WWOX* formaram poucas e menores colônias de células do que as células controle que foram transfectadas apenas com o vetor. Como o crescimento em 'soft agar' não, necessariamente, reflete a habilidade da célula em desenvolver tumor, células MDA-MB-435 foram transfectadas com *WWOX* e outras não (controle), e inoculadas na gordura intramamária de camundongos para comparar a capacidade dos dois grupos em originar o tumor. Foi observado que todos os animais (10/10) controles desenvolveram o carcinoma de mama, palpáveis 7 (sete) dias após a inoculação, contrário ao grupo cujas células foram transfectadas com o cDNA do *WWOX*. Apenas 7 dos 10 animais desenvolveram o tumor, sendo o primeiro palpável apenas no 25º dia. Os tumores foram dissecados e todos de cada grupo foram pesados juntamente. A variação de peso dos tumores foi de 821 ± 295 mg do grupo controle e 52 ± 22 mg para o grupo experimental. Tal diferença ($p=0,00001$) reforça a conclusão de que o gene *WWOX* tem comportamento de gene supressor de tumor.

2.2.4. WWOX E CÂNCER

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. Diversos transcritos alternativos do gene *WWOX* têm sido detectados em câncer. Em diversos tecidos normais, somente o transcrito completo mRNA (wild-type) é expresso e codifica a proteína contendo os domínios WW e o SDR. Em tumores malignos, pode ser encontrado 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 com deleção dos exons 5 a 8 em linhagens de células de mieloma múltiplo e dos exons 6-8 em linhagens de células de adenocarcinoma de colon e de estômago e carcinoma de mama. Além disso, usando primers específicos para a nova junção dos exons 5 e 9, em decorrência da perda dos exons 6-8, foi determinado que aproximadamente 33% dos carcinomas primários de mama apresentavam a forma aberrante do mRNA do *WWOX* com ausência dos exons 6-8. É interessante que 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* em câncer. Outros autores encontraram novos transcritos aberrantes em linhagens de células de adenocarcinoma gástrico, carcinoma de mama e de ovário, além de tumores de ovário (carcinoma de ovário). Essas linhagens de células e tumores exibiram perda parcial do exon 9, perda parcial do exon 9 com inserção de nucleotídeos adjacente ao exon 9, e

perda parcial do exon 6 e total dos exons 7, 8, e 9 (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.* (2004c) estudando carcinoma gástrico demonstraram alterações na transcrição do gene WWOX, com 12% dos tumores apresentando transcrito com perda dos exons 6, 7 e 8 e um caso, com ausência dos exons 7 e 8. Além disso, 23% dos casos apresentaram ausência da transcrição do gene WWOX. Recentemente, um novo transcrito aberrante em linhagens de células de carcinoma hepatocelular foi descrito com a deleção dos exons 6, 7 e 8 e inserção de 96 nucleotídeos entre os exons 5 e 9 (PARK, *et al.*, 2004).

KUROKI *et al.* (2002), analisando 36 casos de carcinoma de células escamosas de esôfago encontraram uma prevalência de 39% dos pacientes com perda de heterozigidade. Alteração no processo de transcrição do mRNA também foi detectado, com dois casos apresentando perda dos exons 6, 7 e 8 e o outro, com ausência de transcrição. No tumor onde foi encontrado ausência de transcrição, foi observado além da perda uma mutação do tipo missense, no códon 291 (exon 8), com a troca de um resíduo de leucina por uma prolina.

YENDAMURI *et al.* (2003) caracterizaram alterações no gene WWOX em câncer de pulmão. Estudando uma amostra de 27 tumores e 7 linhagens de células, eles demonstraram a presença de transcritos aberrantes em 7 tumores e em 2 linhagens de células. Além disso, 37% dos tumores apresentavam perda de heterozigidade (36,4% dos carcinoma de células escamosas e 30% dos adenocarcinomas). Nenhum dos tumores ou linhagens de células estudadas apresentaram mutação do gene WWOX.

Frequentemente 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. BEDNAREK *et al.* (2000) estudaram o efeito da metilação em uma linhagem de célula altamente tumoral de câncer de mama MDA-MB-435, que apresentava baixos níveis de expressão do gene *WWOX*. Além disso, essa linhagem de célula apresenta-se hemizigótica para o gene *WWOX*. Foi demonstrado que a ausência da expressão do gene *WWOX* não estava relacionada com o fenômeno da metilação, uma vez que a expressão deste gene não foi aumentada após o tratamento com 5-azadeoxicitidina, um inibidor de metilação CpG. Nenhum sinal de metilação nas ilhas CpG na região promotora e no primeiro exon do gene *WWOX*, foi encontrado através de sequenciamento bissulfito do DNA em várias linhagens de células de câncer de mama. PARK *et al.* (2004) demonstraram perda da expressão do gene *WWOX* em 60% das linhagens de células de carcinoma hepatocelular analisadas. Novamente, a expressão do gene *WWOX* não pôde ser restaurada nessas células através da desmetilação e acetilação de histona. Por outro lado, KUROKI, *et al.* (2004) encontraram ilhas de CpG metiladas na região promotora 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 de baixa expressão do gene *WWOX* em neoplasias hematopoiéticas (ISHII *et al.*, 2003).

Expressão da proteína tem sido analisada pelo western blot usando anticorpos específicos que reconhecem os domínios WW que são conservados em todos os transcritos aberrantes do mRNA. Uma proteína de 46 kDa foi evidenciada e correlacionada aos resultados obtidos com Northern blot e RT-PCR em linhagens de

câncer de mama (LUDES-MEYERS *et al.*, 2003). Células com altos níveis de expressão de mRNA (como MCF-7, linhagem de célula para câncer de mama) tinham altos níveis de expressão da proteína WWOX com 46 kDa, enquanto linhagens de células que apresentavam baixos níveis de expressão de mRNA do WWOX (MDA-MB-435) apresentavam níveis de expressão indetectáveis da proteína de 46 kDa do WWOX. Além disso, a expressão da proteína parece estar inversamente correlacionada com a agressividade e a capacidade tumorigênica *in vivo* das linhagens de células. Kuroki *et al.* (2004) demonstraram a ausência da expressão da proteína WWOX, através do Western Blot, em uma linhagem de célula de câncer de pâncreas e uma acentuada diminuição da expressão da proteína em outras 8 linhagens estudadas. Do mesmo modo, PARK *et al.* (2004) mostraram uma redução da expressão da proteína WWOX em 73% das linhagens de células de carcinoma hepatocelular.

Expressão da proteína WWOX tem sido examinada em uma variedade de tecidos normais e tumorais usando imunistoquímica. Diversos estudos têm encontrado que a expressão da proteína WWOX está associada com múltiplos tipos de câncer, como o de mama e ovário (LUDES-MEYERS, *et al.*, 2003; NUNEZ *et al.*, comunicação pessoal). A expressão da proteína WWOX foi reduzida em 54,6% e 60% dos tumores de mama, através da imunistoquímica (GULER *et al.*, 2004; NUNEZ *et al.*, 2005). Em ambos os estudos, foi encontrado que a perda da expressão do WWOX foi, significativamente, mais freqüente em tumores negativos para receptor de estrógeno, e para perda de estrógeno e progesterona (GULER *et al.*, 2004; NUNEZ, *et al.*, 2005). Esses dados indicam que tumores negativos para o receptor de estrógeno podem representar uma subclasse de tumores, onde a perda da expressão do WWOX pode estar relacionada ao processo de carcinogênese. 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.* (comunicação pessoal) observaram que 30% dos carcinomas de ovário tinham redução da proteína WWOX e a sua redução foi correlacionada com o estágio avançado da doença, e com os subtipos mucinoso e de células claras que são mais resistentes a quimioterapia. Mais importante, uma correlação estatisticamente significativa foi observada entre a perda da expressão da proteína WWOX e pior resultado do tratamento dos pacientes.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Realizar a análise molecular do gene *WWOX* no carcinoma de células escamosas da cavidade bucal.

Objetivos Específicos

- Investigar a presença de transcritos aberrantes no mRNA;
- Investigar a presença de mutações na região codificadora do gene *WWOX*;
- Investigar se transcritos aberrantes são traduzidos em proteínas;
- Investigar a expressão da proteína *WWOX* no CCE de boca.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - DESENHO DO ESTUDO

Para realizar a análise molecular do gene WWOX no CCE de boca, foi realizado um estudo do tipo transversal experimental. Os indivíduos incluídos no grupo caso apresentavam diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma de células escamosas de boca. Inicialmente, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A), os indivíduos responderam a uma ficha clínica (ANEXO B) contendo dados pessoais (endereço, sexo, raça e idade), dados relativos aos hábitos de tabagismo e etilismo (tipo, frequência e duração do hábito) e dados relativos à doença como localização da lesão, estadiamento clínico (TNM), tratamento instituído, data e local da coleta. Em seguida, 5 ml de sangue venoso e um fragmento do tumor removido durante o tratamento foram coletados de cada indivíduo.

Fragmentos de mucosa normal foram obtidos durante procedimentos cirúrgicos, como biópsias de lesões não neoplásicas ou cirurgias pré-protéticas. Os indivíduos deste grupo foram submetidos aos mesmos procedimentos formais e éticos do grupo caso. Para análise imunoistoquímica, amostras de mucosa normal foram obtidas dos arquivos do laboratório de anatomia patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2 - FONTE E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE – GRUPO CASO

O grupo caso foi constituído por indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma de células escamosas de boca. A seleção e coleta dos participantes foi realizada no Bloco Cirúrgico do Hospital Luxemburgo.

Critérios para inclusão do indivíduo na pesquisa:

- A) Diagnóstico clínico e histopatológico de CCE;
- B) Indivíduo com CCE de boca primário;
- C) Indivíduo ainda não submetido a qualquer tipo de tratamento ou submetido à remoção cirúrgica do tumor.

Critérios para exclusão do indivíduo desta pesquisa:

- A) Indivíduo que não concordou em participar do estudo;
- B) Indivíduo muito debilitado emocionalmente pela doença;
- C) Indivíduo submetido a radioterapia.
- D) Indivíduos que apresentavam CCE de lábio em função da sua etiologia e comportamento que difere do CCE de outras regiões da cavidade bucal;

4.3 - FONTE E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE – GRUPOS CONTROLE

4.3.1 - GRUPO CONTROLE PARA ANÁLISE DE RT-PCR E WESTERN-BLOT.

O grupo controle obtido para análise de RT-PCR e Western-blot foi coletado nas Clínicas de Semiologia e de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais e incluídos no estudo de acordo com os seguintes critérios:

Critérios para a inclusão do indivíduo na pesquisa:

- A) Mucosa bucal saudável;
- B) Indivíduos submetidos a procedimentos cirúrgicos na cavidade bucal (remoção de lesões não neoplásicas e cirurgias pré-protéticas);

Critérios para a exclusão do indivíduo na pesquisa:

- A) Indivíduos apresentando lesões malignas ou displásicas na cavidade bucal;
- B) Indivíduos que não concordaram em participar do trabalho;

4.3.2 - GRUPO CONTROLE PARA ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.

Foram revisadas lâminas coradas em HE para seleção de 20 casos de mucosa normal, selecionados dos arquivos do laboratório de anatomia patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os fragmentos selecionados não apresentavam nenhuma alteração morfológica e indicativo de lesão e que tinham uma quantidade de material suficiente para a realização do presente estudo.

4.4 – AMOSTRA

Foram coletados para o presente estudo 25 casos de CCE de boca e 10 controles para RT-PCR e Western-blot durante o período de agosto de 2003 a junho de 2004. Dos 25 casos de CCE, 5 tiveram que ser excluídos devido a problemas técnicos de processamento das lesões. O sangue coletado dos pacientes foi imediatamente congelado a -80°C . Os fragmentos do tumor obtido do grupo de casos e da mucosa normal do grupo controle foram divididos e uma parte colocada no reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carsbad, CA, USA) e congelada a -20°C e a outra embebida em Tissue Tek e congelada a -80°C . Além disso, uma parte do tumor foi armazenada em formol 10% tamponado, processado e embebido em parafina.

Os dados clínicos relativos dos casos de CCE de boca, como sexo, idade, localização anatômica e TNM estão relacionadas no Quadro 1.

QUADRO 1 – Dados clínicos relativos a sexo, idade, localização anatômica e estadiamento clínico (TNM) dos 20 casos de CCE de boca estudados.

Caso	Gênero	Idade	Localização	TNM
CA2	F	41	Língua	T3N0M0
CA3	M	59	Assoalho de boca	T4N0M0
CA4	M	42	Assoalho de boca	T1N0M0
CA5	M	55	Trígono retromolar	T4N1M0
CA7	M	37	Assoalho de boca	T4N0M0
CA8	M	49	Língua	T2N0M0
CA9	M	59	Língua	T2N0M0
CA10	M	74	Gengiva	T4N0M0
CA11	F	50	Assoalho de boca	T2N0M0
CA12	M	79	Língua	T3N0M0
CA13	M	73	Trígono retromolar	T2N0M0
CA14	M	72	Gengiva	T4N3M0
CA16	M	53	Assoalho de boca	T4N2M0
CA17	M	61	Assoalho de boca	T2N0M0
CA18	M	68	Trígono retromolar	T3N0M0
CA19	F	57	Assoalho de boca	T2N0M0
CA20	M	57	Assoalho de boca	T2N0M0
CA21	F	72	Gengiva	T2N2M0
CA22	M	73	Gengiva	T4N0M0
CA24	M	63	Língua	T2N0M0

Os tumores foram estagiados de acordo a classificação TNM: T- tamanho do tumor, N – metástase nos linfonodos regionais e M – metástase a distância (GREENE, 2002). Gênero: F – Feminino; M – Masculino.

4.5 - EXTRAÇÃO DE RNA

Amostras de CCE de boca e de mucosa normal dos pacientes do grupo controle, armazenados em 500 µl de Trizol, foram submetidas à extração de RNA. O tecido foi macerado com um Tissue Grinder (Kontes, Vineland, NJ), no próprio Trizol e a

extração, realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA) como descrito abaixo.

Foi adicionada às amostras, 100 µl de Clorofórmio (Merk, GE). A mistura foi então agitada em vórtex por alguns segundos, incubada por 3 minutos à temperatura ambiente (TA) e posteriormente, centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C para a separação das fases: uma vermelha (fase orgânica) composta pelo fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa incolor (sobrenadante). O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. A fase aquosa foi então removida cuidadosamente e transferida para outro tubo. A fase orgânica foi armazenada para posteriormente ser submetida à extração de DNA. Para precipitar o RNA contido na fase aquosa, foi adicionado 250 µl de álcool isopropílico (Merk, GE). A mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos à TA. Após, foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. O RNA foi precipitado e frequentemente visível no fundo do tubo. O sobrenadante foi então descartado e o RNA lavado com a adição de 500 µl de álcool etílico a 75% (Merk, GE). A mistura foi então centrifugada por 5 minutos a 7.500 x g a 4°C. O sobrenadante foi removido e o RNA deixado secar por 15 minutos à TA. Após a secagem, o RNA foi ressuscitado em 20µl de água DEPC e congelado a -80°C. As soluções utilizadas para a extração de RNA estão descritas no ANEXO C.

4.6 - EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído a partir da fase orgânica obtida na extração de RNA e do sangue periférico dos pacientes com CCE de boca, adaptando-se os métodos descritos por BOOM *et al.* (1990) e JEANPIERRE (1987).

O DNA da amostra de tumor foi precipitado a partir da fase orgânica obtida na extração de RNA utilizando-se 150µl de etanol absoluto (Merk, GE) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carsbad, CA, USA). A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 3 minutos à TA. O DNA foi sedimentado por centrifugação por 5 minutos a 2.000 x g a 4°C. Na precipitação, os restos de tecidos também foram precipitados comprometendo a qualidade do DNA extraído. Para contornar essa situação o precipitado foi submetido ao protocolo de extração segundo BOOM *et al.* (1990) para a purificação do DNA.

Para extração de DNA a partir de sangue periférico foi feita, inicialmente, a separação dos leucócitos, de acordo com o protocolo descrito por JEANPIERRE (1987). O método consistiu na diluição do sangue total em solução hipotônica para hemólise e centrifugação por 15 minutos a 1.300 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido, lavado com a mesma solução, até obter-se um sedimento claro. O pellet foi ressuspenso em 500µl da própria solução de hemólise e submetido ao processo de extração de DNA propriamente dita, segundo BOOM *et al.* (1990).

Seguindo-se o método de extração de BOOM *et al.* (1990), o pellet de células obtido do sangue e o DNA precipitado da fase orgânica foram adicionados a 900 µl de tampão de lise L6 e a 40 µl de suspensão de sílica. A mistura foi agitada em vortex por alguns segundos, incubada em banho de areia a 56°C por 10 minutos e posteriormente centrifugada em microcentrífuga por 1 minuto a 12.000 x g. Após o descarte do sobrenadante, o pellet de sílica foi lavado 2 vezes com tampão de lavagem L2, repetindo-se a centrifugação entre cada lavagem. Outras duas lavagens sucessivas foram realizadas com etanol a 70% (Merk, GE) e um última com acetona (Merk, GE). O sobrenadante foi descartado e a sílica seca a 56°C por 5 minutos. Posteriormente

adicionou-se 100 μ l de tampão TE, agitou-se em vortex e incubou-se a 56 °C por 18 horas. Finalmente, a mistura foi centrifugada por 2 minutos e o sobrenadante contendo o DNA transferido para outro tubo. As soluções utilizadas para extração de DNA estão descritas no ANEXO D.

4.7 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA E RNA

Amostras de DNA e RNA foram submetidas à quantificação através da espectrofotometria. O princípio da espectrofotometria é a leitura de cromóforos encontrados nas moléculas biologicamente ativas, que são aqueles derivados da ligação π (duplas ligações) em sistemas ressonantes. Por causa disso, moléculas como o DNA e o RNA – cujo principal cromóforo são as bases aminadas – e as proteínas – cujo principal cromóforo são os aminoácidos aromáticos e a ligação peptídica – absorvem luz na região do espectro correspondente ao ultravioleta.

O espectrofotômetro foi ligado 30 minutos antes de se iniciar a leitura para estabilização da luz ultravioleta utilizada para a quantificação. As amostras foram diluídas em água e colocadas em uma cubeta de cristal de 1 ml. A cubeta foi colocada então no aparelho, previamente zerado em relação a absorbância da cubeta e da água (branco), e obtidas as leituras de absorbância em dois tipos de comprimento de onda: 260 nm, comprimento de onda ótimo para leitura de RNA/DNA e, no comprimento de onda de 280 nm (ótimo para leitura de proteínas). As leituras foram realizadas em duplicata e uma média foi obtida em relação às duas leituras. A concentração de RNA e DNA foi calculada da seguinte forma:

$[\text{RNA}(\mu\text{g/mL})] = A \times A_{260} \times \text{diluição}$, onde a A é uma constante de cada substância e é definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absolver luz em um determinado comprimento de onda. No caso do RNA o valor desta constante é 40. A_{260} é a leitura da absorbância da amostra no comprimento de onda de 260 nm. Diluição corresponde a quantas vezes a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

$[\text{dsDNA}(\mu\text{g/mL})] = B \times A_{260} \times \text{diluição}$, onde a B é uma constante de cada substância e é definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absolver luz em um determinado comprimento de onda. No caso do dsDNA (DNA de fita dupla) o valor desta constante é 50. A_{260} é a leitura da absorbância da amostra no comprimento de onda de 260 nm. Diluição corresponde a quantas vezes a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

4.7.1 - AVALIAÇÃO DA PUREZA DO RNA/DNA EXTRAÍDO

A pureza das amostras foi obtida determinando a relação entre os valores de absorbância nos comprimentos de onda 260 (A_{260}), correspondente aos ácidos nucleicos (DNA e RNA), e 280 (A_{280}), correspondente às proteínas.

Relação ótima entre A_{260}/A_{280} :

para RNA - 1,9 a 2,0;

para DNA - 1,8 a 1,9.

Valores abaixo da relação ótima significam que a amostra possui uma quantidade maior de proteína, que podem interferir na utilização dessas amostras.

4.8 - TRANSCRIÇÃO REVERSA E RT-PCR.

4.8.1 - TRATAMENTO DO RNA COM DNASE.

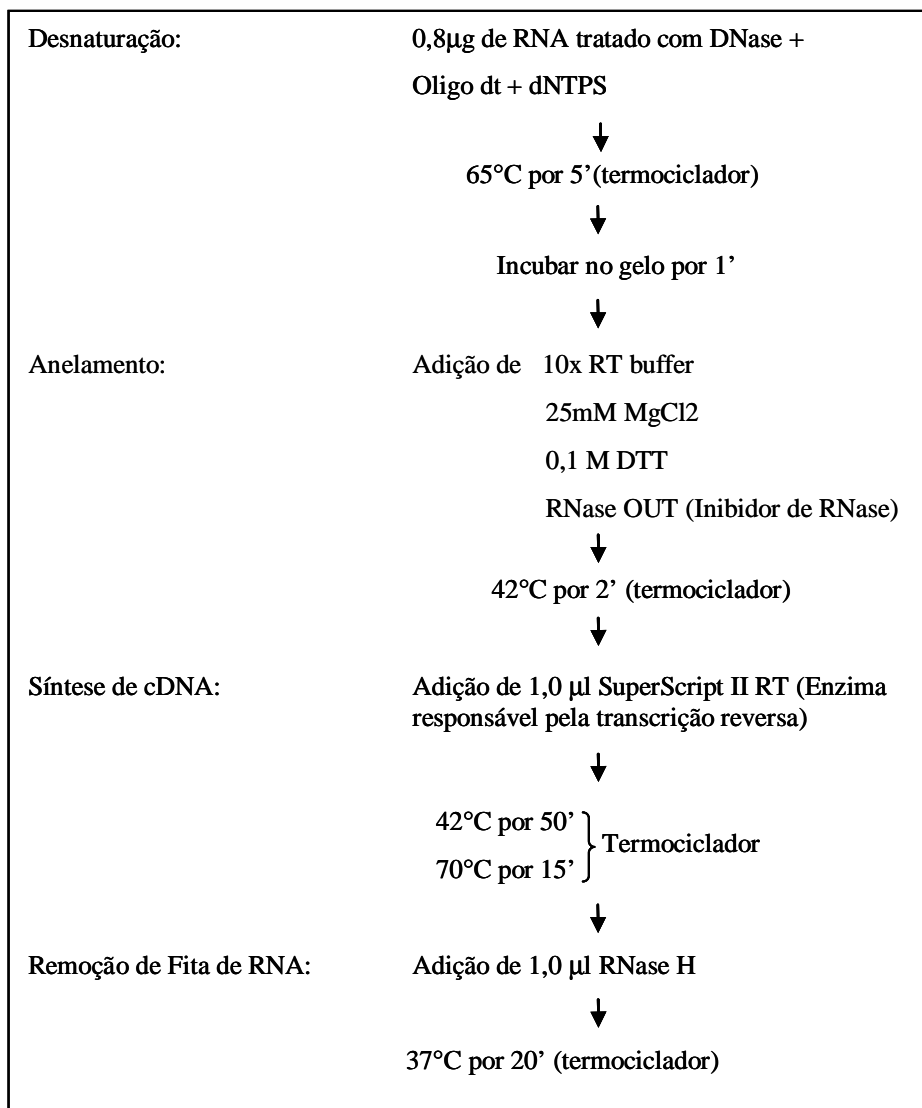
O RNA foi tratado com Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carsbad, CA, USA) para eliminar possível contaminação com o DNA genômico.

Após a quantificação, 1,0 µg de RNA extraído foi tratado com DNase, de acordo com o manual do fabricante. O volume de RNA correspondente a 1,0 µg foi adicionado a 1,0 µl de tampão 10x (DNase I Reaction Buffer), 1,0 µl de DNase e completado com água DEPC para um volume final de 10 µl. A mistura ficou incubada por 10 minutos a TA. Para inativar a DNase, 1,0 µl de EDTA (25mM) foi adicionado e a mistura, incubada em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg) por 10 minutos a 65°C. Após o aquecimento, o RNA estava pronto para ser utilizado no RT-PCR.

4.8.2 – SÍNTESE DE cDNA - TRANSCRIÇÃO REVERSA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do mRNA total extraído das amostras, via transcrição reversa pelo kit SuperScript First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carsbad, CA, USA). Para a síntese do cDNA, foi utilizado 0,8 µg de RNA tratado com DNase. A reação foi realizada de acordo com o manual do fabricante e representada através do DIAGRAMA 1.

DIAGRAMA 1: Síntese do cDNA via transcrição reversa



Após o tratamento para remoção da fita de RNA, o cDNA de fita simples foi sintetizado em um volume de 21 µL e diluído para um volume final de 100 µl, sendo congelado a -20°C.

4.8.3 - RT –PCR

Após a transcrição reversa, o cDNA obtido foi utilizado para a amplificação do transcrito do gene WWOX, via Nested-PCR. A primeira amplificação (1^o Round) foi realizada com os primers WWF (forward) 5'- AGTTCCTGAGCGAGTGGACC - 3' e WWR (reverse) 5'- TTACTTTCAAACAGGCCACCAC – 3' descritos por Kuroki *et al.* (2002).

A segunda amplificação (2^o Round) foi realizada com os primers descritos na QUADRO 2 e os produtos obtidos, mostrados no QUADRO 3. Todas as reações foram realizadas com um volume final de 25 µl. 1 µl do cDNA foi utilizado para a primeira amplificação, com 10 pmol de cada primer, 2,5 mM MgCl₂, 1,5 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), tampão de PCR 1x, e 1,25 unidades da Taq DNA Polymerase Recombinante (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carsbad, CA).

A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastercycler gradient thermocycler, Eppendorf AG, Hamburg) com as seguintes etapas: uma desnaturação inicial por 8 minutos a 95°C, seguindo por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. 1 µl do 1^o Round foi utilizado para a realização do 2^o Round (todos os pares de primers utilizados), sob as mesmas condições da PCR para a primeira amplificação. Amplificação do GAPDH (KUROKI *et al.* 2002) foi realizado como controle para a qualidade do cDNA obtido da reação da transcrição reversa. Os casos que foram negativos para o gene WWOX e positivo para o gene GAPDH, foram submetidos à amplificação da Citoqueratina 16 (AIHARA *et al.*, 1997) que foi utilizada como um marcador de células epiteliais, para mostrar presença de células epiteliais na amostra.

QUADRO 2 – Iniciadores utilizados no 2º Round do Nested RT-PCR.

Nome	Seqüência
WWNFOR	5' - AGGTGGCCTCCACAGTC – 3'*
WWNREV	5' - GTGTGTGCCCATCCGCTCT – 3'*
WW1FOR	5' - CGGCAAAGATACGACGGCAG – 3'
WW2FOR	5' - ACTTTTGCTCTACCCTGG – 3'
WW1REV	5' - GTTGGAGAAGAGGATGTTGC – 3'

* Iniciadores descritos por KUROKI *et al.*, 2002. WWNFOR localiza-se antes do exon1; WWNREV, após o exon 9; no exon 4; WW2FOR, no exon 7 e WW1REV, no exon 8.

QUADRO 3 – Produtos obtidos pelo Nested RT-PCR.

Iniciadores	Produto	Tamanho (pb)
WWNFOR/ WWNREV	Todos os exons	1.294 pb
WW1FOR/WW1REV	Exon 4* – Exon 8*	606 pb
WW2FOR/ WW1REV	Exon 7* – Exon 9	633 pb

* parte do exon.

4.9 - ANÁLISE DE MUTAÇÃO NO GENE WWOX

DNA genômico extraído do tumor e do sangue dos pacientes com CCE de boca foram utilizados para a análise de mutação no gene WWOX. O DNA genômico foi submetido à PCR, amplificando os fragmentos correspondentes aos 9 exons do gene WWOX. A reação em cadeia da polimerase foi realizada para um volume final de 25 µl, com as seguintes condições: 200 a 400 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer

(Quadro 4); 1,5 mM MgCl₂, 1,5 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), tampão de PCR 1 x, e 1,25 unidades de Taq DNA Polymerase, Recombinante (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carsbad, CA, USA). A amplificação foi realizada em um termociclador (Mastercycler gradient thermocycler, Eppendorf AG, Hamburg) com as seguintes etapas: uma desnaturação inicial a 95°C por 8 minutos, seguido por 35 ciclos composto de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Cada fragmento foi amplificado sob condições específicas de temperatura de anelamento descritas no QUADRO 4.

Para cada reação foi feito um controle negativo (branco), contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA, para avaliar se o resultado obtido é proveniente da amostra de DNA utilizada, e não de contaminação de DNA proveniente do ambiente externo.

QUADRO 4: Iniciadores e temperatura de anelamento utilizados na amplificação dos 9 exons do gene WWOX.

Exons	Temperatura de anelamento (°C)	Produto de PCR (pb)	Iniciadores (seqüência 5'-3')
1	60	431	F: GGAGACTGGATTTTCAGCTTC R: CCCTGGACCCTTTTCCCT
2	58	284	F: GTCCTCTTTCTCCTTCTTCC R: CAATTACCTGTCACCTCTCT
3	60	394	F: ACGAAAGCCAGTTGATGTGA R: GCGGGGAAAATAGAAGAATG
4	58	233	F: CTTTCTCTTTTGGGCAGC R: GCAGTCCCAAAGATAAATAAC
5	57	377	F: AGGACTCTACCCACAAC R: ACACACTCCACTGAAATC
6	58	275	F: ATTAAACAGGGGAATTCCGAC R: TCTCCCAATTGTGTTTCATCTG
7	62	316	F: ACATCCATGGATCCCGAAG R: TGGTATGACAAAGGGGATAAGTG
8	58	457	F: TGCACCCAGCATTTCCTTAGATTTCC R: ACCACCGTCATGCCCGCAAG
9	60	505	F: GACGCCATCTCATCACTCC R: TTTACTTTCAAACGGCCACC

Iniciadores descritos por BEDNAREK *et al.*, 2000.

4.10 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os produtos da PCR e do Nested-PCR foram analisados através da eletroforese em um gel de poliacrilamida (PAGE) a 6,5% (MANIATIS *et al.*, 1982). Foram aplicados 3 µl de cada produto juntamente com 1,0 µl de gel loading buffer (GLB). Para determinar o peso molecular do fragmento amplificado, foi aplicado em uma canaleta do gel, 1,0µl de padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder mix, 0,5 µg/µl – MBI Fermentas). A corrida foi realizada em tampão TBE 1 x, a 160 V, durante aproximadamente 35', utilizando-se uma cuba específica (mini vertical gel electrophoresis unit, Sigma). Os reagentes utilizados para confecção do gel de poliacrilamida e as soluções utilizadas na eletroforese em PAGE estão descritas no ANEXO E.

4.11 - COLORAÇÃO PELA PRATA

Devido à grande afinidade do íon prata por ácidos nucleicos, estes formam complexos lineares com o metal. O processo de coloração é uma adaptação do método descrito por BASSAM *et al.* (1991), que se baseia na capacidade da prata de se ligar ao DNA fixo em uma matriz, sendo posteriormente oxidada, produzindo cor que vai do amarelo escuro ao preto. Com isso, é possível visualizar e identificar os fragmentos de DNA e cDNA que migraram no gel, de acordo com seu peso molecular.

O protocolo consiste de uma série de etapas, descritas no QUADRO 5.

A integridade e a qualidade do material amplificado são verificadas pelo padrão de bandas formado pelo material amplificado no gel. As bandas devem apresentar-se

bem delimitadas, e seu posicionamento no gel, quando comparado ao das bandas de um padrão de peso molecular, deve ser compatível com o tamanho esperado para o fragmento. Cada amostra deve apresentar apenas uma banda, correspondente ao fragmento amplificado, sendo admissível a presença de mais bandas apenas em casos específicos. As soluções utilizadas na coloração do gel de poliacrilamida pela prata estão no ANEXO F.

QUADRO 5: Protocolo de coloração pela prata do gel de poliacrilamida.

Reagente	Tempo	Condições
1. Ácido acético 10%	8 minutos	Sob agitação
2. Água destilada	3 minutos	Sob agitação
3. Solução de prata	8 minutos	Sob agitação
4. Água destilada	30 segundos	Sob agitação
5.Revelador	Até a coloração aparecer	Sob agitação
6. Ácido acético	10-15 minutos	Sob agitação
7. Água destilada	10-15 minutos	Sob agitação
8. Secar em papel celofane	12-24h	

4.12 – PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR E RT-PCR PELA COLUNA

4.12.1 – PURIFICAÇÃO DIRETA DOS PRODUTOS PELA COLUNA

Produtos da PCR obtidos na análise de mutação no gene WWOX e do Nested RT-PCR, este último, apresentando apenas um tipo de transcrito por amostra, foram submetidos ao método de purificação direta pela coluna. Esta técnica consiste na purificação do material amplificado, eliminando somente fragmentos de baixo peso molecular (100 a 120 pb), como, por exemplo, excesso de iniciadores, que podem inibir a reação de sequenciamento. Dessa forma, o produto de PCR, para ser submetido a esse tipo de purificação deve estar em excelente qualidade, sem a presença de bandas inespecíficas de alto peso molecular, apresentando apenas impurezas de baixo peso molecular.

Para realização desse tipo de purificação, foi utilizada o *Kit* GFX de purificação (*GFX PCR and Gel Band Purification Kit* da Amersham Biosciences). O *Kit* consiste de uma coluna contendo fibra de vidro (que tem a função de filtrar os fragmentos indesejáveis), tubos de microcentrífuga, solução para capturar o DNA e solução de lavagem. Após a identificação dos tubos coletores, cada qual com sua coluna adaptada, procedeu-se à aplicação das amostras (50 µl) junto com 500 µl do tampão de captura (acetato). Centrifugou-se a 20.000 x g, em microcentrífuga, por 30 segundos, descartando-se o material centrifugado. À coluna contendo o DNA, aplicou-se 500 µl de um tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), procedendo-se novamente a centrifugação com descarte do material. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrífuga estéril e aplicou-se 50 µl de TE pH 8,0. Em

temperatura ambiente, aguardou-se aproximadamente 5 minutos e centrifugou-se a 20.000 x g por 2 minutos. A pureza das amostras também foi certificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%.

4.12.2 – PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS PELA COLUNA SUBMETIDOS AO GEL DE AGAROSE

O protocolo utilizado para preparação e corrida dos géis de agarose foi adaptado a partir do método descrito por VOGELSTEIN & GILLESPIE (1979).

A purificação em gel de agarose consiste em um procedimento que também visa purificar o material obtido pela reação em cadeia da polimerase. Em alguns produtos de amostras obtidos no Nested RT-PCR foi detectada mais de uma banda, sendo, portanto, necessário separá-las para que se pudesse fazer a reação de sequenciamento em separado.

A técnica consiste em correr o produto de PCR por eletroforese em gel de agarose utilizando dois ou três produtos de PCR, feitos separadamente, cada qual com o equivalente a 50 µl de produto final. Esse volume é aplicado em gel de agarose a 2,0% e submetido à eletroforese por aproximadamente 30 minutos, em tampão de corrida TAE 1x, a 180 V. Após corrida, o gel é mergulhado em solução de brometo de etídio (concentrado) por 20 minutos para visualização das bandas.

Após o reconhecimento das bandas de interesse, as mesmas foram removidas cortando separadamente a parte do gel onde elas se encontravam. Cada bloco de agarose contendo uma banda de interesse foi colocada em um tubo de 1,5 mL e adicionado um volume de tampão de captura na proporção de 1µl de tampão para cada 1µg de agarose

contendo a banda a ser purificada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 65°C. Após a completa liquefação da banda, a mistura foi transferida para a coluna do *Kit* GFX de purificação (*GFX PCR and Gel Band Purification Kit* da Amersham Biosciences), sendo submetida aos mesmos passos descritos na sessão anterior. As soluções utilizadas na purificação pela coluna estão descritas no ANEXO G.

4.13 - SEQUENCIAMENTO

O método utilizado, descrito inicialmente por SANGER *et al.* (1981), baseia-se na síntese de uma fita de DNA por uma enzima DNA polimerase a partir de um molde de fita simples, interrompendo esta duplicação quando há incorporação de um dideoxynucleotídeo (ddNTP), que, por não possuir o grupo hidroxila ligado ao carbono 3', não é capaz de sofrer nova esterificação, interrompendo a extensão da cadeia.

A reação de sequenciamento do DNA foi realizada com o Kit de sequenciamento Big Dye Terminators (ABI Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Para que ocorra a reação, é necessário um mix (*Terminator Ready Reaction Mix*), fornecido pelo kit que contém os ddNTP's, os dNTP's, a enzima polimerase, MgCl₂ e tampão Tris-HCl, pH=9.0. Os componentes utilizados para essa etapa estão listados no QUADRO 6.

QUADRO 6 - Componentes utilizados para a reação de sequenciamento e suas quantidades.

Componentes	Quantidade
<i>Terminator Ready Reaction Mix</i>	2 μ l
Tampão de incubação	3 μ l
Produto de PCR	100 ng
Iniciador	3,2 pmoles
Água deionizada	q.s.p. 20 μ l
Total	20 μl

Existem três passos principais na reação de sequenciamento (como na PCR), que podem ser repetidos por 25 a 30 ciclos. Esses passos são:

1. Desnaturação do DNA a 96° C por 30 segundos.

Durante a desnaturação, a fita dupla de DNA se abre, formando duas fitas simples, sendo que todas as reações enzimáticas são paralisadas (por exemplo, a extensão do ciclo anterior).

2. Anelamento a 50° C por 15 segundos.

Na reação de sequenciamento, somente um iniciador é usado. Desta forma, somente uma fita é copiada (na PCR dois iniciadores são usados, formando duas fitas cópias). O iniciador se liga à fita simples por meio de ligações iônicas. Uma vez ligado em uma

região específica e complementar da fita simples, a polimerase inicia a formação da fita complementar.

3. Extensão a 60° C por 4 minutos.

Após o anelamento, a temperatura é elevada a 60° C, que é a temperatura ideal de ação da polimerase (normalmente é de 72° C, mas, devido à presença de ddNTP's, que são quimicamente modificados pela fluorescência, a temperatura é diminuída para 60° C para que haja tempo de incorporação dessas moléculas quimicamente modificadas). A partir desse momento, as bases são adicionadas de forma complementar à fita simples que está disponível para ser copiada. Pode ser adicionado tanto um dNTP quanto um ddNTP à fita nascente. Quando um ddNTP é incorporado, a reação de extensão é paralisada, uma vez que esse dideoxynucleotídeo contém um átomo de hidrogênio no terceiro átomo de carbono (o dNTP contém um grupo –OH nesta posição). Como os ddNTP são fluorescentes, é possível identificar a cor da última base fluorescente adicionada, por meio da leitura pelo sequenciador automático.

Após 25 ciclos de repetição, o produto final foi precipitado em álcool isopropílico (75%), durante 15 minutos. Centrifugou-se por 25 minutos a 16.000 x g, descartando-se em seguida o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em etanol 70% e depois centrifugado por mais 10 minutos; após descarte do sobrenadante, o produto foi seco no termociclador a 80° C por 2 minutos, adicionando-se em seguida 12µl da solução TSR (*Template Supression Reagent*, ABI PRISM/USA) para que o sequenciador automático possa fazer a leitura em eletroforese por capilaridade.

Foi utilizado, como equipamento de leitura da reação de sequenciamento, o aparelho ABI PRISM 310 Genetic Analyser. As soluções utilizadas nesta etapa estão descritas no ANEXO H.

4.14- IMUNOFLUORESCÊNCIA

Cortes histológicos de 7 μm de CCE de boca e de mucosa normal da cavidade bucal foram realizados em criostato e fixados em acetona a -20°C por 20 minutos. Para reduzir reação inespecífica, foi realizado um bloqueio em tampão PBS/0,5% BSA, contendo 5% de soro normal de cabra (Calbiochem, Darmstadt, Germany), por 30 minutos a TA. Logo em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal anti-WWOX com diluição de 1:100 em PBS/0,5% BSA por 18 horas a TA. Os cortes foram então lavados 3 vezes de 5' em PBS e incubados com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) na diluição de 1:500 em PBS/0,5% BSA e também com um marcador nuclear, com afinidade para a molécula de DNA (DAPI, $5\mu\text{M}$ /Sigma), por 30 minutos a TA. As lâminas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada em PBS e montadas com hydromount (National Diagnostic). As imagens foram obtidas através do sistema de microscopia confocal (Bio-Rad MRC 1024), utilizando uma objetiva de imersão em água de 40x.

4.15- WESTERN BLOT

Extrato de proteína foi obtido a partir de células do CCE de boca e da mucosa normal dos pacientes do grupo controle. Inicialmente, cortes histológicos de 10 μm foram realizados em criostato e corados por 20 segundos com Azul de Toluidina para evidenciar células epiteliais. Cada corte foi levado ao microscópio óptico (Modelo

KF2, Zeiz, GE), onde se procedeu a microdissecção com o objetivo de separar o máximo possível, as células epiteliais (do carcinoma e da mucosa normal), das demais células, diminuindo o grau de contaminação com outras células do tecido.

Após a microdissecção, o tecido separado foi colocado em um tubo com 150 μ l de tampão de lise (RIPA) e 1,0% de inibidores de proteases (Chemicon, International, Temecula, USA). As amostras foram então centrifugadas por 40 segundos a 14.000 x g a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante, contendo as proteínas, foi removido cuidadosamente, transportado para outro tubo e congelado a -20°C.

4.15.1- DOSAGEM DE PROTEÍNAS – MÉTODO BRADFORD

A dosagem de proteína foi feita pelo método colorimétrico descrito por BRADFORD (1976), baseado na formação de complexos entre o corante Coomassie Blue com a cadeia polipeptídica. Um volume de 0,5-5 μ l dos extratos protéicos, obtidos dos tecidos foram utilizados para a quantificação. Amostras em duplicata foram colocadas em tubos de ensaio onde foi adicionado 1,0 mL de NaCl 0,15M e 1,0 ml do reagente de Bradford em cada amostra. A mistura foi incubada por 2 minutos a TA e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Kinects/Endpoint System Analyser – Hitashi) no comprimento de onda de 595nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de diluição padrão de soro de albumina bovina 1mg/ml (BSA) com 1, 3, 5 e 7 μ g. Na figura 1, mostra um exemplo de curva padrão utilizada para quantificação pelo método de Bradford.

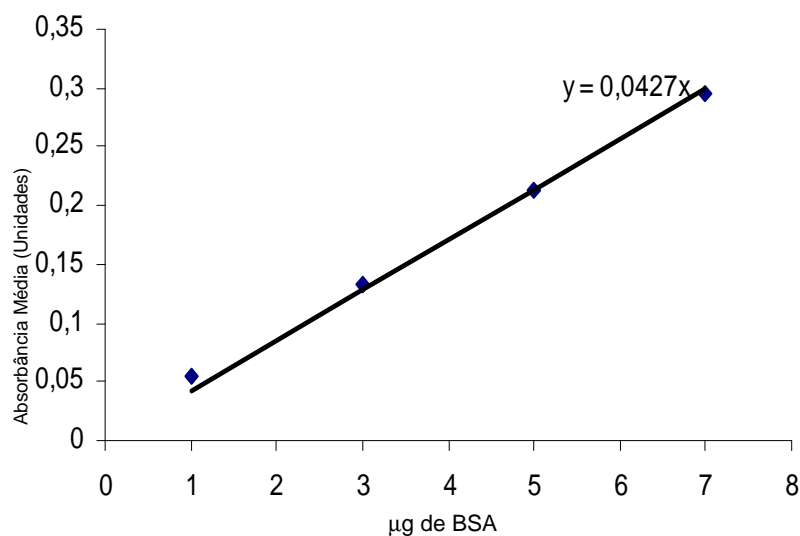


FIGURA 1 – Curva padrão de BSA 1mg/ml utilizada para quantificação da proteínas estudadas ($R^2 = 0,9942$).

4.15.2-ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM SDS-PAGE

Os extratos protéicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, composto de duas partes, uma o gel de concentração e outra, o gel de separação. 50µg do extrato protéico foi aplicado na eletroforese. As amostras foram misturadas em tampão de amostra 6 x e desnaturadas por 5 minutos a 100°C em um termociclador (PTC, MJ Research, USA). Após estes, as amostras foram aplicadas no gel de concentração. Para determinar a massa molecular das proteínas, foi aplicado em uma das canaletas do gel, um padrão de massa molecular. A corrida foi realizada em um tampão de corrida a 100 V, durante 3 horas, utilizando-se uma cuba específica (Amersham, USA). Os reagentes utilizados para confecção do gel de poliacrilamida e as soluções utilizadas na eletroforese em SDS-PAGE estão descritas no ANEXO I.

4.15.3- IMUNOBLOTS

Após a eletroforese em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-PVDF, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) em um tampão transferência utilizando-se um aparato de transferência para Western blot (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ), por 16 horas a 90mA. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau por 3 minutos e lavadas com água deionizada para certificar a presença de proteínas na membrana. As membranas então, foram bloqueadas com tampão PBS-Tween contendo leite a 5% por 45 minutos a TA, sob agitação e lavadas em PBS-Tween por 2 vezes. A detecção da proteína WWOX foi realizada através de um anticorpo anti-WWOX policlonal gentilmente cedido pelo Dr. C.M. ALDAZ, na diluição de 1:500 em PBS-Tween por 2 horas, a TA sob agitação. As membranas foram então lavadas 3 vezes em PBS-Tween por 7 minutos cada e incubadas em um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:20.000 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) em PBS-Tween por 1 hora a TA sob agitação. Após o secundário, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-Tween por 7 minutos cada e incubadas com o kit de quimiluminescência (ECL-PLUS, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) por 5 minutos. As membranas foram então expostas e reveladas em filme de raio X (T-MAT – Kodak) por 10 minutos. Como controle, actina foi detectada usando um anticorpo monoclonal de camundongo anti - β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), diluído 1:1000 e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase, na diluição de 1:1500 (Molecular Probes, Eugene, USA), nas mesmas condições usadas para a proteína WWOX. As soluções utilizadas no Western-blot estão descritas no ANEXO I.

4.16- IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunistoquímica foram realizadas através da técnica da streptavidina-biotina-peroxidase.

Cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram desparafinizados em três banhos de xilol e reidratados em cadeia descendente de etanol. Para a remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% e em seguida, lavados em sete banhos de água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com o tampão 1.0mM EDTA pH 8.0 por 30 minutos em uma panela de vapor (Cuisinart). Para a inibição da peroxidase endógena, os cortes passaram por dois banhos de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, sendo posteriormente lavados em cinco banhos de água destilada.

Cada um dos procedimentos a seguir foram precedidos por 3 lavagens de 5 minutos em solução tampão de TRIS-HCl.

Os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal anti-coelho (gentilmente cedido pelo Dr. Marcelo Aldaz da Universidade do Texas, USA), na diluição de 1:100 em BSA 1% (Sigma, USA) por 18 horas a 4°C. Foram utilizados o anticorpo secundário e o complexo terciário pertencentes ao Kit LSAB Plus Peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, USA). Inicialmente, os casos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado polivalente durante 30 minutos a TA. Sequencialmente efetuou-se a incubação com o complexo streptavidina-peroxidase durante 30 minutos.

A reação foi revelada pelo emprego de solução cromógena diaminobenzidina em pó (Dako Corporation, Carpinteria, USA) associada a peróxido de hidrogênio 3%. Os cortes foram incubados por 6 minutos, sendo então lavados por 5 banhos de água

destilada. A contracoloração foi realizada em solução de hematoxilina de Mayer por 1 minutos. As lâminas foram então lavadas por 5 minutos em água corrente. Posteriormente, os cortes foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA). As soluções utilizadas na imunistoquímica estão descritas no ANEXO J.

4.16.1- ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO

A análise da imunolocalização foi realizada por dois observadores independentes, utilizando-se um retículo de contagem para delimitação de campos em um microscópio de luz (Modelo KF2, Zeiz, GE), sob aumento de 400x.

Em cada campo, delimitado pelo retículo de contagem, foram mensurados o número total de células e o número de células positivas para a proteína WWOX. Foram consideradas positivas as células que apresentavam citoplasma com coloração castanha, como resultado da precipitação do cromógeno diaminobenzidina, independentemente da intensidade da coloração. Como os cortes não apresentavam um número muito grande de campos, optou-se por analisar toda a sua extensão.

Em cada campo avaliado, foram quantificados o número total de células epiteliais e o número de células positivas. A partir dos dados obtidos pela avaliação de todos os campos, calculou-se o índice de marcação através da fórmula:

$$\text{Índice de marcação} = \frac{\text{soma do número de células positivas nos campos} \times 100}{\text{soma do número total de células nos campos}}$$

O índice de marcação indica, portanto, a porcentagem de células positivas sobre o número total de células do CCE de boca. Os casos foram então classificados em scores, de acordo com a porcentagem de células imunopositivas para a proteína WWOX em:

- Score 1: 0 a 10% de células imunopositivas;
- Score 2: 11 a 50% de células imunopositivas;
- Score 3: 51 a 100% de células imunopositivas.

4.17- ASPECTOS ÉTICOS

A realização deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), sob número 054/2004.

5. RESULTADOS

5.1- INVESTIGAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO GENE *WWOX*

Amplificação via RT-PCR foi utilizada para analisar a expressão do mRNA do gene *WWOX*. Sete dos 20 casos de CCE de boca (35%) mostraram expressão alterada ou ausente do gene *WWOX*. Desses 7 tumores, cinco apresentaram transcritos com perda total ou parcial de exons. Dos cinco tumores, apenas o #CA5 expressava somente o transcrito alterado, não exibindo o transcrito normal. Além disso, em dois tumores (#CA3 e #CA18) nenhum transcrito foi detectado. Ambas as amostras foram positivas para a Citoqueratina 16, que foi usada como um marcador de células epiteliais (AIHARA *et al.*, 1997). Amostras de mucosa normal utilizadas como controle apresentaram apenas o transcrito de tamanho normal (FIG. 2A). Os produtos obtidos do RT-PCR foram seqüenciados e mostraram a perda dos exons 6-8 (casos #CA2, #CA5, #CA21 e #CA24) (FIG. 2B). Dois novos transcritos para o gene *WWOX* foram detectados: perda do exon 7 (#CA2) (FIG. 2D) e perda parcial dos exons 8-9 (#CA12) (FIG. 2C). Interessantemente, o tumor #CA2 apresentou dois tipos diferentes de transcrito alterado além do transcrito normal, com perda dos exons 6-8 em um e perda do exon 7 em outro (FIG. 2A). Os demais casos de CCE mostraram apenas o transcrito normal. Os resultados representativos do Nested RT-PCR são mostrados na FIGURA 2.

5.2- ANÁLISE DO DNA GENÔMICO DO GENE *WWOX*

Para determinar a presença de mutações somáticas do gene *WWOX* em CCE de boca e mucosa bucal normal, foi realizado o sequenciamento direto dos produtos da PCR de todas as regiões codificadoras (9 exons). Uma única mutação somática do tipo missense foi detectado no tumor #CA12, 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 (Fig. 2E). Para confirmar a presença desta mutação somática, o DNA do sangue periférico do paciente foi extraído e sequenciado, mostrando apenas a sequência normal (selvagem).

Além disso, 6 alterações de nucleotídeos descritas foram encontradas (PAIGE *et al.*, 2001). A primeira variação envolveu a troca de um C para G no nucleotídeo 746, sem alterar o aminoácido traduzido Leu→Leu, no códon 117 (exon 4); a segunda envolveu a troca de um C para T, 6 bases após a extremidade 3' do exon 5; a terceira, envolveu a troca de um A para G no nucleotídeo 660, resultando na substituição de uma Ala→Thr no códon 179 (exon 6); a quarta, envolveu a troca de um C para G no nucleotídeo 969, resultando na substituição de uma Pro→Ala no códon 282 (exon 8); a quinta envolveu a substituição de um C para T no nucleotídeo 1442, na região não codificadora 3'UTR (exon 9); a sexta envolveu a troca de um T para G no nucleotídeo 1497, na região não codificadora 3'UTR (exon 9). Nenhuma dessas alterações afetam resíduos críticos dos domínios WW ou do domínio SDR e representam variações polimórficas comuns no gene *WWOX*.

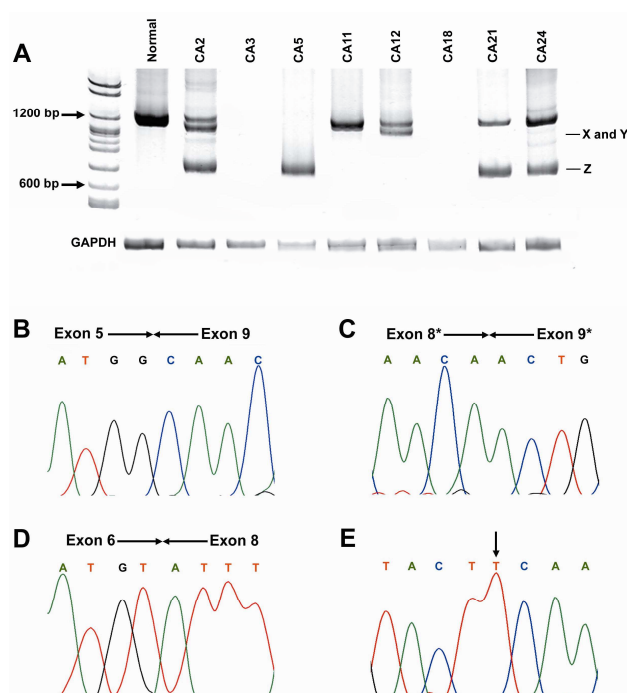


FIGURA 2: Amplificações obtidas pelo RT-PCR do gene *WWOX* dos CCE de boca. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5% foi utilizada para detectar transcrito normal e alterações na transcrição do mRNA do gene *WWOX*. Ausência de transcrição (#CA3 e #CA18) e três tipos de transcritos alterados foram descritos: X (#CA2), Y (#CA12) e Z (#CA2, #CA5, #CA12, #CA21 and #CA24). (B-D), seqüências representativas dos CCE mostrando perda de exons (* representa perda parcial de exon). (B), #CA5; (C), #CA12; (D) #CA2 apresentando alteração da abertura do fragmento de leitura. (E) mutação somática (C→T) do tumor #CA12, causando substituição S329F.

5.3- INVESTIGAÇÃO DA PROTEÍNA WWOX

A localização e distribuição da proteína *WWOX* em CCE de boca e mucosa bucal normal foi realizada através de imunofluorescência e analisada por meio de microscopia confocal. Apenas marcação citoplasmática, principalmente perinuclear, foi observada nos CCEs e mucosa normal (FIG. 3). No tecido normal, a expressão da proteína *WWOX* foi intensa, distribuída em todas as camadas do epitélio (FIG. 3A). No

CCEs de boca, a distribuição da proteína WWOX foi variada, com regiões que mostraram intensa marcação e outras, mostrando ausência da expressão da proteína (FIG.3C).

FIGURA 3: Localização e distribuição da proteína WWOX em CCW e mucosa normal através de imunofluorescência e microscopia confocal. (A) A proteína WWOX foi apresentada localização apenas no citoplasma, com intensa marcação perinuclear detectada em todas as camadas do epitélio da mucosa bucal normal. (B) Controle negativo da mucosa bucal normal, sem incubação com anticorpo primário. (C) CCE de boca apresentando marcação da proteína WWOX com a mesma localização do tecido normal. (D) Controle negativo do CCE de boca. O núcleo das células (azul) foram contracolorados com 5 μ M DAPI (Sigma, USA).

Para determinar se os transcritos alterados do gene WWOX encontrados no CCE de boca são traduzidos em proteínas, nós realizamos a análise através do Western blot dos estratos protéicos dos 20 casos de CCE de boca e também das amostras de mucosa bucal normal. A proteína WWOX foi detectada utilizando um anticorpo policlonal anti-WWOX (resíduos de aminoácidos 12-94), que reconhece tanto a proteína normal quanto as possíveis proteínas truncadas (LUDES-MEYERS *et al.*, 2003). Uma proteína de 46 KDa foi detectada nas amostras de mucosa bucal normal, correspondendo ao tamanho da proteína WWOX. Os transcritos alterados presentes nos tumores #CA2, #CA5, #CA12, #CA21 e #CA24 não foram detectados pelo Western Blot, sugerindo que eles não são traduzidos em proteínas (Fig. 4). Contudo, é possível que estas sejam produzidas, mas podem ser instáveis e por isso degradadas rapidamente.

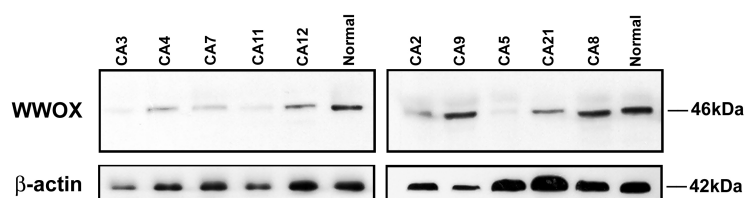


FIGURA 4: Análise da proteína WWOX de CCE de boca através do Western blot. Anticorpo policlonal foi usado para detectar a proteína WWOX em extrato de proteína total. Apenas a proteína WWOX normal com 46 kDa foi detectada.

A expressão da proteína WWOX em mucosa bucal normal e em CCE de boca também foi confirmada através da imunohistoquímica. Células epiteliais da mucosa bucal normal e dos CCEs de boca exibiram uma marcação citoplasmática para a proteína WWOX, como é mostrado na FIGURA 5. Todas as mucosas normais mostraram uma forte marcação (+3) para

a proteína WWOX (FIG. 5A). Dos vinte casos de CCE de boca, oito tumores (40%) mostraram uma redução na expressão da proteína WWOX. Cinco destes (#CA2, #CA10, #CA11, #CA12 and #CA18) exibiram uma marcação moderada (+2) (FIG. 5C) e três (#CA3, #CA5 and #CA16) mostraram uma fraca marcação (+1) (FIG. 5B).

FIGURA 5: Imunoistoquímica para a proteína WWOX em CCE de boca e mucosa bucal normal. (A) Mucosa bucal normal mostrando intensa marcação citoplasmática em todas as camadas do epitélio (score +3). (B) Tumor representativo (score +1) mostrando ausência da proteína WWOX (#CA5). (C) Tumor apresentando poucas células positivas para a proteína WWOX, score +2 (#CA12) e (D) Tumor demonstrando forte marcação para a proteína WWOX (#CA24); 400x.

Analisando conjuntamente os resultados obtidos através do RT-PCR e imunohistoquímica observamos que 50% dos CCEs de boca apresentavam alterações na expressão do gene *WWOX*. Dos sete casos de CCE que apresentaram transcrito alterado no RT-PCR, cinco apresentaram redução da expressão da proteína *WWOX* (TABELA 1). Além do mais, o tumor #CA5 que expressava apenas transcrito alterado foi negativo para a expressão da proteína *WWOX*, reforçando os achados do Western blot, onde os transcritos alterados não são traduzidos em proteínas (FIG. 5B).

TABELA 1- Resultados obtidos do RT-PCR e imunoistoquímica

Tumores	RT-PCR	Imunoistoquímica (Score)
CA2	N Perda exons 6, 7 e 8 Perda exon 7	2
CA3	A	1
CA4	N	3
CA5	Perda exons 6,7 e 8	1
CA7	N	3
CA8	N	3
CA9	N	3
CA10	N	2
CA11	N	2
CA12	N Perda parcial dos exons 8 e 9)	2
CA13	N	3
CA14	N	3
CA16	N	1
CA17	N	3
CA18	A	2
CA19	N	3
CA20	N	3
CA21	N Perda dos exons 6,7 e8	3
CA22	N	3
CA24	N Perda dos exons 6,7 e8	3

RT-PCR: (N) - Transcrito normal (wild type); (A) - Ausência de transcrito.

Imunoistoquímica: scores: (1) – 0 a 10% de células positivas; (2) – 11 a 50% de células positivas; (3) – 51 a 100% de células positivas.

Mucosa normal de pacientes s/ carcinoma foram usadas como controle positivo – todas score (3).

6- DISCUSSÃO

O CCE de boca é o tumor maligno mais comum da cavidade bucal e tem a sua patogênese relacionada à fatores ambientais como o tabaco e o álcool e a distúrbios genéticos (COTRAN *et al.*, 1999). Segundo SCULLY *et al.* (2000b) os eventos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese do CCE de boca estão relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose.

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 (16q23.3-q24.1) expandindo 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 na duplicação pode ser acentuado sob ação de agentes externos como, por exemplo, a afidicolina, que é um inibidor das DNA polimerases do tipo α e δ . Trabalhos têm demonstrado uma alta frequência de sequências recombinantes geradas de rearranjos, comuns em lesões malignas, nas regiões cromossômicas onde se encontra os sítios de fragilidade (POPESCU, 2003).

LE BEAU *et al.* (1998) concluíram que as anormalidades que afetam o gene *FHIT*, expandindo o FRA3B, seriam mais em consequência do gene residir em uma região comumente afetada por rearranjos cromossômicos. A relação do gene *WWOX* e a região de fragilidade faz com que ele seja um candidato a ser afetado por rearranjos genômicos durante a carcinogênese e progressão do tumor. É possível que o mecanismo

de facilitação da progressão do tumor seja mais importante do que o mecanismo de iniciação da neoplasia (LUDES-MEYERS *et al.*, 2004).

Trabalhos têm demonstrado alterações do gene *WWOX* em análises tanto de DNA genômico e RT-PCR, quanto de imunistoquímica e Western blot. No presente estudo, alterações moleculares do gene *WWOX* foram avaliadas em 20 casos de CCE de boca e 10 fragmentos de mucosas bucais normais. O presente estudo é o primeiro a analisar uma série de casos de CCE de boca usando todas as técnicas acima para estudo do gene *WWOX*.

Nós demonstramos que a expressão do gene *WWOX* está comumente alterada no CCE de boca, que sugerem o seu envolvimento no processo de carcinogênese do epitélio de revestimento da cavidade bucal. Análise dos dados obtidos com o estudo de DNA, RNA e proteína mostraram que o *WWOX* está alterado em 50% dos tumores primários de CCE de boca estudados. Entre os tumores estudados, 35% apresentavam perda ou transcrição aberrante no RT-PCR. Além disso, uma nova mutação missense foi descrita, com a substituição de um aminoácido polar sem carga (Serina) para um apolar (Fenilalanina). Em toda a literatura apenas uma mutação somática foi descrita em carcinoma de esôfago, também localizada no exon 8 (KUROKI *et al.*, 2002). Através da imunistoquímica a expressão da proteína *WWOX* estava reduzida em 40% dos tumores (8 de 20).

A frequência das alterações encontradas pelo RT-PCR foi similar às alterações encontradas no câncer de pulmão e adenocarcinoma pancreático (YENDAMURI *et al.*, 2003; KUROKI *et al.*, 2004). BEDNAREK *et al.* (2000) encontraram uma prevalência de 32% dos casos de carcinoma de mama com o transcrito aberrante, com perda dos exons 6-8. Por outro lado, apenas 3 de 27 casos de carcinoma de esôfago apresentavam

transcritos aberrantes (KUROKI *et al.*, 2002). A redução da expressão detectada por imunistoquímica foi menor do que a encontrada em carcinoma de mama e gástrico (AQEILAN *et al.*, 2004; GULER *et al.*, 2004; NUNEZ *et al.*, 2005) mas, similares aos achados em câncer de ovário (NUNEZ *et al.*, comunicação pessoal).

As formas aberrantes do gene *WWOX* podem ser gerados através de transcrito alternativo do mRNA do *WWOX* ou através de deleções de alelos desse gene em câncer (LUDES-MEYERS, *et al.*, 2003). Transcritos alternativos têm sido encontrados associados a várias doenças (VENABLES, 2004). Existe a possibilidade que esses transcritos aberrantes são mRNA não funcionais. 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).

Resultados obtidos no Western blot demonstraram que os transcritos aberrantes encontrados em 5 casos de CCE de boca estudados não foram traduzidos em proteínas. Muitos tipos de tumores e linhagens de células de câncer têm sido analisadas usando diferentes anticorpos que poderiam detectar as proteínas traduzidas dos transcritos aberrantes do mRNA do *WWOX*, mas nenhuma dessas tais proteínas têm sido observadas, com exceção em neoplasias hematológicas (ISHII *et al.*, 2003), onde foi detectado vários tipos de proteínas *WWOX* com tamanho reduzido. É possível que proteínas truncadas codificadas por transcritos aberrantes realmente são produzidas, mas podem ser instáveis e por isso, degradadas rapidamente. Contudo, algumas isoformas aberrantes da proteína *WWOX* podem ser estáveis e funcionais em neoplasias específicas (LUDES-MEYERS *et al.*, 2003).

Sítios de fragilidade do tipo comum são regiões susceptíveis e preferencialmente são alvos de agentes carcinogênicos e isso pode ser compreensivo que alterações no WWOX/FRA16D e FHIT/FRA3B podem ser afetados concomitantemente. Resultados com carcinoma hepatocelular sustentam fortemente a noção que, alterações de genes que expandem 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 e pulmão, que são tumores fortemente associados à exposição a agentes carcinógenos, como o tabaco e o álcool (KUROKI *et al.*, 2002; YENDAMURI *et al.*, 2003). Interessante é o fato que a incidência de alterações no gene WWOX foi mais freqüente no carcinoma de células escamosas do que no adenocarcinoma de pulmão (55,5% e 20%, respectivamente). A incidência de carcinoma de células escamosas é mais fortemente associada ao tabaco do que o adenocarcinoma (MORABIA & WYNDER, 1991). Outros trabalhos reforçam essa relação entre genes que expandem sítios de fragilidade e agentes carcinogênicos, como KUROKI *et al.* (2004) em adenocarcinoma de pâncreas, associado ao tabaco e AQEILAN *et al.* (2004a) em adenocarcinoma gástrico associado ao *H. pylori* e tabaco.

Porém, ainda não se sabe ao certo se as alterações encontradas no gene WWOX funcionam como causa do surgimento ou facilitador da progressão da neoplasia maligna e até mesmo, ocorrem em decorrência do crescimento da lesão. Como CHEN *et al.*, (1996) detectaram perda de heterozigosidade em carcinoma ductal *in situ* de mama, que representa um estágio inicial do desenvolvimento do câncer, é possível que o surgimento de neoplasias malignas estejam associadas com a perda de expressão do

gene *WWOX*. Estudos deste gene em lesões pré-malignas são necessários para comprovar esses achados. Além disso, outro ponto importante a ser salientado é se a perda da expressão do gene *WWOX* pode estar correlacionada com o prognóstico dos pacientes com câncer. Apenas um trabalho na literatura em carcinoma de ovário (NUNEZ *et al.*, comunicação pessoal), demonstrou uma menor resposta ao tratamento quimioterápico em pacientes com perda de expressão da proteína *WWOX*, evidenciando a necessidade de estudos para estabelecer a possível relação entre perda da expressão do gene *WWOX* e prognóstico.

No presente trabalho, nós demonstramos uma redução na expressão do gene *WWOX* em 50% dos casos de CCE de boca, comparados com a mucosa normal, além de uma nova mutação no gene *WWOX*. A presença de alterações na transcrição do mRNA correlacionou com a redução da expressão da proteína nos tumores. Esses resultados mostram que o gene *WWOX* está frequentemente alterado e possivelmente contribui para o processo de carcinogênese no CCE de boca. Estudos complementares são necessários para comprovar a participação do gene *WWOX* no processo de transformação maligna do epitélio bucal.

7- CONCLUSÕES

- Análise molecular demonstrou que o gene *WWOX* está alterado em 50% dos casos de CCE de boca analisados no presente estudo, sugerindo a participação desse gene no processo de carcinogênese do CCE de boca;
- Existem transcritos aberrantes do gene *WWOX* em CCE de boca;
- Mutação missense no gene *WWOX* foi encontrada em um caso de CCE de boca;
- Transcritos aberrantes do gene *WWOX* em 5 casos de CCE de boca não foram traduzidos em proteínas;
- Redução da expressão da proteína *WWOX* ocorreu em 40% dos casos de CCE de boca;

8- 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*. v. 72, n. 3, p. 408-411, Jul 1997.

2- AQEILAN, R. I.; *et al.* Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 101, n. 13, p. 4401-4406, Mar 2004a.

3- AQEILAN, R. I.; *et al.* Physical and functional interactions between the WWOX tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer Res*. v. 64, n. 22, p. 8256-8261, Nov 2004b.

4- AQEILAN, R. I.; *et al.* Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. v. 10, n. 9, p. 3053-3058, May 2004c.

5- ARNHEIM, N. The possible role Z DNA in chromosomal translocations. *Cancer Cells*, v. 2, n. 4, p. 121-122, Apr 1990.

6- BASSAM; *et al.* Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. v.196, n. 1, p. 80-83, Jul 1991.

7- BEDNAREK, A. K.; *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*. v. 60, n. 8, p. 2140-2145, Apr 2000.

8- BEDNAREK, A. K.; *et al.* WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res*. v. 61, n. 22, p. 8068-8073, Nov 2001.

- 9- BOOM, R.; *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n. 3, p.495-503, Mar 1990.
- 10- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* v. 7, n. 72, p. 248-54, May 1976.
- 11- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Brasília, 2005. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005>.
- 12- CHANG, N. S.; *et al.* Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem.* v. 276, n. 5, p. 3361-3370, Feb 2001.
- 13- CHANG, N. S.; *et al.* Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses. *Biochem Pharmacol.* v. 66, n. 8, p.1347-1354, Oct 2003.
- 14- CHEN, T.; AYSEGUL, S.; ALDAZ, C. M. Deletion map of chromosome 16q in ductal carcinoma *in situ* of the breast: refining a putative tumor suppressor gene region. *Cancer Res.* v. 56, n. 24, p. 5605-5609, Dec 1996.
- 15- CHER, M. L.; *et al.* Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Urol.* v.153, n. 1, p.249-254, Jan 1995.
- 16- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Pathologic bases of disease. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 2000. 1425p.
- 17- CROCE, C. M.; SOZZI, G.; HUEBNER, K. Role of *FHIT* in human cancer. *J. Clin. Oncol.* v. 17, n. 5, p.1618-1624, May 1999.

18- DRIOUCH, K.; *et al.* Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene*. v. 21, n. 12, p.1832-1840, Mar 2002.

19- 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*. v. 49, n. 2, p.203-217, Oct 1990.

20- ELO, J.P.; *et al.* 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*. v. 79, n. 1, p.156-160, Jan 1999.

21- GREENE, F. L. American Joint Committee on Cancer and American Cancer Society (eds): AJCC Cancer Staging Manual 6 ed. New York, NY, Springer-Verlag, 2002.

22- GULER, G.; *et al.* The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer*. v. 100, n.8, p. 1605-1614, Apr 2004.

23- HELLMAN, A.; *et al.* Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. *Mol Cell Biol*, v. 20, n. 12, p.4420-4427, Jun 2000.

24- HONG, W. K. Multiple primary squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol*. v. 10, n. 2, p.182-183, Apr 1987.

25- INOUE, H.; *et al.* Sequence of the FRA3B common fragile region: implications for the mechanism of FHIT deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, n. 26, p.14584-14589, Dec 1997.

- 26- ISHI, H.; *et al.* Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies. *Mol Cancer Res.* v. 1, n. 13, p. 940-947, Nov 2003.
- 27- ISHII, H.; *et al.* Effect of exogenous E2F-1 on the expression of common chromosome fragile site genes, FHIT and WWOX. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 316, n. 4, p. 1088-93, Apr 2004.
- 28- IWABUCHI, H.; *et al.* Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res.* v. 55, n. 24, p. 6172-6180, Dec 1995.
- 29- JEANPIERRE, M. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* v.15, n. 22, p. 9611, Nov 1987.
- 30- JINKUN, C.; *et al.* Changing trends in oral cancer in the United States, 1935-1985: a Connecticut study. *J. Oral Maxillofac Surg.* v. 49, n. 11, p. 1152-1158, Nov 1991.
- 31- KAWAKAMI, M.; *et al.* Involvement of H-cadherin (CDH13) on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* v.15, n. 4, p.715-720, Oct 1999.
- 32- KNIGHT, S. J.; *et al.* Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell*, v. 74, n. 1, p.127-134, Jul 1993.
- 33- KROLLS, S. O. & HOFFMAN, S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14.235 cases by age, sex, and race of patients. *JADA.* v. 92, n. 3, p. 571-574, Mar 1976.
- 34- KRUMMEL, K. A.; *et al.* The characterization of the common fragile site FRA16D and its involvement in multiple myeloma translocations. *Genomics.* v. 69, n. 1, p. 37-46, Oct 2000.

- 35- KRUTCHKOFF, D. J.; *et al.* Oral cancer: a survey of 566 cases from the University of Connecticut Oral Pathology Biopsy Service 1975-1986. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* v. 70, n. 2, p. 192-198, Aug 1990.
- 36- KUROKI, T.; *et al.* Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* v. 62, n. 8, p.2258-2260, Apr 2002.
- 37- LE BEAU, M. M.; *et al.* Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum Mol Genet.* v. 7, n. 4, p. 755-761, Apr 1998.
- 38- LI, C.; *et al.* Distinct deleted regions on chromosome segment 16q23-q24 associated with metastases in prostate cancer. *Genes Chrom Cancer.* v. 24 n. 3, p.175-182, Mar 1999.
- 39- LUDES-MEYERS, J. H.; *et al.* WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenet Genome Res.* v. 100, n. 1-4, p. 101-110, 2003.
- 40- LUDES-MEYERS, J. H.; *et al.* WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: identification of candidate interacting proteins. *Oncogene.* v. 23 n. 29, p. 5049-5055, Jun 2004.
- 41- MANGELSDORF, M.; *et al.* Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer. *Cancer Res.* v. 60, n. 6, p. 1683-1689, Mar 2000.
- 42- MANIATIS, T.; *et al.* J. Molecular cloning – a laboratory manual. 1 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. cap. 5, p. 173-178.
- 43- MATSUDA, A. S.; *et al.* Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene.* v. 22, p. 21, p. 3307-3318, May 2003.

- 44- MORABIA, A.; WYNDER, E. L. Cigarette smoking and lung cancer cell types. *Cancer*. v. 68, n. 9, p. 2074-2078, Nov 1991.
- 45- MORK, J. Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway – no good news. *Anticancer Res*. v. 18, n. 5B, p. 3705-3708, Sep-Oct 1998.
- 46- MORKS, J.; *et al.* Head and neck cancer in Norway. A study of the quality of the Cancer Registry of Norway's data on head and neck cancer for the period 1953-1991. *APMIS*. v. 103, n. 5 p. 375-382, May 1995.
- 47- NANCARROW, J. K.; *et al.* Implications of FRA16A structure for the mechanism of chromosomal fragile sites genesis. *Science*, v. 264, n. 5167, p.1938-1941, Jun 1994.
- 48- NEVILLE, B. W. *et al.* Oral and maxillofacial pathology. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 2002. 798 p.
- 49- NISHIDA, N.; *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*. v. 51, n. 6, p.862-868, Jul 1992.
- 50- NUNEZ, M. I.; *et al.* Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status. *Breast Cancer Res Treat* 2005 (in press).
- 51- OLIVER, A. J.; HELFRICK, J. F.; GARD, D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. v. 54, n. 8, p. 949-954, Aug 1996.
- 52- OHTA, M; *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*. v. 84, n. 4, p. 587-97, Feb 1996.

53- PAIGE, A. J.; *et al.* A 700-kb physical map of a region of 16q23.2 homozygously deleted in multiple cancers and spanning the common fragile site FRA16D. *Cancer Res.* v. 60, n. 6, p. 1690-1697, Mar 2000.

54- PAIGE, A. J.; *et al.* WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 98, n. 20, p. 11417-11422, Sep 2001.

55- PANDIS, N.; *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.* v. 5, n. 3, p. 235-238, Oct 1992.

56- PARK, S. W.; *et al.* Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* v. 91, n.4, p. 753-9, Aug 2004.

57- PARKIN, D. M. Global cancer statistic in the year. *Lancet Oncol 2001*, v. 2 n. 9, p. 533-543, Sep 2000.

58- POPESCU, N. C. Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Let.* v. 192. n.1 p. 1-17, Mar 2003.

59- RICHARDS, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends in Genetics.* v. 17, n. 6, p.339-345, Jun 2001.

60- RIED, K.; *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.* v. 9, n. 11, p.1651-1663, Jul 2000.

61- SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science.* v. 214, n. 4526, p. 1205-1210, Dec 1981.

- 62- SAPP, J. P.; EVERSOLE, L. R.; WYSOCKI, G. P. Epithelial disorders. In: Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology. 1.ed. St. Louis: Mosby, 1997. p.174-182.
- 63- SATO, T.; *et al.* Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *Cancer Res.* v. 51, n. 21, p. 5794-5799, Nov 1991.
- 64- SCHWARTZ, G. J.; *et al.* Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck.* v. 22, n. 1, p. 34-41, Jan 2000.
- 65- SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* v.36, n. 3, p. 256-263, May 2000a.
- 66- SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 2. chromosomal aberrations. *Oral Oncology.* v. 36, n. 4, p. 311-327, Jul 2000b.
- 67- SKOTNICKA-KLONOWICZ, G.; *et al.* 16q heterozygosity loss in Wilm's tumor in children and its clinical importance. *Eur. J. Surg. Oncol.* v. 26, n.1, p.61-66, Feb 2000.
- 68- SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. M.; SMEJKAL W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* v. 6, n. 5, p. 963-968, Sep 1953.
- 69- SMITH, D. I.; HUANG, H.; WANG, L. Common fragile sites and cancer: review. *Int. J. Oncol.* v. 12, n. 1, p. 187-196, Jan 1998.
- 70- SUDBO, J.; *et al.* Molecular based treatment of oral cancer: review. *Oral Oncol.* v. 39, n. 8, p. 749-758, Dec 2003.

71- SUDOL, M. & HUNTER, T. New wrinkles for an old domain: review. *Cell*. v. 103, n. 7, p.1001-1004, Dec 2000.

72- SUTHERLAND, G. R.; BAKER, E.; RICHARDS, R. I. Fragile sites still breaking. *TIG*. v. 14, n. 12, p. 501-506, Dec 1998.

73- SUZUKI, H.; *et al.* Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers. *Genes Chrom Cancer*. v. 17, n. 4, p.225-233, Dec 1996.

74- TAKES, R. P.; *et al.* Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res*. v. 18, n. 6B, p.4793-4800, Nov-Dec 1998.

75- TORUNER, G. A.; *et al.* Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Gen and Cytog*. v. 154, n.1, p. 27-35, Oct 2004.

76- TSUDA, H.; *et al.* Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. v. 87., n. 17, p.6791-6794, Sep 1990.

77- VENABLES, J. P. Aberrant and alternative splicing in cancer: review. *Cancer Res*. v. 64, n. 21, p.7647-7654, Nov 2004.

78- VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 76, n. 2, p. 615-619, Feb 1979.

79- WANG, F.; *et al.* Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromo Cancer*. v. 40, n. 2, p. 85-96, Jun 2004.

80- WOOD, N. K.; GOAZ, P. W. Differential diagnosis of oral and maxillofacial lesions. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1997. p.656.

81- Xi, S.; GRANDIS, J. R. Gene therapy for the treatment of oral squamous cell carcinoma: review. *J Dent Res.* v. 82, n. 1, p. 11-16, Jan 2003.

82- YENDAMURI, S.; *et al.* WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* v. 63, n.4, p. 878-881, Feb 2003.

83- YUNIS, JJ & SORENG, AL. Constitutive fragile sites and cancer. *Science.* v. 226, n. 4679, p. 1199-204, Dec 1984.

9- 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 WWOX em Carcinoma de Células Escamosas de Boca”. 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 WWOX, este projeto de pesquisa tem como objetivo, estabelecer uma relação entre alterações no gene WWOX e o desenvolvimento do câncer de boca (carcinoma de células escamosas). 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) 8876-8637/(31) 3212-8637.

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 EXTRAÇÃO DE DNA****- Solução hipotônica EDTA/NaCl 10 mM**

EDTA dissódico bihidratado	3,722 g
Cloreto de sódio	0,584 g
Água destilada autoclavada q.s.p.	1.000 ml

- Suspensão de sílica

Dióxido de sílica	60 g
Água destilada q.s.p.	500 ml

Em um cilindro graduado de 5cm de diâmetro com 27,5cm de coluna de água, sedimentar a suspensão por 24 horas. Descartar o sobrenadante (aproximadamente 440 ml), completar o volume para 500ml com água destilada e ressuspender. Sedimentar por 5 horas, descartar novamente o sobrenadante (aproximadamente 440ml) e adicionar ao restante 660µl de ácido clorídrico 32% (p/v) para ajustar o pH para 2. Aliquotar e autoclavar. A suspensão é estável por 6 meses, sendo armazenada à temperatura ambiente.

- Tampão de lise (L6)

Cloridrato de guanidina	97g
Tris cloridrato 0,1M pH 6.4	100 ml
EDTA 0,2M pH 8.0	22 ml
Triton X-100	2,45 ml

- Tampão de Lavagem (L2)

Cloridrato de guanidina	97 g
Tris cloridrato 0,1M pH 6.4	100 ml

Os tampões de lise e lavagem devem ser estocados ao abrigo da luz, por no máximo 15 dias.

- Tampão TE pH 8.0

Tris pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

ANEXO E**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 F**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 G**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 H

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, dTTP, dUTP)
- AmpliTaq DNA polymerase, FS, com estabilizador térmico
- MgCl₂
- Tris-HCl buffer, pH9.0

- Tampão de diluição:

- 400mM de Tris-HCl pH 9, 10 mM de MgCl₂

-ABI PRISM 310 Genetic Analyser Buffer with EDTA

- Template Supression Reagent (TSR)

ANEXO I

SOLUÇÕES UTILIZADAS NO WESTERN BLOT

- Gel de Concentração (4%)

Acrilamida 30%	0,6 ml
TRIS pH 6.8	1,125 ml
Água deionizada	1,23ml
SDS 10%	45 µl
APS	30 µl
TEMED	3,0 µl

- Gel de Separação (15%)

Acrilamida 30%	4 ml
TRIS pH 8.8	2 ml
SDS 10%	80µl
Água deionizada	2 ml

- Solução de Comassie Blue

Comassie Blue	0,06 g
Ácido perclórico	3 ml
Água deionizada q.s.p.	100 ml

- Tampão de Corrida (10x)

TRIS	30,28 g
Glicina	144 g
SDS	5 g
Água deionizada q.s.p.	1.000 ml
pH 8.3	

- Tampão de Transferência

TRIS	5,815 g
SDS	0,0375g
Glicina	2,93g
Metanol	200 ml
Água Deionizada q.s.p.	1.000ml
pH 9.0-9.5	

- PBS 10x

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	51,6 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11,75 g
NaCl	20 g
Água Deionizada q.s.p.	500 ml
pH 7.4	

- PBS 1x Tween 20 0,1%

PBS 10x	100 ml
Tween 20	1ml
Água Deionizada q.s.p.	1.000 ml

- Ponceau

Ponceau	0,5 g
Ácido acético	1 ml
Água Deionizada q.s.p.	100 ml

ANEXO J**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 L

SEQUÊNCIA DO cDNA E PROTEÍNA DO GENE WWOX

1 gcagtgcgca ggcgtgagcg gtcgggcccc gacgcgcgcg ggtctcgttt ggagcgggag
 61 tgagttcctg agcgagtgga cccggcagcg ggcgataggg gggccagggt cctccacagt
 121 cagccatggc agcgctgcbc tacgcggggc tggacgacac ggacagtgag gacgagctgc
 181 ctccgggctg ggaggagaga accaccaagg acggctgggt ttactacgcc aatcacaccg
 241 aggagaagac tcagtgggaa catccaaaaa ctggaaaaag aaaacgagtg gcaggagatt
 301 tgccatacgg atgggaacaa gaaactgatg agaacggaca agtggttttt gttgaccata
 361 taaataaaaag aaccacctac ttggacccaa gactggcgtt tactgtggat gataatccga
 421 ccaagccaac caccgggcaa agatacgcgc gcagcaccac tgccatggaa attctccagg
 481 gccgggattt cactggcaaa gtggttgtgg tcaactggagc taattcagga ataggggttcg
 541 aaaccgccaa gtcttttgcc ctccatgggt cacatgtgat cttggcctgc aggaacatgg
 601 caagggcgag tgaagcagtg tcacgcattt tagaagaatg gcataaagcc aaggtagaag
 661 caatgacctt ggacctcget ctgctccgta gcgtgcagca ttttgctgaa gcattcaagg
 721 ccaagaatgt gcctcttcat gtgcttgggt gcaacgcagc aacttttgct ctaccctgga
 781 gtctcaccaa agatggcctg gagaccacct ttcaagttaa tcatctgggg cacttctacc
 841 ttgtccagct cctccaggat gttttgtgcc gctcagctcc tgcccgtgtc attgtggtct
 901 cctcagagtc ccactgattt acagatatta acgactcctt gggaaaactg gacttcagtc
 961 gcctctctcc aacaaaaaac gactattggg cgatgctggc ttataacagg tccaagctct
 1021 gcaacatcct cttctccaac gagctgcacc gtcgcctctc cccacgcggg gtcacgtcga
 1081 acgcagtgca tcctggaaat atgatgtact ccaacattca tcgcagctgg tgggtgtaca
 1141 cactgctggt taccttggcg aggcctttca ccaagtccat gcaacagggg gctgccacca
 1201 ccgtgtactg tgctgctgtc ccagaactgg agggctctggg agggatgtac ttcaacaact
 1261 gctgccgctg catgccctca ccagaagctc agagcgaaga gacggcccgg accctgtggg
 1321 cgctcagcga gaggctgatc caagaacggc ttggcagcca gtccggctaa gtggagctca
 1381 gagcggatgg gcacacacac ccgccctgtg tgtgtcccct cacgcaagtg ccagggctgg
 1441 gccctttcca aatgtccctc caacacagat ccgcaagagt aaaggaataa agagcagtc
 1501 caacagagtg aaaaatctta agtaccatg ggaagcaggg aattcctggg gtaaagtac
 1561 acttttctgg ggctgggcta ggcataagtc tctttgcttt ctgggtgggg cctggttgaa
 1621 agtaaaaacc tgcttgggtg gtaggttccg tatctccctg gagaagcacc agcaattctc
 1681 tttcttttac tgttatagaa tagcctgagg tcccctcgtc ccactcagct accaccacgg
 1741 ccaccactgc agccgggggc tggccttctc ctacttaggg aagaaaaagc aagtgttcac
 1801 tgctccttgc tgcattgatc caggagataa ttgtttcatt catcctgacc aagactgagc
 1861 cagcttagca actgctgggg agacaaatct cagaaccttg tcccagccag tgaggatgac
 1921 agtgacacc agagggagta gaatacgcag aactaccagg tggcaaagta cttgtcatg
 1981 actcctttgc taatgctatg caaaaaattc tttagagatt ataacaaatt tttcaaatca
 2041 ttccttagat accttgaaag gcaggaaggg aagcgtatat acttaagaat acacaggata
 2101 ttttgggggg cagagaataa aacgttagtt aatcccttg tctgtcaatc acagtctcag
 2161 ttctcttctg ttcacattgt acttaaacct cctgctgtgc ctgcctcct atgcttaata
 2221 aaagaacatg cttgaatata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

MAALRYAGLDDTSEDELPPGWEERTTKDGVVYYANHTEEKTQW

EHPKTGKRKRKRVAGDLPYGWEQETDENGQVFFVDHINKRTTYLDPRLAFTVDDNPTKPT

TRQRYDGSTTAMEILQGRDF'TGKVVVVTGANSIGIFETAKSFALHGAHVILACRNMAR

ASEAVSRILEEWHKAKVETMTLIDLALLRSVQHFAEAFKAKNVPLHVLVCNAATFALPW

SLTKDGLETTFQVNHLGHFYLVQLLQDVLCSAPARVIVVSSESHRTDINDSLGKLD

FSRLSPTKNDYWAMLAYNRSKLCNILFSNELHRRLSPRGVTSNAVHPGNMYSNIHRS
 WWVYTLFLTLARPF'TKSMVSDCLVEGGHF