

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**BRUNA JALFIM MARASCHIN**

**COMPARAÇÃO DO PERFIL DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM  
AMOSTRAS DE LEUCOPLASIAS BUCAIS EM DIFERENTES POPULAÇÕES**

PORTO ALEGRE  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**BRUNA JALFIM MARASCHIN**

**COMPARAÇÃO DO PERFIL DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM  
AMOSTRAS DE LEUCOPLASIAS BUCAIS EM DIFERENTES POPULAÇÕES**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final para a obtenção do título de doutor em Odontologia.

*Área de Concentração: Patologia Bucal*

**Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados**

PORTO ALEGRE  
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Maraschin, Bruna Jalfim  
COMPARAÇÃO DO PERFIL DA PERDA DE  
HETEROZIGOSIDADE EM AMOSTRAS DE LEUCOPLASIAS BUCAIS  
EM DIFERENTES POPULAÇÕES / Bruna Jalfim Maraschin. --  
2016.  
41 f.

Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2016.

1. Lesão potencialmente maligna. 2. Perda de  
heterozigosidade. 3. Leucoplasia. 4. Câncer bucal. I.  
Rados, Pantelis Varvaki, orient. II. Título.

### **Agradeço,**

Ao pessoal lá de casa, pelo apoio em todos os momentos. À minha **mãe** pelo colo aconchegado e exemplo de mulher que és, ao meu **pai** pelas palavras sábias e pela perseverança que tem na vida, e ao meu **irmão** por me mostrar que não devemos desistir dos nossos sonhos. Agradeço o incentivo e os esforços desmedidos para que a Odontologia fosse possível na minha vida. Muito Obrigada!

Ao **Cris**, meu amor, pela inesgotável paciência, pelas conversas reconfortantes, pelo companheirismo, e por ter sido tão compreensivo nesta reta final. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À **Joca**, que sempre esteve ao meu lado, minha segunda família!

Ao professor **Pantelis** Varvaki Rados, orientador deste trabalho e meu orientador, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, pelo estímulo, pela dedicação e compreensão. Obrigada pelo voto de confiança.

À professora **Miriam** Rosin, orientadora no exterior deste trabalho, por acolher-me em seu laboratório e compartilhar comigo seu tempo tão precioso.

À professora **Lewei** Zhang, patologista oral do Vancouver General Hospital (BC), pelas agradáveis tardes que dividimos juntas ao microscópio e pela calorosa acolhida.

Ao técnico de laboratório **Ivan** Sun pela ajuda valorosa, sem ela esta tese não seria concluída.

Ao professor **Manoel** Sant'Ana Filho, pelo exemplo de professor e cientista. Obrigada pelo acolhimento no programa de Pós-Graduação e na Patologia.

Aos “**patológicos**”, aqueles que entendem as minhas angústias e felicidades. De colegas a amigos, muito obrigada pelo apoio constante.

Às **citológicas**: **Alessandra** Dutra da Silva, **Natália** Daroit e **Natália** Koerich, grupinho amado, que levarei para sempre em meu coração.

Às amigas **Bennes** e **Grey**, colegas e amigas para a vida toda. Obrigada por compreenderem a minha ausência durante este período.

Aos **amigos** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha irmã de alma, **Vivi**, pelos inúmeros conselhos, incansáveis conversas, e por ser parte fundamental nesta caminhada, e peça indispensável na minha vida. Ao amigo **Peu**, pelo apoio, carinho, e as conversas sobre a vida. Aos dois pela **Maria** linda.

À professora **Fernanda** Visioli, que esteve presente em todas as etapas desta jornada sempre disposta a ajudar. Compreendendo os questionamentos que surgiram tentando acalmar o coração ansioso. Muito obrigada pelo carinho e atenção que despendestes na construção desta tese.

Aos professores **Anna** Fossatti, **Laura** de Campos Hildebrand, **Lisiane** Bernardi, **Márcia** Gaiger de Oliveira, **Marcelo** Lammers e **Vinicius** Carrard, pelos ensinamentos compartilhados.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Odontologia da UFRGS, à Simon Fraser University, e a CAPES por possibilitarem a realização do meu curso de pós-graduação.

**OBJETIVO:** A perda de heterozigosidade (LOH) é capaz de avaliar as alterações genéticas de lesões potencialmente malignas. Este ensaio avalia as regiões cromossômicas polimórficas que estão próximas ou na região dos oncogenes e genes supressores de tumor conhecidos. Os objetivos desta tese foram três principais: 1) Avaliar a frequência de perda de heterozigosidade de leucoplasias bucais com diferentes graus de severidade histopatológico em regiões cromossômicas próximas aos genes supressores de tumores. 2) Comparar e correlacionar o perfil de perda de heterozigosidade entre indivíduos da British Columbia (Canadá) e Rio Grande do Sul (Brasil). 3) Avaliar os danos ao DNA que podem ocorrer durante o processamento e armazenamento das amostras de tecido parafinado. **MÉTODOS:** Amostras de leucoplasia bucal (com e sem displasias), fixadas em formalina tamponada 10% e parafinadas, obtidas nos laboratório de patologia bucal do Canadá e do Brasil foram selecionadas e microdissectadas. Procedeu-se a extração de DNA, amplificação por PCR das seguintes regiões microssatélites: 4q (D4S243, FABP2), 9p21 (IFNA, D9S171, D9S1748, D9S1751), 17p11.2 (CHRNA1) e 17p13.1 (tp53 e D17S786). Após o produto do PCR foi separado e visualizado em gel de poliacrilamida por autoradiografia. **RESULTADOS:** Observou-se uma forte correlação entre o perfil de perda de heterozigosidade entre indivíduos com leucoplasia bucal de ambos os países, independentemente da etnicidade. Além disso, pode-se notar que amostras de tecidos parafinados submetidos a mais de 24 horas de fixação em formalina tamponada 10% não serão, em sua maioria, boas amostras para análises de DNA. **CONCLUSÃO:** As lesões potencialmente malignas, provavelmente não são influenciadas em sua etiopatogênia pelas diferenças étnicas. O modelo de risco genético validado por Zhang e colaboradores (2012) parece ser aplicável em nossa comunidade, sendo necessário a sua validação, respeitando procedimentos técnicos padronizados. Ainda, vale ressaltar, que é imprescindível que a comunidade científica passe a adotar metodologias que preservem o material genético das peças dos bancos de tecidos parafinados, que são de inestimável valor para a pesquisa biomédica.

**PALAVRAS CHAVES:** Perda de Heterozigosidade, Lesões Potencialmente Malignas, Leucoplasias, Etnicidade, Formalina, Extração DNA.

**OBJECTIVE:** Loss of heterozygosity (LOH) can evaluate genetic alterations of pre-malignant lesions. This assay evaluates the chromosomal polymorphic regions that are present in tumor suppressor genes and oncogenes. The main objectives of this thesis were: 1) Evaluate the frequency of LOH of oral leukoplakias with different histopathological degrees at chromosomal regions of tumor suppressor genes. 2) Compare the profile of LOH between individuals from British Columbia (Canada) and Rio Grande do Sul (Brazil). 3) Evaluate the DNA damage that may occur with FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) tissues. **METHODS:** FFPE samples of oral leukoplakia (with and without dysplasia), obtained in Canadian and Brazilian oral pathology laboratories were selected and microdissected. DNA extraction and PCR amplification of the following microsatellite regions were conducted: 4q (D4S243, FABP2), 9p21 (IFNA, D9S171, D9S1748, D9S1751), 17p11.2 (CHRNA1) and 17p13.1 (tp53 and D17S786). PCR products were separated and visualized on polyacrylamide gel by autoradiography. **RESULTS:** A strong correlation between the LOH profile among individuals with oral leukoplakia from both countries was observed, regardless ethnicity. Furthermore, FFPE tissues subjected to more than 24 hours of fixation in 10% buffered formalin are not, generally, good samples for DNA analysis. **CONCLUSION:** Pre-malignant lesions etiopathogenesis may not be influenced by ethnicity. The genetic risk model validated by Zhang et al. (2012) seems to be applicable in our community, requiring its own validation, respecting standardized procedures. Still, it is important to emphasize that it is imperative that a scientific community adopts methodologies that preserve the genetic material FFPE tissues that are an invaluable resource for biomedical research.

**KEYWORDS:** Loss of Heterozygosity, Pre-malignant lesions, Leukoplakia, Ethnicity, Formalin, DNA Extraction.

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS .....	8
2. OBJETIVOS .....	18
OBJETIVO GERAL: .....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	18
3. ARTIGO CIENTÍFICO 1 .....	23
4. ARTIGO CIENTÍFICO 2 .....	31
5. CONCLUSÕES .....	39
ANEXOS.....	40



## **1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS**

---

O câncer bucal é um problema de saúde pública. Mais de 260.000 novos casos e 128.000 mortes em decorrência desta doença são estimados anualmente em todo o mundo (Ferley et al., 2015; Warnakulasuriya, 2009). O câncer de cabeça e pescoço é o sexto câncer mais comum no mundo (Argiris et al., 2008), responsável por cerca de 2% de todos os novos cânceres. No Brasil, o câncer de boca, entre os homens, ocupa a quinta colocação em incidência (INCA, 2016). Indivíduos moradores de regiões menos privilegiadas economicamente apresentam maior comportamento de risco para o desenvolvimento do câncer bucal, como o tabagismo e o uso de bebidas alcoólicas, e menor acesso aos serviços de saúde (Auluck et al., 2014). Assim, esta doença é mais prevalente entre os mais pobres (Scully, 2009).

Apesar dos avanços no refinamento cirúrgico e das terapias adjuvantes as taxas de sobrevida do carcinoma espinocelular bucal (CEC), nas últimas 5 décadas, não apresentaram uma melhora substancial, mantendo-se no patamar de 50% em 5 anos (Warnakulasuriya, 2009). Esta deficiência atribui-se essencialmente ao estágio tardio em que se dá o seu diagnóstico, quando as terapias apresentam apenas um impacto limitado (Seoane-Romero et al., 2012). A detecção do câncer bucal nas fases iniciais da carcinogênese pode ser o meio mais eficaz para reduzir as altas taxas de morbidade e mortalidade causadas pelo CEC.

Compreender os fatores etiológicos do câncer bucal é essencial para que estratégias de prevenção sejam desenvolvidas. É geralmente aceito que o CEC apresenta uma etiologia multifacetada e que envolve uma combinação de fatores intrínsecos (condições sistêmicas e hereditariedade) e extrínsecos (exposição ao tabaco, ao álcool e à radiação ultravioleta) (La vecchia et al., 1997).

O consumo de tabaco é o principal e mais importante fator causador, uma vez que atua como um agente iniciador provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular (Ogden & Wight, 1998; Ogden et al., 1999). O consumo de bebidas alcoólicas é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos envolvidos no dano ao tecido da cavidade bucal são parcialmente compreendidos. Determinadas concentrações de álcool causam o aumento da permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a penetração de outros carcinógenos. Além disso, o álcool é responsável pelo aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação. Outras alterações, como a redução da capacidade de reparo de DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (Carrard et al., 2008). O risco para desenvolvimento de câncer tem mostrado relação com a intensidade e a duração dos hábitos de fumar e beber. Castellsague e colaboradores (2004) afirmam, baseados em um estudo caso-controle, que o risco de desenvolvimento de câncer bucal em indivíduos com alto consumo de fumo e de bebidas alcoólicas foi 50 vezes maior do que o dos indivíduos que nunca tinham bebido ou fumado.

Acredita-se, ainda, que exista uma predisposição genética para o desenvolvimento do câncer de boca relacionada a etnicidade. Imigrantes judeus de origem Asquenazi vivendo em Israel têm maior risco de desenvolver câncer que os judeus Sefaradis ou de origem oriental (Gorsky et al., 1994). Entretanto, com o passar do tempo as próximas gerações de descendentes de imigrantes, muitas vezes, adotam o mesmo perfil de risco com relação à saúde e à doença da população do país em que residem. Isto indica, que embora os fatores genéticos desempenhem um papel na etiopatogênia, é provável que o risco de desenvolvimento das doenças é o

resultado da combinação de fatores ambientais e genéticos (Chaturvedi, 2001). O modelo de progressão de risco genético validado por Zhang e colaboradores em 2012 foi realizado na província de British Columbia no Canadá. Caracterizada por uma população étnica heterogênea, composta por mais de um terço de indivíduos imigrantes da Ásia Meridional, China e leste da Índia, que em sua maioria preservaram o hábito de mascar tabaco com ou sem noz de areca e betel quid (Statistic Canada, 2011). Estes componentes são considerados carcinógenos pela Agência Internacional para pesquisa em câncer (IARC, 2004).

A carcinogênese do CEC é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular. O desenvolvimento do carcinoma espinocelular, muitas vezes, pode ser precedido por uma lesão potencialmente maligna (Warnakulasuriya, 2007). Em 1978, a Organização Mundial de Saúde definiu lesão potencialmente maligna como um “tecido morfológicamente alterado em que o câncer bucal era mais provável de ocorrer do que em sua contraparte aparentemente normal” (Kramer et al, 1978).

Dentre as lesões potencialmente malignas de boca, a leucoplasia é a mais frequente, com prevalência estimada entre 0,42 e 5% (Banóczy & Rigó, 1991; Schepman et al., 1996; Delilbasi et al., 2003; Scheifele et al., 2003; Jahanbani, 2003). Segundo Carrard e colaboradores (2010) a prevalência de leucoplasias na população da região metropolitana de Porto Alegre é de 1,01%. A Organização Mundial da Saúde define a leucoplasia da cavidade bucal como uma placa ou mancha branca, não removível por raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra patologia (Barnes et al., 2005).

A grande maioria das leucoplasias não evolui para câncer. De acordo com a literatura, o risco de malignização destas lesões varia entre 0,13% e 17,5% (Einhorn

& Wersall, 1967; Silverman et al., 1976). Sabe-se que alguns fatores clínicos podem contribuir para o maior risco de malignização das leucoplasias, dentre eles pode-se citar: a faixa etária acima de 50 anos (Chiesa et al., 1993; Amagasa et al., 2011) o sexo feminino (Van Der Waal, 2009), localização na mucosa da língua ou do assoalho de boca (Pogrel, 1979; Van Der Waal, 2009), tamanho da lesão maior que 200 mm<sup>2</sup> (Holmstrup et al., 2006; Van Der Waal, 2009), e o tipo clínico não homogêneo (Schepman et al., 1998; Holmstrup et al., 2006; Van Der Waal, 2009).

Microscopicamente, as leucoplasias podem apresentar diferentes alterações morfológicas no tecido epitelial. Estes distúrbios são classificados de acordo com suas características morfológicas em hiperplasia, hiperkeratose (hiperortoceratose ou hiperparaceratose), acantose e displasia epitelial. No diagnóstico histopatológico de uma leucoplasia estes distúrbios de maturação epitelial podem estar presentes isoladamente ou de forma combinada (Warnakulasuriya et al., 2008).

A hiperplasia epitelial caracteriza-se pelo aumento do número de células do tecido com manutenção do seu padrão morfofuncional. A hiperkeratose indica aumento da espessura da camada de ceratina que pode ser do tipo paraceratina ou ortoceratina. A acantose é o espessamento da camada espinhosa do epitélio, resultando no encurtamento das papilas conjuntivas tendendo à planificação da interface epitélio-conjuntivo (Greer, 2006; Warnakulasuriya et al., 2008). A displasia epitelial se caracteriza pela presença de alterações arquiteturais e celulares que podem se estender por toda espessura do epitélio (Lumerman et al., 1995). A displasia epitelial pode ser classificada, de acordo com a extensão das alterações, como leve, moderada e severa. Considera-se displasia leve a situação em que os distúrbios arquiteturais limitam-se ao terço inferior do epitélio, acompanhados por alterações celulares discretas. Já na displasia moderada, as alterações arquiteturais e celulares

atingem os dois terços inferiores do epitélio. Na displasia severa os distúrbios arquiteturais ultrapassam os dois terços do epitélio mostrando atipia celular associada (Warnakulasuriya et al., 2008). No carcinoma *in situ*, as células displásicas ocupam toda a espessura do epitélio, embora a membrana basal ainda esteja intacta (Lumerman et al., 1995). A invasão de células displásicas através da membrana basal para o estroma subjacente e a disseminação destas células para outros locais através dos sistemas linfóide e circulatório são eventos associados ao desenvolvimento de CEC invasivo.

Atualmente, utiliza-se um modelo histológico de risco de progressão para avaliar o potencial de malignização das leucoplasias bucais. Logo, lesões suspeitas de serem potencialmente malignas serão frequentemente biopsiadas. Este modelo baseia-se na presença e no grau de displasia epitelial. Acredita-se que lesões com displasia severa e carcinomas *in situ* apresentam maior probabilidade de progressão para CEC, portanto, devem ser tratados de maneira mais incisiva. Entretanto, a grande maioria das lesões leucoplásicas são de baixo grau (displasia leve e moderada, e lesões sem displasia epitelial), e apenas um pequeno número destas apresentará um prognóstico desfavorável com evolução para câncer bucal (Silverman et al., 1984; Waldron & Shafer, 1975). Um tratamento agressivo não se justifica em termos de risco, efeitos adversos e custos. O exame histopatológico para as lesões de baixo grau não é um bom preditor para a avaliação do risco de malignização (Rosin et al., 2000). Assim, novos métodos que possam auxiliar na diferenciação da pequena parcela de lesões de baixo grau que irá malignizar das que não irão é extremamente importante.

O dogma central da carcinogênese demonstra que para o surgimento de uma neoplasia maligna é necessário um dano genético das células normais, seguida por

sucessivas mutações, levando em última instância à proliferação descontrolada de células progenitoras (Bishop, 1991; Vogelstein, 1992). Duas das classes de genes mais importantes envolvidas na carcinogênese são oncogenes e genes supressores de tumor (Bishop, 1991; Vogelstein, 1992). Estes dois grupos de genes agem de maneira antagônica para regular o crescimento e diferenciação celular. Portanto, lesões com risco de progressão maligna são, possivelmente, geneticamente diferentes de lesões morfológicamente semelhantes, que não possuem risco de transformação. A detecção de tais diferenças proporcionaria a identificação de marcadores úteis na previsão do comportamento das lesões potencialmente malignas. Como resultado, seria possível reconhecer quais os pacientes devem ser tratados de forma mais agressiva daqueles que não necessitam de tratamentos tão invasivos (Rosin et al., 2000).

Uma abordagem promissora que permite a avaliação de alterações genéticas de lesões potencialmente malignas é a análise da perda de heterozigosidade (LOH), que é definida como a perda alélica em um locus heterozigoto para um dado marcador (Thiagalingam et al., 2001; Li et al., 2004). O ensaio de LOH avalia as regiões cromossômicas polimórficas que estão próximas ou na região dos oncogenes e genes supressores de tumor conhecidos. O conceito de LOH é consistente com a “hipótese de Knudson”, que afirma que a inativação de um dos dois alelos de genes supressores de tumores por uma linha germinal ou por uma mutação somática é um passo crítico na carcinogênese, pois somente mais uma mutação é necessária antes da expressão do fenótipo ocorrer (Knudson, 1985).

Para a análise da LOH pode-se utilizar diferentes técnicas: análise de marcadores de microssatélites, análise de cariótipo, hibridação *in situ*, análise de polimorfismos (SNP - single-nucleotide polymorphism) e hibridação comparativa do

genoma (Velasco & Pallares et al., 2008).

A amplificação de microssatélites por meio da técnica da PCR, é um dos métodos mais utilizadas atualmente, por ser sensível e necessitar de pequena quantidade de DNA para a sua realização. Os microssatélites são definidos como segmentos de DNA que apresentam sequências de nucleotídeos constituídos por diferentes bases, as quais se repetem em tipo, ordem e número variado (Li, et al., 2002; Li, Korol et al., 2004). As repetições podem ser caracterizadas pela presença de 1 a 6 bases organizadas em repetições tipo “tandem” (sequenciais), com unidades adjacentes umas às outras (Boland & Goel, 2010). Os microssatélites configuram sequências nucleotídicas altamente polimórficas na população e suscetíveis a erros durante a replicação do DNA (Li et al., 2004; Migaldi et al., 2008). Essas sequências estão dispersas pelo genoma e estão localizados principalmente em regiões não codificadoras. Uma característica marcante na distribuição desses elementos estruturais do DNA é a apresentação de comprimento fixo para cada indivíduo, sugerindo uma variação individual característica, o que tem favorecido a sua utilização como confiável marcador de DNA (Li et al., 2002; Li et al., 2004; Boland & Goel 2010). A LOH em regiões de microssatélites próximos a genes supressores de tumor parece ser um importante evento relacionado à alteração da expressão gênica, o que pode predispor a célula ao crescimento neoplásico (van Houten et al., 2000; Berger et al., 2011).

Em 1996, Califano e colaboradores estabeleceram um modelo de progressão tumoral para o câncer de cabeça e pescoço a partir de 87 lesões potencialmente malignas com diferentes achados histopatológicos do trato aerodigestivo superior (Figura 1). Os resultados do trabalho indicaram que o evento mais precoce do processo de carcinogênese é a LOH de 9p e que histologicamente está associada

com a transição do epitélio normal para hiperplásico. A LOH em 3p e 17p está associada a displasia epitelial, enquanto que o carcinoma *in situ* e CEC foram caracterizadas por deleções adicionais em 4q, 6p, 8, 11q, 13q e 14q.

Figura 1. Modelo molecular de progressão para CEC de cabeça e pescoço.



(Adaptado de Califano et al., 1996)

Rosin et al. (2000) avaliaram a perda de heteroziguidade comparando lesões displásicas de baixo grau que progrediram ou não para o carcinoma espinocelular. Todas as leucoplasias que progrediram para carcinoma espinocelular apresentavam perda do 3p14 e 9p21, com risco relativo de malignização 24 vezes maior do que as lesões que não apresentavam tal alteração. No entanto, a perda destes alelos específicos, ocorria com significativa frequência também em lesões que não progrediram para o carcinoma espinocelular. Logo, outros marcadores foram necessários para a avaliação do potencial de malignização. Lesões cancerizáveis com perda do 3p e/ou 9p e alguma outra perda adicional nos cromossomos 4q, 8p, 11q, 13q e 17p, possuíam risco de transformação em carcinoma espinocelular 33 vezes maior quando comparadas com lesões que não apresentaram perdas em tais alelos. Em 2012 o grupo liderado por Rosin refinou o modelo de risco de progressão tumoral elaborado no ano 2000, e este contava com a avaliação da LOH dos cromossomos 9p, 4q, e 17p e mostrou que lesões com perda tripla apresentavam 52,1 vezes mais chances de transformação maligna quando comparado a lesões com retenção de 9p (Zhang et al., 2012).



Neste trabalho foram utilizados os marcadores de microssatélites nos braços cromossômicos 4q, 9p, e 17p, uma vez que estas estão entre as regiões mais frequentemente perdidas nos CEC bucais e devido ao seus papéis como indicadores de risco em cada etapa da progressão do câncer bucal (Zhang et al., 2012). A seguir cada uma destas regiões é discutida.

**Cromossomo 4.** A LOH no cromossomo 4 foi estudada em câncer de diversos órgãos incluindo fígado, bexiga, ovário e colo uterino. Neste cromossomo esta localizado o fator de crescimento epidérmico (EGF). A perda a 4q25 ocorre em 75% dos cânceres de cabeça e pescoço (Pershouse et al., 1997) e a perda em 4q24-26 ocorre em 47% (Bockmihl et al., 1996; Califano et al., 1996). A LOH nessa região ocorreu em mais de 80% dos tumores de cabeça e pescoço examinados por Pershouse e colaboradores, sugerindo fortemente a existência de um gene supressor de tumores nesta região que desempenhe um papel importante na desenvolvimento deste tipo de tumor. (Pershouse et al., 1997).

**Cromossomo 9.** A LOH em 9p é o defeito cromossômico mais estudado nos cânceres da cabeça e pescoço, sendo a perda de heterozigosidade mais comumente encontrada nas lesões malignas desta região. O loci mais comumente afetado é o 9p21-22, responsável pela codificação da proteína p16<sup>INK4A</sup>, que é uma proteína reguladora do ciclo celular e atua como supressor tumoral. Esta proteína liga-se às Cdk4 e Cdk6, prevenindo a formação do complexo ciclina D1-Cdk 4 e 6, impedindo a fosforilação completa da proteína Retinoblastoma (Rb), promovendo assim a formação complexo Rb-E2F. E2F é um fator de transcrição responsável pela progressão de G1 para S no ciclo celular. Uma vez ligado a Rb o E2F não é capaz de realizar sua função, ocorrendo, assim, a inibição da progressão do ciclo celular (Campisi & Fagagna, 2007).

**Cromossomo 17p.** A perda de heterozigosidade em 17p foi relatada em 50% dos cânceres de cabeça e pescoço, com envolvimento mais frequente de 17p13 e 17p11.1-12 (Adamson et al., 1994, Field et al., 1996, Nawroz et al., 1994). A região 17p13 contém o gene p53 (17p13.1), o qual está frequentemente mutado nos cânceres humanos (Lazarus et al., 1996).

A proteína supressora de tumor p53 regula o ciclo celular controlando os genes p16, p21, MDM2, GADD45, bax, c-Myc e bcl-2 (Li & Sturgis, 2006). Conseqüentemente, a p53 está envolvida na manutenção da estabilidade genômica, na regulação do ciclo celular, na reparação do DNA e na apoptose (Shields 2000, Hsieh et al., 2005). Aproximadamente 50% de todos os cânceres e 90% de cânceres de cabeça e pescoço apresentam mutações do gene p53, sendo a alteração mais comumente encontrada nos cânceres humanos. (Ramet et al., 1995; Husgafvel-Pursiainen et al., 2000; van Oijen & Slootweg, 2000; Zienolddiny et al., 2001; Hsieh et al., 2005).

Observa-se uma associação entre LOH e a progressão de lesões potencialmente malignas para o carcinoma espinocelular bucal, assim existe a necessidade de estudos que avaliem a este tipo de alterações em diferentes populações para a melhor predição do potencial de malignização individual e de adoção de medidas preventivas adequadas.

## 2. OBJETIVOS

---

### **OBJETIVO GERAL:**

- Avaliar a frequência e o perfil de perda de heterozigosidade de biopsias leucoplasias bucais com diferentes graus de severidade histopatológica em regiões cromossômicas próximas aos genes supressores de tumores em diferentes populações.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Avaliar a frequências da LOH das regiões 4q, 9p e 17p em amostras de leucoplasias bucais de uma população do sul do Brasil;
2. Comparar e correlacionar o perfil de LOH das regiões 4q, 9p e 17p entre as populações de British Columbia (Canadá) e Rio Grande do Sul (Brasil);
3. Comparar a capacidade de amplificação do DNA das amostras de tecido parafinado frente a diferentes formas de processamento e armazenamento deste material.

## REFERÊNCIAS

---

1. Amagasa, T. et al. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. *Int J Clin Oncol*, v.16, n.1,p.5-14. 2011.
2. Argiris, A. et al. Head and neck cancer. *Lancet*, v.17, n. 371, v. 9625, p.1695-709, 2008.
3. Auluck, A. et al. Population-based incidence trends of oropharyngeal and oral cavity cancers by sex among the poorest and underprivileged populations. *BMC Cancer*, 2014 May 5;14:316.
4. Banóczy, J. & Rigó, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system In Hungary. *Commun Dent Oral Epidemiol*, v.19, n.5, p. 265-267, 1991.
5. Barnes, L. et al. Epithelial precursor lesions, Organization classification of tumors. *Pathology and genetics of head and neck tumors*. IARC Press, 2005, p. 177-179. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/index.php>>.
6. Berger, A. et al. A continuum model for tumour suppression. *Nature*, v. 476, n. 7359, p.163-169, 2011.
7. Bishop, JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, v.64, p.235-48,1991.
8. Bockmuhl, U. et al. Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res*, v.56, p.5325-9,1996.
9. Brasil. Ministerio da Saude. Instituto Nacional de Cancer. Estimativa 2016: Incidencia de cancer do Brasil/ Instituto Nacional do Cancer. – Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> Acesso em 27/11/2016
10. Califano, J. et al. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Res*, v. 56, p. 2488-2492, 1996.
11. Campisi, J. & Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, n. 9, p. 729-740, 2007.
12. Carrard, V.C. et al. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. *Rev Bras Cancerologia*, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.
13. Carrard, VC. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. *Oral Dis*, v. 17, p. 171–179, 2010.
14. Castellsague, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*, v. 108, p. 741–749, 2004.
15. Chaturvedi, N. Ethnicity as an epidemiological determinant: crudely racist or crucially important? *Int J Epidemiol*, v. 30, n. 5, p. 925-927, 2001.
16. Chiesa, F. et al. Risk of preneoplastic and neoplastic events in operated oral leukoplakias. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v.29B, n.1, Jan, p.23-8. 1993.
17. Day, GL. & Blot, W.J. Second primary tumors in patients with oral cancer. *Cancer*, v. 70, p.14-19, 1992.
18. Delilbasi, C. et al. Prevalence of oral precancerous lesions in a selected turkish population. *Turk J Med Sci*, v. 33, p. 39-42, 2003.
19. Dionne, KR. et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions in the clinic and laboratory. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014
20. Einhorn, J. & Wersall, J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. *Cancer*, v.20, n.12, p. 2189-93, 1967.

21. Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, v.136, n. 5:E359-86, 2015.
22. Gorsky, M. et al. The prevalence of oral cancer in relation to the ethnic origin of Israeli Jews. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 78, p. 408–11, 1994.
23. Greer, RO. Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions. *Otolaryngol Clin North Am*, v.39, n.2, p.249-75, 2006.
24. Holmstrup, P. et al. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol*, v.42, n.5, p.461-74, 2006.
25. Hsieh, LL. et al. p53 polymorphisms associated with mutations in and loss of heterozygosity of the p53 gene in male oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Br J Cancer*, v.92, n. 1, p.30-35, 2005.
26. Husgafvel-Pursiainen, K. et al. p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res*, v.60, n. 11, p. 2906-2911, 2000.
27. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: volume 85 betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines [Internet]. World Health Organization. Lyon, France: IARC; 2004. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100E/mono100E-10.pdf>.
28. Jahanbani, J. Prevalence of oral leukoplakia and lichen planus in 1167 iranian textile workers. *Oral Dis*, v. 9, n. 6, p. 302–304, 2003
29. Knudson, AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*, v. 45, p.1437-43, 1985.
30. Kramer, IR. et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, n. 46, p. 518-39, 1978.
31. La Vecchia, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol*, v. 33, p. 302-12, 1997.
32. Li, G. & Sturgis E. M. The role of human papillomavirus in squamous carcinoma of the head and neck. *Curr Oncol Rep*, v.8, n. 2, p.130-139, 2006.
33. Li, Y. C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*, v.11, n. 12, p. 2453-2465, 2002.
34. Li, YC. et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol*, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.
35. Lumerman, H. et al. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.79, n.3, Mar, p.321-9, 1995.
36. Ogden, G.R. et al. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med*, v. 28, n. 5, p. 216-220, 1999.
37. Ogden, GR. & Wight, AJ. A etiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 36, n. 4, p. 247-251, 1998.
38. Pershouse, M.A. et al. Deletion mapping of chromosome 4 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, v.14, p. 369-73, 1997.
39. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral oncology*, v. 39, n. 8, p. 770-80, 2003.
40. Pogrel, MA. Sublingual keratosis and malignant transformation. *J Oral Pathol*, v.8, n.3, p.176-8, 1979.
41. Ramet, M. et al. "p53 protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, v. 16, n. 9, p. 2117-2124,

- 1995.
42. Reibel, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 14, p. 47-62, 2003.
  43. Rosin, MP. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*, v.6, n. 2, p. 357-62, 2000.
  44. Scheifele, C. et al. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol*, v. 39, n. 6, p. 619–625, 2003.
  45. Schepman, KP. et al. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol*, v.34, n.4, p.270-5,1998.
  46. Schepman, KP. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leukoplakia. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v. 32B, n. 6, p. 416-9, 1996.
  47. Scully C & Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology*, v. 45, n. 4-5, p. 301–8, 2009.
  48. Scully, C. & Bedi, R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol*, v.1, p.37-42, 2000.
  49. Seoane-Romero, JM. et al. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v.1, n.1, p. 35-40, 2012.
  50. Shields, PG. Epidemiology of tobacco carcinogenesis. *Curr Oncol Rep*, v. 2, n. 3, p. 257-262, 2000.
  51. Silverman, S. et al. Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Cancer*, v.38, n.4, p.1790-5, 1976.
  52. Silverman, S. et al. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer*, v. 53, p. 563-8, 1984.
  53. Statistics Canada. 2011 census program [Internet]. [Disponível em: <http://www12.statcan.gc.ca/census-recensement/index-eng.cfm>]
  54. Thiagalingam, S. et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, n. 5, p 2698-2702, 2001.
  55. Van Der Waal, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*, v.45, n. 4-5, p.317-23, 2009.
  56. Van Houten, VM. et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res*, v. 6, n.10, p. 3803-3816, 2000.
  57. Van Oijen, MG. & PJ. Slootweg Oral field cancerization: carcinogen- induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 9, n. 3, p. 249-256, 2000.
  58. Velasco, A. et al. Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, v. 27, n. 3, p. 305-317, 2008.
  59. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Carcinogens leave fingerprints. *Nature*, v. 355, p. 209-10, 1992.
  60. Waldron, CA. & Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*, v.36, p. 1386-92, 1975.
  61. Warnakulasuriya, S. et al. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the*

- American Academy of Oral Pathology, v. 36, n. 10, p 575-80, 2007.
62. Warnakulasuriya, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*, v.37, n.3, p.127-33, 2008.
  63. Warnakulasuriya, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, v. 45, n. 4-5, p. 309–16, 2009.
  64. Zienolddiny, S. et al. Loss of heterozygosity is related to p53 mutations and smoking in lung cancer. *Br J Cancer*, v. 84, n. 2, p. 226-231, 2001.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO 1

---

**Title: Optimizing fixation protocols to improve molecular analysis from FFPE tissues**

*\*Artigo aceito para publicação na revista Brazilian Dental Journal Qualis A2*

Short title: Fixation protocol to improve molecular analysis

Bruna Jalfim Maraschin\*, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Address: Rua Ramiro Barcelos, 2492/503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Telephone: +555133085011 Email: [brunajalfim@gmail.com](mailto:brunajalfim@gmail.com)

Viviane Palmeira da Silva, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Leigha Rock, Faculty of Dentistry, Department of Oral Biological & Medical Sciences, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Huichen Sun, Oral Cancer Prevention Program, British Columbia Cancer Agency Research Centre, Vancouver, BC, Canada.

Fernanda Visioli, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Pantelis Varvaki Rados, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Miriam P. Rosin, Oral Cancer Prevention Program, British Columbia Cancer Research Centre, Vancouver, BC, Canada.

\*Corresponding Author

**SUMMARY:** Most Departments of Pathology around the world have a considerable archive of formalin-fixed paraffin-embedded tissue suitable for molecular assessment. This article points out the potential DNA damage that can occur if basic steps are not followed during processing and storage of these samples. Furthermore, it hopes to establish parameters to optimize quality and quantity of DNA extracted from FFPE tissues.

**Keywords:** formaldehyde, formalin, tissue fixation, fixatives, DNA extraction

#### **INTRODUCTION**

Tissue specimens (biopsies and surgical specimens) routinely are fixed in formaldehyde and preserved in paraffin blocks (formalin-fixed paraffin-embedded – FFPE) (1). Formalin fixation paralyzes cell metabolism and preserves tissue structures



for an accurate histopathological diagnosis. Paraffin or plastic resin blocks are easy to handle, are inexpensive and allow long-term storage. Most Departments of Pathology around the world have a considerable FFPE archive. These samples are a large and invaluable genetic resource for retrospective and longitudinal molecular research, since they are reasonably stable for decades (2). However, recovery of optimal DNA (quality and quantity) from these samples remains a challenge. Therefore, the scientific community should be informed about the importance of taking prevention steps in order to ensure the maximum utilization of FFPE tissues.

## **METHODS**

Paraffin-embedded archival samples from the provincial Oral Biopsy Service of British Columbia, Canada (Group 1) and from the Oral Pathology Service of School of Dentistry from the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (Group 2) were included in this study. The first group consisted of oral leukoplakias with epithelial dysplasia lesions fixed in 10% neutral buffered formalin for a maximum of 24 hours. The group 2, comprised also oral leukoplakias with epithelial dysplasia samples fixed with the same fixative, but for more than 24 hours.

### **Tissue Microdissection and DNA Extraction**

After deparaffinization of 10  $\mu\text{m}$  sections they were stained with methylgreen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Epithelial areas were manually microdissected, the underlying stroma were dissected and used as a source of matched control DNA. The microdissected tissue was digested in proteinase K (0.5 mg/ml) at 48°C for 24 h. Qiagen columns (QIAamp DNA FFPE tissue kit; Qiagen, Hilden, Germany) have been used for extraction of DNA, according to the manufacturer's instruction.

Before amplification, T4 polynucleotide kinase (New England BioLabs, Beverly,

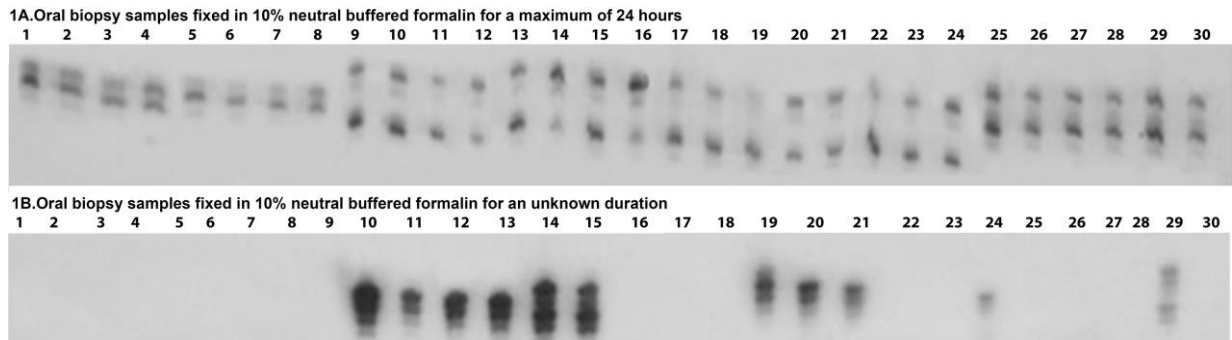
MA) was used to end-label 100 ng of one primer from each pair with [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (20  $\mu\text{Ci}$ ). The microsatellite markers used for DNA amplification were purchased from Research Genetics (Huntsville, AL) and mapped the 9p21 INFA region (F: TGCGCGTTAAGTTAATTGGTT R: GTAAGGTGGAAACCCCACT).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out in 5  $\mu\text{l}$  reaction volumes containing 5 ng of genomic DNA, 1 ng of labeled primer, 10 ng of each unlabeled primer, 1.5 mmol/L each of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), and PCR buffer (16.6 mmol/L ammonium sulfate, 67 mmol/L Tris (pH 8.8), 6.7 mmol/L magnesium chloride, 10 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol, 6.7 mmol/L EDTA, and 0.9% dimethylsulfoxide). PCR amplification was performed for 40 cycles consisting of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 60 seconds and extension at 70°C for 60 seconds with a final extension at 70°C for 5 minutes. The PCR products were separated on polyacrylamide gels and visualized by autoradiography (3).

The data assessment was performed by descriptive analysis.

## RESULTS

The relationship between the duration of time that the samples were fixated and the success of PCR amplification was observed in this study. In samples successfully amplified, intense signals bands were observed (Figure 1A); unsuccessful reactions were seen as blank regions (Figure 1B). In group 1 (24 hours maximum fixation time) 100% of samples were amplified, in contrast with only 36.7% from group 2 (more than 24 hours).



**1A** Group 1 shows oral biopsy samples fixed in 10% neutral buffered formalin for a maximum of 24 hours, then submitted to q-PCR for amplification of the 9p21 region. All 30 samples were successfully amplified (polyacrylamide gels visualized by autoradiography).

**1B** Group 2 shows oral biopsy samples fixed in 10% neutral buffered formalin for more than 24 hours, then submitted to q-PCR for amplification of the 9p21 region. From 30 samples, only 11 were successfully amplified (polyacrylamide gels visualized by autoradiography).

## DISCUSSION

Despite the many advantages that formalin fixation of tissue samples for diagnostic purposes has to offer, the use of FFPE material for molecular analysis remains problematic (13). Formaldehyde as a 10% neutral buffered formalin is the most used fixative because it preserves an extensive range of tissues and tissue components, as well is considerable inexpensive. However, the formalin treatment causes molecular crosslinks and adducts to DNA, which may reduce the signal obtained for later molecular assessment (4). Depending on the amplicon's length analyzed by PCR, these adducts can prevent or hamper DNA replication. Additionally, unbuffered fixatives will lead to DNA fragmentation, which may prevent forward analysis (5).

A large number of methods are available to extract DNA from FFPE tissue. Countless other modified protocols have been suggested to optimize the yield and quality of DNA when damage caused by formalin treatment was important. Usually they comprise extended heating of DNA (60°C, 70°C, 98°C) in buffers in order to remove adducts and crosslinks, allowing downstream analysis (6). Once the tissue specimen is fixed in formalin, DNA modifications and damages can occur; however,

some of the reactions occur rapidly, while others are gradual (7). Therefore, before extraction and purification of DNA, important aspects should be considered, as such: fixation procedure (pH, temperature and duration of fixation, as well as which fixative was chosen) is the main concern that challenges the successful completion of DNA extraction in FFPE tissue, it also depends on pre-fixation factors (e.g. tissue type and amount, degree of autolysis) and post-fixation factors (e.g. temperature and duration of storage) (1).

Duration of surgical procedure, a pre-fixation step, should be as short as possible to prevent anoxia and degradation of the sample. For the same reason it is critical to start fixation treatment right after surgical specimen excision, since significant biochemical alterations occur in tissues within 10 minutes after anoxia (4). Regarding the quality of fixation *per se*, penetration of formalin in tissues occurs at a rate of ~1 mm/hour. With increasing tissue thickness the rate of penetration decreases. Consequently, specimens should be thin enough (5 mm up to 1 cm) to avoid overfixation at the periphery and underfixation at the center (4). Overfixation leads to creation of extensive molecular crosslinks and adducts and underfixation will generate degradation of tissue: both situations may impair subsequent DNA assessments.

Extent of fixative treatment also should be controlled. Considering the rate of penetration of formalin, it is presumed the fixation procedure requires at least 1 hour per mm of tissue thickness (9). Increased fixation time in buffered formalin decreases the average size of DNA extracted from FFPE tissues. Three to six hours of fixation results in greater amounts of high-molecular weight DNA (10). Lastly, temperature of the fixative is important in preservation of DNA. Size of the extracted DNA is directly related to fixation temperature (11). Some studies propose that fixation at 4°C leads to the smallest amount of modification of DNA (12). Furthermore, selection of the fixative

solution is crucial for optimal results: neutral-buffered formalin solution should be used instead of unbuffered or acidic formalin solutions. Acidic pH or presence of formic acid leads to degradation of tissue nucleic acids and it may result in artificial mutations (8).

Concerning the post-fixation steps (temperature and duration of FPPE block storage), it still is controversial in the literature whether storage of paraffin blocks under controlled conditions of temperature can prevent DNA degradation (13). The lack of studies on this topic and the different measurement protocols of nucleic acid used, some of them not comparable, may be the cause of this unresolved problem (6).

Taking into account the increasing biomedical research using DNA and FPPE tissues, the literature suggests that for molecular studies it is important to control the steps below:

- 1) Minimize prefixation time lag
- 2) Use 10% neutral formalin
- 3) Use cold temperature fixation (at 4°C)
- 4) Control the duration of fixation (3 to 6 hours to a maximum of 24 hours depending on the sample thickness)
- 5) Absolutely avoid an acidic pH environment

RESUMO: A maioria dos Departamentos de Patologia em todo o mundo têm um considerável acervo de tecidos embebidos em parafina e fixados em formalina, que são passíveis para análises moleculares. Este artigo apresenta os danos ao DNA que podem ocorrer se passos básicos não forem seguidos durante o processamento e

armazenamento destas amostras. Além disso, estabelece parâmetros para otimizar a qualidade e quantidade do DNA extraído de tecidos FFPE.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was conducted with CNPq support, National Council for Scientific and Technological Development – Brazil (Process: 201997/2014-2).

## REFERENCES

1. Gnanapragasam VJ. Unlocking the molecular archive: the emerging use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for biomarker research in urological cancer. *BJU Int.* 2010;105(2):274-278.
2. Nechifor-Boilă AC, Loghin A, Vacariu V, Halațiu VB, Borda A. The storage period of the formalin-fixed paraffin-embedded tumor blocks does not influence the concentration and purity of the isolated DNA in a series of 83 renal and thyroid carcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2015;56(2 Suppl):759-763.
3. Zhang L, Michelsen C, Cheng X, Zeng T, Priddy R, Rosin MP. Molecular Analysis of Oral Lichen Planus A Premalignant Lesion? *Am J Pathol.* 1997;15(2):323-327.
4. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002;161(6):1961-1971.
5. Zimmermann J, Hajibabaei M, Blackburn DC, Hanken J, Cantin E, Posfai J, et al. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. *Front Zool* 2008;5:18.
6. Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *Plos One* 2007;2(6):e537.
7. Chaw YF, Crane LE, Lange P, Shapiro R. Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochemistry* 1980;19(24):5525-5531.
8. Díaz-Cano SJ and Brady SP. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn Mol Pathol* 1997;6(6):342-346.
9. Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM, Gutman P. Effects of Fixative and Fixation Time on the Extraction and Polymerase Chain Reaction Amplification of RNA from Paraffin-Embedded Tissue: Comparison of Two Housekeeping Gene mRNA Controls. *Diagn Mol Pathol* 1994;3(3):148-155.
10. Douglas MP and Rogers SO. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res* 1998; 401:77-88.
11. Cross SS and Start RD. Estimating mitotic activity in tumours. *Histopathology* 1996; 29(5):485–488.
12. Noguchi M, Furuya S, Takeuchi T, Hirohashi S. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int* 1997;47:685–691.
13. Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, et al. Nucleic

acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses.  
Virchows Arch 2012;460(2):131-140.

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO 2

---

**Title: Oral Leukoplakia's Loss of Heterozygosity Profile: a Brazilian & Canadian case-control study**

*\*Artigo formatado de acordo com as regras da revista Histopathology Qualis A1*

Bruna Jalfim Maraschin\*, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Address: Rua Ramiro Barcelos, 2492/503, CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Telephone: +555133085011  
Email: [brunajalfim@gmail.com](mailto:brunajalfim@gmail.com)

Alessandra Dutra da Silva School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Natalia Batista Daroit School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Nataila Koerich Laureano School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Viviane Palmeira da Silva, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Leigha Rock, Faculty of Dentistry, Department of Oral Biological & Medical Sciences, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Huichen Sun, Oral Cancer Prevention Program, British Columbia Cancer Agency Research Centre, Vancouver, BC, Canada.

Fernanda Visioli, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Pantelis Varvaki Rados, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Miriam P. Rosin, Oral Cancer Prevention Program, British Columbia Cancer Research Centre, Vancouver, BC, Canada.

\*Corresponding Author

**Abstract:** *Aims:* Correlate leukoplakia's loss of heterozygosity (LOH) profiles between Canadian and Brazilian individuals. *Methods and results:* Areas of epithelial dysplasia of 18 Brazilian oral leukoplakia samples were microdissected. LOH was assessed by amplification of microsatellite markers located on chromosomes 4, 9, and 17. Strong correlation between groups was observed regardless ethnicity ( $r=0.911$  and  $p=0.00$ ). *Conclusions:* our results suggest that oral cancer may not be influenced in its pathogenesis by genetic characteristics, which could be inherited by ethnicity.

**Keywords:** Loss of heterozygosity, premalignant lesions, ethnicity, oral cancer



## INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (SCC) is a global public health issue. More than 260,000 new cases and 128,000 deaths are estimated annually worldwide.<sup>1</sup> Over the past 5 decades the prognosis of this disease has not improve significantly. This deficiency is mainly associated to the late-stage of diagnostic, when therapies have had only a limited impact. Detecting oral cancer in the premalignant stage could be the most effective means of reducing the high rates of morbidity and mortality from this disease.<sup>2</sup>

For an early and successful therapeutical intervention it is important to be capable of differentiate high-risk premalignant lesions from those at low-risk undergoing malignant progression.<sup>3</sup> Severity of dysplasia provides an indication of premalignant lesion progression, mainly for higher grades of dysplasia. However, this criterion is a relatively poor predictor for lower grade dysplasia and should not be grounded alone to differentiate high-risk and low-risk premalignant lesions.<sup>4</sup>

More reliable tests for predict oral premalignant progression have been identified over the time. Loss of heterozygosity (LOH) has been shown to be a potent independent risk predictor.<sup>5,6,7,8,9</sup> In 2012, Zhang et al. developed and refined a model for oral premalignant.<sup>3</sup> That model showed a greater than 52.1-fold increase in progression risk for lesions with 9p, 4q, and 17p LOH compared with lesions with retention of 9p.

This genetic risk model was developed and validated in the very specific population from British Columbia (BC), which is a diverse province from Canada which characterized by a heterogeneous population, composed of more than a third of immigrants from South Asia, China, and East India, who mostly preserved the habit of

chewing tobacco with or without walnut and betel quid.<sup>10,11</sup> Genetic and environmental factors play a role together in the development of oral cancer.<sup>12</sup> In order to be able to use this risk progression model in the rest of the world it is important to compare the LOH profile between the population whose model was validated and other populations of the world.

We began this assessment with individuals from Rio Grande do Sul, Brazil, characterized by a great heterogeneity population. This region was colonized mainly by Azoreans, Germans and Italians, and who intermarried with the local people (Guaranis, Kaingang and Xokleng) and also Afrodescendant individuals.<sup>13</sup>

## **MATERIAL AND METHODS**

The University Ethics Committee board approved this study (protocol number 06949612.7.0000.5347)

Oral leukoplakia cases were selected from the archival of the Oral Pathology Service of School of Dentistry from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (n=18). Histological diagnoses of the specimens were reconfirmed by two authors (LZ & BM), both oral pathologists. The criteria used for the diagnosis of dysplasia were those established by WHO (2005).<sup>14</sup> Thirty-six cases from the provincial Oral Biopsy Service of British Columbia were selected according to age, sex, race, exposure to tobacco, lesion site, and histological index.

### **Tissue Microdissection and DNA Extraction**

After deparaffinization of 10  $\mu$ m sections they were stained with methylgreen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Epithelial areas were manually microdissected, the underlying stroma were dissected and used as a source of matched control DNA. The

microdissected tissue was digested in proteinase K (0.5 mg/ml) at 48°C for 24 h. Qiagen columns (QIAamp DNA FFPE tissue kit; Qiagen, Hilden, Germany) have been used for extraction of DNA, according to the manufacturer's instruction.

### Molecular Analysis

Before amplification, T4 polynucleotide kinase (New England BioLabs, Beverly, MA) was used to end-label 100 ng of one primer from each pair with [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (20  $\mu\text{Ci}$ ). The microsatellite markers used for DNA amplification were purchased from Research Genetics (Huntsville, AL) and mapped the following regions: 4q (D4S243, FABP2), 9p21 (IFNA, D9S171, D9S1748, D9S1751), 17p11.2 (CHRN1) and 17p13.1 (tp53 and D17S786).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out in 5  $\mu\text{l}$  reaction volumes containing 5 ng of genomic DNA, 1 ng of labeled primer, 10 ng of each unlabeled primer, 1.5 mmol/L each of dATP, dGTP, dCTP, and dTTP, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), and PCR buffer (16.6 mmol/L ammonium sulfate, 67 mmol/L Tris (pH 8.8), 6.7 mmol/L magnesium chloride, 10 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol, 6.7 mmol/L EDTA, and 0.9% dimethylsulfoxide). PCR amplification was performed. The PCR products were separated on polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.<sup>3</sup>

### Statistical Analysis

All patients were paired according to age, sex, ethnicity, exposure to tobacco, lesion site, and histological index. Spearman test was performed to correlate LOH pattern between Rio Grande do Sul group and British Columbia group.

In a second analysis, lesions according to histological index were paired and correlated between different ethnicities (whites Brazilians and Asians Canadians).

## **RESULTS**

Table 1 shows demographics, tobacco habits, histology index and LOH profile for all patients in the current study. For this analysis all variables were paired. Spearman test demonstrated a strong correlation between groups ( $r=0.911$  and  $p=0.00$ ).

Table 2 shows demographics, tobacco habits, histology index and LOH profile for all patients in the current study. This analysis attempted to demonstrate how ethnicity may interferes in LOH profile; however, pairing for other variables was not complete possible. Spearman test demonstrated a strong correlation between groups ( $r=0.910$  and  $p=0.00$ ).

Table 1. Patient characteristics and LOH profile

Characteristic	Rio Grande do Sul (BR)	British Columbia (CA)	r <sup>g</sup>	p
Age <sup>a</sup> , n (%)				
Young	9 (50)	9 (50)		
Old	9 (50)	9 (50)		
Sex, n (%)				
Female	5 (28)	5 (28)		
Male	13 (72)	13 (72)		
Ethnicity				
White	18	18		
Non-White	0	0		
Tobacco exposure, n (%)				
Ever smoked	14 (78)	14 (78)		
Never smoked	4 (22)	4 (22)		
Site, n (%)				
High-risk site <sup>b</sup>	5 (28)	5 (28)		
Low-risk site <sup>c</sup>	13 (72)	13 (72)		
Histology of index biopsy, n (%)				
Mild dysplasia	7 (39)	7 (39)		
Moderate dysplasia	8 (45)	8 (45)		
Severe dysplasia	3 (16)	3 (16)		
Presence of LOH, n (%)			0,911	0,00
Low-risk LOH <sup>d</sup>	8 (44)	9 (50)		
Intm-risk LOH <sup>e</sup>	9 (50)	8 (44)		
High-risk LOH <sup>f</sup>	1 (6)	1 (6)		

<sup>a</sup>Old was defined as age above median (53.5 years).

<sup>b</sup>Ventrolateral tongue/floor of mouth.

<sup>c</sup>Remaining sites.

<sup>d</sup>Low-risk: 9p retention.

<sup>e</sup>Intm-R (Intermediate-risk LOH): (9pLOH only or with either 17pLOH or 4qLOH but not both) compared with low-risk (9pR).

<sup>f</sup>High-risk LOH: (9pL and 4qL and 17pL).

<sup>g</sup>Spearman correlation coefficient.

Table 2. Patient characteristics and LOH profile according to ethnicity

Characteristic	Rio Grande do Sul (BR)	British Columbia (CA)	r <sup>g</sup>	p
Age <sup>a</sup> , n (%)				
Young	9 (50)	2 (11)		
Old	9 (50)	16 (89)		
Sex, n (%)				
Female	5 (28)	7 (39)		
Male	13 (72)	11 (61)		
Ethnicity				
White	18	0		
Asian	0	18		
Tobacco exposure, n (%)				
Ever smoked	14 (78)	15 (83)		
Never smoked	4 (22)	5 (17)		
Site, n (%)				
High-risk site <sup>b</sup>	5 (28)	9 (50)		
Low-risk site <sup>c</sup>	13 (72)	9 (50)		
Histology of index biopsy, n (%)				
Mild dysplasia	7 (39)	7 (39)		
Moderate dysplasia	8 (45)	8 (45)		
Severe dysplasia	3 (16)	3 (16)		
Presence of LOH, n (%)			0,910	0,00
Low-risk LOH <sup>d</sup>	8 (44)	7 (39)		
Intm-risk LOH <sup>e</sup>	9 (50)	10 (55)		
High-risk LOH <sup>f</sup>	1 (6)	1 (6)		

<sup>a</sup>Old was defined as age above median (53.5 years).

<sup>b</sup>Ventrolateral tongue/floor of mouth.

<sup>c</sup>Remaining sites.

<sup>d</sup>Low-risk: 9p retention.

<sup>e</sup>Intm-R (Intermediate-risk LOH): (9pLOH only or with either 17pLOH or 4qLOH but not both) compared with low-risk (9pR).

<sup>f</sup>High-risk LOH: (9pL and 4qL and 17pL).

<sup>g</sup>Spearman correlation coefficient.

## DISCUSSION

Advanced-stage diagnosis in oral cancer is one of the main reasons for the lower survival rate linkage to this disease. Detecting squamous cell carcinoma at an early moment could be the most effective method of improving the outrageous numbers related to oral cancer.<sup>2</sup> The oral cavity is a site that is easily accessible to clinical examination and our knowledge of premalignant lesions and risk factors are well defined. However, a major obstacle to squamous cell carcinoma prevention is the lack of molecular risk predictors for oral premalignant lesions with global validation. Zhang et al. developed and validated a genetic risk model in a specific community from Canada.<sup>3</sup> It remains unclear, still, whether this model could be functional for the rest of the international community.

We investigated the correlation between the LOH profile of Canadian and Brazilian individuals with oral leukoplakias, which demonstrated a strong association, regardless ethnicity. This points out an indication that the robust genetic risk model previous validated by Zhang et al in 2012 could be use as an adjunct instrument for oral cancer prevention worldwide.<sup>3</sup> These data need to be further strengthened by a population-based study with individuals with oral leukoplakia with a follow-up time that allows the validation of this model in our community. Furthermore, our results suggest that oral premalignant lesion may not be influenced in its pathogenesis by genetic characteristics, which could be inherited by ethnicity. Thus, studies conducted in specific communities could be applicable in the most diverse communities worldwide, regardless of their heterogeneity. Once these findings become more reliable, individuals of around the world will be benefited with the development of early diagnosis in the field of oral cancer.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was conducted with CNPq support, National Council for Scientific and Technological Development – Brazil (Process: 201997/2014-2).

## REFERENCES

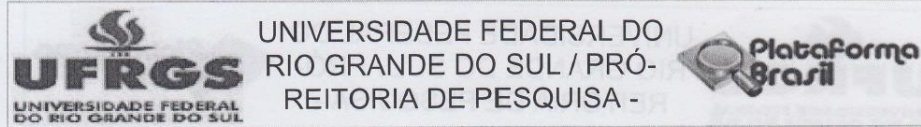
1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-86.
2. Seoane-Romero JM, Vázquez-Mahía I, Seoane J, Varela-Centelles P, Tomás I, López-Cedrún JL. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 1:17(1):e35-40.
3. Zhang L, Poh CF, Williams M et al. Loss of Heterozygosity (LOH) Profiles—Validated Risk Predictors for Progression to Oral Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5(9):1081-9.
4. Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC. Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions in the clinic and laboratory. *Int J Cancer* 2015; 1:136(3):503-15.
5. Califano J, van der Riet P, Westra W et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56:2488–92.
6. Mao L, Lee JS, Fan YH et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* 1996; 2:682–5.
7. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1702–10.
8. Lippman SM, Hong WK. Molecular markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:1323–6.
9. Rosin MP, Cheng X, Poh C et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6:357–62.
10. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: volume 85 betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines [Internet]. World Health Organization. Lyon, France: IARC; 2004. [Available in]: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100E/mono100E-10.pdf>.
11. Statistics Canada. 2011 census program [Internet]. [Available in]: <http://www12.statcan.gc.ca/census-recensement/index-eng.cfm>
12. Chaturvedi, N. Ethnicity as an epidemiological determinant: crudely racist or crucially important? *Int J Epidemiol* 2001; 30:925-927.
13. Gottlieb MG, Augustin CHS, Gomes I et al, Longevity and aging in Rio Grande do Sul state: a historical, ethnic and morbi-mortality profile of elderly people. *Rev Bras Geriatr Gerontol* 2011; 14(2):365-380.
14. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005.

## 5. CONCLUSÕES

---

1. As lesões potencialmente malignas provavelmente não são influenciadas em sua etiopatogênia pelas diferenças étnicas;
2. O modelo de risco genético validado por Zhang e colaboradores (2012) parece ser aplicável no Rio Grande do Sul, sendo necessário, ainda, a sua validação na mesma;
3. É imprescindível que a comunidade científica passe a adotar metodologias que preservem o material genético das peças dos bancos de tecidos parafinados, que são de inestimável valor para a pesquisa biomédica.





**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DO PADRÃO DE DESCAMAÇÃO, DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A CARCINÓGENOS, COM LEUCOPLASIAS E COM CÂNCER BUCAL

**Pesquisador:** Fernanda Visioli

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 06949612.7.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Patrocinador Principal:** Faculdade de Odontologia

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 261.037

**Data da Relatoria:** 04/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

**Objetivo da Pesquisa:**

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 261.037

**Recomendações:**

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto está sendo avaliado após recebimento das respostas à segunda carta de pendências. Todas as pendências foram atendidas e o projeto está em condições de ser aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 02 de Maio de 2013

Assinado por:  
José Artur Bogo Chies  
(Coordenador)

Bruno Cassel Neto  
Vice-Pró-Reitor de Pesquisas  
PROPESQ/UFRGS

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br