

GABRIELA PAULA GOMES

***DESEQUILÍBRIO ENTRE GENES ALELOS DA REGIÃO 9p21
EM TUMORES DE PELE***

CAMPINAS

2002

GABRIELA PAULA GOMES

***DESEQUILÍBRIO ENTRE GENES ALELOS DA REGIÃO 9p21
EM TUMORES DE PELE***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para Obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, Área de Concentração Ciências Básicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2002

NIDADE BC
CHAMADA T/UNICAMP
GSP5d
EX
OMBO BC/ 51394
ROC 16-837/02
DX
REÇO R\$ 11,00
ATA 0711102
CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00176317-0

11810 266073

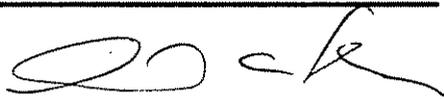
G585d Gomes, Gabriela Paula
Desequilíbrio entre genes alelos da região 9p21 em tumores de pele
/ Gabriela Paula Gomes. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Laura Sterian Ward
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Câncer. 2. Pele. 3. Genes. I. Laura Sterian Ward. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

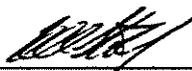
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa. Dra. Laura Sterian Ward*

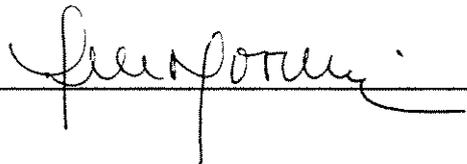


Membros:

1. Professor Doutor Hamilton Ometto Stolf



2. Professora Doutora Aparecida Machado de Moraes



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 28.02.2002

DEDICATÓRIA

*A minha mãe **Maria Lúcia**, que me incentivou no meu estudo, muita compreensão e carinho.*

*Ao meu irmão **Júnior**, na nossa amizade e no companheirismo em todos os momentos.*

*Ao meu namorado **Luciano**, que me ajudou em sua compreensão, dedicação nos momentos difíceis deste trabalho, com muito carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, a minha persistência, o desânimo de muitas vezes e a esperança nas etapas que hoje consegui superá-las.

Á **Profa. Dra. Laura Sterian Ward**, agradeço por toda a sua compreensão, dedicação e paciência nos momentos bons e ruins na minha tese.

Á **Profa. Dra. Aparecida Machado Moraes**, do ambulatório de Dermatologia da UNICAMP, que cedeu amostras de tecido á fresco.

Ao **Prof. Dr. Hamilton Ometto Stolf**, do ambulatório de Dermatologia da UNESP, que cedeu amostras de tecido á fresco.

Á **Profa. Dra. Malú**, do Hemocentro UNICAMP e aluna **Cíntia Moraes**, participaram do estudo do Herpes Vírus-6 em tumores de pele.

Aos **pacientes** que permitiram o consentimento para participar da pesquisa.

Á amiga de graduação **Priscila Perez**, sempre acompanhando as dificuldades, alegrias e saudades.

Ás amigas de **mestrado Elaine Morari e Hérika Armound**, pelos momentos bons e pelas dificuldades passadas e superadas.

Á estagiária do laboratório **Janaína Leite**, que ajudou a realizar a extração de DNA de algumas amostras de tecido a fresco e está continuando o trabalho que iniciei do estudo do Vírus Herpes-6 em tumores de pele. E pela diversão nos congressos.

Á estagiária do laboratório **Fabiana Granja**, que ajudou a repadronizar a temperatura de um primer. E pela diversão nos congressos.

Á funcionária do projeto **GENOMA Patrícia**, que chegou faz pouco tempo, com grande compreensão.

Á aluna de medicina **Cláudia**, que ajudou na coleta de amostras de tecido.

Á aluna de medicina **Marina**, que ajudou a realização de extração de DNA e a conseguir alguns “papers” na biblioteca.

Ao aluno de medicina **Nilton**, que ajudou na coleta de tecido em Botucatu, na extração de DNA dos tecidos e que agora está continuando o trabalho que iniciei do estudo do Herpes-6 em tumores de pele.

Á aluna de **mestrado da USP Cláudia**, trabalha no Hospital Sírio Libanez, ajudou na padronização do gel do aparelho D-CODE.

Ao aluno de medicina **Rafael**, que ajudou no final da tese.

Á funcionária **Angela**, do Hemocentro UNICAMP, que ajudou na padronização da técnica de coloração de Nitrato de Prata.

Á funcionária **Viviane** do laboratório de hepatite, realizamos um estudo de Vírus em tumores de Tiróide.

Á funcionária **Simone**, que emprestava reagente quando faltava.

Á funcionária **Helen**, que emprestava TAQ e sempre dedicada aos amigos.

Á amiga **Márcia Garandi** psicóloga, sempre ouvindo as minhas dificuldades e alegrias.

Á amiga **Fernanda Linares**, que saímos para nos divertir e esquecer de muitos estresses, durante este trabalho.

Agradeço as **pessoas**, as quais eu conheci durante o curso de pós-graduação e me incentivou a prosseguir o estudo.

Á funcionária da limpeza **Neli**, que me socorria na limpeza da bancada com nitrato de prata.

Aos revendedores **Gustavo e Lazinho**, que forneceram materiais de laboratório, sempre atenciosos.

À secretária **Renata** da pós, que sempre estava lembrando o prazo de relatórios e entregas de papéis burocráticos.

Aos amigos da informática **Daniel, Jeferson, Rafael e Alisson**, que ajudaram nas minhas dificuldades em informática.

A **todos** que ajudaram e eu possa ter esquecido de mencionar o nome.

OBRIGADO MESMO! VOCÊS SÃO OS MELHORES!

A realização deste trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Nunca É Tarde

*Quando no cais só fica ancorada
A indiferença e já não resta nada
Senão as ilusões a que te agarras.*

*Ouve a voz inefável das guitarras
Tingindo de paixão a madrugada
No fim duma viagem povoada
Do canto indecifrável das cigarras.*

*Saberás então que há sempre um começo
No profano rio em que a vida arde,
E é nessa maré viva que estremeço.*

*Mas, ainda que saibas que nunca é tarde,
Não tardes, que sem ti eu anoiteço,
E não peças jamais ao rio que aguarde.*

ANTÓNIO TOMÉ

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
INTRODUÇÃO	18
O CÂNCER.....	19
BASES GENÉTICAS DO CANCER.....	24
INSTABILIDADE GENÔMICA.....	25
O CÂNCER DE PELE.....	26
EMBASAMENTO DO ESTUDO DO GENE p16 EM CANCER DE PELE.....	28
OBJETIVOS	30
PACIENTES E MÉTODOS	32
PACIENTES.....	33
EXTRAÇÃO DE DNA.....	34
PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	34
SSCP – SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHYSM.....	37
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	50
SUMMARY	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO	62

LISTA DE ABREVIATURAS

CDKs	quinases dependentes de ciclinas
CDKIs	inibidores de quinases dependentes de ciclinas
GST	gene supressor tumoral
MSI	instabilidade microssatélite
HPV	Papiloma Vírus Humano
EBV	Vírus de Epstein Baar
UV	Radiação ultra-violeta
CBC	Carcinoma Baso Celular
CEC	Carcinoma Espinocelular
AK	Queratose Actínica
KA	Queratoacantoma
MTS1	multiple tumor supressor 1 (supressor tumoral múltiplo 1)
ORF	open reading frames (região de leitura aberta)
LOH	loss of heterozygosity (perda de heterozigozidade)
SDS	detergente SDS (dodecilsulfato de sódio)
EDTA	ethylenedinitrilo tetraacetic acid (ácido tetracético etileno dinitrilo)
TBE	Tris, Ácido Bórico e EDTA
TE	Tris e EDTA
PCR	reação em cadeia da polimerase
S	sense
AS	antisense

HCl	ácido clorídrico
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
dNTPs	deoxinucleotídeo
Taq	Termus aquaticus
SSCP	single strand conformation polymorphysm (polimorfismo da conformação da fita simples)

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1: Primers utilizados para amplificação.....	35
Tabela 2: Reagentes utilizados no gel de poliacrilamida 8% (SSCP).....	37

	<i>PÁG.</i>
Figura 1: Pontos de controle do ciclo celular.....	21
Figura 2: Fatores de estímulo e bloqueio do ciclo celular.....	23
Figura 3: Ciclo utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	36
Figura 4: Gel de gradiente eletroforético de agarose 0,8% para a visualização do DNA extraído das amostras de tecido tumoral e normal.....	40
Figura 5: Gel de gradiente eletroforético de agarose 2,0% para a visualização do DNA amplificado com marcadores microssatélites pela técnica de PCR.....	41
Figura 6: Gel de gradiente eletroforético de poliacrilamida 8% para visualização de perda de heterozigidade alélica (LOH) e instabilidade microssatélite em amostras de tecido tumoral e normal.....	43

	<i>PÁG.</i>
Anexo 1: Termo de Consentimento redigido conforme as determinações do nosso Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP.....	63



RESUMO

O câncer de pele não-melanocítico é o mais comum do mundo ocidental e sua incidência tem aumentado rapidamente, particularmente nos indivíduos claros, com pouca proteção da pigmentação. Análise de perda de heterozigidade alélica na região 9p21-p22, onde se encontram os genes supressores tumorais CDKN2a/p16INK4a, p19ARF e p15INK4b, tem sido freqüentemente descrita em muitos tumores malignos, incluindo o melanoma familiar. Perdas e ganhos em outras regiões do cromossoma nove também têm sido freqüentemente observados e podem indicar mecanismos adicionais no processo de tumorigênese da célula basal. Usando DNA extraído de tecido tumoral e tecido normal correspondente, examinamos 13 lesões pré-malignas e 58 tumores cutâneos malignos. Os casos benignos e pré-malignos incluíram 4 de queratose solar, 3 de queratoacantoma, 3 de nevo melanocíticos, 2 doenças de bowen e 1 neurofibroma. Tumores de pele malignos incluíram 14 carcinomas espinocelulares, 40 carcinomas basocelulares e 4 melanomas. Foram usados 4 pares de primers para amplificar repetições de microssatélites no cromossomo 9. Identificamos 8 casos (20%) de desequilíbrio alélico entre os carcinomas basocelulares, sendo 2 casos de perda de heterozigidade alélica e 6 casos de instabilidade microssatélite. Nenhum evento foi detectado nas lesões pré-malignas ou nos outros casos malignos. Essa dependência fenotípica sugere que exista uma grande distinção entre as duas mais importantes formas de cânceres de pele não-melanocítico na sua tendência de apresentar instabilidade microssatélite no cromossomo 9 no CBC.



INTRODUÇÃO

O CÂNCER.

O câncer ocorre por causa de um dano genético que altera a expressão ou as propriedades bioquímicas, isto é, a função de genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular (WARD, 1997). Este dano genético pode ser adquirido ou, mais raramente, herdado (CHITTENDEN *et al*, 1995). Na verdade, ele representa uma vantagem de crescimento para a célula afetada que passa a se multiplicar de forma mais rápida do que as células similares não danificadas, transmitindo às células filhas este “defeito vantajoso”, o qual propicia a formação de um clone de células tumorais (WARD, 2000).

Todos os dias, cerca de 350 bilhões de células se dividem no organismo adulto normal, em maior ou menor velocidade (KO *et al*, 1994). Células da epiderme, por exemplo, são trocadas praticamente todos os dias (CHITTENDEN *et al*, 1995). A cada divisão celular, nossas células estão sujeitas à ação agressora de vários fatores ambientais que podem levar a algum dano genético. Os agentes agressores ao genoma, nosso conjunto de genes, também chamados de agentes genotóxicos, podem ser grosseiramente divididos, para fins didáticos, em:

- eventos químicos, como os clássicos ésteres de forbol (MULLIN *et al*, 1997), o benzeno nas leucoses (KHOKHLOV *et al*, 1976).
- agentes físicos, como a radiação ultra-violeta, por exemplo, no câncer de pele (GALLAGHER *et al*, 1995-a) ou a radiação ionizante e o câncer de tireóide (NIKIFOROV & GNEPP, 1999).
- agentes biológicos como o papilomavirus no câncer de colo de útero (MACIAG, 1999) e o *Helicobacter pylori* para o cancer gástrico (GONG *et al.*, 1999) e o vírus da hepatite C para o câncer de fígado (KONO *et al*, 2000).

A grande maioria dos cânceres do ser humano ocorre por uma interação entre fatores ambientais como vírus, fumaça de cigarro, alimentos e bebidas, poluição urbana e industrial, radiação ultra-violeta e a bagagem genética de cada indivíduo (WARD, 1997).

Os recentes progressos em genética molecular têm permitido compreender melhor os mecanismos pelos quais o câncer se desenvolve e progride. Conhecemos ao menos parte do processo de transformação celular, bem como o papel de diferentes genes na sucessão de eventos que levam a célula a tornar-se independente dos mecanismos controladores do ciclo celular. Sabemos que a célula danificada precisa vencer uma série de barreiras fisiológicas a fim de escapar do controle normal de crescimento e progredir até a malignidade. Esses obstáculos seqüenciais conspiram para garantir que o processo tumorigênico seja um evento raramente concluído com sucesso (CHITTENDEN *et al*, 1995).

Na FIGURA 1, esquematizamos alguns dos principais pontos de controle do ciclo celular.

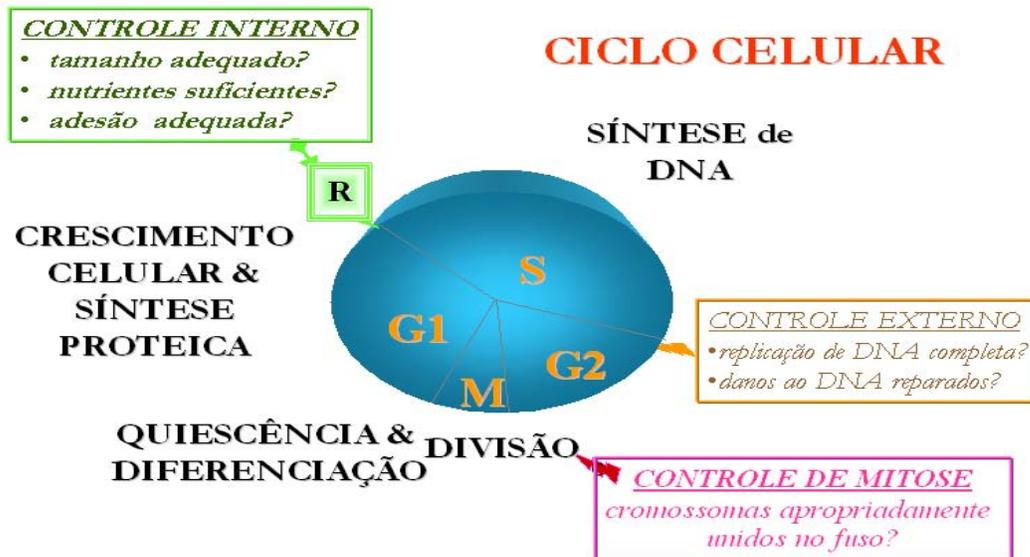


Figura 1: Pontos de controle do ciclo celular. O ciclo celular é composto de uma seqüência ordenada de fases. A célula diferenciada se encontra em G0, onde ela atingiu sua diferenciação terminal e está quiescente. Se a célula está destinada a proliferar, ela entra em G1, período em que aumenta de tamanho e prepara as proteínas de que necessita para síntese de DNA. Durante esta fase, a célula é sensível às condições ambientais. Se elas não forem favoráveis, a célula pára em G1. A partir do ponto R (ponto de restrição), a divisão celular ocorrerá independente de condições ambientais. Na fase S sintetiza-se o DNA que será replicado durante a fase G2. No início de G2 outro ponto de controle importante verificará a qualidade do DNA replicado. Finalmente, na fase mitótica (M), o DNA duplicado é equitativamente dividido entre as duas células filhas. A mitose será impedida se na checagem da mitose verificar-se anormalidades na divisão dos cromossomas.

Esta seqüência de fases com seus respectivos pontos de controle permite que a célula complete seu ciclo normal, replicando-se sem dar origem a células anormais. A divisão celular normal é positivamente regulada ou estimulada através de vias sinalizadoras. Estas vias respondem a fatores extra-celulares, os quais agem através de uma seqüência de proteínas - por exemplo: receptores, proteína G, proteíno-quinases e fatores de transcrição.

A progressão pelo ciclo celular a seguir é, em parte, controlada por uma série de proteínas chamadas "quinases dependentes de ciclinas" (CDKs), particularmente nas transições de fases, tanto de G1 para S quanto de G2 para M (PAULOVICH *et al*, 1997). Os níveis de ciclinas oscilam durante as fases do ciclo, determinando o momento apropriado de sua ligação com CDKs. Este último grupo de proteínas por sua vez, fosforila uma série de substratos chave que permitirão a progressão de uma fase à outra do ciclo celular.

Por outro lado, um grupo de inibidores do ciclo atua impedindo ou regulando negativamente as vias sinalizadoras de tal progressão no ciclo de divisão celular. À semelhança dos fatores estimuladores que levam à produção de ciclinas/CDKs, os reguladores negativos ativarão inibidores dos CDKs: os CDKIs. Podemos distinguir duas famílias de CDKIs, de acordo com seu mecanismo de ação, homologia e CDK alvo: 1) o grupo do p21, p27 e p57 e 2) o grupo do p16, p15, p18 e p19. Este circuito de indutores e de bloqueadores do ciclo celular está representado na FIGURA 2.

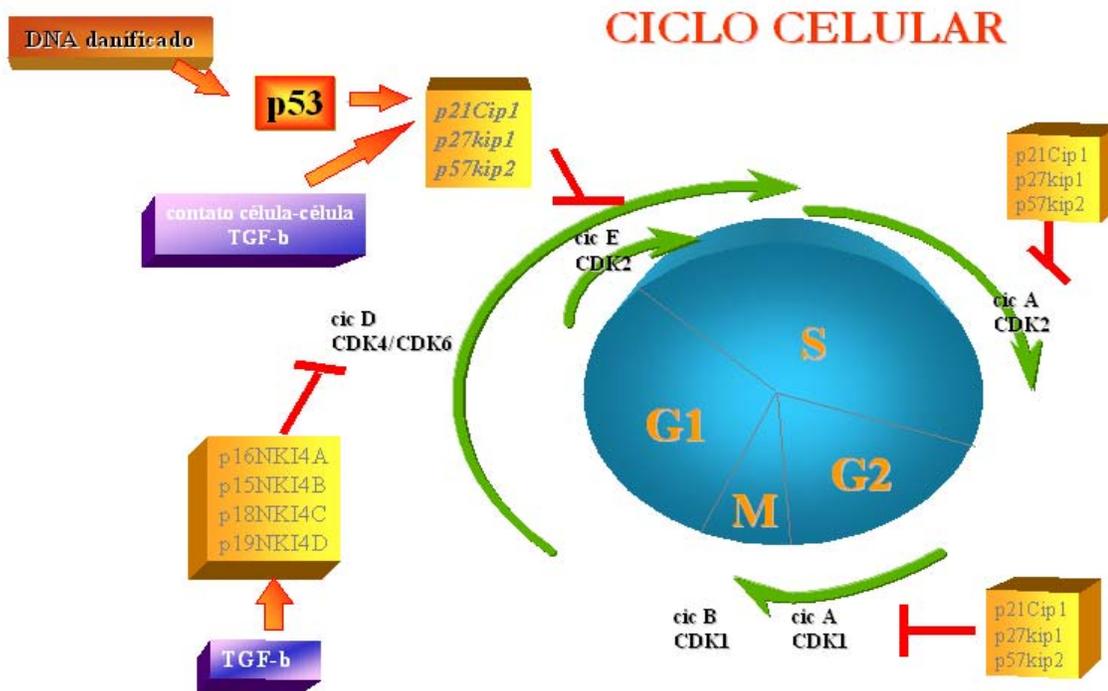


Figura 2: Fatores de estímulo e bloqueio do ciclo celular. As ciclinas são reguladoras das subunidades dos CDKs. Diferentes ciclinas se associam a diferentes CDKs, podendo associar-se a mais de um CDK nas diferentes fases do ciclo celular. A atividade ciclina/CDK é bloqueada por uma série de inibidores específicos. Eles podem ser agrupados na família p21/p27/p57 que bloqueia múltiplos complexos ciclina/CDKs e na família p16/p15/p18/p19 que inibe os complexos CDK4/CDK6. Alguns fatores podem parar o ciclo em G1, como os danos causados por irradiação que, ativando o p53, induzem a produção de p21 e o TGF- β que induz produção de p15 e p27.

BASES GENÉTICAS DO CÂNCER

Mutações tanto nos mecanismos estimuladores de divisão (oncogenes), como nos protetores ou bloqueadores (genes supressores tumorais), podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais. Cada uma das proteínas envolvidas no ciclo celular é codificada por um gene. Mutações nestes genes podem levar a desregulação do ciclo celular. Os genes que atuam de forma positiva, induzindo ou estimulando a progressão do ciclo são chamados proto-oncogenes pois ao sofrerem mutações se tornarão oncogenes, cuja ação permitirá ganho de função à célula mutante. Ao contrário, as proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular são codificadas pelos assim chamados genes supressores tumorais. Mutações neste grupo de genes se manifestarão pela sua falta de ação mas o efeito final será similar: perda dos mecanismos controladores do ciclo celular normal. Já se sabe há muito tempo que expressão imprópria de fatores de crescimento ou de seus receptores contribui para o desenvolvimento de neoplasias. Mais recentemente, demonstrou-se que hiper-expressão da ciclina D1 induz progressão de hiperplasia a carcinomas em camundongos (PAULOVICH *et al*, 1997). Amplificações da ciclina D1 também foram encontradas em tumores primários e linhagens celulares tumorais (WANG *et al*, 1994; MOTOKURA *et al*, 1991). No ser humano, medidas indiretas baseadas na prevalência de tumores em diferentes faixas etárias permitem inferir que são necessárias cerca de cinco a seis mutações sucessivas para que uma célula se torne maligna e agressiva (WEINBERG, 1989).

A natureza de muitas destas mutações seqüenciais e dos fatores que atuam na regulação do crescimento e diferenciação vem sendo recentemente descritos. De acordo com seu principal mecanismo de ação, os genes sujeitos a mutações no câncer humano podem ser classificados em 3 grupos: os oncogenes, os genes supressores tumorais (GST) e os controladores do tempo de vida celular (FAGIN, 1994). As mutações envolvendo oncogenes são mutações ativantes e podem ocorrer por uma série de mecanismos: translocação cromossômica, amplificação gênica, inserção retroviral, mutação pontual (WEINBERG, 1989; BISHOP, 1987; LUKAS *et al*; 1994). Essas proteínas geralmente atuam de forma dominante, isto é, a mutação de um alelo pode conferir à célula o fenótipo neoplásico. Os genes supressores tumorais, ao contrário, agem inibindo ou prevenindo a

expressão deste fenótipo (WEINBERG, 1989; BISHOP, 1987). Assim, os GST atuam de forma recessiva, isto é, ambos os alelos devem estar perdidos ou não-funcionantes. O exemplo clássico do GST é o gene defeituoso herdado no retinoblastoma familiar. O alelo normal é suficiente para proteger o organismo do desenvolvimento de um câncer (KNUDSON, 1993). Este só se manifestará por perda ou inativação do alelo normal, ocorrência eventual durante a proliferação celular (KNUDSON, 1993). Os GST são os mais freqüentemente mutados na maior parte das neoplasias humanas, com a notável exceção dos cânceres de linhagem hematológica.

Uma terceira classe de genes age interferindo no tempo de vida e na morte programada (apoptose) das células. O gene *bcl2* é um exemplo de gene que, ao permitir prolongamento da vida da célula, faz com que ela tenha mais oportunidade para adquirir novas mutações vantajosas (CHITTENDEN *et al*, 1995).

INSTABILIDADE GENÔMICA

Instabilidade do genoma tem sido considerado um importante fator na formação e progressão da neoplasia. Para se tornar neoplásica, a célula deve sofrer uma ou mais de uma alteração no seu genoma, usualmente na forma de mutações dos genes envolvidos no ciclo celular, o que leva a um relaxamento dos mecanismos de controle do crescimento e divisão. Células nas quais os mecanismos de controle foram alterados tem maior chance de desenvolver novas anormalidades genéticas (STARK, 1993). Uma vez que a célula se torna neoplásica, ela pode ou não evoluir para a formação de um clone de células tumorais. No entanto, novas mutações são necessárias para conferir a este clone tumoral propriedades invasivas e metastáticas. Quando o câncer se torna grande o suficiente para ser clinicamente diagnosticado, as células que o compõe são geralmente heterogêneas. O nível de heterogeneidade tende a predizer o prognóstico e a resposta à terapêutica. A variabilidade encontrada nas células tumorais é resultado da instabilidade genômica que usualmente ocorre no processo de tumorigênese. O aparecimento de variantes tumorais resistentes a drogas e à radiação são exemplos do que ocorre como resultado das alterações genéticas propiciadas pela instabilidade do genoma (FEARON & VOGELSTEIN, 1990; BATES *et al*, 1997).

A instabilidade genômica foi caracterizada na maioria dos tumores humanos como instabilidade cromossômica (aneuploidia, deleções, ampliações) (LENGAUER *et al*, 1998). Um grupo de tumores mostrou pequenas mutações, com instabilidade de nucleotídeos (CAHILL *et al*, 1998), instabilidade minissatélite (DIAKOUMIS *et al*, 1998) ou instabilidade microssatélite (MSI). A instabilidade microssatélite se manifesta em pequenas deleções em sequências repetidas de nucleotídeos em “tandem” no DNA do tumor comparado com o DNA da amostra normal (ARZIMANOGLU *et al*, 1998). A instabilidade microssatélite foi primeiramente descoberta na síndrome hereditária de polipose/câncer colo-retal, que representa uma das mais comuns síndromes associadas com predisposição a câncer no homem (REDSTON, 2001). Tem sido associada com 15% de cânceres esporádicos colo-retais e também a cânceres em várias outras localidades como estômago e bexiga (REDSTON, 2001; ARZIMANOGLU *et al*, 1998; ATKIN, 2001).

Numerosas observações mostram que alterações de microssatélites no DNA, apesar de aleatórias, tendem a ser associadas com mutações de genes que controlam o crescimento celular e a apoptose, e estas modificações nos loci de microssatélite parecem ter um importante papel no desenvolvimento de cânceres humanos (ATKIN, 2001).

O CÂNCER DE PELE

O câncer de pele é o mais comum do mundo ocidental e sua incidência tem aumentado rapidamente (SARIDAKI *et al*, 2000), particularmente nos indivíduos claros, com pouca proteção da pigmentação. Lesões de pele associadas à exposição aos carcinógenos físicos, químicos e/ou biológicos e influenciadas por fatores como o sexo, o tipo racial e a idade, infecção por Papiloma Vírus Humano (HPV) e pelo vírus de Epstein Baar (EBV) também vem sendo consistentemente relacionadas com a incidência de tumores de pele. Produzem lesões interessantes para o estudo das mutações envolvidas em seu aparecimento e evolução (ASZTERBAUM *et al*, 1999; RUBBEN *et al*, 2000), podendo ser detectadas e biopsiadas com facilidade.

A pele oferece ampla variedade de tipos tumorais malignos e a maioria deles está diretamente relacionada à exposição da radiação ultravioleta (UV) solar (GALLAGHER *et al*, 1995-a; SCHWARTZ *et al*, 1994). Evidências epidemiológicas sugerem que a exposição intensa em caucasóides deve resultar mais frequentemente em melanomas e carcinomas basocelulares (CBC), enquanto que exposição crônica cumulativa ao UV seria um fator de risco maior para o carcinoma de células escamosas (CEC). Os CBC representam 75% e os CEC representam 20% dos cânceres de pele humano (REES, 1994). Embora ambos se originem do queratinócito epidérmico, apresentam comportamentos clínicos e biológicos muito diferentes. Os CEC podem manifestar diferentes morfologias, desde lesões papulosas, nodulares, ulceradas a lesões vegetantes ou verrucosas. Tem crescimento rápido e causam metástases à distância. O CEC apresenta-se como um tumor esporádico e, ao contrário do CBC, raramente está associado a síndromes familiares. As queratoses actínicas (AK) são lesões eritematosas, queratóticas, que surgem nas áreas da pele expostas ao sol. Frequentemente são múltiplas e caracterizam-se histologicamente por displasia do queratinócito (GALLAGHER *et al*, 1995-b; SCHWARTZ *et al*, 1994). A AK é considerada uma etapa inicial do CEC baseado em evidências epidemiológicas, histopatológicas e moleculares (AHMADIAN *et al.*, 1998). A Doença de Bowen é um CEC *in situ*, distinto clinicamente. Apresenta-se como lesão eritematosa, descamativa e queratótica, de crescimento centrífugo. Pode se transformar em lesão invasiva em 8% dos casos não tratados (REES, 1994). O queratoacantoma (KA) também é uma neoplasia cutânea epitelial, provavelmente originada nos queratinócitos dos folículos pilosos. É uma lesão pápulo-tumoral, com centro queratótico, que surge nas regiões expostas ao sol, de rápido crescimento, podendo sofrer involução espontânea (LEVINE, 1997).

EMBASAMENTO DO ESTUDO DO GENE p16 EM CÂNCER DE PELE

O cromossomo 9 sofre freqüentemente deleções no CEC esporádico, e possivelmente, mais de um gene supressor tumoral deve estar envolvido em sua patogênese (STONES *et al.*, 1995; QUELLE *et al.*, 1997). No braço longo do cromossomo 9, em 9p21-22, está localizado o gene p16, no locus MTS1 (multiple tumor supressor 1) que codifica 2 proteínas: p16 e p19, estruturalmente não relacionadas mas ambas envolvidas na inibição do ciclo celular.

O gene p16 é constituído de 3 exons (exon 1- constituído por 126 pares de bases; o exon 2- constituído por 307 pares de bases e o exon 3- constituído por 11 pares de bases) e codifica uma proteína de 16 Kda com atividade de inibidor da quinase dependente de ciclina 4/6 (CDK4/6). Essa enzima CDK4/6, quando associada à ciclina D, é responsável pela fosforilação da proteína Rb (pRb). Essa fosforilação faz com que pRb libere E2F, um fator de transcrição que atua permitindo a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. A proteína p16 se associa a CDK4/6, inibindo sua ação catalítica e impedindo, portanto, a formação do complexo ciclina D-CDK4/6 e, conseqüentemente, a fosforilação de pRb. Assim, não há liberação de E2F e o ciclo celular pára. O gene p16 atua, portanto, como um regulador negativo do ciclo, bloqueando a progressão do ponto R da fase G1. BARTSCH *et al.*, 1995, HEALY *et al.*, 1996 e STONE *et al.*, 1995 também demonstraram que o gene p16 possui duas ORF (open reading frames), exon 1 α e exon 1 β , que codificam 2 transcritos distintos. O exon 1 α codifica para a proteína p16, enquanto o exon 1 β codifica a proteína p19ARF, também denominada p14 em seres humanos (STONES *et al.*, 1998). A proteína p19ARF se liga a MDM2 no ponto R da fase G1 do ciclo celular atuando, dessa forma, na degradação da proteína p53 via ubiquitina (CHIN *et al.*, 1998). Assim, estabelece-se uma rede de informações entre p53 e Rb, sem dúvida dois dos genes mais conhecidos no controle do ciclo celular. A inativação de p19 em tumores humanos é um evento mais raro do que a inativação de p16, restringindo-se ao exon 1 β . Alteração do exon 2 está associada apenas à inativação do gene (QUELLE *et al.*, 1997). Em leucemias linfóides agudas de células T, inativação do gene p19 parece ser o principal evento (GARDIE *et al.*, 1998).

Inativação de p16 é observada em 39% dos carcinomas renais (DIAKOUMIS *et al.*, 1998). Mutações puntiformes de p16 foram observadas em 33% dos melanomas esporádicos (BARTSCH *et al.*, 1995) mas em apenas 1 dos 26 casos analisados por HEALY *et al.*, 1996. Nos carcinomas de células basais, que consistem na maior parte das neoplasias humanas, 69% (46 de 67 casos) mostraram LOH e somente 6 de 67 (9%) exibiram instabilidade microssatélite (SARIDAKI *et al.*, 2000).

A expressão de p16 foi relatada como diminuída no melanoma esporádico, o que se associa com LOH em seu locus cromossômico (9p21-22) com frequência (NEUMANN *et al.*, 1995; ROSENBERG *et al.*, 2000; QUELLE *et al.*, 1997; PIEPKORN, 2000; VELTMAN *et al.*, 2001; OWONIKOKO *et al.*, 2001; CHIN *et al.*, 1998; FUJIMOTO *et al.*, 1999; PICCINI *et al.*, 1997).

Ainda é motivo de controvérsias o significado de alterações genéticas nas lesões pré-cancerosas e sua correlação com o câncer cutâneo (TSAO, 2000). São relativamente poucos os trabalhos envolvendo estudos de LOH em CEC. Apenas um autor estudou 9q22.3, e sugere que a perda da região seja um evento tardio no CEC (CHIN *et al.*, 1998). Embora haja extensas evidências de que p16 é importante no melanoma maligno (pesquisa Medline 1997-1999, palavras chaves: p16 x melanoma= 84 referências) e em outros tipos de tumores escamosos (pesquisa Medline, ano 1997-1999, palavras chaves: p16 x squamous cancer = 81 referências), existem apenas 4 referências a p16 em carcinoma espinocelular de pele. Em três dos trabalhos, sugere-se que o p16 seja importante na tumorigênese de camundongos, talvez cooperando com *ras* (QUELLE *et al.*, 1997).



OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Implementar em nosso laboratório a técnica de estudo de perda de heterozigozidade alélica e a instabilidade genômica através dos marcadores microssatélites.
2. Estudar a prevalência de perda de heterozigozidade alélica e a instabilidade microssatélite na região 9p21-22 em tumores cutâneos malignos e lesões pré-malignas.
3. Procurar estabelecer o papel da instabilidade genômica nesta região no processo de desenvolvimento e progressão destes tumores.



***PACIENTES E
MÉTODOS***

PACIENTES

Os tumores e tecidos normais foram coletados no ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP pela Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes. Também contamos com a ajuda do Prof. Dr. Hamilton Ometto Stolf do Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, que nos cedeu as amostras obtidas durante um programa de prevenção de câncer de pele.

Os pacientes submetidos à coleta de amostra das lesões foram devidamente informados e assinaram o Termo de Consentimento redigido conforme as determinações do nosso Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP (anexo 1). Coletamos amostras de 71 pacientes, os fragmentos de lesões benignas, pré-malignas, carcinoma in situ e tumores malignos estão distribuídas a seguir. Incluímos 4 amostras de queratose solar (2 casos masculinos e 2 casos femininos, 51+/-11 anos de idade), 3 de queratoacantoma (2 casos femininos e 1 caso masculino, 51+/-11 anos de idade), 3 de nevo melanocíticos (3 casos masculinos, 52+/-12 anos de idade). 2 de doença de Bowen (1 caso masculino e 1 caso feminino, 52+/-12 anos de idade) e 1 de neurofibroma (1 caso masculino, 51+/-12 anos de idade). Incluímos 14 amostras de carcinoma espinocelular (8 casos masculinos e 6 casos femininos, 52+/-12 anos de idade), 40 de carcinoma basal (20 casos masculinos e 20 casos femininos, 54+/-16 anos de idade) e 4 de melanoma (2 casos masculinos e 2 casos femininos, 51+/-14 anos de idade). Todos os pacientes foram examinados e interrogados cuidadosamente com particular atenção para imunossupressão como os transplantes de órgãos, outras malignidades e infecção por HIV. Um fragmento central do tumor foi coletado no ato cirúrgico, imediatamente imerso em nitrogênio líquido e estocado em *freezer* - 80°C até a extração de DNA. O diagnóstico foi comprovado na revisão do prontuário do paciente com o laudo anátomo patológico.

Em todos os pacientes foram coletadas também, amostras de pele, aparentemente normais, como controle, para estudo do DNA. A área escolhida para a retirada estava pelo menos, 5cm da lesão tumoral clinicamente visível.

EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO

O DNA foi isolado a partir da porção central de tecido tumoral e tecido normal usando o método fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al*, 1989). Foram macerados 50 mg de tecido ainda congelado e digeridos com proteinase K (20 mg/ml), juntamente com tampão de proteinase K (Tris 100mM - SDS 5% - EDTA 2mM) e incubados a 55°C durante 16 horas.

Após a digestão completa da amostra a purificação foi feita com fenol-clorofórmio (1:1), seguido de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). A precipitação foi feita com acetato de amônio 10M e etanol 100%. O *pellet* foi lavado com álcool 70%, seco à vácuo e ressuspendido em tampão TE.

QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA foi determinada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 260nm DNA/ 280nm proteína . O DNA foi visualizado em um gel de agarose a 0,8% em TBE 1x (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M). O DNA foi corado com azul de bromofenol e após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O gene P16 foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se um termociclador Perkin Elmer 9600, tanto em tecidos tumorais como em tecidos normais para controle. Foram utilizados quatro pares de primers (marcadores de microssatélites), obtidos da Research Genetics (Huntsville AL) (Tabela 1).

Tabela 1: Primers utilizados para amplificação de 9p21-22 e de outras regiões no cromossoma 9

PRIMER	SEQUENCIA 5'-3'	EXON	PB	ANNEALING
D9S120	S GCAGCCCAACACAAATTCATA AS AGAACTGTCTTGGGCCACC	9q31-q34	141-155	58°C
D9S156	S ATCACTTTTAACTGAGGCGG AS AGATGGTGGTGAATAGAGGG	9p23-9p22	133-155	55°C
D9S200	S GCATTTACAGGAAATAATCTAAGG AS CCTCTCTGCATGCCCCAG	9p21-9p12	107-127	55°C
D9S1748	S CACCTCAGAAGTCAGTGAGT AS GTGCTTGAAATACACCTTTCC	9p21-9p21	130-150	58°C

S – sense

AS - antisense

O PCR foi realizado nas seguintes condições: 20 ng DNA, 50nM de cada primer, 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl₂, 100 μM de dNTPs e 0.5 Taq DNA polimerase. As ampliações foram realizadas conforme mostra a FIGURA 3.

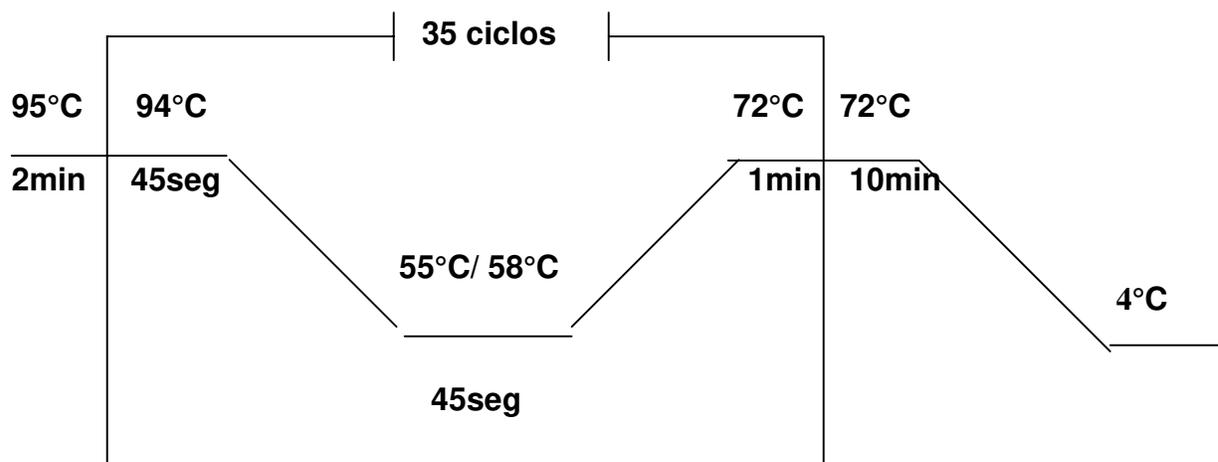


Figura 3: Ciclo utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

SSCP – SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHYSM

A Técnica de SSCP (análise de polimorfismo da conformação de fita simples) foi utilizada para a pesquisa de perda de heterozigozidade alélica (LOH) ou de desequilíbrio alélico. Para tanto, fizemos uso de um gel de poliacrilamida, cujos reagentes estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 : Reagentes utilizados no gel de poliacrilamida 8%

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
Uréia	3M
Acrilamida	40%
TBE	10X
H ₂ O q.s.p. destilada	-
Persulfato de amônia	10%
Temed	-
Glicerol	10%

A técnica se resume nos seguintes passos: após amplificação, o produto da PCR foi diluído na proporção de 1:1 em tampão de corrida eletroforética (formamida deionizada 98% pH 7,0; EDTA 10mM pH 8,3; xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%), desnaturado por 10 minutos no termociclador e carregado no gel de poliacrilamida, juntamente com o tampão de corrida eletroforética TBE 1X, submetido a eletroforese por 16 horas a 65V. A coloração foi feita através da técnica do nitrato de prata. O gel foi exposto a luz ultra-violeta e analisado com auxílio de um sistema fotográfico Kodak, resultando numa imagem dos fragmentos alélicos na região designada. Um programa de computador foi utilizado para determinar o fator de desequilíbrio alélico, através da intensidade das bandas. (Programa Kodak Scientific Image Systems; 1994)

Para casos informativos, isto é, heterozigóticos, uma redução de mais 65% da intensidade do sinal de um dos dois alelos do tumor, em relação ao tecido normal correspondente, foi considerada LOH embora não esteja totalmente excluído o desequilíbrio alélico secundário da amplificação. Casos homozigotos foram considerados não informativos para a perda de heterozigozidade.

Definimos instabilidade microssatélite através da visualização de deslocamentos (“shifts”) de bandas obtidas nos tecidos tumorais em relação aos normais ou quando verificávamos a presença de uma banda extra na análise da amostra tumoral, na região amplificada.



RESULTADOS

De todos os 71 casos estudados foi extraído DNA como exemplifica a FIGURA 4.

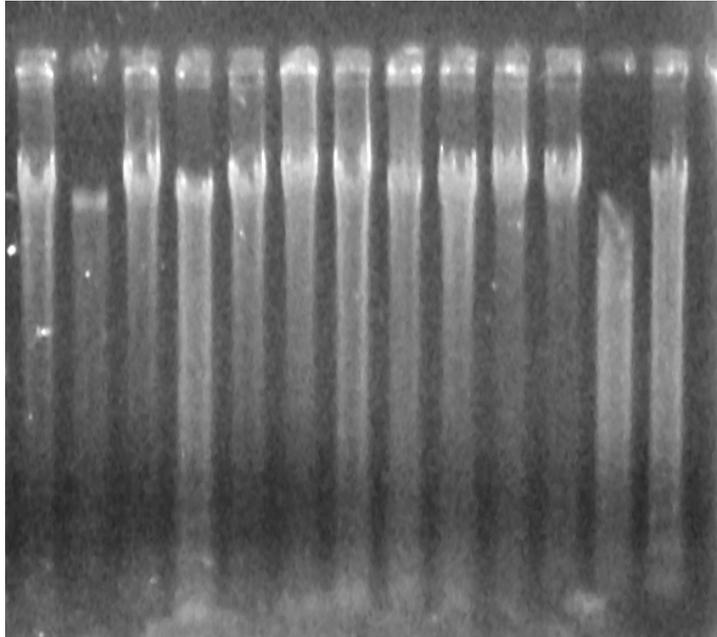


Figura 4: Gel de agarose a 0,8% para a visualização do DNA extraído das amostras de tecido tumoral e normal.

Esses DNAs foram amplificados por pelo menos um par de primers utilizados para examinar a região do cromossomo 9p21-9p22 conforme exemplifica a FIGURA 5.

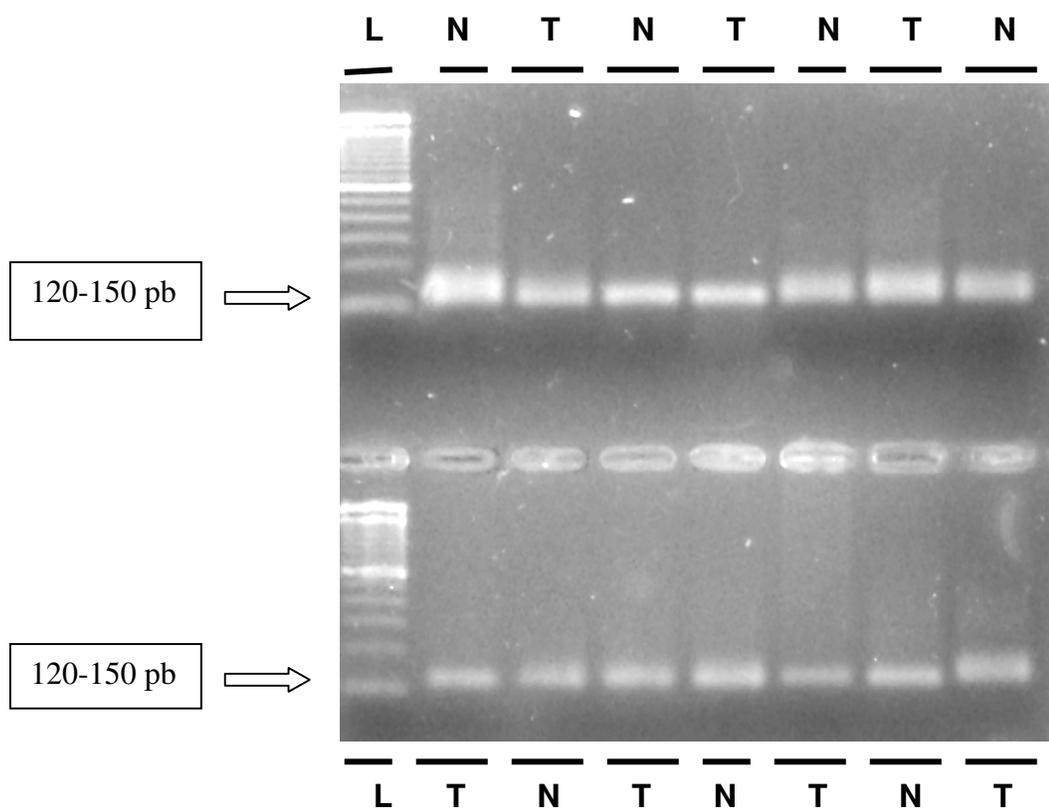


Figura 5: Gel de agarose 2,0% para a visualização do DNA amplificado com marcadores microsatélites pela técnica de PCR. Na primeira coluna temos um marcador de peso molecular de 100pb, e nas outras colunas temos o produto de PCR amplificado com fragmentos de 120-150 pares de bases, amostras de tecido tumoral (T) e tecido normal (N).

As amostras foram analisadas a seguir em relação a desequilíbrio alélico. Dois casos de CBC mostraram a presença de LOH (FIGURA 6 - e) e 6 outros CBC mostraram ter a presença de uma banda extra com o uso de um marcador microssatélite para a região 9p21 (FIGURA 6 - c,d). Além disso, 3 destes 6 pacientes com CBC mostraram um desequilíbrio alélico na região 9p23-9p22 e dois deles apresentaram uma banda extra no locus 9q31-9q34 indicando erro de replicação (FIGURA 6 – a,c,d).

Todos os 8 pacientes (5 casos femininos e 3 casos masculinos, 54+/-16 anos de idade), apresentavam a cor de pele branca e múltiplas lesões cutâneas devidos a exposição solar. Os tumores examinados foram retirados em cinco pacientes da região da cabeça e pescoço, sendo nos outros três do tronco e dorso. Não fomos capazes de identificar um padrão clínico que diferencie estes casos dos demais pacientes com CBC.

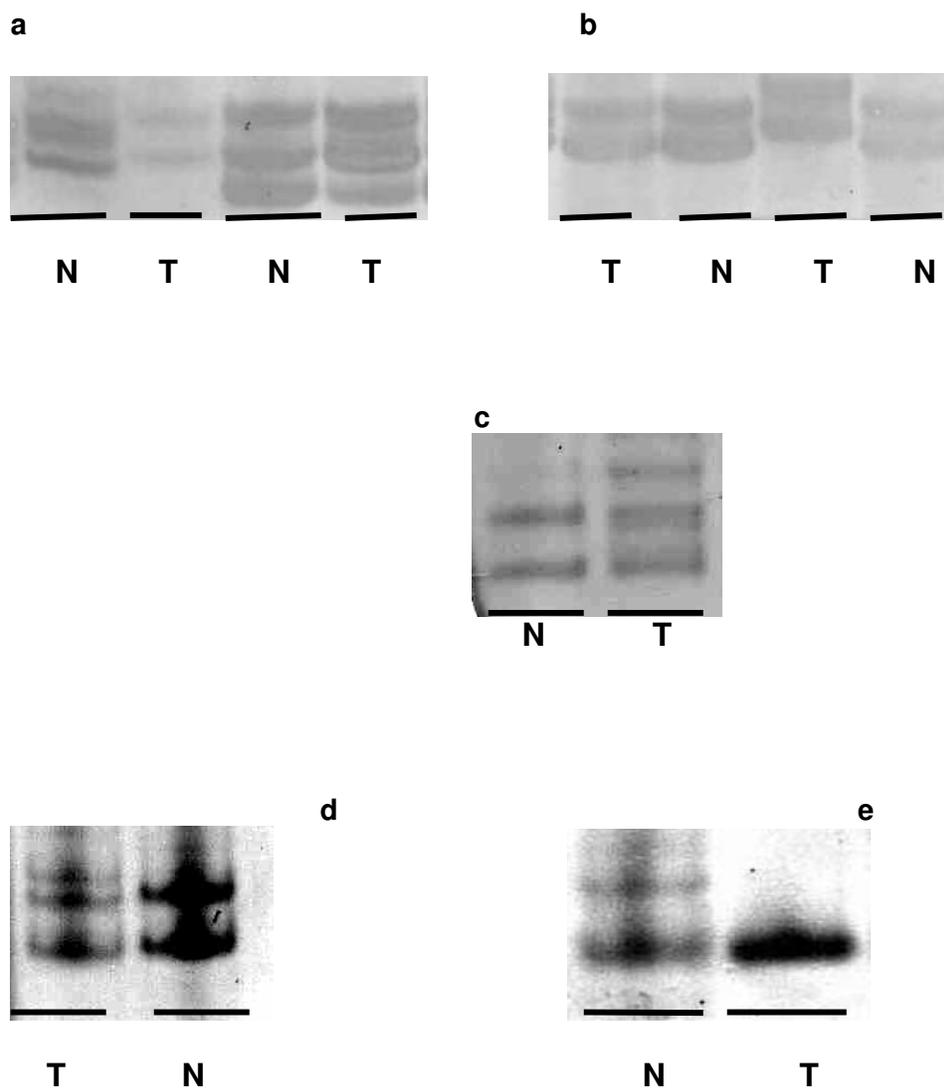


Figura 6: Gel eletroforético de poliacrilamida 8%, para visualização de perda de heteroziguidade alélica (LOH) e instabilidade microssatélite com as amostras de tecido tumoral e normal.

O quadro **a** mostra dois pares de amostras de carcinoma basocelular sendo que o tumor do primeiro par está menos evidente do que o tecido normal, sugerindo que apresenta instabilidade microssatélite; utilizamos o marcador D9S1748. No quadro **b**,

foram testados dois pares de amostras de carcinoma basocelular com o marcador D9S200. O segundo par mostrou uma mudança na velocidade da corrida das bandas indicativa de instabilidade microssatélite. No quadro **c** testamos que o mesmo tumor anterior exibe uma banda extra na região 9p21-9p22 usando o marcador D9S120. Os quadros **d** e **e** mostram amostras de carcinoma basocelular que apresentam instabilidade microssatélite e a perda de heterozigozidade alélica na região 9p21-9p22 com os marcadores D9S200 e D9S1748, respectivamente.



DISCUSSÃO

O câncer humano desenvolve-se a partir de alteração genética que permite à célula mutada um crescimento desordenado e indiferenciação celular (NAMBA *et al*, 1990). Estas condições traduzem-se em vantagem desta célula modificada, que é capaz de transmitir às suas células filhas este benefício. Tais anormalidades podem ser herdadas ou adquiridas por fatores ambientais, como os raios ultra-violeta, que mudam a expressão ou as propriedades bioquímicas de genes relacionados com o ciclo celular .

A neoplasia maligna mais comum no mundo ocidental é o câncer de pele, sendo que a maior parte destes são os não- melanocíticos. Os CBC representam 75% e os CEC cerca de 20% dos cânceres cutâneos (MILLER, 1991; KWA *et al*, 1992).

Estudos epidemiológicos mostram que os carcinomas basocelulares e carcinomas espinocelulares são frequentemente resultados de uma longa exposição à radiação ultra-violeta. Apesar de sua origem comum a partir do queratinócito epidérmico, ambos os carcinomas possuem comportamentos clínicos e biológicos distintos e uma evolução diferente.

O carcinoma basocelular frequentemente ocorre em áreas mais expostas ao sol como face, pescoço e membros superiores. Apresenta crescimento lento e lesões como pápulas translúcidas com telangectasias e ulcerações (WEEDON, 1992).

Os carcinomas espinocelulares têm crescimento rápido e causam metástases à distância. Apresentam-se geralmente como tumores esporádicos e, ao contrário do CBC, raramente estão associados a síndromes familiares (KO *et al*, 1994; WEEDON, 1992). Existem evidências de mutações induzidas pela radiação UV no gene do p53, tanto nos CBC como nos CEC (BRASH *et al*, 1991; VAN DER RIET *et al*, 1994); os CEC apresentam-se como lesões eritematosas, queratósicas, que surgem nas áreas da pele expostas ao sol; frequentemente são múltiplas e caracterizam-se histologicamente por displasia (GALLAGHER *et al*, 1995a; GALLAGHER *et al*, 1995-b). A Doença de Bowen é um CEC *in situ*, distinto clinicamente. Apresenta-se como lesão eritematosa, descamativa e queratósica, de crescimento centrífugo. Pode se transformar em lesão invasiva em 8% dos casos não tratados (WEEDON, 1992). O queratoacantoma (KA) também é uma neoplasia cutânea epitelial, provavelmente originada nos queratinócitos dos folículos pilosos. É uma

lesão pápulo-tumoral, com centro queratósico, que surge nas regiões expostas ao sol, de rápido crescimento, podendo sofrer involução espontânea (SCHWARTZ *et al*, 1994). Histologicamente o KA pode se assemelhar ao CEC, sendo às vezes, difícil diferenciá-los. Entretanto seu curso clínico é marcadamente diferente (QUINN *et al*, 1994). Descrições de múltiplos KA também sugerem uma semelhança etiopatogênica (WITTEN & ZAK, 1952). Entretanto, os eventos relacionados com a progressão para um tumor invasivo, principalmente das queratoses actínicas até um CEC invasivo, não estão claros ainda (REES, 1994).

Instabilidade genômica frequentemente resulta em alteração sutil de sequência dentro dos microssatélites; esta instabilidade é resultado de um defeito na capacidade da célula em reparar erros de replicação durante a duplicação do DNA, devido à mutação no gene de reparo (KINZLER & VOGELSTEIN, 1996).

A perda de heterozigozidade (LOH) constitui um mecanismo genético no qual células somáticas heterozigóticas se tornam homozigóticas, por que o seu alelo selvagem correspondente se perde. LOH hoje é reconhecido como uma das maiores causa de transformação maligna.

Usamos 71 amostras de tecidos tumorais e normais cujo DNA foi amplificado por PCR usando marcadores microssatélites para análise de polimorfismo de repetições de dinucleotídeos no braço longo do cromossomo 9, e também na região 9p21-22, onde está localizado o gene p16, que é um gene supressor tumoral.

Nas amostras de carcinoma espinocelular, não foi encontrado nenhum desequilíbrio alélico ou perda de heterozigozidade no gene p16, o que nos sugere que este gene não seja importante neste mecanismo tumorigênico.

Entretanto, obtivemos uma taxa de 20% de desequilíbrio alélico em carcinoma basocelular. Dois casos de CBC apresentaram perda de heterozigozidade alélica enquanto outros seis casos mostraram uma banda extra com um dos marcadores microssatélites para a região 9p21. Dentre estes seis casos, três pacientes demonstraram desequilíbrio alélico nas regiões 9p23-9p22 e dois apresentaram uma banda extra na região 9q31-9q34, indicando erro de replicação.

Todos os oito pacientes tinham pele de cor branca e apresentavam múltiplas lesões, particularmente em locais expostos ao sol. Os tumores de cinco pacientes foram da região da cabeça e pescoço e os três demais do tronco. Não foi possível identificar nenhum padrão clínico que distinguisse estes casos dos demais pacientes com CBC.

Outros estudos relataram perda da função do gene p16 associada a um aumento na susceptibilidade a uma variedade de cânceres, incluindo os melanomas malignos (FUNK *et al*, 1998). Em melanoma familiar cerca de 20-30% dos casos apresentaram mutações no p16. No melanoma esporádico os dados ainda são controversos (MACKIE, 1998; FUNK *et al*, 1998). Nos casos de câncer de pele não-melanocíticos, os primeiros dados mostraram uma baixa frequência da perda de 9p em CBC em contraste com os CEC (QUINN *et al*, 1994; SIKKINK *et al*, 1997). Uma alta frequência de LOH na região 9p21-9p22 do cromossomo foi demonstrado por alguns autores recentemente, porém não foram encontradas mutações do p16INK4a/p19ARF em pacientes gregos com CBC (SARIDAKI *et al*, 2000).

Em 16 casos de CBC onde foram investigados anormalidades do cromossomo 9q, autores descreveram uma taxa de 69% de LOH (VAN DER RIET *et al*, 1994).

Ao analisar 37 lesões pré-malignas (ceratose actínica) e 14 CEC esporádicos, pesquisadores não encontraram instabilidade microssatélite em nenhum deles fazendo uso de seis marcadores microssatélites. Dentre as 37 ceratoses actínicas, encontraram LOH em sete casos e apenas 1 caso de CEC apresentava perda de heterozigidade, o que levou o autor a concluir que em casos de AK não se espera a progressão para CEC (KUSHIDA *et al*, 1999). Outro estudo analisou 7 casos de queratoacantoma usando marcador microssatélite D9S171 para cromossomo 9p e encontrou apenas 1 caso com LOH; ao analisar 9 casos com o marcador microssatélite D9S160 para cromossomo 9q, encontrou apenas 1 LOH (WARING *et al*, 1996).

Nas lesões pré-malignas examinadas por pesquisador, encontrou-se um diferente padrão de LOH, sugerindo que um importante gene supressor tumoral no cromossomo 9q estaria presente no desenvolvimento de CEC (HOLMBERG *et al*, 1996).

Mais recentemente, outros pesquisadores descreveram uma perda regional de 9q em 33% dos CBC testados abrangendo 9q22.3, onde o gene Patched havia sido mapeado (ASHTON *et al*, 2001). Ao usar uma técnica de hibridização comparativa, esses autores observaram novos e recorrentes ganhos cromossômicos em 9p em 20% dos casos, coincidentemente a mesma taxa de desequilíbrio alélico obtida em nossos casos.

Três de nossos carcinomas basocelulares apresentaram instabilidade em dois ou mais marcadores do cromossomo 9, sugerindo que um subgrupo de pacientes esteja mais sujeito a desequilíbrio alélico ou erros de replicação. O fato que somente os CBC apresentavam este desequilíbrio pode mostrar que existe uma grande diferença entre as duas mais importantes formas de câncer de pele não- melanocítica na sua tendência de apresentar instabilidade microssatélite no cromossomo 9. Estes resultados sugerem uma diferença fundamental nos mecanismos de controle de estabilidade cromossômica nestas duas formas de câncer, e demonstram que os CBC podem ser geneticamente mais instáveis do que se pensava anteriormente.



CONCLUSÃO

Entre os casos de CBC, CEC e as lesões benignas e pré-malignas estudadas, somente os casos de CBC apresentaram instabilidade microssatélite.

Três amostras de CBC apresentaram instabilidade genética em dois ou mais marcadores microssatélites (D9S156 e D9S120), sugerindo que estes tumores sofreram erros de replicação.

Concluimos que existe uma diferença entre as duas formas fenotípicas mais importantes de cânceres de pele não- melanocíticos, isto é, uma tendência em apresentar instabilidade microssatélite nos casos de carcinoma basocelular, em relação ao carcinoma espinocelular. Isto poderia ser uma diferença fundamental no mecanismo de controle de estabilidade cromossômica nestas duas formas de câncer.



SUMMARY

Non-melanoma skin cancer is the most common malignancy in human beings, and the incidence continues to increase. Loss of heterozygosity analysis in the 9p21-p22 region, that harbors the CDKN2a/p16INK4a, p19ARF, and p15INK4b tumor suppressor genes, have been frequently described in a wide range of human malignancies, including familial melanomas. Also, losses and gains in other regions of chromosome 9 have been frequently observed and may indicate additional mechanisms in basal cell tumorigenesis. Using DNA extracted from tumor and matched normal tissues, we examined 13 premalignant and 58 malignant skin tumors. Benign cases included 4 solar keratosis, 3 keratoachantomas, 3 melanocytic nevi, 2 Bowen's disease and 1 neurofibroma. Malignant skin tumors included 14 squamous cell, 40 basal cell carcinomas and 4 melanomas. Using 4 sets of primers to amplify polymorphic microsatellite repeats on chromosome 9, we identified 8 cases (20%) of allelic imbalance among basal cell carcinomas, 2 cases of loss of heterozygosity and 6 cases of microsatellite instability. No events were detected among the premalignant or the other malignant cases. This phenotype-dependency suggest that there is a major distinction between the two most important forms of non-melanoma skin cancers in their tendency to present microsatellite instability in chromosome 9.



*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- AHMADIAN A; REN Z.P; WILLIAMS C; PONTEN; ODEBERG J; PONTEN J; UHLEN M; LUNDEBERG J. Genetic instability in the 9q22.3 region is a late event in the development of squamous cell carcinoma. Oncogene. 17(14):1837-43, 1998.
- ARZIMANOGLU II, GILBERT F, BARBER HR. Microsatellite instability in human solid tumors. Cancer. 82:1808-1820, 1998.
- ASHTON KJ, WEINSTEIN SR, MAGUIRE DJ, GRIFFITHS LR. Molecular cytogenetic analysis of basal cell carcinoma DNA using comparative genomic hybridization. J Invest Dermatol. 117:683-686, 2001.
- ASZTERBAUM M, BEECH J, EPSTEIN EH JR. Ultraviolet radiation mutagenesis of hedgehog pathway genes in basal cell carcinomas. J Investig Dermatol Symp.4(1):41-5, 1999.
- ATKIN NB. Microsatellite instability. Cytogenet Cell Genet. 92:177-181, 2001
- BARTSCH D.; SHEVLIN, D.W.; TUNG W.S.; KISKER O; WELLS S.A; GOODFELLO W.P.J.; Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas. Genes Chrom.Câncer. 14:189-195,1995.
- BATES GD, VAN WOERKOM AE, LOPES O, WARING R, KLOVRZA L. Genetic polymorphism and drug-induced movement disorders. Br J Psychiatry. 170:485, 1997.
- BISHOP JM. The Molecular genetics of câncer. Science.235:305-311, 1987.
- BRASH DE., RUDOLPH JA, SIMON JA, LIN A, MCKENNA GJ, BADEN HP, HALPERIN AJ, PONTEN J. A role for sunlight in skin cancer. UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA.88:10124-10128, 1991.
- CAHILL DP, LENGAUER C, YU J, RIGGINS GJ, WILLSON JK, MARKOWITZ SD, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. Nature. 392(6673):300-3, 1998.

- CHIN L.; POMERANTZ J.; DEPINHO R.A; The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene two products/two pathways". TIBS. 23:291-296,1998.
- CHITTENDEN T, HARRINGTON EA, O'CONNOR R, FLEMINGTON C, LUTZ RJ, EVAN GL AND GUILD BC. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bax. Nature.374:733-739,1995.
- DIAKOUMIS E, SOURVINOS G, KIARIS H, DELAKAS D, CRANIDIS A, SPANDIDOS DA. Genetic instability in renal cell carcinoma. Eur Urol. 33(2):227-32, 1998.
- FAGIN JA. Molecular pathogenesis of human thyroid neoplasms. Thyroid Today. 17:1-7, 1994.
- FEARON ER, VOGELSTEIN B A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 61(5):759-67, 1990.
- FUJIMOTO A; MORITA R.; HATTA N.; TAKEHARA K.; TAKATA M.; p16INK4a inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma. Oncogene 18(15):2527-32,1999.
- FUNK JO, SCHILLER PI, BARRETT MT, WONG DJ, KIND P, SANDER CA. p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. J Cutan Pathol. 25:291-296, 1998
- GALLAGHER RP, HILL GB, FINCHAM S, COLDMAN AJ, MCLEAN DI, THREFALL WJ. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. Arch Dermatol. 131:157-163, 1995a.
- GALLAGHER RP, HILL GB, FINCHAM S, COLMAN AJ, MCLEAN DI, THREFALL WJ. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin Cancer. II Squamous cell carcinoma. Arch Dermatol.131:164-169, 1995.b
- GARDIE B; CAYULA J.M.; MARTINI S.; SIGAUX F. Genomic alterations of the p19ARF encoding exons in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 92(3):1016-20,1998.

- GONG C; MERA R; BRAVO J.C; RUIZ B; DIAZ-ESCAMILLA R; FONTHAM E.T; CORREA P; HUNT J.D. KRAS mutations predict progression of preneoplastic gastric lesions. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 8(2):167-71, 1999.
- HEALY E; SIKKINK S; REES J.L; Infrequent mutation of p16INK4a in sporadic melanoma. J. Inv. Dermatol., 107(3):318-321,1996.
- HOLMBERG E, ROZELL BL, TOFTGARD R. Differential allele loss on chromosome 9q22.3 in human non-melanoma skin cancer. Br J Cancer. 74:246-250, 1996
- KHOKHLOV AS, RESHETOV PD, CHUPOVA LA, CHERCHES BZ, ZHIGIS LS, STOYACHEMKO I A. Chemical studies on actinoxanthin. J Antibiot (Tokyo). 29(10):1026-34, 1976.
- KINZLER, K.W. and VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell. 87:159-170,1996.
- KNUDSON AG. Antioncogenes and human cancer. Proc Nat Acad Sci USA 90:10914-10921,1993.
- KO CB, WALTON S, KECZKES K, BURY HPR, NICHOLSON C. The emerging epidemic of skin cancer. Br. J. Dermalol.130:269-272, 1994.
- KONO T, KOBAYASHI H, ISHII M, NISHIGUCHI S, TANIGUCHI S. Synchronous development of disseminated superficial porokeratosis and hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. J Am Acad Dermatol.;43:966-8, 2000.
- KUSHIDA Y, MIKI H, OHMORI M. Loss of heterozygosity in actinic keratosis, squamous cell carcinoma and sun-exposed normal-appearing skin in Japanese: difference between Japanese and Caucasians. Cancer Lett. 140:169-175, 1999.
- KWA RE, CAMPANA K, MOY RL. Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. J Am Acad Dermatol. 26:1-26, 1992.
- LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Genetic instabilities in human cancers. Nature. 396:643-649, 1998.

- LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell.88:323-331, 1997.
- LUKAS J, PAGANO M, STASKOVA Z, DRAETTA G, BARTEK J. Cyclin D1 proteins oscillates and is essential for progression in human tumor cell lines. Oncogene; 9:707-718,1994.
- MACIAG P.C., “Genetic instability to HPV infection and cervical cancer “. B.J. of Medical and Biological Research.32:915-922,1999.
- MACKIE RM. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. Eur J Cancer 34 Suppl 3:S3-6, 1998.
- MILLER SJ. Biology of basal cell carcinoma (Part I). J Am Acad Dermatol. 24:1-13, 1991.
- MOTOKURA T, BLOOM T, KIM HG, JUPPNER H, RUDERMAN JV, KRONENBERG HM, ARNOLD A, A novel cyclin encoded by abcl1-linked candidate oncogene. Nature.350:512-515,1991.
- MULLIN JM, MARANO CW, LAUGHLIN KV, NUCIGLIO M, STEVENSON BR, SOLER P. Different size limitations for increased transepithelial paracellular solute flux across phorbol ester and tumor necrosis factor-treated epithelial cell sheets. J Cell Physiol. 171(2):226-33, 1997.
- NAMBA H, MATSUO K, FAGIN JA. Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors. J Clin Invest. 86(1):120-125, 1990.
- NEUMANN H.P; ENG C.; MULLIGAN L.M. GLAVAC D.; ZAUNER I.; PONDER B.A; CROSSEY P.A; MAHER E.R.; and BRAUCH H. Consequences of direct genetic testing for germline mutations in the clinical management of families with multiple endocrine neoplasia Type II. JAMA. 274:1149-1151,1995.
- NIKIFOROV YE, GNEPP DR. Pathomorphology of thyroid gland lesions associated with radiation exposure: the Chernobyl experience and review of the literature. Adv Anat Pathol. 6(2):78-91, 1999.
- OWONIKOKO T.; LOBERG C.; GABBERT H.E.; SARBIA M.; “Comparative analyses of basaloid and typical squamous cell carcinoma of the oesophagus: a molecular biological and immunohistochemical study”. J.Pathol.193(2):155-161, 2001.

- PAULOVICH AG, TOCZYSKI DP, HARTWELL LH. When checkpoints fail. Cell. 83:315-321,1997.
- PICCINI S.; DOGLIONI C.; MAESTRO R.; VUKOSAVIJEVIC T.; GASPAROTTO D.; ORAZI C.D.; BOIOCCHI M. “ p16/CDKN2 and CDK4 gene mutations in sporadic Melanoma development and progression. Int.J.Cancer. 74:26-30,1997.
- PIEPKORN M.; “Melanoma genetics: Na update with focus on the CDKN2A (p16)/ARF tumor suppressor “. J.Am. Dermatol 42:705-22, 2000.
- QUELLE DE, CHENG M.; ASHMUN RA.; SHERR CJ.; Cancer associated mutations at the INK4a locus cancer cell cycle arrest by p16 INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,.94:669-673,1997.
- QUINN AG, CAMPBELL C, HEALY E, REES JL Chromosome 9 allele loss occurs in both basal and squamous cell carcinomas of the skin. J Invest Dermatol 102:300-303, 1994.
- REDSTON M. Carcinogenesis in the GI tract: from morphology to genetics and back again. Mod Pathol.14(3):236-45, 2001.
- REES J. Genetic alterations in non-melanoma skin cancer J Invest Dermatol 103(6):747-50, 1994.
- ROSENBERG L.C.; FINNEMORE M.E.; LARSON S. P.; NOGUEIRA P.C.; DELANEY L.T.; DNA alterations in tumor scrapes VS. Biopsies of squamous cell carcinomas of the head and neck. Int. J. Cancer (Pred. Oncol.) 89:105-110, 2000.
- RUBBEN A, BABILAS P, BARON JM, HOFHEINZ A, NEIS M, SELS F, SPORKERT M. Analysis of tumor cell evolution in a melanoma: evidence of mutational and selective pressure for loss of p16ink4 and for microsatellite instability. J Invest Dermatol. 114(1):14-20, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab.,Plainview, N.Y.1989.

- SARIDAKI Z., KOUMANTAKI E., LILOGLOU T., SOURVINOS G., PAPADOPOULOS O, ZORAS O, SPANDIDOS A D., “High Frequency of loss of Heterozygosity on Chromosome Region 9p21/22 but lack of p16INK4a/p19ARF mutations in Greek Patients with Basal Cell Carcinoma of the Skin “. J. Invest Dermatol ,115:719-725, 2000.
- SCHWARTZ SB, HIGGINS PJ, RAJASEKARAN AK, STAIANO-COICO. Gelsolin expression in normal human keratinocytes is a function of induced differentiation. Adv Exp Med Biol;358:169-81, 1994.
- STARK GR. Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. Adv Cancer Res;61:87-113, 1993.
- STONES S.; JILANG P.; DAYANANTH P.; TAVTIGIAN SW.; KATCHER H.; PARRY D.; PETERS G.; KAMB A. Complex structure and regulation of the p16 (MTS1) locus. Cancer Res. 55:2988-2994,1995.
- TSAO H. Update on familial cancer syndromes and the skin. J. Am. Acad. Dermatol.42:939-69, 2000.
- VAN DER RIET P, KARP D, FARMER E, WEI Q, GROSSMAN L, TOKINO K, RUPPERT JM, SIDRANSKY D. Progression of basal cell carcinoma through loss of chromosome 9q and inactivation of a single p53 allele. Cancer Res. 54:25-27,1994
- VELTMAN JÁ.; VAN WEERT I.; AUBELE M.; BOT F.J.; RAMACKERS F. C.; MANNI J. J.; HOPMAN AH.; “Specific steps in aneuploidization correlate with loss of heterozygosity of 9p21, 17p13 and 18q21 in the progression of pre malignant laryngeal lesions.” Int. J. Câncer.91(2):193-199,2001.
- WANG TC, CARDIFF RD, ZUKERBERG L, LEE E, ARNOLD A, SCHMIDT EV. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. Nature,369:669-671,1994.
- WARD.S.L. Genética molecular do câncer: implicações no câncer da tiróide humana. Ver. Bras. Clin. Terap.,23(6):212-218,1997.

- WARD SL. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. Rev Bras Clin Terap,26(3):103-107,2000.
- WARING AJ, TAKATA M, REHMAN I, REES JL. Loss of heterozygosity analysis of keratoacanthoma reveals multiple differences from cutaneous squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 73:649-653, 1996.
- WEEDON D. Tumours of the epidermis. In: Systemic Pathology: The skin.9(3): 729-776,1992.
- WEINBERG R. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res, 49:3713-3721,1989.
- WITTEN VH, ZAK FG. Multiple, primary, sel-healing prickle-cell epithelioma of the skin. Cancer.5:539, 1952.



ANEXOS



**LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

TERMO DE CONSENTIMENTO

Departamento de Clínica Médica

**Projeto de Pesquisa em Genética Molecular do Câncer
Profa. Dra. Laura Sterian Ward**

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a).....
.....Anos RG..... HC.....
Endereço.....
Telefone.....

Concordo em doar sangue e um pedaço do material retirado durante minha cirurgia para pesquisa de genes que podem estar envolvidos no aparecimento do câncer. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados de meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam usados para avaliar a importância dos genes, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação.

Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento do câncer no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora. Não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual.

Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no fone: (19)3788.8954.

Prof.a Laura Sterian Ward, Chefe do Lab. Genética Molecular do Câncer, FCM-UNICAMP
Tel.: 19-7888954 Cidade Universitária Zeferino Vaz, CP 6111, 13081-970 Campinas, SP
Ward@unicamp.br