**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**PESQUISA DE MUTAÇÕES NO GENE CDKN2A EM
PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE
MELANOMA HEREDITÁRIO**

Jair Huber

**Ribeirão Preto
2003**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PESQUISA DE MUTAÇÕES NO GENE CDKN2A EM
PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE
MELANOMA HEREDITÁRIO**

Jair Huber

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre
Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

**RIBEIRÃO PRETO
2003**

FICHA CATALOGRÁFICA

Huber, Jair

Pesquisa de mutações no gene CDKN2A em pacientes com critérios clínicos de melanoma hereditário. Ribeirão Preto, 2003.

60 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética.

Orientadora: Ramos, Ester Silveira.

1. Melanoma familiar. 2. CDKN2A. 3. Neoplasia. 4. Cromossomo 9. 5. PCR. 6. SSCP.

LOCAL E DATA DA DEFESA PÚBLICA:

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2003.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

“Na ciência, objeto da investigação não é a natureza em si mesma, mas a natureza subordinada à maneira humana de pôr o problema”.

Werner Heisenberg (1901-1976) - Prêmio Nobel da Física em 1932.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos pacientes que apesar de passarem por um momento difícil em suas vidas
souberam entender os objetivos dessa pesquisa e ajudar sendo voluntários.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ester Silveira Ramos por ter me orientado e acreditado no meu trabalho.

À Equipe Multidisciplinar do Ambulatório de Melanoma por sua contribuição permitindo um primeiro contato com os pacientes.

Ao Prof. Dr. Wilson Silva Jr. e à Camila do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro por me ajudarem no seqüenciamento.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone por permitir utilizar o seu laboratório no início desta pesquisa e a Rosane por ter me auxiliado nos meus primeiros PCR's e no seqüenciamento.

Aos membros da banca examinadora pela gentileza em aceitar o convite para apreciação deste trabalho.

À Adriane por ter tido paciência em me ensinar a manusear uma pipeta e ensinar a fazer os primeiros PCR's.

À Profa. Dra. Maria Vanderly Andréa (Tia) que com sua longa experiência me ensinou a fazer SSCP.

Ao Reginaldo e ao Sílvio sempre pacientes em me ajudar no laboratório.

À Jeny e ao Mendelson por me ajudarem no seqüenciamento.

Aos colegas Álvaro, Marcus Vinícius, Daniela, Ana Karina, Christina e Milena
companheiros constantes nessa jornada.

À amiga Lisandra sempre doce e disposta a me ajudar no laboratório enquanto eu
“estudava”.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP-USP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (HC-FMRP-USP).

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

Introdução	Pág. 1
Objetivos	Pág. 7
Casuística	Pág. 9
Materiais e Métodos	Pág. 12
Resultados	Pág. 21
Discussão	Pág. 31
Conclusões	Pág. 38
Referências Bibliográficas	Pág. 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CDI – do inglês *Cyclin-dependent Kinase Inhibitory* (Inibidor de Quinase Ciclina-dependente)

CDK - do inglês *Cyclin-dependent Kinase* (Quinase Ciclina-dependente)

CDK4 - do inglês *Cyclin-dependent Kinase 4* (Quinase Ciclina-dependente 4)

CDKN2A – do inglês *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A* (Inibidor de Quinase Ciclina-dependente 2A)

CDKN2B – do inglês *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2B* (Inibidor de Quinase Ciclina-dependente 2B)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – do inglês *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

HCl – Ácido Clorídrico

K - Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

M – Molar

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MTS – Supressor tumoral múltiplo.

NaOH – Hidróxido de Sódio

p16^{INK4A} – do inglês *Inhibitor of Cyclin-dependent Kinases 4A Protein* (Proteína Inibitória da Quinase Ciclina-dependente 4A)

ARF – do inglês *Alternative Reading Frame* (Quadro Alternativo de Leitura).

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)

pRB – Proteína do Retinoblastoma

Rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SSCP – do inglês *Single Strand Conformational Polymorphism* (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples)

TBE - Tris-Ácido Bórico-EDTA

Tris – Hidroximetil-Aminometano

UTR – do inglês *Untranslated Region* (Região Não Traduzida)

V – Volts

W – Wats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do gene CDKN2A e seus transcritos.

Figura 2 – Padrões de bandas obtidos pela técnica de SSCP para o éxon 1.

Figura 3 – Padrões de bandas obtidos pela técnica de SSCP para o éxon 2.

Figura 4 – Padrões de bandas obtidos pela técnica de SSCP para o éxon 3.

Figura 5 – Cromatograma do éxon 1 do paciente 19.

Figura 6 – Cromatograma do éxon 2 do paciente 8.

Figura 7 – Cromatograma do éxon 3 do paciente 8.

Figura 8 – Cromatogramas do éxon 3 dos pacientes 4 e 21.

Figura 9 – Cromatogramas do éxon 3 dos pacientes 10 e 15.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas de melanoma hereditário e esporádico.

Tabela 2 – Sequências dos pares de *primers* utilizados nas PCRs.

Tabela 3 – Identificação dos pacientes, registro no HC-FMRP-USP, idade do diagnóstico de melanoma, presença de tumores múltiplos primários (PTMP) e presença de mais membros da família afetados (PMMFA).

Tabela 4 – Alterações encontradas nos 22 pacientes.

Tabela 5 – Classificação das famílias por número de afetados.

RESUMO

HUBER, J. Pesquisa de mutações no gene CDKN2A em pacientes com critérios clínicos de melanoma hereditário. 2003. 60 p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.

A incidência do melanoma, tumor maligno que se origina dos melanócitos, vem crescendo em todo o mundo. História familiar positiva da doença tem sido relatada em 8 a 14% dos pacientes afetados. Muitos estudos sugeriram o envolvimento da região 9p21, onde se encontra o gene CDKN2A, no surgimento dessa neoplasia. Este é um gene supressor tumoral clássico e a inativação dos dois alelos tem sido detectadas em linhagens celulares tumorais de famílias com melanoma hereditário e esporádico. Mutações em linhagens germinativas do gene CDKN2A têm sido identificadas em aproximadamente 20% das famílias com melanoma familiar. Utilizando técnicas de biologia molecular como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Conformação Estrutural de Fita Simples (SSCP) e seqüenciamento, este projeto estudou 22 pacientes com critérios clínicos de melanoma hereditário e encontrou uma mutação (P48T) em um paciente numa família de três afetados. Em 13 casos foi identificado pelo menos um dos três polimorfismos: 500 C>G (31,9%), 540 C>T (27,3%) e A148T (4,5%). Os resultados demonstram a importância da pesquisa de mutações no gene CDKN2A principalmente em famílias com dois ou mais membros afetados pela doença.

Palavras-Chave: Melanoma hereditário, CDKN2A, Neoplasia, PCR, SSCP, Cromossomo 9.

ABSTRACT

HUBER, J. Search for mutations in the CDKN2A gene in patients with clinical pattern of hereditary melanoma. 2003. 60 p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The incidence of melanoma, malign tumor that originates from melanocytes, is increasing all over the world. Positive familial history of disease has been related in 8 to 14% of affected patients. Several studies have suggest the 9p21 region evolvement, where is located the CDKN2A gene, in the arising of this neoplasia. It is a classic tumor suppressor gene and the inactivation of two alleles has been detected in tumor cells lines of families with hereditary and sporadic melanoma. Nowadays germeline mutations in CDKN2A gene have been identified in almost 20% of families with familial melanoma. Using molecular biology techniques like Polymerase Chain Reaction (PCR), Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) and sequencing, this project studied 22 patients with clinical pattern of hereditary melanoma and it found one mutation (P48T) in one patient belonged to a three affected family. Thirteen cases had at least one of the three polymorphisms: 500 C>G (31,9%), 540 C>T (27,3%) e A148T (4,5%). The results show the importance of the search for mutations in the CDKN2A gene mainly in families with two or more affected by disease.

Key Words: Hereditary melanoma, CDKN2A, Neoplasia, PCR, SSCP, Chromosome.

INTRODUÇÃO

O melanoma é um tumor maligno de pele que se origina dos melanócitos, células pigmentadas normalmente presentes na epiderme. A incidência do tumor vem crescendo drasticamente em todo mundo. Nos Estados Unidos há uma estimativa de 53.600 casos novos em 2002 e 7.400 mortes devidas ao melanoma (Tucker *et al.*, 2003). História familiar positiva de melanoma tem sido relatada em 8 a 14% dos pacientes afetados. Nos casos hereditários os pacientes tendem ser mais jovens, ter um grande número de nevos, desenvolver múltiplos melanomas primários e apresentar maior risco de desenvolver a doença quanto maior for a exposição ao sol, sugerindo uma interação genético-ambiental na susceptibilidade para o tumor nessas famílias (Greene, 1998) (Tabela 1).

Nos últimos anos muitos estudos sugeriram o envolvimento da região cromossômica 9p21 no surgimento dessa neoplasia. Em aproximadamente 50% de todos os melanomas familiares têm sido encontradas ligações genéticas com marcadores localizados em 9p21 (Flores *et al.*, 1997). Nesta região encontra-se o gene CDKN2A adjacente ao CDKN2B, sendo o primeiro mais próximo ao telômero e ambos constituindo o *locus* MTS (Supressor Tumoral Múltiplo) (Hannon & Beach, 1994). O CDKN2A é um gene supressor tumoral clássico e a inativação dos dois alelos tem sido detectada freqüentemente em linhagens celulares tumorais de famílias com melanoma hereditário e esporádico (Flores *et al.*, 1997). Ele apresenta uma característica especial que consiste na produção de dois transcritos. Um promotor induz a produção de um transcrito formado pelos éxons 1 α -2-3, que codifica a proteína p16^{INK4a}, enquanto um outro produz um transcrito formado pelo éxons 1 β -2-3 e codifica a proteína p19^{ARF} (ARF = “Alternative Reading Frame” ou Quadro de Leitura Alternativo). Os dois transcritos compartilham os éxons 2 e 3 que são idênticos, diferindo no quadro aberto de leitura (“open reading frame”), sendo,

portanto, as seqüências de aminoácidos do p16^{INK4a} e p19^{ARF} completamente distintas (Mao *et al.*, 1995) (Figura 1).

Tabela 1 - Características clínicas de melanoma hereditário e esporádico.

Característica	Melanoma Hereditário	Melanoma Esporádico
Média de idade (anos)		
Homem	36	57
Mulher	29	50
Diagnóstico antes dos 20 anos	10%	2%
Múltiplos melanomas primários	30%	4%
Presença de nevos displásico	Maioria	~30%
História familiar positiva de melanoma	100%	~10%

Modificado de Greene, 1998.

O ciclo celular é um processo complexo que envolve numerosas proteínas regulatórias que conduzem a célula, por meio de uma seqüência específica de eventos, à mitose e à produção de duas células filhas. Esse processo é regulado por proteínas chamadas ciclinas e por quinases ciclina-dependentes (CDK) (Schafer, 1998). Diferentes fases do ciclo celular são reguladas por complexos ciclinas/CDK distintos. Um dos pontos mais importantes ocorre em G1 tardio, logo antes da replicação do DNA (fase S). É conhecido como ponto de restrição em mamíferos. Um dos mecanismos que leva ao câncer está relacionado à falha da regulação do ciclo celular nos pontos de restrição, sendo que, na maioria dos casos, a alteração ocorre nos complexos ciclina/CDK (Hunter & Pines, 1994).

Figura 1 - Representação esquemática do gene CDKN2A, do transcrito alfa e do transcrito beta (modificado de Larsen, 1996).

Recentemente foi identificado um novo tipo de regulador do ciclo celular, o inibidor de complexos Ciclina/CDK (CDI). A perda do controle do ciclo celular causada pela inativação dos CDIs resulta no crescimento celular contínuo. A proteína p16^{INK4a} é um inibidor dos complexos Ciclina/CDK, principalmente o CDK4 (Quinase Ciclina-dependente 4), impedindo a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB). A perda ou diminuição da proteína p16^{INK4a} numa célula (um melanócito, no caso) provavelmente aumenta a divisão celular pela liberação do ponto de restrição entre a fase G1 e S do ciclo celular (Biggs & Kraft, 1995; Grandér, 1998).

Mutações em linhagens germinativas no gene CDKN2A têm sido identificadas em 8 a 44% das famílias com melanoma estudadas até hoje (Greene, 1998). Holland *et al.* (1999) relataram que a incidência de mutação no gene nas famílias estudadas era de 8,4 % (11/131), mas a incidência aumentava nas famílias com três ou mais membros afetados (15,1% - 10/66) quando comparadas às famílias com somente dois membros afetados (1,5% - 1/65). Nas famílias com três ou mais casos, mutações no CDKN2A eram mais frequentes se pelo menos um membro da família tinha apresentado melanomas primários múltiplos (31,6% - 6/19). Os autores concluíram que existe uma correlação significativa entre a história familiar e a probabilidade de detecção de mutação no gene CDKN2A.

As mutações Arg24Pro, Met53Ile e Gly101Trp no gene CDKN2A já foram descritas em diversos trabalhos e a análise funcional da proteína p16^{INK4a} codificada em todos esses casos mostra uma diminuição da inibição do CDK4 (Holland *et al.*, 1999). A múltipla ocorrência dessas mutações em linhagens germinativas pode representar pontos quentes no gene ou a descendência dessas famílias de ancestrais comuns, chamada de mutação fundadora (Ciotti *et al.*, 2000; Yakobson *et al.*, 2003).

Alguns polimorfismos já foram descritos no gene CDKN2A tanto no éxon 2 como na região 3' não traduzida (UTR) do éxon 3. Uma transição A/G no códon 148 no éxon 2 resultando na troca do aminoácido Ala para Thr (Ala148Thr) é descrita em alguns trabalhos como um polimorfismo comum não trazendo nenhuma repercussão funcional para a proteína p16^{INK4a} (Platz *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 1999).

Mutações no CDK4, localizado no cromossomo 12p15, parecem ser uma causa rara de susceptibilidade para o melanoma hereditário. Quatro alterações já foram descritas no CDK4 até agora (Soufir *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 1999; Tsao *et al.*, 2000). Duas delas como mutações pontuais em linhagem germinativa em 3

famílias com a doença. Ambas as mutações localizadas no mesmo códon (Arg24Cis, Arg24His). As alteações ocorrem na região de inibição da proteína e provocam uma resistência à inibição da CDK4 pelo p16^{INK4a} (Tsao *et al.*, 2000).

Outros possíveis genes envolvidos no melanoma hereditário são o CDKN2B, um gene homólogo ao CDKN2A que se localiza a 35kb proximal a este na região 9p21 (Kamb *et al.*, 1994a; Hannon and Beach, 1994) e o produto gênico alternativo codificado pelos exons 1β-2-3 do gene CDKN2A, codificando um outro inibidor do ciclo celular (p19^{ARF}) (Stone *et al.*, 1995a; Mao *et al.*, 1995; Quelle *et al.*, 1995). O CDKN2B é considerado um candidato para a predisposição ao melanoma devido à sua localização e grande homologia com o gene CDKN2A. A inativação desse gene tem sido observada com alta frequência juntamente com o CDKN2A (Kamb *et al.*, 1994a; Flores *et al.*, 1996) ou, em baixa frequência, independente do gene CDKN2A (Stone *et al.*, 1995a; Glending *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 1996) em células tumorais e linhagem germinativa. A proteína p19^{ARF} está também frequentemente alterada em melanomas esporádicos e, enquanto compartilha pouca ou nenhuma semelhança com a proteína p16^{INK4a}, é um outro potente inibidor da progressão do ciclo celular que funciona independentemente dos CDKs (Quelle *et al.*, 1995).

Gillanders *et al.*, 2003 estudaram 49 famílias australianas e 33 de outros continentes com pelo menos três membros afetados e que não tinham o envolvimento dos genes CDKN2A e CDK4. Através de análise de ligação de 414 marcadores de pequenas repetições em tandem (STR – *Short Tandem Repeat*) concluíram a possível existência de um novo *locus*, região 1p22, envolvida no melanoma hereditário.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Pesquisar mutações no gene CDKN2A em pacientes com critérios clínicos sugestivos de melanoma hereditário.
- 2) Verificar a frequência das possíveis mutações no gene CDKN2A comparando-as com as da literatura.
- 3) Após a detecção da mutação, auxiliar as famílias afetadas através de aconselhamento genético com ênfase na importância da prevenção de casos novos.

CASUÍSTICA

Mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), processo HCRP nº 1959/2001 e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, registro nº 2350, foram selecionados pacientes com diagnóstico anatomopatológico de melanoma que se enquadravam pelo menos em um dos seguintes critérios de seleção: (a) história de mais de um membro da família afetado; (b) presença de múltiplos tumores primários; (c) aparecimento da neoplasia antes dos 50 anos de idade.

Os pacientes foram submetidos a consultas individuais para esclarecimentos a respeito da pesquisa, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e montagem do heredograma. Após os pacientes foram comunicados por carta a comparecerem ao setor de coleta do HC-FMRP-USP para a coleta de sangue periférico.

Dos 23 pacientes selecionados, não relacionados geneticamente entre si, 22 pacientes aceitaram participar da pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e compareceram para a coleta de sangue (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação dos pacientes, registro no HC-FMRP-USP, idade do diagnóstico de melanoma, presença de tumores múltiplos primários (PTMP) e presença de mais membros da família afetados (PMMFA).

Paciente	Registro	Idade	PTMP	PMMFA
1 – GV	0392629	57 anos	Não	? ^a
2 – OC	0470155	77 anos	Não	? ^a
3 – EAF	0481908	65 anos	Não	Sim (1) ^b
4 – AODJ	0432534	47 anos	Não	Não
5 – AG	0318401	18 anos	Não	Não
6 – VLMM	0544207	53 anos	Não	Sim (3) ^b
7 – ZMB	0515785	58 anos	Não	Sim (1) ^b
8 – MAMP	0521315	43 anos	Não	Sim (1) ^b
9 – OS	0452652	60 anos	Sim (2) ^c	Sim (1) ^b
10 – GSR	0328401	49 anos	Não	Não
11 – MEMB	0548533	46 anos	Não	Não
12 – AMFS	0434804	50 anos	Não	Não
13 – CFL	0485201	45 anos	Não	? ^a
14 – MRSC	0142364	36 anos	Não	Não
15 – NBLP	0329335	42 anos	Não	Não
16 – MAM	0521504	59 anos	Não	Sim (1) ^b
17 – HAS	0261117	44 anos	Não	Não
18 – CAO	0493732	52 anos	Não	? ^a
19 – RB	0472355	50 anos	Não	Sim (2) ^b
20 – FRD	0509209	43 anos	Não	Não
21 – IFCS	0281949	52 anos	Não	? ^a
22 – AKB		22 anos	Não	Sim (2) ^b

(a) : possível membro da família afetado.

(b) : número total de outros membros afetados na família.

(c) : número de tumores primários.

MATERIAIS E MÉTODOS

A análise molecular das amostras coletadas foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, Bloco – C, Departamento de Genética da FMRP-USP.

I – Coleta de Material.

Sangue periférico - foram colhidos cinco a 10ml de sangue venoso periférico, a vácuo, em tubos estéreis contendo EDTA. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos e retirado o plasma, para posterior estoque em freezer a -20°C.

II – Extração do DNA.

A técnica descrita consiste no método de extração salina (proteínase K *salting out*) modificado (Miller et al., 1988):

O sangue coletado foi transferido para um tubo cônico (*eppendorf*) e adicionado 500 µl de solução de lise, contendo sacarose 0,32M, tris-HCl 12mM, MgCl₂ 5mM e triton-X 1%, centrifugado a 13000 rpm por 20 segundos e desprezado o sobrenadante. Em seguida foi adicionado mais um ml de solução de lise, homogeneizado, centrifugado novamente a 13000 rpm por 20 segundos e desprezado o sobrenadante (essa etapa foi repetida 3-4 vezes até se obter um *pellet* limpo – branco). Após foi acrescentado 80 µl de tampão contendo 0,375 M de NaCl e 0,12 M Edta; 280 µl de água *mille-Q*; 10 µl de SDS 20% e 8 µl de proteinase K 25mg/ml, homogeneizado e colocado em banho-maria a 55°C durante 3 a 12 horas.

As amostras então foram colocadas em geladeira (4°C) durante 15 minutos, depois adicionado 120 µl de NaCl 5M, agitado no vortex por 8 segundos, centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e retirado 400 µl do sobrenadante e transferido para outro tubo, desprezando-se o *pellet*. Após é adicionado um mililitro

de etanol absoluto, homogeneizado, colocado no freezer a -85°C por 15 minutos, centrifugado a 14000 rpm em centrífuga refrigerada a 0°C por 10 minutos e colocado novamente no freezer a -85°C por 20 minutos. Depois foi centrifugada a 14000 rpm em centrífuga refrigerada a 0 °C por mais 10 minutos, descartado o sobrenadante, adicionado um mililitro de etanol 70% gelado, centrifugado a 14000 rpm em centrífuga refrigerada a 0 °C por 10 minutos, desprezado o sobrenadante e invertido o tubo para que haja ao final apenas o material do fundo (*pellet*). Centrifugado em seguida em centrífuga aquecida a 37°C por 15 minutos com os tubos abertos, acrescentado 50 µl de água *mille-Q*, agitado e aquecido a 37°C por 60 minutos. Após as amostras com DNA extraído estão prontas para serem congeladas a -20°C.

III - Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR):

Neste trabalho utilizamos a técnica da PCR para amplificação do gene estudado a partir do DNA genômico extraído do sangue periférico. A reação foi realizada em aparelho da marca Stratagene® - Robo Cyclor 40.

Os *primers* utilizados foram adquiridos junto a GIBCO®. Os três éxons do gene p16 foram amplificados pelos seguintes pares de *primers* [letra minúscula em negrito → *primer*; letra minúscula → íntron (região não codificadora); letra maiúscula → éxon (região codificadora)]:

a) Éxon 1

Fragmento amplificado: 276 pares de bases.

cggagagggggagagcaggcagcgggcggcggggagcagcatggagccggcggcggggagcagcATG
 GAGCCTTCGGCTGACTGGCTGGCCACGGCCGCGGCCCCGGGGTCGGGTAG
 AGGAGGTGCGGGCGCTGCTGGAGGCGGGGGCGCTGCCCAACGCACCGAA
 TAGTTACGGTCGGAGGCCGATCCAGgtgggtagagggtctgcagcgggagcaggggatggcg
 ggcgactctggaggacgaagtttgcaggggaattggaatcaggtagcg

Primers (QUESNEL *et al.*, 1995; RASOOL *et al.*, 1995)

Sense: 5'-cggagagggggagagcaggca-3'

Anti-sense: 5'-gcgctacctgattccaattc-3'

b) Éxon 2

Fragmento amplificado: 394 pares de bases.

ttcctttcgtcatgccggccccaccctggctctgaccattctgttctctctggcagGTCATGATGATGG
 GCAGCGCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAA
 CTGCGCCGACCCCGCCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGG
 AGGGCTTCCTGGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCT
 GGACGTGCGCGATGCCTGGGGCCGTCTGCCCCTGGACCTGGCTGAGGAG
 CTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGCGGCTGCGGGGGGCA
 CCAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGCGGAAGGTCCCTCAGgt
gaggactgatgatctgagaatttttac

Primers (QUESNEL *et al.*, 1995)

Sense: 5'-ttcctttccgtcatgccgg-3'

Anti-sense: 5'-gtacaaattctcagatcatcagtctc-3'

c) Éxon 3

Fragmento amplificado: 347 pares de bases

gttttctttctgccctctgcagACATCCCCGATTGAaagaaccagagaggctctgagaaacctccgga
aacttagatcatcagtcaccgaaggtcctacagggccacaactgccccgccacaacccaccccgcttctgtagtttcatt
tagaaaatagagcttttaaaaattcctgcctttaacgtagatataagccttccccactaccgtaaattgccatttatcattttt
atatattcttataaaaatgtaaaaactcacgcccta**aagcgcacattcatgtggg**

Primers (RASOOL *et al.*, 1995)

Sense: 5'-gttttctttctgccctct-3'

Anti-sense: 5'-cccacatgaatgtgcgctt-3'

Para cada éxon foram padronizadas as condições da PCR conforme a Tabela 3.

As condições de ciclagem foram:

Um ciclo de 94° C (temperatura de denaturação) por 5 minutos e 2 minutos à TA (temperatura de *annealing*) específica de cada *primer*; depois 35 ciclos a 72° C por 1 minuto, 94° C por um minuto e TA por 1 minuto; em seguida um ciclo a 72° C por 10 minutos.

Para a verificação da reação, 03 µl do produto da PCR e 01µl de corante (azul de bromofenol, xileno cianol e 01 µl de brometo de etídio) foram aplicados em gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi feita com tampão TBE (tris/borato EDTA) 1X a 100V, por aproximadamente 40 minutos.

Tabela 3 – Condições de amplificação da reação de PCR.

Reagentes	Éxon 1	Éxon 2	Éxon 3
Água	14 µl	12 µl	12 µl
Tampão	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
DNTP 10mM	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Mg ⁺⁺ 50mM	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
<i>Primer 1</i> (10µg/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<i>Primer 2</i> (10µg/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
DMSO	0	2,0	2,0
Taq polimerase (5u/µl)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
DNA (0,1µg/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Temperatura de <i>annealing</i>	62° C	64° C	64° C

IV – Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (*Single Strand Conformational Polymorphism - SSCP*).

A técnica de SSCP consiste na desnaturação do fragmento amplificado pela PCR através de tampão desnaturante e calor seguido da eletroforese do fragmento em gel de poliacrilamida. A presença de apenas uma base alterada no fragmento amplificado pode induzir a uma mudança na conformação estrutural adquirida pela fita simples de DNA que poderá ser detectada por meio de diferenças na mobilidade migratória no gel (Hayashi & yandell, 1993).

A técnica de SSCP foi realizada conforme o protocolo abaixo:

• Preparo das amostras:

Num tubo de 100 µl foi pipetado 3 µl do produto da PCR, 3 µl de solução denaturante (azul de bromofenol : 0,015 g; xileno-cianol : 0,015 g; EDTA 0,5 M pH 8,0 : 200 µl; formamida deionizada : 9,75ml), desnaturado a 94 °C por 5 minutos e colocado no gelo por pelo menos 2 minutos. Em seguida foram aplicadas 4 a 6 µl dessa solução em gel de acrilamida 8% e corrido em tampão TBE 1X a 80 V, 5 mA e 8W por 6 a 8 horas em temperatura de 4 °C.

• Coloração com prata:

Após a eletroforese o gel foi fixado com etanol 10% por 10 minutos e com ácido nítrico (1,54 ml de ácido nítrico em 100 ml de água) por 3 minutos. Em seguida foi lavado em água *mille-Q* até serem eliminados os fixadores (3 vezes). Depois o gel foi impregnado por 20 minutos em solução de prata 0,2%, lavado 3 vezes com água *mille-Q* e revelado com solução de carbonato de sódio (6g de carbonato de sódio em 200 ml de água e 108 µl de formaldeído). A reação de

revelação foi interrompida com ácido acético 5% e após o gel foi deixado secando entre duas folhas de papel celofane molhadas com água e embebidas em solução de glicerol 15%.

V – Reação de Seqüenciamento Automático.

As amostras que apresentaram um padrão de banda que diferia do controle normal (N) no SSCP foram seqüenciadas de acordo com o seguinte protocolo: num tubo cônico pequeno (*eppendorf* de 100 µl) foi adicionado 2 µl de *BigDye*; 1µl de *Primer* (3,2 mM); 0,5 a 2,0 µl do produto da PCR, conforme a intensidade da banda no gel e completado com água *Milli-Q* para um volume total de 6 µl de reação. A ciclagem usada foi a mesma da PCR específica para cada *primer*.

• Precipitação da reação de seqüenciamento.

Depois de realizada a reação de seqüenciamento a mesma foi precipitada adicionando-se a ela 80 µl de isopropanol absoluto, homogeneizado no vortex (levemente), incubado por 15 minutos à temperatura ambiente protegido da luz, centrifugado por 45 minutos na rotação de 3000 rpm e desprezado o sobrenadante. Em seguida adicionado 200 µl de etanol 70% gelado, centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm e desprezado o sobrenadante. Depois o *eppendorf* foi deixado secando por 1 hora a temperatura ambiente ou por 30 minutos a 37° C.

- **Seqüenciador automático.**

Depois de precipitadas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto para o seqüenciamento automático utilizando um equipamento ABI Prism 377, Applied Biosystems®.

RESULTADOS

I - Análise de mutação pelo SSCP

A técnica do SSCP mostrou alterações dos padrões de migrações das bandas em alguns pacientes. Esses pacientes foram selecionados para o sequenciamento (Figuras 2, 3 e 4).

Exon 1 : Figura 2.

Todos os pacientes apresentaram um padrão de migração das bandas igual ao controle normal (N) com exceção do paciente 19 selecionado para sequenciamento.

Figura 2 - Padrões de bandas obtidos pela técnica de SSCP para o **éxon 01**. Os números acima correspondem ao número de cada paciente conforme Tabela 01.

Éxon 2: Figura 3.

Para o éxon 2 o paciente número 8 apresentou um padrão de migração das bandas diferente do controle normal e foi selecionado para seqüenciamento. Os demais tiveram um padrão de migração igual ao N.

Figura 3 - Padrões de bandas obtidos pela técnica de SSCP para o éxon 2. Os números acima correspondem ao número de cada paciente conforme Tabela 01.

Éxon 3 : Figura 4.

O éxon 3 apresentou o maior número de pacientes com alterações no padrão de migração das bandas em relação ao controle N. Entre os pacientes que apresentaram alterações na migração houve semelhanças no padrão de bandas. Dentre os pacientes que apresentaram padrões diferentes do controle N e semelhantes entre si foi selecionado apenas um para o seqüenciamento.

Figura 4 - Padrões de bandas obtidos pela técnica de SSCP para o **éxon 03**. Os números acima correspondem ao número de cada paciente conforme Tabela 01.

Desta maneira, dentre os pacientes 1, 4 e 9 que apresentaram um igual padrão de bandas, foi selecionado apenas o 4 para seqüenciamento. Dentre os pacientes 5, 7, 10 e 11 foi selecionado o 10. Dentre os 14 e 15 foi selecionado o 15 e dentre os 17, 18 e 21 foi selecionado o 21. Seqüenciado também o paciente oito por apresentar um padrão totalmente diferente dos demais e do controle N.

II – Seqüenciamento.

Éxon 1.

O paciente 19, único a apresentar uma padrão de bandas diferente do controle normal no éxon 1, revelou no seqüenciamento um **N** na posição 142 em função de uma sobreposição de ondas no cromatograma que representam os nucleotídeos **C** e **A** nessa posição. Isto determina que o paciente é heterozigoto e possui um alelo com o nucleotídeo **C** na posição 142 (normal) e outro alelo com o nucleotídeo **A** (mutado) (Figura 5). Essa transversão **C** → **A** num dos alelos altera o códon 48 CCG para ACG levando a mudança do aminoácido prolina para treonina nessa posição (P48T) na proteína p16^{ink4a}. Essa mutação foi descrita por Moore *et al.*, 2000 em um paciente italiano com câncer pancreático e por Della Torre *et al.*, 2001 em uma família também italiana com melanoma maligno cutâneo.

Éxon 2.

O seqüenciamento do éxon 2 do paciente 8 mostrou uma transição **G** para **A** na posição 442 nos dois alelos (homozigoto). Esta alteração provoca a troca do aminoácido alanina pela treonina na posição 148 da proteína p16^{ink4a} (Ala148Thr ou A148T). Esta alteração foi descrita pela primeira vez por Hussussian *et al.*, 1994 sendo considerada um polimorfismo no éxon 2 do gene CDKN2A (Figura 6).

Figura 5 - Cromatograma do paciente 19, éxon 1. Seta mostrando a sobreposição das ondas que representam os nucleotídeos C e A na posição 142.

Figura 6 - Cromatograma do paciente 8, éxon 2, mostrando a troca G para A na posição 442 (seta).

Éxon 3.

O seqüenciamento do fragmento amplificado pela PCR que contem o éxon 3 não revelou alterações na região codificadora, ou seja, no éxon propriamente dito. Entretanto, mostrou alterações já reconhecidas como polimórficas nas posições 500 e 540 da região 3' não traduzida (UTR) do éxon (Holland *et al.*; 1995) justificando dessa maneira as alterações dos padrões de bandas obtidas pelo SSCP.

O paciente 8 que apresentou um padrão de banda totalmente diferente dos demais, inclusive do controle N, no seqüenciamento apresentou um polimorfismo na posição 500 **C>G** nos dois alelos (Homozigoto) (Figura 7).

Figura 7 - **A**, cromatograma normal do éxon 03 mostrando o nucleotídeo C na posição 500. **B**, cromatograma do paciente 8, éxon 3, mostrando a troca da base C por uma G na posição 500 nos dois alelos.

Tanto no seqüenciamento do paciente 4 (que mostrou um padrão de bandas igual aos pacientes 1 e 9), como no paciente 21 (com padrão de bandas igual ao 17 e 18) também foram observados o polimorfismo 500 C>G na região 3' UTR do éxon 3 nos dois alelos (homozigoto) (Figura 8).

Figura 8 - **A**, cromatograma normal do éxon 03 mostrando o nucleotídeo C na posição 500. **B** e **C**, cromatogramas dos pacientes 4 e 21 respectivamente, éxon 3, mostrando alelos homozigóticos com um G (polimórfico) na posição 500.

O paciente 10 (que possui um padrão de bandas igual aos pacientes 5, 7 e 11) e o paciente 15 (padrão de bandas igual ao 14) mostraram no seqüenciamento o polimorfismo 540 C>T somente em um dos alelos (heterozigoto). Essa conclusão é obtida através do cromatograma que mostra na posição 540 da região 3' UTR do éxon 3 um N resultante da sobreposição das ondas C e T no cromatograma (Figura 9).

Figura 9 - A, cromatograma normal do éxon 03 com nucleotídeo C na posição 540. B e C, cromatogramas dos pacientes 10 e 15 respectivamente com N na posição 540 indicando heterozigose.

A tabela a seguir (Tabela 4) mostra um resumo de todas as alterações encontradas pelo SSCP e confirmadas pelo seqüenciamento nos 22 pacientes.

Tabela 4 – Alterações encontradas nos 22 pacientes.

Paciente	Éxon 1	Éxon 2	Éxon 3
1			500 C>G (P)**
2			
3			
4			500 C>G (P)**
5			540 C>T (P) *
6			
7			540 C>T (P) *
8		A148T (P)**	500 C>G (P)**
9			500 C>G (P)**
10			540 C>T (P) *
11			540 C>T (P) *
12			
13			
14			540 C>T (P) *
15			540 C>T (P) *
16			
17			500 C>G (P)**
18			500 C>G (P)**
19	P48T (M)*		
20			
21			500 C>G (P)**
22			

** Homozigoto

* Heterozigoto

(P): Polimorfismo

(M): Mutação

DISCUSSÃO

O SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) é uma técnica eficiente para detectar mutações e polimorfismos em cânceres humanos e outras doenças genéticas. Esse exame seguido de seqüenciamento de nucleotídeos, no caso de migração alterada, é o método mais comum de investigação, tendo sido utilizado em praticamente todos os trabalhos consultados (Flores *et al.*, 1997; Soufir *et al.*, 1998 entre outros). No atual estudo, para a detecção de substituições, deleções ou inserções de uma base ou de uma seqüência curta de nucleotídeos foi utilizada essa técnica, descrita por Orita *et al.* (1989).

Nesse trabalho foi observado que todas as alterações de migração de bandas encontradas no SSCP corresponderam a diferenças na seqüência de bases do DNA confirmados pelo seqüenciamento dos fragmentos amplificados pela PCR. Foram alterações no genoma já relatadas como mutações ou polimorfismos anteriormente. Isso reforça o conceito de que o SSCP é um bom exame de triagem para mutações podendo ser utilizado em Serviços de Genética. Um dos géis de eletroforese evidenciou até a formação de um heteroduplex no éxon 1 do paciente 19 (Figura 2). Esta alteração corresponde a uma molécula de DNA (fita dupla) híbrida formada pelas fitas simples de dois alelos distintos. Isto pode ocasionar erros de pareamento envolvendo às vezes apenas um par de bases, levando a formação de dobras na molécula e influenciando na velocidade de migração das mesmas no gel de eletroforese.

Neste trabalho investigou-se a presença de mutações nos três éxons do gene CDKN2A em um conjunto de pacientes que se enquadravam em alguns dos critérios clínicos (portador de melanoma com idade inferior a 50 anos, mais de um membro da família afetado ou a presença de múltiplos tumores primários) que poderiam servir para selecionar prováveis portadores de melanoma hereditário. A média de idade foi

de 48,5 anos. Dos 22 casos selecionados, não relacionados geneticamente entre si, cinco (22,7%) apresentavam mais um membro da família afetado, dois (9,1%) com mais dois membros afetados e apenas um caso (4,5%) com mais três afetados (Tabela 5).

Tabela 5 - Classificação das famílias por número de afetados.

Nº de Afetados na Família	Nº de Famílias	Nº de Identificação na Tabela dos Pacientes
Apenas 1	14	1,2,4,5,10,11,12,13,14,15,17,18,20 e 21
2	5	3,7,8,9 e 16
3	2	19 e 22
4	1	6

Todas as alterações encontradas pelo SSCP nos éxons 2 e 3, confirmadas pelo seqüenciamento, resultaram de três polimorfismos já descritos dentro do gene CDKN2A. No total 13 casos (59,1%) apresentaram polimorfismos localizados em algum dos dois éxons, sendo que o paciente 8 apresentou dois polimorfismos em homozigose (Tabela 4).

Os polimorfismos e suas freqüências variam muito em diversos trabalhos na literatura provavelmente devido à etnia e à miscigenação de cada população estudada. Platz *et al.* (1997), ao estudarem 181 indivíduos pertencentes a famílias suecas, encontraram apenas três (1,7%) com um polimorfismo (A148T ou 442 A>G). Flores *et al.* (1997), pesquisando 30 famílias australianas, observaram um total de 16 (53,3%) delas com três polimorfismos, 318 G>A (3,3%), 442 A>G (13,3%) e 500

C>G (53,3%). As frequências dos três polimorfismos encontrados no atual estudo são 500 C>G (31,9%), 540 C>T (27,3%) e A148T (= 442 A>G) (4,5%) (Tabela 4). Os resultados encontrados nessa pesquisa são semelhantes aos de Flores *et al.* (1997) provavelmente pela variedade étnica e miscigenação da nossa população.

Clinicamente, uma característica chave nas síndromes de câncer hereditário é o início numa idade jovem. No entanto, em nenhum dos 11 pacientes com menos de 50 anos desta pesquisa foi encontrado uma mutação no gene estudado. Este resultado está de acordo com o relato de Tsao *et al.* (2000) que pesquisaram mutações no gene CDKN2A em 49 pacientes com melanoma em idade jovem (<40anos) independente de história familiar positiva ou não. Eles encontraram apenas uma paciente (2%) com a mutação M53I entre 49 pacientes. Segundo os autores, a prevalência de mutações no gene CDKN2A em pacientes com melanoma na idade jovem é baixa e isso confirma a idéia de que muitos casos familiares representam na verdade grupos de melanomas esporádicos entre fenótipos de alto risco ou ainda, a possibilidade da existência de outros genes suscetíveis relacionados ao melanoma que podem contribuir para o início da doença. Soma-se a isso o fato de que a metodologia empregada no atual trabalho (PCR-SSCP e seqüenciamento) detecta mutações de ponto nas regiões codificadoras do gene e grandes deleções bialélicas. Entretanto, não podemos excluir deleções monoalélicas, mutações na região promotora do gene e ainda a hipermetilação como um mecanismo de inativação do gene CDKN2A sendo que a possível existência de um gene envolvido no mecanismo de *imprinting* na região cromossômica 9p, que poderia predispor ao melanoma hereditário, ainda é desconhecida (Soufir *et al.*, 1998).

Um outro grupo que se esperaria ser mais suscetível a alterações genéticas são os pacientes com mais de um tumor primário. Nesse estudo foi encontrado

apenas um paciente com dois melanomas cutâneos, um na região dorsal e outro na coxa esquerda com um exame anatomopatológico interrogando ser primário ou metastático (paciente 9). Esse paciente apresentou alteração no SSCP somente no éxon 3 e o seqüenciamento revelou o polimorfismo 500 C>G na região 3' não traduzida (UTR) do éxon nos dois alelos (homozigoto). Este resultado está de acordo com a revisão de Hayward (2003) na qual refere que para o grupo de pacientes que desenvolveu mais de um tumor primário a prevalência de mutações no gene CDKN2A é relativamente baixa e conclui que a maioria dos melanomas com mutações no gene tem história positiva da doença na família.

Atualmente as pesquisas em melanoma familiar em todo o mundo sugerem que a prevalência de mutações no gene CDKN2A varia muito entre os continentes e também entre grupos de pacientes na mesma região. Por exemplo, Hussussiam *et al* (1994) relataram 13 de um total de 18 famílias dos Estados Unidos da América com mutação no gene (72%). Enquanto Kamb *et al* (1994), no mesmo país, encontraram mutações somente em duas de 36 famílias (5,5%). Na Europa, mutações no gene CDKN2A foram relatadas em um grande número de famílias na França (Soufir *et al.*, 1998) e em apenas cinco de 64 famílias suecas (7,8%) (Platz *et al.*, 1997). Na Austrália, entre outros estudos, Walker *et al.* (1995) encontraram mutações em sete de 18 famílias (38,8%) enquanto Holland *et al.* (1995) relataram apenas uma entre 17 famílias com melanoma familiar (5,8%).

A única mutação encontrada nesse estudo, P48T no éxon 1 do paciente 19, nos dá uma prevalência de 4,5 % se levarmos em consideração todos os casos selecionados (n=22). Entretanto, se considerarmos apenas as famílias com dois ou mais membros afetados (n=8) a prevalência é de 12,5 % e se nos restringirmos às famílias com 3 ou mais membros afetados (n=3) a prevalência é de 33,3%. Segundo

Holland *et al.* (1999), existe uma forte correlação entre história familiar e probabilidade de detecção de mutação no gene CDKN2A. Essa probabilidade é maior se o número de casos confirmados na família forem 3 ou mais e ela não é significativamente diferente em famílias com 4 ou mais casos.

Soufir *et al.* (1998) estudaram 48 famílias com melanoma, 20 com pelo menos três membros afetados e 28 com pelo menos dois afetados sendo que um deles apresentou o início da doença antes dos 50 anos. Dezesesseis mutações diferentes no gene CDKN2A foram encontradas em 21 famílias (44%), uma das mais altas prevalências de mutações observadas nesse gene em todo o mundo. Segundo esses autores, a discrepância de seus dados em relação a outras prevalências bem mais baixas na literatura pode ser explicada de duas maneiras. Primeiro, a proporção de melanomas hereditários com ligação genética à região 9p pode diferir amplamente entre as populações. Segundo, os critérios de seleção de melanomas hereditários por eles utilizados são mais restritivos que aqueles usados em outros estudos e, dessa maneira, diminuiriam a probabilidade dos melanomas hereditários selecionados serem na verdade casos esporádicos.

A mutação P48T foi descrita pela primeira vez por Moore *et al.* (2000) em um paciente italiano com câncer pancreático. Della Torre *et al.* (2001) estudaram 15 famílias italianas com melanoma e entre outras mutações no gene CDKN2A relataram novamente a mutação P48T. Segundo os autores, a mutação claramente segrega com o melanoma na família e na análise funcional da proteína mutada, esta se mostra alterada na inibição do crescimento e da progressão do ciclo celular. Entretanto, testes *in vitro* de ligação ao CDK demonstram que a variante P48T retém alguma atividade colocando-a na categoria dos mutantes que estão parcialmente danificados. O paciente relatado no trabalho atual com a mutação P48T possui

ascendência italiana o que nos faz levantar a hipótese de um ancestral comum já que muitas das mutações já relatadas em melanoma familiar têm como origem uma mutação fundadora (Ciotti *et al.*, 2000; Yakobson *et al.*, 2003).

A associação melanoma familiar e câncer pancreático é conhecida. Muitos autores descreveram pacientes com os dois tumores e a presença de mutação do gene CDKN2A (Parker *et al.*, 2003; Bartsch *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2001). Levando em consideração o relato de um paciente com câncer pancreático e a presença da mutação P48T no gene CDKN2A em linhagem germinativa, deve-se considerar a necessidade de um rastreamento de tumores pancreáticos nos indivíduos portadores dessa mutação e seus familiares.

O resultado dessa pesquisa mais os dados levantados na literatura mostram que deve haver uma relação do melanoma hereditário com alterações no gene CDKN2A. Assim como a interação desse gene com outros cânceres. Entretanto, há ainda muito para se pesquisar principalmente no que diz respeito ao produto dessas alterações, ou seja, a proteína mutada e sua análise funcional para uma melhor avaliação de sua ação no ciclo celular. O maior conhecimento das bases moleculares que envolvem essa doença poderá no futuro diminuir ainda mais a morbidade e a mortalidade associadas ao melanoma especialmente o hereditário.

CONCLUSÕES

Ao final deste estudo, conclui-se que:

- 1) Em um ambulatório de oncologia, em especial de melanoma, devem ser sempre avaliados os critérios clínicos para doença hereditária, principalmente a existência de outros membros da família afetados, para a identificação de possíveis casos familiares e a indicação de triagem de mutações associadas à doença. Isso permite um aconselhamento genético adequado e posterior detecção de portadores assintomáticos.
- 2) A pesquisa de mutações no gene CDKN2A deve ser realizada principalmente em famílias com melanoma com dois ou mais membros afetados.
- 3) A técnica de PCR-SSCP pode ser utilizada em Serviços de Genética como bom método de triagem de mutações de ponto no gene CDKN2A.
- 4) O seqüenciamento deve ser realizado nos casos índices (propósitos) de cada família para identificar se o padrão de migração do SSCP se deve a um polimorfismo ou a uma mutação. No último caso o SSCP poderá ser utilizado posteriormente para os outros membros da família sem a necessidade do seqüenciamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bartsch DK, *et al.* CDKN2A germline mutations in familial pancreatic cancer. **Ann Surg.** 236(6):730-7,2002.

Biggs JR, Kraft AS. Inhibitors of cyclin-dependent kinases and cancer. **J Mol Med** 73:509-514, 1995.

Ciotti P *et al.* A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. **Am J Hum Genet.** 67(2):311-319, 2000.

Flores JF *et al.* Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes as well as neighboring 9p21 markers in sporadic melanoma. **Cancer Res** 56:5023-5032, 1996.

Flores JF *et al.* Analysis of the CDKN2A, CDKN2B and CDK4 genes in 48 Australian melanoma kindreds. **Oncogene** 15: 2999-3005, 1997.

Gillandersn E *et al.* Localization of a novel melanoma susceptibility locus to 1p22. **Am J Hum Genet.** 73:301-313, 2003.

Glendening JM *et al.* Homozygous loss of the p15INK4B gene (and not the p16INK4 gene) during tumor progression in a sporadic melanoma patient. **Cancer Res.** 55(23):5531-5535, 1995.

Grander D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer ? **Med Oncol** 15:20-26, 1998.

Greene MH. The Genetics of Hereditary Melanoma and Nevi. **American Cancer Society**, Contents 86/8, Supplement October 15, 1999, 1644-1657, 1998.

Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF induced cell cycle arrest. **Nature** 371:257-261, 1994.

Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum Mut** 2(5):338-348, 1993.

Holland EA *et al.* Analysis of the p16 gene, CDKN2A, in 17 Australian melanoma Kendreds. **Oncogene** 11:2289-2294, 1995.

Holland EA *et al.* CDKN2A (p16INK4a) and CDK4 mutation analysis in 131 australian melanoma probands: effect of family history and and multiple primary melanomas. **Genes Chromosomes Cancer** 25:339-348, 1999.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell** 79:573-582, 1994.

Hussussian CJ *et al.* Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nat Genet.** 8(1):15-21, 1994.

Kamb A *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science** 264:436-440, 1994.

Larsen CJ. p16^{INK4a} : a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression. **Oncogene** 12:2041-2044, 1996.

Lynch HT *et al.* Update on familial pancreatic cancer. **Curr Gastroenterol Rep.** 3(2):121-8, 2001.

Mao L *et al.* A novel p16^{INK4a} transcript. **Cancer Res** 55(14):2995-2997, 1995.

Moore PS *et al.* A novel germline mutation, P48T, in the CDKN2A/p16 gene in a patient with pancreatic carcinoma. **Hum Mutat.** 16(5):447-8, 2000.

Orita M *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 86(8):2766-70, 1989.

Parker JF *et al.* Pancreatic carcinoma surveillance in patients with familial melanoma. **Arch Dermatol.** 139(8):1019-25, 2003.

Parker SL *et al.* Cancer statistics. **CA Cancer J Clin.** 47(1), 5-27, 1997.

Platz A *et al.* Screening of germline mutations in the CDKN2A and CDKN2B genes in Swedish families with hereditary cutaneous melanoma. **J Natl Cancer Inst** 89(10):697-702, 1997.

Quelle DE *et al.* Alternative reading frame of the INK4A tumor supressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. **Cell** 83:993-1000, 1995.

Quelle DE *et al.* Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16^{INK4a} but not by the alternative reading frame protein p19^{ARF}. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 669-673, 1997.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniats J. Molecular cloning – A laboratory manual. 2 ed. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, 1989.

Schafer KA. The cell cycle: a review. **Vet Pathol.** 35:461-478, 1998.

Soufir N *et al.* Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. **Hum Molec Genet** 7:209-216, 1998.

Stone S *et al.* Complex structure and regulation of the p16 (MTS1) locus. **Cancer Res** 55:2988-2994, 1995.

Tsao H *et al.* Low Prevalence of Germline CDKN2A and CDK4 Mutations in Patients With Early-Onset Melanoma. **Arch Dermatol.** 136:1118-1122, 2000.

Tucker MA *et al.* Melanoma etiology: where are we? **Oncogene.** 22:3042-3052, 2003.

Walker GJ *et al.* Mutations of the CDKN2/p16INK4 gene in australian melanoma kindreds. **Hum Mol Genet.** 4:1845-1852, 1995.

Yakobson E *et al.* A single Mediterranean, possibly Jewish, origin for the Val59Gly CDKN2A mutation in four melanoma-prone families. **Eur J Hum Genet.** 11(4):288-296, 2003.