MARCOS ANTONIO RODRIGUES MARTINEZ

**Estudo das alterações dos microssatélites D6S251 e
D6S252 no carcinoma basocelular esporádico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Cyro Festa Neto

**São Paulo
2006**

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Kátia Rocha Martinez**, pelo carinho, amizade e apoio
nos momentos difíceis, além da paciência e compreensão
ao longo desses anos de cumplicidade e amor.

Aos meus queridos irmãos **José Roberto e Lílían Cristina** que com carinho,
amizade e incentivo, contribuíram muito para meu desenvolvimento pessoal

Aos meus queridos pais **Vicente e Leonora** (*in memoriam*)
pelos ensinamentos, princípios e pela minha existência.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Cyro Festa Neto**, orientador deste trabalho, pela paciência, confiança, amizade, entusiasmo e ensinamentos científicos essenciais para que pudesse realizá-lo.

À **Profa. Dra. Itamar Romano Ruiz**, do laboratório de genética do Instituto Butantan, por sua dedicação, respeito, ensinamentos e por acreditar em mim e no meu trabalho.

Aos **Profs. Drs. Evandro Rivitti e Luiz Carlos Cucé**, pela cordialidade e oportunidade de ingresso na pós-graduação da FMUSP.

Aos **Profs. Drs. José A. Sanches Jr., Valéria Aoki e Marcus Maia**, pela arguição no exame de qualificação, proporcionando-me mais ensinamentos e subsídios para o término desta dissertação.

À **Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto**, pelo suporte financeiro e avaliação histológica dos espécimes estudados.

Ao **Prof. Dr. Luiz Henrique Camargo Paschoal**, pelos ensinamentos durante a residência médica e apoio durante a pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Eugênio Pimentel**, pelo auxílio na seleção de casos e disponibilização do centro cirúrgico para a realização das cirurgias.

À **Sra. Eli Maria de Freitas Ferreira**, pelo auxílio nos assuntos burocráticos.

À **Dra. Sandra S. Pato**, diretora do Ambulatório de especialidades Dr. Domingos Ítalo Le Vocci, pelo apoio e compreensão durante a realização do meu trabalho.

Aos amigos dermatologistas **Paulo Eduardo Trindade Filho, Jefferson Alfredo de Barros e Daniela Presente Taniguchi** pelo incentivo, amizade e coleguismo.

Aos queridos amigos **Waldykson Fernando de Souza, Rogério Duque de Almeida, Milena Abdalla e Fábio M. Monteiro** por todos esses anos de amizade e convívio.

Ao **Prof. Dr. Carlos D. Machado Filho**, pelos ensinamentos cirúrgicos e incentivo.

A todos os **médicos assistentes e residentes dos Departamentos de Dermatologia da FMUSP e da FMABC**, pelo auxílio na seleção dos pacientes e pelo convívio diário.

Aos amigos do Laboratório de Genética do Instituto Butantan; **Rodrigo, Luciana, Marcelo, Losanges, Anelise e Juliana** pelo auxílio e cordialidade durante este ano de convívio.

Ao amigo **Guilherme Francisco**, biólogo e pós-graduando da FMUSP pelos ensinamentos e ajuda na realização dos PCRs e géis de poliacrilamida, além é claro, do excelente gosto musical.

A **todos os pacientes** que a mim confiaram a condução de seus tratamentos além de terem me ensinado a viver com esperança, simplicidade e otimismo.

"Alteri ne facias quod tibi fieri non vis"
“Não faça a outrem o que não desejarias que fosse feito a ti”

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	07
3. REVISÃO DA LITERATURA	09
3.1 Conceitos Básicos em Genética Molecular	10
3.1.1 Microssatélites	13
3.1.2 Instabilidade de microssatélites (MSI)	18
3.1.3 Implicações clínicas da MSI	19
3.1.4 Perda de heterozigosidade (LOH)	22
3.2 Genética molecular aplicada ao CBC	24
4. MÉTODOS	33
4.1 Casuística	34
4.2 Métodos	39
4.2.1 Obtenção das amostras e extração do DNA	39
4.1.2 Avaliação de LOH e MSI nos microssatélites	41
5. RESULTADOS	45
5.1 Microssatélite D6S251	46
5.2 Microssatélite D6S252	49
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	58
8. ANEXOS	60
9. REFERÊNCIAS	69

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CBC	carcinoma basocelular
CCNM	câncer cutâneo não-melanoma
CEC	carcinoma espinocelular
D	direita
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
Dr.	doutor
E	esquerda
EDTA	ácido tetracético etilenodiamina
Et al.	e outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GDP	difosfato de guanosina
GST	gene supressor de tumor
GTP	trifosfato de guanosina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HNPCC	câncer colo-retal hereditário sem polipose
Kb	kilobases
LOH	perda de heterozigosidade
mL	mililitros
μL	microlitros
mM	milimolar

MM	melanoma maligno
MMR	sistema de reparo de DNA
MSI	instabilidade de microssatélites
PB	pares de bases
PCR	reação da polimerase em cadeia
Prof.	professor
PTCH	gene Patched
PTCH 1	gene Patched 1
PTCH 2	gene Patched 2
RER	erro de replicação
Rpm	rotações por minuto
SNBC	síndrome do nevo basocelular
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	ultravioleta
UVB	raios ultravioleta tipo B
USP	Universidade de São Paulo
V	volt

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Organização do material genético da célula eucariótica	11
Figura 2 - Estrutura e função dos genes	13
Figura 3 - Representação esquemática de um microssatélite a partir de um cromossomo	15
Figura 4 - Organização do Genoma Humano e as seqüências repetitivas .	16
Figura 5 - Representação da localização dos microssatélites D6S251 e D6S252 no braço longo do cromossomo seis (6q14-16)	17
Figura 6 - Modelo mostrando as mutações genéticas que ocorrem na progressão de adenoma para carcinoma colo-retal	19
Figura 7 - Modelo para elucidação molecular da LOH	23
Figura 8 - Representação das funções dos proto-oncogenes e oncogenes no ciclo celular	26
Figura 9 - Representação das funções dos genes supressores de tumor no ciclo celular	27
Figura 10 - Dano ao DNA produzido pela radiação ultravioleta (UV) contida na luz solar	28
Figura 11 - Representação esquemática da MSI e LOH que podem ocorrer nos <i>loci</i> 6q14-16 onde estão localizados os microssatélites D6S251 e D6S252	31
Figura 12 - Organograma demonstrando a casuística final estudada de 26 CBCs para o microssatélite D6S251 e 15 CBCs para o D6S252	35
Figura 13 - Resolução das amostras 6 e 12 em gel de poliacrilamida onde a MSI é representada pela seta (←) nas amostras tumorais (6t e 12t) em comparação com os controles 6n (pele normal) e 12s (sangue/leucócitos) para o microssatélite D6S251. À esquerda observa-se o marcador de peso molecular (100 a 200 pb <i>ladder</i>)	46

Figura 14 -	Resolução das amostras 9, 10, 18 e 24 em gel de poliacrilamida com LOH representada pelo asterisco (*) nas amostras tumorais (9t, 10t, 18t e 24t) em comparação com a pele normal (n) para o microssatélite D6S251	47
Figura 15 -	Padrões normais do microssatélite D6S251 após resolução em poliacrilamida. Nesta figura, vemos o marcador de peso molecular (100 – 200 pb <i>ladder</i>) e as amostras 2 e 26 representadas pela pele normal (n) e tumor (t) exibindo padrões semelhantes de bandas	48
Figura 16 -	LOH e MSI nas amostras de CBC de alto e baixo risco para o microssatélite D6S251	48
Figura 17 -	Padrões normais do microssatélite D6S252 após resolução em poliacrilamida. Nesta figura, podemos ver tecido normal sendo pele (n) e/ou sangue(s) e tumores (t) mostrando padrões semelhantes de bandas. Vemos aqui representadas as amostras 5, 6 e 20, além do marcador de peso molecular (M) .	49

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1 - Relação entre proto-oncogene, tipo de alteração e tipo de câncer	25
Tabela 2 - Algumas alterações na estrutura genômica do CBC e em outros tumores cutâneos	30
Tabela 3 - Amostras de CBC estudadas e excluídas, localização do tumor e classificação histopatológica de risco para o microssatélite D6S251	37
Tabela 4 - Amostras de CBC estudadas e excluídas, localização do tumor e classificação histopatológica de risco para o microssatélite D6S252	38
Tabela 5 - Lista dos <i>primers</i> utilizados na obtenção dos padrões de microssatélites D6S251 e D6S252	42
Tabela 6 - CBCs incluídos no estudo e que apresentaram alterações do microssatélite D6S251	47

RESUMO

Martinez MAR. *Estudo das alterações dos microssatélites D6S251 e D6S252 no carcinoma basocelular esporádico* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 78p.

O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia maligna mais comum em humanos. As alterações genéticas que ocorrem no desenvolvimento do CBC são apenas parcialmente compreendidas. Há muito interesse na determinação das bases genéticas do CBC que expliquem o fenótipo localmente invasivo e o comportamento metastático infrequente desse tumor cutâneo. Nós investigamos a presença de Instabilidade de microssatélites (MSI) e Perda de heterozigosidade (LOH) nos microssatélites D6S251 e D6S252 (6q14-16) de CBCs esporádicos de alto e baixo risco, evidenciados através de visualização da mobilidade e intensidade de bandas obtidas pela eletroforese em gel de poliacrilamida após PCR específico em comparação com o controle normal (pele/sangue) obtidos do mesmo paciente. Encontramos para o microssatélite D6S251, alterações em 6 das 26 amostras de CBC estudadas (23,07 % do total). MSI foi observada em 2 amostras de alto risco, que corresponde a 7,69 % de todas as amostras e 15,38 % das de alto risco). LOH foi observada em 4 amostras, que corresponde a 15,38 % do total e 30,76 % das de alto risco). Tanto MSI como LOH ocorreram apenas em amostras de CBC de alto risco (46,15 % das amostras de alto risco), que sugere o provável envolvimento da região 6q14 na diferenciação do CBC. Não observamos qualquer alteração do microssatélite D6S252 nas 15 amostras estudadas em comparação com o controle. Futuros estudos devem ser realizados com a finalidade de identificar genes relacionados ao CBC e sua diferenciação, focando na região 6q14 onde o microssatélite D6S251 está localizado.

Descritores: carcinoma basocelular/ genética, instabilidade cromossômica, perda de heterozigosidade, repetições de microssatélites, neoplasias cutâneas

SUMMARY

Martinez, MAR. *Study of alterations in microsatellites D6S251 and D6S252 in sporadic basal cell carcinoma* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006. 78p.

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common human neoplasm. The genetic alterations underlying BCC development are only partly understood. Much interest lies in determining the genetic basis of BCC to explain the unique locally invasive phenotype and infrequent metastatic behavior of these skin tumors. We have analyzed microsatellites D6S251 and D6S252 (6q14-16) patterns of sporadic BCC tumor samples using PCR-based assay. All tumor samples were divided into high- and low-risk histological subtypes and compared to controls as normal skin and/or leucocytes. We have encountered D6S251 alterations in 6 of 26 BCC samples (23.07%). Microsatellite instability (MSI) was found in 2 high-risk tumor samples, corresponding to 7.69 % of all sporadic BCC samples and 15.38 % high-risk samples. Loss of heterozygosity (LOH) was observed in 4 BCC samples, representing 15.38 % of all BCC samples studied and 30.76% of high-risk samples. Both LOH and MSI occurred in high-risk BCC samples (46.15% of high-risk BCC samples), suggesting the 6q14 region could be involved in BCC differentiation. We have not found any alteration in D6S252 microsatellite in 15 samples studied in comparison with normal control tissues. Further studies will be carried out in the aim of identification of related genes involved with BCC and its differentiation, particularly focusing on the 6q14 region where microsatellite D6S251 is located.

Descriptors: basal cell carcinoma / genetics, chromosomal instability, loss of heterozygosity, microsatellites repeats, skin neoplasms

1 INTRODUÇÃO

O câncer cutâneo não-melanoma (CCNM) continua sendo o mais incidente em nosso País em ambos os sexos. Embora de baixa letalidade e apresentando altas taxas de cura clínica, pode provocar morbidade considerável, onerando os serviços de saúde. Por tratar-se de neoplasias malignas de bom prognóstico, é provável que exista sub-registro devido à característica indolente e instituição de tratamento adequado e oportuno. Por esta razão, as estimativas das taxas de incidência e dos números esperados de casos novos de CCNM devem ser consideradas como estimativas mínimas¹. No Brasil estima-se uma incidência aproximada de 142 mil novos casos de CCNM em 2005¹.

O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia maligna cutânea mais freqüente, representando aproximadamente 75% dos CCNM no mundo ocidental². Nos Estados Unidos o CBC é o tipo de câncer mais diagnosticado, com quase um milhão de casos estimados por ano³.

Os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do CBC são bem conhecidos e incluem raça, idade, gênero, exposição à radiação ultravioleta (UV) e capacidade individual de reparação do ácido desoxirribonucléico (DNA)⁴. A exposição excessiva ao ultravioleta B (UVB) tem sido associada ao aumento do risco para o desenvolvimento dos cânceres cutâneos incluindo o CBC, pois pode produzir dano ao DNA, especialmente nas pirimidinas².

O papel da radiação UV no desenvolvimento dos CCNM e em especial no CBC é crucial. Primeiro, a radiação UV causa mutações no DNA celular e a falha no

reparo dessas alterações genéticas pode levar a um crescimento celular desordenado e formação de tumor, sendo sua ação importante no processo de carcinogênese de neoplasias malignas cutâneas⁵. Segundo, a radiação UV tem um grande efeito sobre o sistema imune cutâneo, induzindo a um estado de imunossupressão local que impede a rejeição do tumor neoformado⁶.

A transformação maligna de uma célula da camada basal da epiderme ou dos anexos dá origem ao CBC, tumor que apresenta como principais características a indolência e o crescimento lento, sendo localmente destrutivo e que raramente produz metástases.

As formas esporádicas (não-herdadas) de CBC representam a maioria absoluta dos casos diagnosticados, enquanto que as herdadas são mais raras e fazem parte principalmente da síndrome do nevo basocelular (SNBC), com diversos sintomas clínicos que incluem a presença de múltiplos CBCs em pacientes jovens.

O CBC possui diferenças de comportamento biológico que podem ser explicadas pela presença de fatores intrínsecos ao próprio tumor, como o padrão de crescimento tumoral, o potencial de recorrência e metástase, o padrão histológico e os fatores genéticos⁷. Fatores extrínsecos, como sítio de origem, terapêutica escolhida e estado imunológico do portador da neoplasia também podem influenciar no comportamento biológico do CBC.

Do ponto de vista histológico, são observados padrões de crescimento variáveis que conferem ao CBC diferenças no seu comportamento biológico. Atualmente para o CBC, duas classificações histológicas vêm sendo sugeridas e aceitas. Uma baseia-se no padrão de crescimento e outra na diferenciação histológica. A classificação baseada nos padrões de crescimento tem maior

significância biológica, e é adotada pelo Colégio Real de Patologistas do Reino Unido. Esta classificação considera a existência dos tipos nodular, superficial, infiltrativo, morfeiforme ou esclerodermiforme, micronodular e de padrão misto⁸.

A classificação pelo padrão de crescimento é útil no desenvolvimento do conceito de alto e baixo risco dos subtipos histológicos de CBC. Os CBCs de alto risco são caracterizados pela probabilidade aumentada de extensão subclínica, excisão incompleta, comportamento agressivo de invasão local e/ou recorrência local. Os CBCs de alto risco incluem o superficial, infiltrativo ou morfeiforme e o micronodular⁸.

Câncer é uma doença essencialmente genética caracterizada por instabilidade genômica e proliferação celular incontrolada. A maior parte dos cânceres, especialmente os tumores sólidos, se desenvolvem após o acúmulo de múltiplas lesões gênicas. A maioria dos tumores resulta de mutações causadas por alterações na replicação do DNA, carcinógenos, ou defeitos no aparato de reparação do DNA.

Durante o processo de transformação tumoral e malignização, dá-se uma instabilidade geral do genoma que pode resultar de mutação em genes de reparo e outros genes^{9,10}. Essa instabilidade pode ser visualizada pelas alterações nos padrões de microssatélites.

A instabilidade genômica que ocorre em células neoplásicas tem sido alvo de inúmeros trabalhos e sua ocorrência vem sendo demonstrada em muitas doenças de origem genética.

Alterações no DNA repetitivo têm sido úteis em avaliações prognósticas, como marcadores no estadiamento de tumores, e na pesquisa oncológica básica,

fornecendo novos elementos para a compreensão do funcionamento do genoma como um todo.

Dentre as alterações que os microssatélites podem sofrer, destacam-se dois principais tipos: a instabilidade de microssatélites (MSI) e a perda de heterozigosidade (LOH).

No CBC, MSI e/ou LOH foram observadas em especial no cromossomo 9. A região 9q (9q21, 9q22^{11,12}, 9q22-qter e 9p21¹³) onde estão localizados os microssatélites D9S15, D9S50, D9S52, D9S53, D9S197, D9S287 e D9S303 demonstraram MSI e LOH com taxas variando de 20 a 75 %, o mesmo ocorrendo na região 9p (D9S165)^{14,15}.

Em um estudo realizado com CBCs esporádicos foi observada LOH em mais de 20% nos microssatélites D4S414, D4S426 (4q32-35) e de 15 a 20 % nos microssatélites D1S249(1q32), D3S1597(3p24), D10S541(10q22.1) e D17S791(17q21.3)¹⁵.

Em trabalho prévio realizado por nosso grupo, estudamos a instabilidade genômica num grupo de 10 CBCs (um herdado e nove esporádicos) e encontramos 60 % de MSI e 20 % de LOH para o microssatélite D6S251 e 10 % de MSI para o microssatélite D6S252¹⁶, até então nunca descritos. Esse achado nos levou a continuar estudando a região, ampliando o número de amostras. Escolhemos apenas CBCs esporádicos (não-herdados) pois respondem por quase todos os casos de CBCs encontrados na prática clínica, enfatizando a diferenciação histológica pois até o presente momento não há relatos na literatura que correlacione a instabilidade genômica (LOH e MSI) dos microssatélites D6S251 e D6S252 com os aspectos histológicos dos CBCs.

O presente estudo visa proporcionar uma melhor compreensão do real papel dos microssatélites D6S251 e D6S252 na gênese e diferenciação histológica do CBC, a neoplasia maligna mais freqüente na espécie humana.

2 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo avaliar a instabilidade genômica (MSI e LOH) dos microssatélites D6S251 e D6S252 localizados no cromossomo seis (6q14-16.2) nos tumores de pacientes portadores de CBC esporádico através da reação em cadeia da polimerase (PCR). As alterações encontradas serão correlacionadas à severidade e agressividade, sugeridas pela análise dos tipos histológicos presentes nos espécimes obtidos e incluídos neste estudo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Conceitos Básicos em Genética Molecular

Antes de conceituar o que são microssatélites e qual o seu emprego na medicina de uma maneira geral, é importante rever alguns conceitos básicos em genética médica, bem como resumir o histórico desse setor das ciências biológicas.

A palavra genética deriva da raiz grega *gen*, que significa “vir a ser”. Foi empregada pela primeira vez em 1906, por Bateson, para designar o estudo da hereditariedade e da variação dos seres vivos¹⁷.

A genética tem raízes milenares, sendo muito antigo o conhecimento da transmissão hereditária de algumas doenças. Hipócrates, entre 460 e 377 a.C., já fazia menção a doenças hereditárias ou familiares¹⁸. Apesar destas raízes milenares, a Genética desenvolveu-se a partir de meados do século XIX e início do XX, resultando da integração de áreas da ciência como citologia, estatística, bioquímica e biologia molecular, permitindo novos horizontes na compreensão dos fenômenos da hereditariedade.

O pioneiro padre agostiniano Gregor Mendel iniciou seus experimentos genéticos em 1865, entretanto seus estudos foram retomados somente a partir de 1880, quando o mundo científico começou a entender o processo de divisão das células somáticas e germinativas¹⁸, devido aos trabalhos de Flemming, Strausburger, Waldeyer, van Beneden e Boveri¹⁷.

Assim, o conhecimento sobre o comportamento das células foi cada vez mais relacionado ao seu núcleo que contém grande parte do material genético celular. A região granular é identificada como cromatina e durante a divisão celular, a cromatina forma massas densas denominadas cromossomos¹⁸.

Os cromossomos podem ser vistos como um arranjo de ácidos nucléicos e proteínas (histonas). As histonas são solúveis em água e se associam aos cromossomos humanos de maneira a formar os nucleossomos que garantem a estabilidade estrutural dos cromossomos¹⁸ (**Figura 1**).

Adaptado de Klug & Cummings 1997

Figura 1 – Organização do material genético da célula eucariótica.

Em humanos normais, o material genético é distribuído em 46 cromossomos, sendo 23 herdados do pai e 23 da mãe. Portanto, os seres humanos são diplóides, pois possuem duas cópias de cada informação genética¹⁸.

O ácido nucléico que constitui o cromossomo é denominado DNA. O DNA é organizado em segmentos lineares de bases nucleotídicas e seu tamanho é comumente referido em relação aos números de bases, ou kilobases (kb). Quando essa sequência linear de bases representa o código da informação necessária para a produção de uma determinada proteína é denominado gene. Portanto, o conjunto de todos os ácidos nucléicos é denominado genoma¹⁸.

Estima-se que o genoma humano possui entre 80 e 150 mil genes, o que corresponde a aproximadamente 10% do genoma. Os demais 90% do genoma são compostos de sequências repetitivas de DNA que alguns autores relatam como “DNA lixo”, “lixo genético” ou “*junk* DNA”.

Outro aspecto importante na organização dos ácidos nucléicos que constituem um gene de um organismo eucarionte é o fato de que parte considerável da informação contida num gene não é diretamente relacionada ao seu produto, a proteína. Uma grande parte dos genes contém sequências não codificantes, ou seja, o código não faz parte da proteína final. Tais regiões recebem o nome de íntrons, enquanto as regiões codificantes do gene recebem o nome de éxons. A função dos íntrons nos genes ainda não é completamente esclarecida, apesar das várias hipóteses postuladas. Além destas, um gene ainda apresenta regiões regulatórias, responsáveis pelo controle da sua expressão¹⁸. **(Figura 2)**

Figura 2 – Estrutura e função dos genes

3.1.1 Microssatélites

Várias categorias diferentes de DNA repetitivo são reconhecidas. É útil identificar se as seqüências repetitivas ou repetições estão agrupadas em um ou alguns poucos locais ou se estão dispersas pelo genoma, intercaladas com seqüências de cópia única ao longo do cromossomo. As seqüências repetitivas agrupadas constituem de 10 a 15% do genoma e consistem em arranjos de várias repetições curtas organizadas em *tandem*. Os diferentes tipos de tais repetições em *tandem* são coletivamente chamados de DNA satélite, assim denominados porque muitas das famílias de repetições originais em *tandem* podiam ser purificadas por densidade de centrifugação do resto do genoma como frações “satélite” do DNA¹⁹.

Assim as repetições *tandem* estão organizadas no sentido 3' de uma sequência seguida da extremidade 5' de uma outra sequência ficando, portanto alinhadas na mesma direção. Os DNAs satélites estão situados principalmente na região do centrômero e contêm milhares de repetições²⁰.

De acordo com a extensão da sequência repetitiva, as repetições *tandem* podem ser classificadas em: satélites, minissatélites e microssatélites²¹.

- **Satélites:** são as repetições mais extensas.
- **Minissatélites:** são compostos por repetições de 9 a 80 pares de bases nucleotídicas (pb).
- **Microssatélites:** são curtas seqüências repetidas de um a seis nucleotídeos que freqüentemente mostram polimorfismo multialélico e têm sido extensivamente usados como marcadores genéticos. (**Figura 3**)

Os microssatélites podem ser compostos por um mononucleotídeo (AAAAAAAAAAAAAAAA), dinucleotídeos (GTGTGTGTGTGTGTGTGT), trinucleotídeos (CAGCAGCAGCAGCAGCAG) e assim por diante, sendo a forma (CA)_n a mais comum existente^{22,23}. Na figura 3 podemos observar a representação de uma curta seqüência repetitiva trinucleotídea (TTA)₈ a partir de um cromossomo.

Figura 3 – Representação esquemática de um microsatélite a partir de um cromossomo.

Embora os microssatélites já tenham sido considerados como *junk* DNA, estas sequências têm função no genoma, principalmente na regulação da expressão gênica. Existem numerosos exemplos de microssatélites e minissatélites afetando a expressão gênica de diversas maneiras, atuando como sequências que podem ser reconhecidas por fatores de transcrição ou também afetando a estrutura da cromatina e a conformação do DNA²². Na figura a seguir temos a representação da organização do genoma humano e das sequências repetitivas em *tandem*. (**Figura 4**)

Figura 4 – Organização do Genoma Humano e as seqüências repetitivas.

Os microssatélites D6S251 e D6S252 estão localizados no braço longo do cromossomo seis (*loci* 6q14-16.2). Ambos são compostos por seqüências repetitivas (GT)_n e possuem tamanhos variando de 144-162 pb e de 154-166 pb, respectivamente. A figura a seguir mostra a localização dos microssatélites D6S251 e D6S252. (**Figura 5**)

Figura 5 - Representação da localização dos microsatélites D6S251 e D6S252 no braço longo do cromossomo seis (6q14-16).

3.1.2 Instabilidade de Microssatélites (MSI)

A natureza polimórfica dos microssatélites deve-se às altas taxas de mutações, da ordem de 5-10 por locus por gameta. Entretanto, os microssatélites podem originar variantes, aumentando ou diminuindo o número de repetições, isto é, instabilidade de microssatélites (MSI). O DNA extraído de células de determinados tumores pode apresentar alterações no número de unidades repetidas em um ou mais microssatélites quando comparados aos mesmos microssatélites existentes em amostras de DNA de um tecido normal do mesmo indivíduo, como aquele obtido nas células sangüíneas²⁴. Resumidamente, células tumorais podem apresentar “impressões digitais” defeituosas em seu DNA quando comparadas aos outros tecidos normais do organismo²¹.

A instabilidade de microssatélites depende de inúmeros parâmetros, incluindo: número de repetições; o conteúdo da sequência, localização cromossômica e a capacidade de reparo do DNA durante sua replicação²³.

3.1.3 Implicações Clínicas da MSI

Até o momento, foi apresentado que alterações genéticas acarretam o desenvolvimento do câncer. Esse fenômeno tem sido extensivamente investigado por vários autores, principalmente no câncer colo-retal. Esse modelo é considerado ideal para a compreensão do processo carcinogênico, devido à progressão da pré-malignidade para malignidade, ou seja, de adenoma para carcinoma. A grande

maioria dos cânceres surge de uma inativação mutacional dos genes supressores e da ativação de oncogenes²⁵.

A figura a seguir (**Figura 6**), adaptada de Fearon e Volgestein, explica a seqüência de mutações genéticas que ocorre na evolução para o câncer colo-retal. Os genes mutados mais comumente envolvidos são o APC, K-RAS, DCC e o TP53²⁶.

Figura 6 - Modelo mostrando as mutações genéticas que ocorrem na progressão de adenoma para carcinoma colo-retal.

Em 1993, MSI foi observada tanto no câncer de colo-retal hereditário não-polipose (HNPCC) quanto no câncer colo-retal esporádico, mostrando uma via genética alternativa no desenvolvimento desse câncer^{27,28}.

A definição de microssatélites bem como a definição de instabilidade de microssatélites (MSI) já foi dada nos tópicos anteriores, sendo necessário apenas lembrar que a verificação de instabilidade nessa região nada mais é que uma verificação indireta de um defeito no sistema de reparo do DNA (MMR). O MMR

humano inclui as proteínas codificadas pelos seguintes genes: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 e hPMS2 e esse sistema é responsável pela identificação e excisão de anormalidades que ocorrem durante a replicação do DNA, anormalidade essa que pode ser representada por danos químicos e físicos ao DNA²⁵.

É preciso completar que os microssatélites são regiões com um risco particular de mutação devido o deslizamento da enzima DNA-polimerase durante a replicação do DNA. Qualquer “erro de replicação” (RER) pode ocasionar uma mutação pontual ou ainda, a produção de proteínas inespecíficas para a finalidade de reparo (proteínas truncadas). É muito comum também afetar os genes que incluem ou estão diretamente ligados à região de microssatélites como TGFBR2, ILGF, E2F-4 e BAX^{29,30}. Esses genes são raramente mutados nos tumores que não demonstraram MSI³¹.

Outros trabalhos mostraram que em diversos tumores como, por exemplo, o câncer colo-retal, há a identificação de vias moleculares com acúmulo paulatino de mutações em genes fundamentais para a proliferação celular e apoptose. Esses cânceres ainda podem demonstrar uma extensa variedade no número de cromossomos, caracterizando dessa forma a aneuploidia e também uma extensiva perda de material genético, chamada de perda de heterozigidade (LOH). A grande maioria das células cancerígenas que apresentam MSI são diplóides e não mostraram LOH. Isso reforça o conceito que existem duas vias distintas no desenvolvimento do câncer, uma via “supressora” postulada por Fearon e Vogelstein e outra via “mutante” representada pela instabilidade de microssatélites²⁵.

MSI tem sido extremamente descrito em vários cânceres, e possui extrema relevância clínica já que os tumores que seguem a via “mutante” podem comportar-se de maneira biológica diferindo daqueles tumores que seguem a via “supressora”²⁵.

Percebe-se que a aplicabilidade do estudo de MSI no HNPCC é vasta e extremamente importante do ponto de vista clínico e esse tipo de estudo, como citado anteriormente, passou a ser rotina na prática clínica em cânceres colo-retais.

A MSI tem sido verificada em muitos tumores sólidos. Atualmente, a definição e a interpretação de instabilidade são reportadas na literatura de maneira variável. Essa verificação está sendo feita principalmente em cânceres gástricos, endometriais e ovarianos²⁵.

Nos tumores gástricos, alguns autores sugerem que há uma predominância de positividade de MSI no de antro gástrico³². Entretanto outros autores verificaram a presença de MSI em toda extensão gástrica³³. Já nos tumores ovarianos, a incidência de MSI varia de 3 a 53% e essa variação é atribuída de acordo com os tipos e os números de marcadores de microssatélites utilizados³⁴.

Nos tumores endometriais, alguns estudos demonstram relação entre a presença de MSI e grau histológico avançado³⁵.

Entretanto, no CCNM e em especial no CBC a informação a respeito de MSI é ainda controversa. A incidência reportada em alguns estudos varia de 0 a 30% embora, menos de 10% apresentem altas taxas de MSI^{36,37}. Mais adiante discutiremos mais acerca da instabilidade genômica que ocorre no CCNM, em especial no CBC.

3.1.4 Perda de Heterozigosidade (LOH)

A perda de heterozigosidade (LOH) é definida como a perda de um alelo em um *locus* heterozigoto constitucional. Como exemplo, podemos citar o que ocorre com o gene CDKN2A que codifica a proteína p16, localizado no cromossomo 9p21, e é considerado um exemplo de inativação por LOH, ocorrendo freqüentemente em pulmão, pele e outras formas comuns de cânceres humanos³⁸.

LOH pode ocorrer de diversas maneiras (**Figura 7**):

- Através da perda de um alelo ou gene por uma deleção simples, resultantes de duas quebras na dupla fita ou recombinação mitótica dupla envolvendo o braço homólogo do cromossomo;
- Pela perda extensa de material genético, envolvendo um inteiro ou uma porção do braço cromossômico;
- Por recombinação mitótica entre homólogos ou translocação;
- Através da perda de um cromossomo inteiro.

Entretanto, a existência de cópias múltiplas de um cromossomo pode levar a homozigosidade³⁸.

Figura 7 - Modelo para elucidação molecular da LOH (adaptado de Thiagalingam *et al.*).

Mutações no gene TP53 podem causar instabilidade genômica e facilitar a progressão carcinogênica. Carcinomas espinocelulares (CEC) e CBCs mostram frequentemente perda de fragmentos cromossômicos e LOH.

Em um estudo realizado no Instituto Butantan, foram utilizados quatro microssatélites adjacentes ao gene patched 1 (PTCH1) e dois próximos ao gene patched 2 (PTCH2), ambos envolvidos no desenvolvimento de CBC. Foram analisados dez pacientes com CBC hereditários (síndrome do nevo basocelular) dos quais quatro apresentaram LOH no microssatélite D9S180, próximo ao gene PTCH1³⁹.

Mutações nos genes supressores de tumor PTCH1, no cromossomo 9q22-3, e PTCH2, no cromossomo 1p33, têm sido associadas à etiologia dos CBCs^{40,41,42}. Esses genes supressores fazem parte da via de sinalização *sonic hedgehog* que, quando induzida pela inativação de PTCH1 e/ou PTCH2, leva à proliferação celular.

3.2 Genética Molecular Aplicada ao CBC

Como vimos, o câncer é uma doença essencialmente genética caracterizada por instabilidade genômica e proliferação celular incontrolada. A maior parte dos cânceres, especialmente os tumores sólidos, se desenvolvem após o acúmulo de múltiplas lesões gênicas, causadas por alterações na replicação do DNA, carcinógenos, ou defeitos no aparato de reparação do DNA.

Há duas classes principais de genes que podem sofrer mutações e contribuir para a gênese do câncer: os oncogenes e os genes supressores de tumor (GST)³.

Genes que atuam no sentido de estimular a divisão celular podendo levar ao crescimento descontrolado são chamados de proto-oncogenes. Estes genes são ativos na fase embrionária, e inativos nas células adultas. Muitos proto-oncogenes são moléculas sinalizadoras de crescimento que ao se tornarem mutadas ficam perpetuamente “ligadas”, gerando a amplificação dos sinais de crescimento celular, suplantando os controles normais impostos pela homeostase celular. Oncogenes são em geral, geneticamente dominantes, sendo que a mutação de uma cópia de proto-oncogene é suficiente para produzir o fenótipo. São exemplos de oncogenes o N-RAS, H-RAS e C-MYC^{3,43}.

Mutações ativadoras do gene RAS estão entre as mais comuns no câncer humano. As proteínas ras são pequenas proteínas-G que transduzem sinais intracelulares. Mutações no RAS freqüentemente alteram a taxa de hidrólise de trifosfato de guanosina (GTP) em difosfato de guanosina (GDP), levando a uma proteína ativada que impropriamente promove o crescimento e sobrevivência celular. Há estudos que sugerem mutações do RAS em até 30% dos CBCs³.

A **tabela 1** mostra de maneira sucinta a relação entre alguns proto-oncogenes, tipo de alteração que pode ocorrer e o tipo de malignidade associada:

Tabela 1 - Relação entre proto-oncogene, tipo de alteração e tipo de câncer.

Proto-oncogene	Alteração no proto-oncogene	Neoplasia Maligna
ABL	Translocação	Leucemia mielóide crônica
BCL-2	Translocação	Linfoma de células B
CYCD-1	Translocação	Câncer de mama
MYC	Translocação	Linfoma de Burkitt
GIP	Mutação de ponto	Câncer de ovário e de adrenal
K-RAS	Mutação de ponto	Leucemias agudas, câncer de tireóide e melanoma
MYC	Amplificação	Câncer de pulmão, mama e cervix
L-MYC	Amplificação	Câncer de pulmão
N-MYC	Amplificação	Neuroblastoma

Na **figura 8**, está representada a função dos oncogenes no ciclo celular de uma célula eucariótica.

Figura 8 – Representação das funções dos proto-oncogenes e oncogenes no ciclo celular.

Alguns genes supressores de tumor controlam o crescimento celular por inibirem o ciclo e a divisão celular, regulando negativamente os sinais de crescimento ou promovendo a morte celular.

Na **figura 9**, exemplificamos as principais funções e mecanismos de ação dos genes supressores de tumor.

Figura 9 – Representação das funções dos Genes Supressores de Tumor no ciclo celular. Nos CBCs esporádicos podemos encontrar mutação no gene supressor TP53.

Este gene TP53 codifica a proteína p53, que tem sido denominada a “guardiã” do genoma, modulando múltiplas funções celulares entre elas a transcrição gênica, síntese e reparo de DNA, parada do ciclo celular e apoptose. Assim, a p53 percebe a lesão genotóxica e pára a divisão celular para permitir os reparos no DNA. Entretanto, se a injúria genética é severa, a p53 pode também induzir uma resposta apoptótica no esforço de eliminar células defeituosas e potencialmente malignas.

Mutações no TP53 foram descritas nos CBCs, com taxas variando até 60 %. Muitas das mutações são CC $\rightarrow$ TT ou C $\rightarrow$ T nos sítios de pirimidina, o que sugere dano causado pela radiação UV⁶.

No desenvolvimento do CBC esporádico a radiação UV é o carcinógeno mais importante. Além de interferir nos mecanismos imunológicos da pele, o UV induz a formação de pontes químicas entre duas pirimidinas adjacentes, particularmente timinas (dimerização), deslocando a posição dessas bases nitrogenadas na hélice de DNA, impedindo o pareamento adequado com as bases da fita oposta. Mutações pontuais induzidas pelo UV em oncogenes ou genes supressores específicos podem estimular a proliferação celular, podendo levar à gênese do CBC (**Figura 10**).

Figura 10 - Dano ao DNA produzido pela radiação ultravioleta (UV) contida na luz solar. Duas bases de timina adjacentes tornam-se covalentemente ligadas, formando um dímero de timina. Células da pele expostas à luz solar são muito suscetíveis a esse tipo de dano ao DNA

O gene *patched* (PTCH) é outro exemplo de gene supressor de tumor inativado tanto no CBC esporádico como no hereditário. O PTCH é o homólogo humano do gene *patched* da drosófila e está localizado no locus 9q22.3 (cromossomo 9). Foi inicialmente isolado por dois grupos independentes durante a pesquisa sobre o gene responsável pela síndrome do nevo basocelular (SNBC). Mutações nos genes PTCH1 (9q22-3), e PTCH2 (1p33), têm sido associadas à etiologia dos CBCs esporádicos e herdados há mais de uma década^{40,41,42}. Mutações somáticas no gene PTCH têm sido identificadas em 20 a 30% dos CBCs esporádicos estudados. Mutações detectadas no gene PTCH nos CBCs esporádicos também contêm alterações nucleotídicas UV-específicas como as C→T e CC→TT. Dentre as mutações detectadas estão: mutações *nonsense*, deleções e inserções, as quais levam à produção alterada de proteínas *patched*². Tem sido proposto que o gene PTCH funciona como um gene “guardião”, isto é, uma célula precursora de neoplasia adquire uma vantagem de sobrevivência com a inativação deste gene, e essa inativação seria necessária antes da expansão clonal e posterior acúmulo de outras lesões genéticas que levam à formação do CBC⁴⁴.

Podemos observar representadas na tabela a seguir (**Tabela 2**), algumas alterações observadas na estrutura genômica do CBC e outras malignidades cutâneas.

Tabela 2 - Algumas alterações na estrutura genômica do CBC e em outros tumores cutâneos.

Cromossomo	gene	Observações	Tumor
1p36	N-RAS	Mutação codon 61 em 20% linhagens metastáticas e tumor primário <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> sob UV; maior frequência de alterações no cromossomo 1	MM ^{45,46,47,48} CEC ⁴⁹
1p33	PTCH2	Síndrome Nevóide do Carcinoma Basocelular; mutações	CBC ^{41,42}
4q32-35	ING1L, SAP30	LOH em mais de 20% nos microsatélites D4S414,D4S426	CBC ¹⁵
5q13	Não identificado	Região candidata	CBC ⁵⁰
6	Não identificado	Mutações, deleções (LOH, MSI)	CBC ¹⁶ MM ^{45,46,51}
9p21	MTS1	Genes supressores CDKN2a (p16) e CDKN2b (p15)	MM ^{52,53}
9q22.3-31	PTCH1	Síndrome do nevo basocelular; LOH esporádico e familiar	CBC ⁴⁸
11p	H-RAS	Aberrações cromossômicas	MM ⁴⁶
11q13	MYC	8% amplificação gênica 7-13% amplificação gênica	MM ⁴⁹ CEC ⁴⁶
12p	K-RAS	Aberrações cromossômicas	MM ⁵⁴
16q22.1	CDH	E-caderina: supressor de invasão de carcinoma epitelial	CEC ⁵⁵
17p	TP53	Supressor mutado em 30% de linhagens. Mutações, substituições, microdeleções (UV) 20-50%. Superexpressão	MM ⁵⁶ CEC ⁵⁶ CBC ^{41,56}

Diferentes pesquisas demonstraram MSI em diversos tipos de câncer, como por exemplo, em gliomas⁵⁷ e de mama⁵⁸. No caso de câncer de pele, foram comparados CBCs, carcinomas espinocelulares (CEC) e melanomas malignos (MM), observando bandas extras e LOH em alguns destes casos, demonstrando assim alterações no DNA repetitivo¹³.

No CBC, MSI e/ou LOH foram observadas em especial no cromossomo 9. A região 9q (9q21, 9q22^{11,12}, 9q222-qter e 9p21¹³) onde estão localizados os microsatélites D9S15, D9S50, D9S52, D9S53, D9S197, D9S287 e D9S303 demonstraram MSI e LOH com taxas variando de 20 a 75%, o mesmo ocorrendo na região 9p (D9S165)^{14,15}.

Em um estudo realizado com CBCs esporádicos foi observada LOH em mais de 20% nos microssatélites D4S414, D4S426 (4q32-35) e de 15 a 20% nos microssatélites D1S249(1q32), D3S1597(3p24), D10S541(10q22.1) e D17S791(17q21.3)¹⁵.

As alterações (LOH e MSI) dos microssatélites podem de maneira indireta evidenciar outras alterações em importantes genes adjacentes ou próximos destas regiões. Em alguns casos de LOH, pode ter havido perda de parte do respectivo cromossomo. Na figura a seguir procuramos mostrar de modo esquemático as possíveis alterações que podem ocorrer nos *loci* 6q14-16.2, localização dos microssatélites D6S251 e D6S252.

Figura 11 – Representação esquemática da MSI e LOH que podem ocorrer nos *loci* 6q14-16 onde estão localizados os microssatélites D6S251 e D6S252.

O microssatélite D6S251 localizado no *locus* 6q14 parece ser mais suscetível a mudanças durante a proliferação desordenada que leva à formação do CBC, abrindo a possibilidade que genes correlatos ao CBC residam nesta região¹⁶. Este fato foi comprovado através do encontro de instabilidade do microssatélite D6S251 (MSI) em 60% de dez CBCs estudados sendo 9 esporádicos e um herdado¹⁶. Para o D6S252 foi observada LOH em 10% dos mesmos CBCs estudados¹⁶. Nenhum outro trabalho relacionando alterações dos microssatélites D6S251 ou D6S252 com o CBC foi encontrado na literatura até o momento. Em pesquisa realizada para detecção de LOH no braço longo do cromossomo seis (6q13-6q27) em carcinomas de mama, foi observado com taxas variando de 11,4 a 38,9%⁵⁹. Deleção próxima à região do microssatélite D6S251 foi relatada somente em carcinomas de mama⁶⁰.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Este trabalho foi realizado utilizando amostras de CBC e tecido normal obtidos de pacientes portadores de CBC esporádicos (não-herdados).

Os pacientes portadores destes tumores realizavam acompanhamento nos ambulatórios de Oncologia Cutânea e Cirurgia Dermatológica da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) no período de novembro de 2004 a abril de 2005.

As amostras de CBC e de tecido normal foram estudadas histologicamente para confirmação diagnóstica após exérese da peça operatória.

Foi considerado tecido normal, o sangue e/ou pele com ausência de neoplasia residual proveniente da região peritumoral utilizada para reconstrução cirúrgica do defeito gerado primariamente pela cirurgia a qual os pacientes foram submetidos.

Inicialmente foram selecionadas 32 amostras tumorais e 23 de tecido normal (sangue/pele normal), relativas a 23 pacientes portadores de CBC submetidos a cirurgia para exérese da neoplasia.

Após avaliação histológica foram selecionadas 26 amostras de CBC esporádicos e 17 de tecido normal provenientes de 17 pacientes de ambos os sexos e com idades variando de 46 a 89 anos. Outras 6 amostras tumorais provenientes de 6 pacientes foram excluídas pois tratavam-se de carcinoma metatípico (**Figura 12**). Quatro pacientes eram portadores de mais de um CBC.

Figura 12 – Organograma demonstrando a casuística final estudada de 26 CBCs para o microsatélite D6S251 e 15 CBCs para o D6S252.

Todas as informações referentes aos pacientes, amostras, classificação histológica, risco, resultados da PCR obtidos podem ser consultados no **anexo C**.

Optamos considerar o número de tumores obtidos e não o número de pacientes devido ao comportamento histológico do CBC ser individualizado e a possibilidade de utilizar um menor número de pacientes e controles.

Os CBCs incluídos no estudo foram classificados quanto ao grau de risco histológico. Foram considerados de alto risco os seguintes subtipos histológicos: esclerodermiforme, micronodular e as formas mistas incluindo algum desses 2 subtipos. As formas nodular, nódulo-cística e variantes foram consideradas de baixo risco.

O tipo superficial foi considerado de baixo risco devido ao seu comportamento clínico e biológico menos agressivo.

Para o estudo do microssatélite D6S251 utilizamos 26 CBCs, sendo 13 de alto risco e 13 de baixo risco e para o microssatélite D6S252 utilizamos 15 CBCs, sendo 6 de alto risco e 9 de baixo risco.

Os CBCs incluídos no estudo e suas classificações de risco histológicos são mostrados na **tabela 3** (amostras utilizadas na verificação das alterações do microssatélite D6S251) e na **tabela 4** (amostras utilizadas na verificação das alterações do microssatélite D6S252).

Tabela 3 - Amostras de CBC estudadas e excluídas, localização do tumor e classificação histopatológica de risco para o microsatélite D6S251.

CBC	Localização	Histopatologia	Risco
01	Bucal E	Nodular	Baixo
02	Orelha E	Nodular/ Micronodular / Esclerodermiforme	Alto
03	Antebraço D	Nodular/ Micronodular / Esclerodermiforme /Adenóide	Alto
05	Mandibular E	Sólido/Superficial	Baixo
06	Sulco Nasogeniano D	Nodular/Esclerodermiforme	Alto
07	Epicanto E	Sólido	Baixo
08	Zigomática D	Sólido/Cístico/Micronodular	Alto
09	Malar E	Sólido/Cístico/ Micronodular	Alto
10	Frontal E	Sólido/Nodular/ Micronodular	Alto
11	Infrapalpebral D	Nodular	Baixo
12	Dorso Nasal	Sólido/ Micronodular	Alto
13	Infrapalpebral E	Nodular	Baixo
14	Frontal D	Nodular	Baixo
15	Infrapalpebral D	Nodular / Micronodular	Alto
16	Infrapalpebral D	Nodular / Micronodular	Alto
17	Antebraço D	Nodular	Baixo
18	Infrapalpebral D	Nodular /Adenóide/Superficial	Alto
19	Mandibular D	Nodular/ Micronodular	Alto
20	Asa Nasal D	Sólido	Baixo
21	Asa nasal E	Sólido	Baixo
22	Dorso	Sólido/Superficial	Baixo
23	Tórax anterior	Nodular/Superficial	Baixo
24	Dorso Nasal	Sólido/ Micronodular	Alto
25	Infrapalpebral E	Sólido/ Micronodular	Alto
26	Temporal E	Sólido-cístico	Baixo
32	Antebraço E	Nodular/Superficial	Baixo

Tabela 4 - Amostras de CBC estudadas e excluídas, localização do tumor e classificação histopatológica de risco para o microsatélite D6S252.

CBC #	Localização	Histopatologia	Risco
01	Bucal E	Nodular	Baixo
02	Orelha E	Nodular / Micronodular/ Esclerodermiforme	Alto
03	Antebraço D	Nodular / Micronodular / Esclerodermiforme/ Adenóide	Alto
05	Mandibular E	Sólido/Superficial	Baixo
06	Sulco Nasogeniano D	Nodular/ Esclerodermiforme	Alto
07	Epicanto E	Sólido	Baixo
13	Infrapalpebral E	Nodular	Baixo
14	Frontal D	Nodular	Baixo
16	infrapalpebral D	Nodular / Micronodular	Alto
18	Infrapalpebral D	Nodular /Adenóide/Superficial	Alto
20	Asa Nasal D	Sólido	Baixo
21	Asa nasal E	Sólido	Baixo
22	Dorso	Sólido/Superficial	Baixo
23	Tórax anterior	Nodular/Superficial	Baixo
30	Dorso Nasal	Sólido/Micronodular/Superficial	Alto

Após avaliação clínica e confirmação e classificação histológica, o fluxograma do trabalho foi explicado para todos os pacientes. O termo de consentimento livre e esclarecido foi devidamente aplicado e assinado (**Anexo A**), assim como informações gerais sobre o paciente e os tumores foram coletadas (**Anexo B**).

4.2 Métodos

O estudo foi desenvolvido prospectivamente.

A seleção dos pacientes portadores de CBC foi realizada através de criterioso exame clínico, biópsia do tumor e estudo histológico prévio, sendo que todos os pacientes foram tratados cirurgicamente pelo autor e posteriormente acompanhados no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, como previamente explicado.

Foi feita a análise das alterações (MSI e LOH) nos microssatélites D6S251 e D6S252 nas amostras de CBC selecionadas (26 para o microssatélite D6S251 e 15 para o D6S252) em comparação com o tecido normal (controle) provenientes de 17 pacientes portadores esporádicos (não-herdados) desta neoplasia através da técnica da PCR e posterior resolução em gel de poliacrilamida.

Toda a metodologia empregada está descrita e pormenorizada abaixo.

4.2.1 Obtenção das amostras e extração do DNA

As amostras de sangue (leucócitos), pele normal e tumor dos pacientes com CBC foram obtidas durante as cirurgias realizadas no Hospital das Clínicas da FMUSP.

Dez mililitros (mL) de sangue periférico foram acondicionados em tubo a vácuo contendo EDTA (BD®) e mantido resfriado a 4°C. Fragmentos de pele normal e do CBC foram colocados em criotubos e acondicionados em nitrogênio líquido imediatamente após a obtenção. Todo esse material foi encaminhado para o

Laboratório de Genética do Instituto Butantan em recipientes próprios para transporte de material biológico para posterior utilização.

Para a extração do DNA, as amostras de pele normal e os tumores foram biopulverizados individualmente em aparelho da marca Dismembrator® sendo os produtos transferidos individualmente para tubos Corex® mantidos no gelo, cada qual contendo 2,5 ml de solução digestiva TES (Tris-HCl 10 mM pH8.0, EDTA 10 mM, SDS 0,6 %) e Proteinase K (100 mg/ml) (Life Technologies®).

As suspensões obtidas ficaram incubadas em banho-maria a 50°C por 2 horas, e após esse tempo igual volume de fenol pH 7-8 foi colocado, agitando-se por inversão durante 15 minutos. Em seguida foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (2:1) agitando-se por mais 15 minutos.

Após centrifugação de 20 minutos a 10.000 rpm (rotor Sorvall RC-5B) e 4°C, o infranadante foi desprezado deixando-se a interfase. Acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico e agitou-se por mais 15 minutos.

Após mais uma centrifugação por 20 minutos a 10.000 rpm e 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de ensaio, e o DNA foi então precipitado com acetato de sódio 500 mM e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado.

Os materiais foram mantidos a – 20°C *overnight* e depois centrifugados nas condições anteriores, e secos a vácuo. Suspendeu-se o DNA de cada amostra em TE tratando-os com RNase 50µg/ml, 1h, 37°C, e novamente extraído com fenol, conforme descrito. Os DNAs foram suspensos em água miliQ e armazenados a 4°C.

Quanto ao DNA do sangue (leucócitos), este foi tratado com solução para lise das hemácias. Para cada 10 ml de sangue colocou-se 0,5 ml de EDTA 10 mM, 5,0 ml de tampão de lise 10x e 45 ml de água, incubando 2 horas no gelo. Após

centrifugação por 10 min., 1000 rpm, 4°C o *pellet* foi tratado com solução digestiva conforme protocolo acima.

A integridade de todas as amostras de DNA foi verificada em gel de agarose a 1% coradas com brometo de etídio, fotografadas sob luz ultravioleta e sua quantificação confirmada em espectrofotômetro.

4.2.2 Avaliação de LOH e MSI nos Microssatélites

Para estudo dos microssatélites D6S251 e D6S252, ambos localizados no cromossomo 6 (6q14-16), foram realizadas reações de PCR para amplificação destes.

As reações de PCR para estes marcadores foram realizadas individualmente em tubo Eppendorf estéril onde foram colocados 10x PCR buffer, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP mix, 10 pMol de *primer* direto e reverso (MVG- Biotech®), 1 unidade de Taq DNA polimerase, 100 ng de DNA e água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 µl de reação. Em seguida levaram-se os tubos ao termociclador (Extract Gene®), onde foram submetidos a 40 ciclos de 94°C 1 min., 52°C 50s, e 72°C 50s com 5 minutos de extensão para o D6S251 e 40 ciclos de 94°C 45s., 53°C 45s, e 72°C 50s com 5 minutos de extensão para o D6S252 .

Os *primers* direto e reverso utilizados para amplificação dos microssatélites D6S251 e D6S252 constam da **tabela 5**.

Tabela 5 - Lista dos *primers* utilizados na obtenção dos padrões de microssatélites D6S251 e D6S252.

Cromosomo	Observação	Microssatélite	Tipo de repeat	Primers direto (D) e reverso (R)
6q14	região repetitiva*	D6S251	(GT) _n 144-162pb	D- TTCCTAACCAGGTTTCAATG R- ATATTTTAAAGTAAGTTGCAC
6q16		D6S252	(GT) _n 154-166pb	D- ATGGCTCAGGATTCACATTG R- TGAAAGGAAAGTCCTGCTTC

*Região repetitiva = heterocromatina constitutiva

Uma vez extraídos, os DNAs de sangue, pele normal e CBCs dos pacientes foram devidamente quantificados em gel de agarose 1% através da comparação com DNA de lâmbda (Gibco-BRL) em concentrações de 150, 300 e 450 ng/ul.

Para verificar se houve alterações nestes *loci* nos tumores em relação ao equivalente no sangue ou pele normal, os produtos de PCRs foram colocados em gel de agarose e visualizados sob luz UV. Após esse procedimento, o gel de poliacrilamida a 6% disposto numa cuba eletroforética vertical V16 (*Life Technologies*®) foi realizado. As amostras foram arranjadas lado a lado, estando o produto de PCR do sangue ao lado da pele normal e esta ao lado do tumor, de maneira a permitirem a comparação entre os resultados do mesmo paciente. O gel continha também um marcador de peso molecular “100 bp Kb *Ladder*”. A eletroforese foi realizada a 150V por cerca de 1,5 horas, usando-se tampão TEB 0.5x para a corrida.

Após a corrida, o gel passou por um método de coloração com prata: após ser retirado da cuba de eletroforese, foi mergulhado em um recipiente contendo 300 ml de solução fixadora contendo 30 mL de etanol absoluto, 2,25 mL de ácido acético glacial e água destilada, deixando em agitação por 10 minutos. Em seguida

adicionaram-se 10 ml de solução de nitrato de prata (50 mL de solução fixadora, 0,3 g de AgNO_3 e água destilada), deixando-se novamente por 10 minutos sob agitação. Retiraram-se as soluções, lavou-se o recipiente rapidamente com água destilada e por fim colocou-se solução reveladora (4,5 g de NaOH a 3 %, 450 μL de formaldeído a 37 % e 150 ml de água destilada), deixando-se sobre o gel até o DNA ser corado.

No final a solução foi retirada e o gel foi fotografado sob luz branca. A partir das fotografias obtidas dos géis, fez-se uma análise das alterações através da contagem do número de fragmentos obtidos do sangue pele normal e dos tumores. Foi feita também uma contagem em relação ao número de bandas perdidas e ganhas pelo tumor em relação às bandas obtidas no sangue, tido como padrão normal do paciente. Fragmentos no tumor que mostravam grande diferença de intensidade quando comparados aos fragmentos idênticos obtidos no sangue, também foram considerados.

Quando essa intensidade no tumor era pelo menos 50% maior, considerava-se como ganho e quando menor, considerada perda.

O tamanho esperado para D6S251 foi de 144-162 pb e de 154-166 para o D6S252. Os resultados foram analisados de maneira a verificar se no DNA tumoral amplificado houve algum LOH, isto é, se o tumor perdeu um dos alelos cromossômicos ou um dos cromossomos homólogos, ou se houve MSI, caracterizada quando um dos alelos apresenta ganho ou perda dos *repeats* internos.

Os padrões dos microssatélites D6S251 e D6S252 de cada tumor foram comparados com pelo menos um de seus respectivos controles (leucócitos ou pele normal) para verificar se houve LOH e MSI. As alterações por ventura encontradas

nos tumores estudados foram analisadas e confrontadas com os tipos histológicos e de risco previamente classificados.

Depois de todo o processo analítico, MSI foi considerada quando ocorreu o aparecimento de uma banda “extra” ao fragmento amplificado e LOH foi considerada quando houve desaparecimento de uma das bandas do material amplificado, sempre comparando as amostras colhidas de cada paciente e considerando o tecido normal (pele/leucócitos) como padrão de normalidade na corrida eletroforética. Essa análise foi realizada por três observadores independentes em momentos diferentes de realização desse estudo.

Fotografias dos géis de agarose e poliacrilamida estão disponíveis no **anexo D**.

5 RESULTADOS

Das amostras de CBC incluídas, foi realizada a pesquisa e avaliação da existência de MSI e LOH em comparação com o tecido normal, com os seguintes resultados obtidos:

5.1 Microssatélite D6S251

Foram incluídas 26 amostras de carcinomas basocelulares obtidas de dezessete pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

MSI ocorreu nas amostras 6 e 12 (7,69 % do total das amostras de CBC). Ambas pertencentes ao grupo de alto risco que corresponde a 15,38 % das mesmas (Figura 13).

Figura 13 – Resolução das amostras 6 e 12 em gel de poliacrilamida onde a MSI é representada pela seta (←) nas amostras tumorais (6t e 12t) em comparação com os controles 6n (pele normal) e 12s (sangue/leucócitos) para o microssatélite D6S251. À esquerda observa-se o marcador de peso molecular (100 a 200 pb *ladder*).

LOH foi encontrado nas amostras 9, 10, 18 e 24 (15,38 % do total das amostras de CBC). Essas 4 amostras que apresentavam LOH eram todas pertencentes ao grupo de alto risco, o que corresponde a 30,77 % das 13 amostras de alto risco estudadas (**Figura 14**).

Figura 14 – Resolução das amostras 9, 10, 18 e 24 em gel de poliacrilamida com LOH representada pelo asterisco (*) nas amostras tumorais (9t, 10t, 18t e 24t) em comparação com a pele normal (n) para o microssatélite D6S251.

Todas as alterações do microssatélite D6S251 (LOH e MSI) observadas e suas devidas classificações histológica e de risco no estudo estão representadas na **tabela 6**.

Tabela 6 – CBCs incluídos no estudo e que apresentaram alterações do microssatélite D6S251

CBC #	Classificação Histológica	Risco	Alteração D6S251
06	Nodular/esclerodermiforme	Alto	MSI
09	Sólido/Cístico/Micronodular	Alto	LOH
10	Sólido/Nodular/Micronodular	Alto	LOH
12	Sólido/Micronodular	Alto	MSI
18	Nodular/Adenóide-cístico/Superficial	Alto	LOH
24	Sólido/Micronodular	Alto	LOH

As outras 20 amostras de CBC estudadas apresentaram padrões de microssatélite semelhantes aos seus respectivos controles, isto é, não apresentaram alterações significativas (exemplos mostrados nas **figura 15**).

Figura 15 – Padrões normais do microssatélite D6S251 após resolução em poliacrilamida. Nesta figura, vemos o marcador de peso molecular (100– 200 pb *ladder*) e as amostras 2 e 26 representadas pela pele normal (n) e tumor (t) exibindo padrões semelhantes de bandas.

MSI e LOH ocorreram em 6 das 26 amostras estudadas, o que corresponde a 23,07%. Todas as amostras que apresentaram LOH ou MSI eram do grupo de alto risco (**Figura 16**).

Figura 16 – LOH e MSI nas amostras de CBC de alto e baixo risco para o microssatélite D6S251.

5.2 Microssatélite D6S252

Para o estudo do microssatélite D6S252, foram incluídas 15 amostras de carcinomas basocelulares esporádicos. Após a PCR e resolução em gel não houve qualquer evidência de instabilidade genômica, ou seja, não foi observado MSI ou LOH em nenhuma das 15 amostras estudadas. Alguns exemplos podem ser vistos na figura abaixo:

Figura 17 – Padrões normais do microssatélite D6S252 após resolução em poliacrilamida. Nesta figura, podemos ver tecido normal sendo pele (n) e/ou sangue(s) e tumores (t) mostrando padrões semelhantes de bandas. Vemos aqui representadas as amostras 5,6 e 20, além do marcador de peso molecular (M).

6 DISCUSSÃO

O Câncer é uma doença essencialmente genética caracterizada por instabilidade genômica e descontrole da proliferação celular. A maior parte dos cânceres, especialmente os tumores sólidos, se desenvolvem após o acúmulo de múltiplas lesões gênicas. A maioria dos tumores resulta de alterações na replicação do DNA causadas por carcinógenos ou por defeitos no aparato de reparação do DNA.

Os genes correspondem a apenas 10% de todo o material genético contido nas células humanas. Os demais 90% do genoma são compostos de seqüências repetitivas de DNA. Entre elas estão os microsatélites¹⁹ que são curtas seqüências repetitivas em *tandem* que têm sido extensivamente utilizados como marcadores genéticos^{22,23}.

A transcrição de seqüências repetitivas instáveis pode dar origem a produtos totalmente diversos do esperado, que podem afetar a regulação de genes nas células e tecidos além da geração de novos alelos com aumento ou diminuição de unidades de repetição^{61,62}, contribuindo para aparecimento de um fenótipo maligno.

MSI caracteriza-se pela alteração do tamanho das repetições e muitas vezes pode ser utilizada como evidência indireta de erros de replicação, devido sua relação com a falha do sistema de reparo. Já a LOH representa a perda de um dos alelos, podendo relacionar-se à perda de um *locus* cromossômico inteiro e que pode conter genes importantes⁶³ como, por exemplo, genes supressores de tumor. Ambas tem

sido utilizadas como teste diagnóstico no estadiamento e evolução das células tumorais, bem como na possível susceptibilidade hereditária ao tumor, podendo ainda auxiliar em condutas posteriores de tratamento.

Inúmeras alterações e mutações genéticas ocorrem em células cancerosas e vem sendo identificadas através de vários métodos incluindo o utilizado neste estudo.

Seqüências flanqueadoras dos microssatélites são usadas como *primers* para sua amplificação através da PCR. A resolução dos produtos da PCR em gel de poliacrilamida permite detectar ganhos ou perdas de *repeats* internos aos microssatélites (MSI), bem como sua deleção (LOH).

Nós investigamos a presença de MSI e LOH nos microssatélites D6S251 e D6S252 (6q14-16) de CBCs esporádicos de alto e baixo risco histológico, evidenciados através de visualização da mobilidade e intensidade de bandas obtidas pela eletroforese em gel de poliacrilamida após PCR específica em comparação com o controle normal (pele/sangue) obtido do mesmo paciente.

Dados da literatura apontam para a incidência variável de MSI em tumores malignos cutâneos utilizando diferentes microssatélites, a maioria deles localizados no cromossomo 9. Menos de 5% de 137 CCNM, mostraram MSI em regiões cromossômicas diferentes da 9p21¹⁴. Para o CBC, a frequência de MSI no cromossomo 9 não dependeu da idade de aparecimento do tumor, sendo prevalente no cromossomo 9p, enquanto que LOH foi observado no cromossomo 9q⁶⁴, indicando provável envolvimento do gene PTCH.

LOH no cromossomo 9p associado à perda ou inativação do gene CDKN2A parece ocorrer tanto no CBC quanto no CEC. Amostras de CEC exibiram LOH (52 %) em pelo menos um microsatélite, mas somente 7 % exibiram MSI neste *locus*⁶⁵.

Nosso grupo, analisou quatro microsatélites próximos ao gene PTCH 1 e dois próximos ao gene PTCH 2 de dez amostras de CBCs provenientes de doentes portadores da SNBC (herdados). Foi observada LOH apenas no microsatélite D9S180 (PTCH1) próximo ao gene PTCH1³⁹.

O *locus* (6q14) onde se localiza o microsatélite D6S251 parece ser suscetível à mudanças durante a proliferação celular que ocorre no câncer. No câncer de mama foi relatada uma região deletada próxima a esse *locus*⁶⁰.

No câncer cutâneo só existe um trabalho, realizado por nosso grupo, referente aos microsatélites D6S251 e D6S252¹⁶ em dez amostras de CBCs sendo 9 esporádicos e um herdado (SNBC). As alterações encontradas nessa pequena amostra motivaram a realização do presente estudo, procurando aumentar a amostra de CBCs e utilizando apenas CBCs esporádicos por serem mais freqüentes na prática clínica.

Encontramos alterações em 23,07% do total de amostras para o microsatélite D6S251 e nenhuma alteração ao estudarmos o microsatélite D6S252.

Ao estudarmos as alterações do microsatélite D6S252 observamos que das 15 amostras de CBCs utilizadas, nenhuma mostrou qualquer alteração em comparação ao controle normal (pele/sangue).

No trabalho citado anteriormente ocorreu 10% de LOH no microsatélite D6S252 no CBC do paciente portador da SNBC¹⁶. Esta aparente divergência com relação ao presente trabalho talvez esteja relacionada ao fato da utilização de apenas

CBCs esporádicos. Naquela amostra, os dois eventos de alteração observados (MSI e LOH) pertenciam ao CBC desse paciente portador da SNBC. Nosso achado sugere que provavelmente não exista associação ou envolvimento do cromossomo 6q16 (D6S252) no desenvolvimento do CBC esporádico.

Por sua vez, ao estudarmos o microssatélite D6S251 (6q14), utilizamos 26 amostras de CBCs e comparamos os achados aos seus respectivos controles normais (pele/sangue). Observamos que havia alteração em 6 das 26 amostras (23,07%).

Duas amostras mostraram MSI (7,69% do total de amostras) e quatro LOH (15,38% do total de amostras).

O único dado de literatura relacionando o CBC a alterações no cromossomo 6q14 (D6S251), encontrou 60 % de MSI e 20 % de LOH num grupo de 10 CBCs (9 esporádicos e um herdado)¹⁶. Estas taxas mais baixas de MSI e mais altas de LOH em comparação com o estudo supra citado talvez se deva, ao contrário do nosso, da presença de um CBC herdado.

Quanto ao número de regiões instáveis, verificamos que 7,69% das amostras de CBC foram instáveis somente para o microssatélite D6S251. Alguns autores comentam que o fato das células apresentarem instabilidade em uma ou duas regiões, implica em uma ineficiência do sistema de reparo e não na sua completa inativação^{66,67}. O número de regiões instáveis também poderia ser aumentado se tivéssemos estudado um número muito maior de microssatélites.

Uma vez conhecidas as alterações genômicas encontradas nos CBCs esporádicos procuramos correlacioná-las com o grau de agressividade dos tumores baseados nos diferentes tipos histológicos existentes.

Utilizamos a classificação histológica de risco sugerida *pelo Royal College of Pathology* do Reino Unido (modificada) que está baseada nos padrões de crescimento tumoral e no útil conceito de baixo e alto risco para os subtipos histológicos.

De acordo com essa classificação, CBCs de alto risco são caracterizados por um aumento da probabilidade de extensão subclínica e/ou excisão incompleta e/ou comportamento invasivo e agressivo local e/ou recorrência local. CBCs de alto risco incluem os subtipos superficial, infiltrativo/esclerodermiforme e micronodular. O CBC nodular é o principal subtipo classificado como de baixo risco, que inclui todas as suas variantes como o CBC nodulocístico e o fibroepitelioma de Pinkus⁸.

No nosso estudo o tipo histológico CBC superficial foi colocado no grupo de baixo risco, diferentemente da classificação acima descrita. Entendemos que sua inclusão de alto risco só se deva a recidivas frequentes por excisão incompleta e não pelo seu comportamento biológico e subtipo histológico sabidamente menos agressivo.

Das 15 amostras de CBCs utilizadas no estudo das alterações do microssatélite D6S252, 9 eram de baixo risco e 6 de alto risco porém nenhuma mostrou qualquer alteração em comparação ao controle normal (pele/sangue).

Das 26 amostras de CBCs utilizadas no estudo da microssatélite D6S251 (6q14), 13 de eram de risco e 13 de baixo risco histológico. Observamos que havia alteração em 6 das 26 amostras (23,07%) e todas ocorreram apenas nas amostras que foram classificadas como de alto risco (46,15%).

Duas amostras mostraram MSI (7,69% do total de amostras e 15,38% das de alto risco) e quatro LOH (15,38% do total de amostras e 30,76% das de alto risco).

Nenhuma amostra considerada de baixo risco mostrou qualquer alteração em comparação ao controle normal.

Tanto LOH quanto MSI ocorreram apenas em amostras de CBC de alto risco (46,15 % das amostras de CBC de alto risco estudadas).

Em relação à histologia, o subtipo nodular foi o mais freqüente nas amostras de baixo risco. Todas as amostras de alto risco exibiam mais de um padrão histológico (padrão misto), sendo o subtipo micronodular o mais freqüente (presente em 12 amostras), seguido pelo esclerodermiforme (presente em 3 amostras). Logo, todas as amostras que mostraram LOH e MSI apresentavam histologia de padrão misto, sendo que o componente micronodular estava presente em 4 das 6 amostras alteradas.

Não podemos inferir qualquer conclusão sobre os subtipos isolados, pois, todas as amostras são mistas, ou seja, apresentam mais de um subtipo histológico. A presença de vários subtipos no mesmo CBC parece conferir a essa neoplasia uma maior agressividade local apesar da origem provir da mesma linhagem celular.

Em suma, em nosso estudo constatamos que as células do CBC são susceptíveis a alterações genéticas do microssatélite D6S251 (6q14), especialmente aqueles considerados de alto risco. A ocorrência de alterações no microssatélite D6S251 em 23,07% dos CBCs estudados (46,15 % dos CBCs esporádicos de alto risco) denota uma freqüência não desprezível de MSI e LOH neste grupo, se compararmos com os CBCs de baixo risco e mesmo com os resultados obtidos para o microssatélite D6S252.

Esses achados sugerem que deve existir participação ou envolvimento do cromossomo 6q14 (D6S251) na diferenciação e gênese dos CBCs esporádicos.

Novos estudos deverão ser conduzidos a fim de verificar o real papel do *locus* 6q14 na diferenciação e agressividade do CBC esporádico, além de possibilitar a identificação de genes relacionados ao CBC próximos a essa região onde o microssatélite D6S251 está localizado.

7 CONCLUSÕES

O estudo dos microssatélites D6S251 e D6S252 em amostras de CBC esporádicos permitiu chegar às seguintes conclusões:

1. O microssatélite D6S252 não parece estar envolvido no desenvolvimento de CBCs esporádicos;
2. O fato de encontrarmos 23,07% de alterações (LOH e MSI) no microssatélite D6S251 em amostras consideradas de alto risco (46,15%) sugere que pode haver envolvimento do cromossomo 6 (região 6q14) na diferenciação e gênese desses CBCs esporádicos.

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M () F ()
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO:.....CIDADE
 CEP:.....TELEFONE: DDD(.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M () F ()
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO:.....CIDADE:
 CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).....
-

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Estudo das Alterações dos Microssatélites D6S251 e D6S252 no carcinoma basocelular esporádico**
- PESQUISADOR: Cyro Festa Neto
 CARGO/FUNÇÃO: Professor Assistente Doutor CRM/SP: 27716
 UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 SEM RISCO () RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO ()
 RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
 (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 6 (Seis) meses.
-

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa sobre o Estudo **das Alterações dos Microssatélites D6S251 e D6S252 no Carcinoma Basocelular Esporádico**. Se decidir participar, é importante que leia atentamente as informações contidas neste termo a fim de compreender o seu papel nesta pesquisa.

1. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

Você foi selecionado(a) para participar desta pesquisa por ser portador(a) de um câncer de pele chamado Carcinoma Basocelular. Este tipo de câncer de pele é o mais freqüente e seu aparecimento vem crescendo muito nos últimos anos devido principalmente à exposição intensa da pele ao sol durante a vida. O principal objetivo desta pesquisa é verificar e avaliar a existência de uma alteração genética nas células dos pacientes portadores do Carcinoma Basocelular. Essa alteração pode ser um dos fatores responsáveis para o aparecimento deste câncer de pele, sendo que esta pesquisa poderá ajudar os médicos e pesquisadores a compreender melhor esta doença.

É preciso que você entenda a natureza da sua participação na pesquisa e dar o seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

2. PROCEDIMENTOS UTILIZADOS

Caso concorde em participar desta pesquisa, você será submetido(a) a alguns procedimentos médicos que serão explicados a você agora.

O tratamento proposto para você é a cirurgia de remoção do câncer de pele.

Será necessária a coleta de sangue para a realização de exames pré-operatórios. Essa coleta será realizada no laboratório do Hospital das Clínicas por profissional habilitado. É preciso que você permita que 10 mililitros do sangue coletado sejam utilizados para estudarmos seu material genético.

A cirurgia de remoção do câncer de pele será realizada no Hospital das Clínicas por médicos habilitados. Será preciso que você consinta que o material retirado na cirurgia seja fornecido para a realização da pesquisa. Esse material será submetido a estudo anátomo-patológico e do seu material genético.

Seu papel na pesquisa será o de consentir o fornecimento do material para a sua realização, o que não prejudicará o seu tratamento. O material obtido para o estudo poderá também ser utilizado em futuras pesquisas.

3. RISCOS RELACIONADOS A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

Se concordar em participar desta pesquisa científica, poucos riscos estarão envolvidos. O sangue colhido para a realização de exames pré-operatórios e fragmentos do carcinoma basocelular removidos na cirurgia farão parte do material estudado e a manipulação destes por parte do pesquisador não acarretará nenhum desconforto ou risco para você.

4. BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

A participação na pesquisa não acarretará gasto para você, sendo totalmente gratuita. O conhecimento que você adquirir a partir da sua participação na pesquisa poderá beneficiá-lo com informações e orientações futuras em relação ao seu problema e tratamento, propiciando um melhor conhecimento dos fatores de risco sobre o câncer de pele. O tratamento poderá ou não trazer benefícios a você, mas as informações obtidas por meio do estudo poderão ser importantes para a descoberta de novos fatores envolvidos no Carcinoma Basocelular.

As consultas, exames, procedimentos relacionados ao estudo e tratamentos utilizados serão inteiramente gratuitos.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:**1. ACESSO, A QUALQUER TEMPO, ÀS INFORMAÇÕES SOBRE PROCEDIMENTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS RELACIONADOS À PESQUISA.**

Em caso de dúvidas relacionadas a sua participação na pesquisa, você poderá a qualquer momento entrar em contato com o pesquisador e tirar suas dúvidas. Com relação às informações sobre os procedimentos aos quais foi ou será submetido, os médicos do Setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas poderão esclarecer todas as suas dúvidas e dar maiores explicações sobre os procedimentos e tratamento.

2. LIBERDADE DE RETIRAR SEU CONSENTIMENTO E DE DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM PREJUÍZO À CONTINUIDADE DA ASSISTÊNCIA.

É importante que você esteja consciente de que a participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e de que você pode recusar-se a participar ou sair do estudo a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tenha direito de outra forma. Em caso de você decidir retirar-se do estudo, deverá notificar ao profissional e/ou pesquisador que esteja atendendo-o. A recusa em participar ou a saída do estudo não influenciarão seus cuidados nesta instituição. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

3. CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE.

Algumas informações obtidas a partir de sua participação neste estudo não poderão ser mantidas estritamente confidenciais. Os profissionais de saúde que estarão cuidando de você, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e os pesquisadores podem precisar consultar seus registros. Você não será identificado quando o material de seu registro for utilizado, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza as inspeções em seus registros.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Caso você necessite de informações adicionais, ou tenha mais perguntas sobre o estudo, por favor, ligue para o pesquisador/assistente Dr. Marcos Antonio Rodrigues Martinez no telefone 11-6193-8873.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Seu papel na pesquisa será o de consentir o fornecimento do material proveniente da cirurgia de retirada do Carcinoma Basocelular o qual é portador, bem como de 10 mililitros de sangue para a realização da pesquisa. Esse material poderá ser utilizado em pesquisas futuras e este consentimento também terá validade para estas, sendo este termo de consentimento de validade temporal ilimitada. Não haverá prejuízo ao seu tratamento que vem sendo feito no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200__ .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo B - Informações gerais sobre os pacientes e tumores

Registro Geral : _____ **Data:** ____/____/____

Nome: _____

Sexo: () masculino () feminino **Escolaridade(anos):** _____

Renda: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ **Idade:** _____

Profissão: _____ **Procedência:** _____

Fototipo (Fitzpatrick): () I () II () III () IV () V () VI

Usa Filtro Solar? () sim () não

Localização do(s) CBC(s), Tipo Histológico e Classificação de Risco:

- a. _____ () AR () BR
- b. _____ () AR () BR
- c. _____ () AR () BR
- d. _____ () AR () BR
- e. _____ () AR () BR

Anexo C - Lista geral de pacientes e CBCs utilizados no estudo. Nesta tabela constam as iniciais dos pacientes, o gênero, a idade, o fototipo (Fitzpatrick), numeração dada para as amostras, localização dos CBCs, subtipo histológico, risco histológico, resultados das PCRs para os microssatélites D6S251 e D6S252.

Iniciais	Gênero	Idade	Fototipo	CBC	Localização	Histopatologia	Risco	D6S251	D6S252
LL	Masculino	83	III	01	Bucal E	Nodular	Baixo	Inalterado	Inalterado
ZTS	Feminino	82	III	02	Orelha E	Nodular / Micronodular / esclerodermiforme	Alto	Inalterado	Inalterado
AA	Masculino	62	II	03	Antebraço D	Nodular / Micronodular / esclerodermiforme /adenóide	Alto	Inalterado	Inalterado
AA	Masculino	62	II	04	Frontal D	CA Metatípico	Excluído	Excluído	Excluído
AA	Masculino	62	II	05	Mandibular E	Sólido / Superficial	Baixo	Inalterado	Inalterado
AA	Masculino	62	II	06	Sulco Nasogeniano D	Nodular / esclerodermiforme	Alto	MSI	Inalterado
AA	Masculino	62	II	07	Epicanto E	Sólido	Baixo	Inalterado	Inalterado
SGA	Masculino	65	IV	08	Zigomática D	Sólido / Cístico / Micronodular	Alto	Inalterado	Não Realizado
SGA	Masculino	65	IV	09	Malar E	Sólido / Cístico / Micronodular	Alto	LOH	Não Realizado
ELG	Feminino	89	III	10	Frontal E	Sólido / Nodular/ Micronodular	Alto	LOH	Não Realizado
DAF	Masculino	60	IV	11	Infrapalpebral D	Nodular	Baixo	Inalterado	Não Realizado
EOC	Masculino	81	III	12	Dorso Nasal	Sólido / Micronodular	Alto	MSI	Não Realizado
SJR	Masculino	66	II	13	Infrapalpebral E	Nodular	Baixo	Inalterado	Inalterado
JBA	Masculino	50	III	14	Frontal D	Nodular	Baixo	Inalterado	Inalterado
JLS	Feminino	55	III	15	Infra palpebral D	Nodular / Micronodular	Alto	Inalterado	Não Realizado
BD	Masculino	61	II	16	Infra palpebral D	Nodular / Micronodular	Alto	Inalterado	Inalterado
ERA	Feminino	80	III	17	Antebraço D	Nodular	Baixo	Inalterado	Não Realizado
HC	Masculino	77	III	18	Infra palpebral D	Nodular / Adenoide/Superficial	Alto	LOH	Inalterado
SGA	Masculino	65	III	19	Mandibular D	Nodular / Micronodular	Alto	Inalterado	Não Realizado
MAS	Masculino	46	III	20	Asa Nasal D	Sólido	Baixo	Inalterado	Inalterado
MAS	Masculino	46	III	21	Asa nasal E	Sólido	Baixo	Inalterado	Inalterado
MAS	Masculino	46	III	22	Dorso	Sólido / superficial	Baixo	Inalterado	Inalterado
MAS	Masculino	46	III	23	Tórax anterior	Nodular / superficial	Baixo	Inalterado	Inalterado
MRR	Feminino	52	III	24	Dorso Nasal	Sólido / Micronodular	Alto	LOH	Não Realizado
MRR	Feminino	52	III	25	Infra palpebral E	Sólido / Micronodular	Alto	Inalterado	Não Realizado
WJD	Masculino	82	III	26	Temporal E	Sólido-cístico	Baixo	Inalterado	Não Realizado
LCP	Masculino	60	II	27	Retroauricular D	Ca Metatípico	Excluído	Excluído	Excluído
DAM	Feminino	71	III	28	Dorso Nasal	Ca Metatípico	Excluído	Excluído	Excluído
AR	Masculino	80	II	29	Infra palpebral E	Ca Metatípico	Excluído	Excluído	Excluído
MAS	Masculino	46	III	30	Dorso Nasal	Sólido / Micronodular / Superficial	Alto	Não Realizado	Inalterado
AFS	Masculino	59	III	31	Frontal D	Ca Metatípico	Excluído	Excluído	Excluído
ZAB	Feminino	48	III	32	Antebraço E	Nodular / Superficial	Baixo	Inalterado	Não Realizado

Anexo D - Fotografias dos géis de agarose e poliacrilamida obtidas durante a realização do trabalho

Gel de Agarose. Quantificação de algumas amostras de tecido normal e CBCs estudados.

Gel de Agarose. Visualização de algumas amostras de tecido normal e CBCs após a realização da PCR.

Resolução em gel de poliacrilamida para o microssatélite D6S251.
Algumas amostras de tecido normal e CBCs utilizadas.

Resolução em gel de poliacrilamida para o microssatélite D6S252.
Algumas amostras de tecido normal e CBCs utilizadas (numeração por paciente).

9 REFERÊNCIAS

1. Incidência de Câncer no Brasil – *Estimativa 2005* [online]. Rio de Janeiro. Instituto Nacional do Câncer (INCA) - Ministério da Saúde; 2005. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2005/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5
2. Ratner D, Peacocke M, Zhang H, Ping XL, Tsou HC. UV-specific p53 and PTCH mutations in sporadic basal cell carcinoma of sun-exposed skin. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(2):293-7.
3. Tsao H. Genetics of nonmelanoma skin cancer. *Arch Dermatol*. 2001;137:1486-92.
4. Preston DS, Stern RS. Nonmelanoma cancers of the skin. *N Engl J Med*. 1992;327:1649-62.
5. Ananthaswamy HN, Pierceall WE. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol*. 1990;52(6):1119-36.
6. Grossman D, Leffell DJ. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Arch Dermatol*. 1997;133:1263-70.
7. Cabrera T, Garrido U, Concha A, Martin J, Esquivias J, Oliva MR, Ruiz-Cabello F, Serrano S, Garrido F. HLA molecules in basal cell carcinoma of the skin. *Immunology*. 1992;185:440-52.
8. Saldanha G, Fletcher A, Slater DN. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. *Br J Dermatol*. 2003;148:195-202.

9. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ, Honchel R, Halling KC. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res.* 1996;56:4836-40.
10. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, *et al.* Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nature Genet.* 1995;9: 48-55.
11. Iwata K, Takamura N, Nakashima M, Alipov G, Mine M, Matsumoto N, Yoshiura K, Prouglo Y, Sekine I, Katayama I, Yamashita S Loss of heterozygosity on chromosome 9q22.3 in microdissected basal cell carcinomas around the Semipalatinsk Nuclear Testing Site, Kazakhstan. *Hum Pathol.* 2004;35:460-4.
12. Shen T, Park S, Boni R, Saini N, Pham T, Lash AE, Vortmeyer AO, Zhuang Z. Detection of loss of heterozygosity on chromosome 9q22.3 in microdissected sporadic basal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 1999; 30:284-7.
13. Ribeiro GRH, Francisco G, Teixeira LVS, Romão-Correia RF, Sanches Jr. JA, Festa Neto C, Ruiz IRG. Repetitive DNA alterations in human skin cancers. *J Dermatol Sci.* 2004;36:79-86.
14. Quinn AG, Healy E, Rehman I, Sikkink S, Rees JL. Microsatellite instability in human non-melanoma and melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol.* 1995;104(3):309-12.

15. Sironi E, Cerri A, Tomasini D, Sirchia SM, Porta G, Rossella F, Grati FR, Simoni G. Loss of heterozygosity on chromosome 4q32-35 in sporadic basal cell carcinomas: evidence for the involvement of p33ING2/ING1L and SAP30 genes. *J Cut Pathol*. 2004;31(4):318-22.
16. Francisco G, Festa Neto C, Sanches Jr. JA, Ruiz IRG. Genomic instability in basal cell carcinomas. *J Dermatol Sci*. 2005;39:186-8.
17. Beiguelman B. *Citogenética humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. 328p.
18. Rossi BM, Pinho M. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: LEMAR; 1999. 98p.
19. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard, HF. *Thompson & Thompson Genética Médica*. 6ª. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
20. Étienne, J. *Bioquímica Genética e Biologia Molecular*. 6ª. Edição. São Paulo: Santos Livraria Editora, 2003.
21. Pinho M. Câncer colo-retal com instabilidade de microssatélites: uma doença diferente. *Rev Bras Coloproctol*. 2002; 22:139-44.
22. Iglesias RA, Kindlund E, Tammi M, Wadelius C. Some microsatellites may act as novel polymorphic cis-regulatory elements through transcription factor binding. *Gene*. 2004; 341:149-165.
23. Hussein MR, Wood GS. Microsatellite instability and its relevance to cutaneous tumorigenesis. *J Cutan Pathol*. 2002;29:257-67.
24. Abe Y, Masuda H, Okubo R. Microsatellite instability of each tumor in sporadic synchronous multiple colorectal cancers. *Oncol Rep*. 2001;8:299-304.

25. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implicationsof microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2003; 29:201-12
26. Fearon ER, Vogeltein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61:759-67
27. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993; 363:558-61.
28. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993; 260:816-9.
29. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGFbeta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995; 268:1336-8.
30. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet*. 1996; 14:255-7.
31. Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, Rhyu MG, Cottrell J, Abraham JM, Biden K, Simms L, Leggett B, Bova GS, Frank T, Powell SM, Sugimura H, Young J, Harpaz N, Shimizu K, Matsubara N, Meltzer SJ. Frequent mutation of the E2F-cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res*. 1997; 57:2350-3.

32. Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Ritchie AJ, Weber JL, Russell SE. Widespread microsatellite instability occurs infrequently in adenocarcinoma of the gastric cardia. *Oncogene*. 1996; 12:1653-62.
33. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene*. 1994; 9:29-32.
34. Sood AK, Holmes R, Hendrix MJ, Buller RE. Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001; 61:4371-4.
35. Tibiletti MG, Furlan D, Taborelli M, Facco C, Riva C, Franchi M, Cossu A, Trubia M, Taramelli R, Capella C. Microsatellite instability in endometrial cancer: relation to histological subtypes. *Gynecol Oncol*. 1999; 73:247-52.
36. Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res*. 1996; 56:4021-6.
37. Dillon EK, de Boer WB, Papadimitriou JM, Turbett GR. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in mammary carcinoma and its probable precursors. *Br J Cancer*. 1997; 76:156-62.
38. Thiagalingam S, Foy RL, Cheng K, Lee HJ, Thiagalingam A, Ponte JF. Loss of heterozygosity as a predictor to map tumor suppressor genes in cancer: molecular basis of its occurrence. *Curr Opin Oncol*. 2002; 14:65-72.
39. Santos DCC. *Estudo de mutações nos genes PTCH e de microssatélites em pacientes portadores de carcinoma basocelular esporádico e síndrome de Gorlin*. [Dissertação]. Rio Claro: Instituto de Biociências da UNESP; 2003.

40. Gailani MR, Bale SJ, Leffel DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S, Drum MA, Pastakia B, McBride OW, Kase R, et al. Developmental defects in Gorlin Syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell*. 1992;69:111-7.
41. Zaphiropoulos PG, Unden AB, Rahnama F, Hollingsworth RE, Toftgard R. PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res*. 1999;59:787-92.
42. Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ. Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum. Mol. Genet*. 1999;8:291-7.
43. Louro ID, Llerena Jr. JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Conforti-Froes N. *Genética Molecular do Câncer*. São Paulo: MSG; 2002.
44. Gailani MR, Bale AE. Developmental genes and cancer: Role of Patched in basal cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(15):1103-09.
45. Albino AP, Fountain JW. *Molecular genetics of human malignant melanoma*. Kluwer Academic Publishers Publishers, 1993. capítulo 8, p. 201-55.
46. Birbaum D, Adelaide J, Marics I, Raybold F. Recherche d'une base moléculaire des cancers: l'exemple des mélanomes malins. *Bull Cancer*. 1989; 76: 227-36.
47. Dracopoli NC, Harnett P, Bale SJ, Stanger BZ, Tucker MA, Housman DE, Kefford RF. Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci*. 1989; 86: 4614-18.

48. Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN, Lahti J, *et al.* Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 10557-61.
49. Brison O. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1155: 25-41.
50. Verma RS, Arvind B. Chromosomes in clinical medicine. In: *Human chromosomes: principles and techniques*. 2^a ed.: McGraw-Hill Inc.1995.p.362-409.
51. Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, Meese EU, Casey G, Araujo DE, Witkowski CM, Nagle RB. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science.* 1990;247:568-71.
52. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, *et al.* Assignment of a locus for familial melanoma, MLM to chromosome 9p13-p22. *Science.* 1992;258:1148- 52.
53. Dracopoli NC, Houghton NA, Old LJ. Loss of polymorphic restriction fragments in malignant melanoma: implications for tumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci.* 1985; 82:1470-4.
54. Kraehn GM, Scharl M, Peter RU. Human malignant melanoma. A genetic disease? *Cancer.* 1995; 75:1228-37.
55. Berxs G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJ, van Bokhoven A, van Roy F. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics.* 1995; 26:281-9.

56. Basset-Seguin N, Dereure O, Guillot B. Bases génétiques des tumeurs cutanées. *Ann. Dermatol. Vénéréol.* 1995;122: 217-25.
57. Dams E, Van de Kelft EJ, Martin JJ, Verlooy J, Willems PJ. Instability of microsatellites in human gliomas. *Cancer Res.* 1995;55(7):1547-9.
58. Contegiacomo A, Palmirotta R, De Marchis L, Pizzi C, Mastranzo P, Delrio P, et al. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer.* 1995;64(4):264-8.
59. Noviello C, Courjal F, Theillet C. Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6 in breast cancer: possibly four regions of deletion. *Clin Cancer Res.* 1996;2(9):1601-6.
60. Sheng ZM, Marchetti A, Buttitta F, Champeme MH, Campani D, Bistocchi M, Lidereau R, Callahan R. Multiple regions of chromosome 6q affected by loss of heterozygosity in primary human breast carcinomas. *Br J Cancer.* 1996;73:144-7.
61. Wooster R, Cleton-Jansen A-M, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS, Gusterson BA, Ponder BA, von Deimling A, Wiestler OD, et al. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet.* 1994;6:152-6.
62. Peris K, Keller G, Chimenti S, Amantea A, Kerl H, Hofler H. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma. *J Invest Dermatol.* 1995;105:625-8.
63. Roa JC, Araya JC, Villaseca MA, Roa I, Correa P. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in neoplastic and preneoplastic gastric lesions. *Rev Med Chil.* 2003;131(11):1227-3.

64. D'Errico M, Calcagnile AS, Corona R, Fucci M, Annessi G, Baliva G, Pasquini P, Dogliotti E: p53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late stage. *Cancer Res.* 1997;57:747-52.
65. Saridaki Z, Liloglou T, Zafiropoulos A, Koumantaki E, Zoras O, Spandidos DA: Mutational analysis of CDKN2A genes in patients with squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2002;148:638-48.
66. Jonsson M, Johannsson O, Borg A. Infrequent occurrence of microsatellite instability in sporadic and familial breast cancer. *Eur J Cancer.* 1995;31(A): 2330-4.
67. Glebov OK, McKenzie KE, White CA, Sukumar S. Frequent P53 gene mutations and novell alleles in familial breast cancer. *Cancer Res* 1994;54: 3703-9.