Luciana Sanches Cabral

**A instabilidade genômica como fator
prognóstico e diagnóstico na progressão de
queratose actínica para carcinoma
espinocelular humano**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz

São Paulo

2007

Luciana Sanches Cabral

**A instabilidade genômica como fator
prognóstico e diagnóstico na progressão de
queratose actínica para carcinoma
espinocelular humano**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz

São Paulo

2007

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, mesmo lutando por seus ideais não deixam de olhar para aqueles que mais precisam, sempre buscando a igualdade e a preservação do ambiente para as futuras gerações.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz, orientadora deste trabalho, pela paciência, confiança e ensinamentos científicos constantes em todos estes anos.

Aos Profs. Drs. Cyro Festa Neto, José A. Sanches e Eugênio Pimentel pelo auxílio na obtenção das amostras estudadas.

Aos Mestres Marcos A. R. Martinez, Daniela C. C. Santos e Adriana M. Orimoto pela doação de amostras de DNA para este estudo e ensinamentos.

À Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto, pela avaliação histológica dos espécimes estudados

Ao dermatologista Alberto Cardoso pela ajuda na obtenção de amostras tumorais.

Aos amigos do Laboratório de Genética do Instituto Butantan Losanges de F. Lozano, Juliana S. Capitânio, Anelise Klein, Marcelo M. T. de Souza, Rodrigo F. Ramalho, Alessandra F. de Souza, Dra. Ruth Camargo Vassão, Dr. Durvanei Augusto Maria, Zenaide L. da Silva, Nair Pereira, Vilma Barsaline, Ronaldo Dias e Valquíria Menezes, pela paciência, colaboração e amizade.

Aos Profs. Drs. Cyro Festa Neto, Shigueko S. T. Pueyo e Valéria Aoki pela argüição no exame de qualificação, proporcionando mais ensinamentos para o término deste trabalho.

À minha mãe Jaira Sanches pelo apoio, paciência e amor.

A todos os meus familiares pelo apoio.

Ao meu namorado Rodrigo Ramos pelo amor, companheirismo e paciência.

Aos meus tios Artur Persoli e Rosa L. Persoli pelo apoio e motivação desde a faculdade.

Aos meus colegas de moradia Carolina Di Paolo, Henrique Serezani, Sandro Detoni e Márcia de Oliveira Rocha que me aturaram e incentivaram.

Aos meus amigos da cidade de Santos que sempre me recebem se braços abertos.

A todos os pacientes por terem concordado em colaborar com esta pesquisa.

À FUNDAP e FAPESP pelo apoio financeiro.

“É melhor tentar e falhar,
que se preocupar e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver...”

Martin Luther King

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 Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos de 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	1
1.1 Estrutura da pele e malignização das células	1
1.2 Cânceres cutâneos	4
1.3 Queratose actínica	5
1.4 Radiação UV e câncer	6
1.5 DNA repetitivo e câncer	8
2 OBJETIVOS	14
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
3.1 Casuística	15
3.2 Extração e quantificação do DNA.....	15
3.3 Microsatélites.....	16
3.4 RAPD	18
4 RESULTADOS	21
4.1 Microsatélites.....	21
4.1.1 Alterações detectadas nos microsatélites com cada “primer”.....	23
4.1.1.1 D6S251	23
4.1.1.2 D6S252	24
4.1.1.3 D9S50	24
4.1.1.4 D9S180	25
4.1.1.5 D9S287	25
4.1.1.6 D9S280	26
4.1.2 Alterações gerais obtidas nos microsatélites.....	26
4.2 RAPD	28
4.2.1 “Primer” OPA-2.....	28
4.2.2 “Primer” OPA-7.....	30

4.2.3 “Primer” OPA-13.....	31
4.2.4 “Primer” OPA-17.....	32
4.2.5 “Primer” OPB-8.....	34
4.2.6 “Primer” OPB-11.....	35
4.2.7 “Primer” OPB-13.....	37
4.2.8 “Primer” OPB-19.....	39
4.2.9 Padrões gerais obtidos com a técnica RAPD.....	40
5 DISCUSSÃO	44
5.1 Microssatélites.....	44
5.2 RAPD	48
6 CONCLUSÕES	53
7 ANEXOS	54
8 REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μl	microlitro (10^{-6} litro)
μM	micro Molar (10^{-6} Molar)
A	ampère
AK	“actinic keratosis”
BCC	“basal cell carcinoma”
CBC	carcinoma basocelular
CCNM	câncer cutâneo não-melanoma
CDKN1A	“cyclin-dependent kinase 1 A”
CDKN2A	“cyclin-dependent kinase 2 A”
CEC	carcinoma espinocelular
CM	melanoma cutâneo
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido tetracético etilenodiamina
et al.	e outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
HC	Hospital das Clínicas
HPV	papiloma vírus humano
KA	queratoacantoma
Kb	Kilobases (1000 pares de bases)
LOH	perda de heterozigosidade
M	molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
mM	mili Molar (10^{-3} Molar)
MSI	instabilidade de microssatélite
ng	nanogramas (10^{-9} gramas)
NM	nevo melanocítico
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	par de bases

pMol	pico Molar (10^{-12} Molar)
PCR	polimerase chain reaction
PTCH	“patched”
QA	queratose actínica
RAPD	“random amplified polimorphic DNA”
Rb	retinoblastoma
rpm	rotações por minuto
SCC	“squamous cell carcinoma”
SDS	dodecil sulfato de sódio
SHH	sonic hedgehog
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TES	TRIS + EDTA + SDS
TP53	gene codificador da proteína p53
TRIS	tris-hydroxymethyl-aminomethane
TSG	“tumor supressor gene”
USP	Universidade de São Paulo
UVA, UVB, UVC	ultravioleta tipos A, B e C
V	volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado formado de cinco camadas celulares principais: germinativa, espinhosa (malpighiana), granulosa e camada córnea. Na lâmina basal estão os melanócitos, que produzem melanossomos, distribuídos para as camadas superiores ² .	1
Figura 2 – Diversos componentes relacionados ao controle do ciclo celular em G0/G1 ou G1/S são considerados supressores tumorais ¹¹ .	3
Figura 3 - Componentes do espectro eletromagnético (Adaptado de Soehnge et al. ⁵).	7
Figura 4 – Localização dos genes CDKN2A e PTCH 1 e microssatélites estudados no cromossomo 9 humano, referidos neste estudo	10
Figura 5 - Cromossomo 6 humano mostrando a localização dos microssatélites D6S251 e D6S252	12
Figura 6 - Quantificação do DNA em gel de agarose através do programa Kodak 3.6. A concentração de cada amostra está indicada abaixo (ng/μl). Foi aplicado 1 μl de cada amostra. Os números e letras acima de cada “slot” identificam os pacientes e respectivas lesões. (?) DNA de fago lambda; (N) tecido normal.	21
Figura 7 - Padrão dos microssatélites D9S180 (A) e D6S252 (B). Nestas amostras não foram observadas diferenças entre os padrões das lesões e dos tecidos controles. Os números e letras acima de cada “slot” identificam os pacientes e respectiva lesão. (S) sangue, (N) tecido normal.	22
Figura 8 - Alterações encontradas no microssatélite D6S251. As setas mostram LOH (pacientes 21, 22 e 234) e a cabeça da seta mostra MSI (pacientes 201 e 258). (M) Marcador de peso molecular 50 ou 100 bp (BioLabs), (N) tecido normal.	23
Figura 9 – A seta indica MSI em D6S252 no CEC III do paciente 258. (M) Marcador 50 bp (BioLabs), (N) tecido normal	24
Figura 10 - Presença de MSI na QA do paciente 261 (veja seta). (M) Marcador 100 bp (BioLabs), (N) tecido normal	24

Figura 11 – Pacientes 21 e 258 mostram MSI no padrão do microssatélite D9S180, indicados pelas setas. (M) Marcador 100 bp (BioLabs), (S) sangue, (N) tecido normal.....	25
Figura 12 – A seta mostra LOH no CEC I (paciente 21) referente ao microssatélite D9S287. (M) marcador 100 bp (BioLabs), (S) sangue.	25
Figura 13 – Padrão do microssatélite D9S280. A seta indica MSI nos pacientes 21 e 239. (S) sangue, (N) tecido normal, (M PCRM) Marcador PCR Marker (BioLabs)	26
Figura 14 - Exemplos de padrões RAPD obtidos com o “primer” OPA-2. As setas mostram ganho ou perda da banda de 1, 7 Kb. (M) Marcador 100 bp (LGC), (S) sangue, (N) tecido normal.....	29
Figura 15 – Padrão RAPD obtido com o “primer” OPA-7 em gel de agarose 1,5 % (A) e em gel de poliacrilamida 7 % (B). QA (paciente 274) mostrou padrão igual ao tecido normal (A). As setas indicam ganho ou perda da banda de 1,4 Kb (B). (M) Marcador 100 bp BioLabs, (N) tecido normal, (S) sangue	31
Figura 16 – Padrão RAPD obtido com o “primer” OPA-13 em gel de agarose 1,5 %. Os pacientes 274, 223 e 227 apresentam padrão de bandas igual ao normal. (M) Marcador 1 Kb (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue	32
Figura 17 – Padrão RAPD obtido com o “primer” OPA-17 em gel de agarose 1,5 %. O paciente 201 apresentou padrão de bandas igual ao normal. As setas indicam algumas perdas/ganhos de diferentes bandas. (M) Marcador 2-Log ladder (BioLabs), (N) tecido normal	33
Figura 18 - Padrão RAPD obtido com o “primer” OPB-8 em gel de agarose 1,5 %. As setas indicam uma banda de aproximadamente 520 pb presente no tecido normal, e perdida em 26 % das lesões. M 1 Kb: marcador 1 Kb DNA Ladder (Ultraclean); M pBR Hinf I: marcador plasmídeo pBR322 clivado com a enzima de restrição Hinf I; (N) tecido normal.....	35
Figura 19 - Padrão RAPD obtido com o “primer” OPB-11 em gel de agarose 1,5 %. O CEC I (paciente 223) e o CEC II (paciente 234) apresentaram padrão de bandas igual ao controle. As setas indicam perda ou ganho da	

banda de aproximadamente 1,8 Kb. (M) Marcador 1 Kb (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue..... 36

Figura 20 - Padrão RAPD obtido com o “primer” OPB-13 em gel de agarose 1,5 %. As setas indicam perda ou ganho de bandas de 1,8 Kb, 1 Kb, 800 pb e 600 pb. O paciente 241 apresentou padrão igual ao controle. M 1 Kb: marcador 1 Kb (BioLabs); M LMW: Marcador Low Molecular Weight (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue 38

Figura 21 - Padrão RAPD obtido com o “primer” OPB-19 em gel de agarose 1,5 %. As setas indicam perda ou ganho de bandas de 1,3 Kb. M 1 Kb L: marcador 1 Kb Ladder (BioLabs); M 50 bp: Marcador 50 bp (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos “primers” que foram usados na obtenção de padrões de microssatélites.....	17
Tabela 2 - Total de lesões estudadas por tipo histológico com cada microssatélite.	18
Tabela 3 - Sequência dos “primers” usados para obtenção dos padrões de RAPD e temperatura de anelamento	19
Tabela 4 - Total de lesões estudadas por “primer” para RAPD.....	20
Tabela 5 - Total de pacientes, LOH e MSI em cada paciente por microssatélite estudado.....	27
Tabela 6 - Porcentagem de lesões apresentando perda, ganho ou igual número de bandas nos padrões RAPD alterados.	41
Tabela 7 - Total de lesões que apresentaram padrão de bandas igual ou diferente do controle com cada “primer” de RAPD.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes, em cada tipo de lesão, usando o “primer” OPA-2	29
Gráfico 2 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPA-7	30
Gráfico 3 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPA-13	32
Gráfico 4 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPA-17	33
Gráfico 5 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-8	34
Gráfico 6 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-11	37
Gráfico 7 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-13	39
Gráfico 8 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-19	39
Gráfico 9 - Porcentagem de padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes obtidos com a técnica RAPD em cada tipo histológico de lesão .	41

Cabral LS. *A instabilidade genômica como fator prognóstico e diagnóstico na progressão de queratose actínica para carcinoma espinocelular humano* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

A instabilidade genômica tem sido amplamente usada para caracterizar células cancerosas. Alterações genéticas em queratose actínica (QA) e carcinoma espinocelular (CEC) foram investigadas pelo método de “random amplified polymorphic DNA” (RAPD) e análise de microssatélites com o objetivo de encontrar marcadores moleculares para auxiliar o prognóstico e o diagnóstico médico. O DNA foi obtido de pacientes brasileiros cirurgiados e tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, totalizando oito QAs, 24 CECs, e tecidos normais e/ou leucócitos correspondentes. Os microssatélites estudados foram D6S251, D6S252, D9S15, D9S50, D9S52, D9S180, D9S196, D9S280 e D9S287, tendo em vista a detecção de instabilidade genômica representada por perda de heterozigidade (LOH) e instabilidade de microssatélites (MSI). Os “primers” usados para comparar os padrões de RAPD foram OPA-2, OPA-7, OPA-13, OPA-17, OPB-8, OPB-13, OPB-17 e OPB-19. Foi obtida correlação significativa na progressão de QA (1/8) para CEC (5/22) referente ao microssatélite D6S251. As diferenças nos padrões de DNA obtidos pelo método RAPD comparados aos controles foram maiores em lesões com maior grau de severidade segundo critério histológico. O mesmo padrão RAPD foi observado no controle e no tumor em 27 % QA, 24 % CEC I, 9 % CEC II e 0 % CEC III. Estes resultados mostram que o microssatélite D6S251 e o método de RAPD são informativos, podendo ser potenciais candidatos para auxílio no diagnóstico e prognóstico de QA e CEC.

Descritores: 1.Ceratose 2.Carcinoma de células escamosas 3.Instabilidade de microssatélites 4.Perda de heterozigidade 5.Técnica de amplificação ao acaso de DNA polimórfico.

Cabral LS. Genomic instability as a prognostic and diagnostic factor on the progression of human actinic keratosis, to squamous cell carcinoma. [master thesis]. School of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2007.

Genomic instability has been widely used to characterize cancer cells. Genetic alterations in human actinic keratosis (AK) and squamous cell carcinomas (SCC) were investigated by the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method, and microsatellite analysis. DNA was obtained from Brazilian patients diagnosed and treated in the School of Medicine of University of Sao Paulo out Clinics Hospital. Eight AKs, 24 SCCs, and 4 BCCs, matched to normal skin tissue and/or leukocytes were studied. Microsatellite patterns were obtained with primers specific to amplify D6S251, D6S252, D9S15, D9S50, D9S52, D9S180, D9S196, D9S280, and D9S287, in search of detection Loss of heterozygosity (LOH) and Microsatellite instability (MSI). The RAPD primers were: OPA-2, OPA-7, OPA-13, OPA-17, OPB-8, OPB-13, OPB-17, and OPB-19. A significant correlation was obtained regarding the progress of AK (1/8) to SCC (5/22) detected with the D6S251 microsatellite. DNA fingerprint obtained with RAPD primers were altered in increasing number of samples, according to their histological degree of differentiation. Similar RAPD patterns were observed in tumor and control in 27 % AK, 24 % SCC I, 9 % SCC II, and zero SCC III. These results suggest microsatellite D6S251 and RAPD method to be potential tools in diagnosis and prognosis of AK and SCC.

Descriptors: 1.Keratosis 2.Carcinoma, squamous cell 3.Microsatellite instability 4. Loss of heterozygosity 5.Random amplified polymorphic DNA technique.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura da pele e malignização das células

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica (epiderme) e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica (derme)¹. Vista da derme para a superfície, a epiderme possui diversas camadas (Figura 1).

Figura 1— A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado formado de cinco camadas celulares principais: germinativa, espinhosa (malpighiana), granulosa e camada córnea. Na lâmina basal estão os melanócitos, que produzem melanossomos, distribuídos para as camadas superiores².

Mutações genéticas podem conferir às células algumas características especiais como capacidade ilimitada de proliferação, perda de resposta a fatores de inibição de crescimento, evasão de apoptose (morte celular programada), capacidade de migrar e invadir outros tecidos (metástases) e produção de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Tais mutações podem levar ao desenvolvimento do câncer³.

Análises moleculares de células cancerosas em vários estágios de progressão têm revelado alterações em genes supressores tumorais (TSG) e oncogenes acumuladas durante a progressão do tumor e correlacionadas com a agressividade do câncer⁴. Qualquer gene que codifica uma proteína capaz de transformar células em cultura ou de induzir câncer em animais é chamado oncogene. Dos muitos oncogenes conhecidos, todos, com poucas exceções, são derivados de genes celulares normais (proto-oncogenes), cujos produtos participam no controle dos processos de crescimento celular. TSGs codificam proteínas que reduzem ou inibem a progressão do ciclo celular, através de fases específicas e proteínas de controle de pontos de checagem que podem interromper o ciclo celular. Se o DNA estiver danificado, ou em presença de cromossomos anormais, essas proteínas podem promover a apoptose ou ativar genes que codificam enzimas reparadoras de DNA⁵.

Um dos TSGs mais estudados é o TP53, que está localizado no cromossomo 17p13⁵. Este gene codifica um fator de transcrição (proteína p53), cujas principais funções são induzir a expressão de diferentes proteínas que levam a célula à apoptose ou interrompem o ciclo celular em casos de danos no DNA. Radiação UV pode induzir mutações no gene TP53, associadas a mais da metade de todos os cânceres humanos⁶. Nesse caso, o gene perde sua função, favorecendo a contínua divisão da célula mutante.

A proteína p53 induz a transcrição da inibidora da ciclinquinase p21^{WAF/CIP}. O gene que codifica essa proteína p21 é chamado CDKN1A, e

está localizado no cromossomo 6p21.2. A proteína p21^{WAF/CIP} liga-se e inibe os complexos CDK-ciclinas na fase G₁. Como resultado, células que apresentam DNA danificado são retidas em G₁ até que o dano seja reparado e que os níveis de p53 e p21^{WAF/CIP} caiam; as células podem, então, progredir até a fase S (Figura 2)⁷.

Outro importante inibidor de ciclinoquinase é p16^{INK4A}, codificado pelo gene CDKN2A, localizado no cromossomo 9p21⁸. A proteína p16^{INK4A} inibe a progressão do ciclo celular em G₁ ao bloquear as ciclinas D4 e D6 de fosforilar a proteína retinoblastoma (Rb) (Figura 2)⁹. Outra proteína originada deste mesmo locus é p14^{ARF}, envolvida na via de p53¹⁰.

Figura 2 – Diversos componentes relacionados ao controle do ciclo celular em G₀/G₁ ou G₁/S são considerados supressores tumorais¹¹.

O TSG PTCH codifica uma proteína regulatória envolvida na via de sinalização de sonic hedgehog, o qual tem um papel importante na tumorigênese. Este gene está envolvido no desenvolvimento de CBC, mas também de outros tumores cutâneos¹².

1.2 Cânceres cutâneos

Tumores de pele incluem o carcinoma espinocelular (CEC), originado dos queratinócitos da camada espinhosa da pele; carcinoma basocelular (CBC), derivado das células basais, e melanoma cutâneo (CM), originado dos melanócitos (Figura 1). Os principais tipos de cânceres cutâneos não-melanoma (CCNM) (CEC e CBC), estão entre os tipos mais comuns de tumores malignos que o ser humano adquire no curso de sua vida. Estima-se que ao ano sejam diagnosticados 2.750.000 novos casos em todo o mundo, sendo aproximadamente 70% CBC e 20% CEC. Outros CCNM incluem neoplasias originadas de estruturas dérmicas e do tecido subcutâneo, que constituem uma pequena porcentagem de todos estes tumores, e têm diferentes origens¹³. No Brasil, a estimativa de novos casos de CCNM em 2006 foi 55.480 casos em homens e 61.160 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 31 casos novos a cada 100 mil homens e 65 para cada 100 mil mulheres. É o mais incidente em homens em todas as regiões do Brasil, e o segundo mais freqüente nas mulheres somente na região sudeste¹⁴.

O fator etiológico de maior importância no desenvolvimento dos CCNM é a radiação ultravioleta (UV), estimando-se ser responsável por 90% dos casos. Os 10% restantes dividem-se entre radiações ionizantes, carcinógenos químicos, papiloma vírus humano (HPV), e fatores intrínsecos, como fatores genéticos, lesões precursoras e fatores imunológicos⁶. CEC geralmente se desenvolve na face, orelhas, dorso das mãos, lábio inferior, mucosa oral e genitália externa. Seu predomínio está relacionado com a

idade e exposição solar crônica. O aparecimento de metástases pode ocorrer após meses ou anos do início da lesão, sendo mais comum nos carcinomas de mucosas, em cicatrizes de queimaduras ou ainda no dorso das mãos^{13,15}.

A classificação citológica de CEC foi introduzida por Broders (1921)* citado por Barksdale et al.¹⁶ e tem sido usada até hoje. Normalmente é usado o grau de pleomorfismo nuclear e maturação citoplasmática medida por queratinização. O grau pode ser reportado com números 1-4 ou 1-3 ou descrito como: bem, moderadamente ou pobremente diferenciado¹⁶. Clinicamente apresenta-se como um nódulo duro, queratósico, podendo ter seu centro ulcerado. Sua evolução é rápida, aumentando de tamanho, podendo se tornar verrucoso ou vegetante¹³. O comportamento biológico do CEC depende do tipo de apresentação, tamanho, profundidade, etiologia e sítio anatômico do tumor, apresentando riscos maiores de metástases que CBC⁶. Acredita-se que o CEC, como a maioria dos outros tipos de câncer possui lesões precursoras como a queratose actínica (QA), cuja progressão para CEC é de aproximadamente 10 % dos casos, e keratoacantoma (KA), recentemente proposto por Burnworth et al.¹⁵.

1.3 Queratose actínica

QA é considerada por muitos como uma lesão pré-maligna que surge nas áreas expostas ao sol em indivíduos de pele clara, acima de quarenta anos. Pode surgir como lesão única, mas geralmente são múltiplas. Localiza-se preferencialmente no dorso das mãos e dos antebraços, face e

couro cabeludo de indivíduos calvos. Clinicamente, apresenta-se como lesões escamosas, secas, ásperas, amareladas, de tamanho variável, geralmente menores de um centímetro. O curso das lesões é crônico, podendo haver malignização com evolução para CEC. Histopatologicamente, a QA apresenta células anaplásicas e um certo desarranjo das células da camada malpighiana¹³.

Diversos trabalhos têm considerado a QA ora como lesão pré-maligna^{17,18,19,20,9,21,15}, ora como maligna²². A QA foi profundamente discutida na recente revisão de Ackerman & Mones²², que afirma: “sem tratamento, a QA pode progredir, se estender, aprofundar-se, metastatizar e até causar a morte”.

1.4 Radiação UV e câncer

A luz solar é composta de um espectro de radiação eletromagnética, dividida em três regiões de comprimento de onda: ultravioleta, visível e infravermelha (Figura 3). A radiação UV pode ser dividida em três grupos, cada um com efeitos biológicos diferentes. A UVC (200-280 nm) é bloqueada pela camada de ozônio; UVA (320-400 nm) e UVB (280-320 nm) atingem a superfície da Terra e geram consequências biológicas na pele e nos olhos. Estudos mostram que a radiação UVB é mais carcinogênica que a UVA⁵.

*Broders AC. *Squamous cell epithelioma of the skin*. Ann Surg. 1921; 73: 141–60.

Figura 3 - Componentes do espectro eletromagnético (Adaptado de Soehnge et al.⁵)

O DNA é atingido pela radiação UV, formando fotoprodutos dipirimidina UV-específicos. Estes podem ser reparados por excisão de nucleotídeos. Caso isso não ocorra, as mutações geradas podem iniciar eventos carcinogênicos: a exposição crônica aos raios UVB pode modificar a estrutura epitelial, expandindo clones pré-malignos²³. A radiação UV atinge a célula epidérmica que será precursora de CEC sendo absorvida pelo DNA e induzindo alterações em alguns dos genes desta célula. As mutações mais significantes ocorrem nos TSGs, como o gene TP53, cuja inativação leva à proliferação celular⁶.

A maioria dos pontos quentes de mutações em câncer de pele induzidas por UV em humanos inativa as funções de p53. Mais de 90 % de CEC e 56 % de CBC contêm mutações únicas em sítios dipirimidina. Essas mutações também foram encontradas em QA e na pele danificada pelo sol. Mutações no gene TP53 têm sido observadas em mais que 90% do CEC

invasivo “in situ”^{5,6}.

1.5 DNA repetitivo e câncer

Embora o DNA repetitivo já tenha sido considerado como “junk DNA”, estas seqüências têm uma função no genoma, principalmente na regulação da expressão gênica. Existem numerosos exemplos de microssatélites e minissatélites (longas seqüências repetidas em “tandem” entre 20 e 50 vezes, contendo unidades de 15 até cerca de 100 pares de bases) afetando a regulação da expressão gênica de diversas maneiras, podendo ser reconhecidas por fatores de transcrição ou também afetando a estrutura da cromatina e a conformação do DNA^{7,24}.

Microssatélites são curtas seqüências 1-6 bases repetidas em “tandem” que freqüentemente mostram polimorfismo multialélico e têm sido extensivamente usados como marcadores genéticos. A classe mais comum existente é a forma (CA)_n^{24,25}. Repetições de mononucleotídeos A e T são mais comuns, totalizando 10 Mb ou 0,3 % do genoma nuclear. Repetições de C e G são raras. Repetições de dinucleotídeos CA somam 0,5 % do genoma; já as repetições GT/AG também são comuns (50 Kb ou 0,2 % do genoma). Repetições CG/GC são raras porque os resíduos C são flanqueados em 3' por um resíduo G (CpG), os quais são propensos a metilação e subsequente desaminação, resultando em TpG (ou CpA na fita oposta). Repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos também são raros, mas altamente polimórficos, sendo potenciais marcadores²⁶.

A natureza polimórfica dos microssatélites é devida às altas taxas de mutações causadas por erros da DNA polimerase (“slippage”), da ordem de

5-10 por locus por gameta, que podem originar variantes, aumentando ou diminuindo o número de repetições internas, i.e., podendo gerar a conhecida instabilidade de microssatélites (MSI). Esta instabilidade depende de numerosos parâmetros, incluindo número de repetições; conteúdo da seqüência, localização cromossômica e capacidade de reparo do pareamento das células²⁵.

Mutações germinativas em microssatélites variam de um nível não detectável a até 8×10^{-3} . Estas mutações podem diferir do seu alelo parental por uma única unidade de repetição, não sendo geradas por “crossing-over” desigual e sim por mau pareamento causado por deslizamento (“slipped strand mispairing”). O mau pareamento entre repetições em “tandem” é responsável por grandes deleções e duplicações, sendo considerado um mecanismo que propicia a evolução genômica²⁶.

A perda de heterozigosidade (LOH) é definida como a perda de um alelo em um locus heterozigoto constitucional, portador de microssatélite, sendo aceito como marcador de um dos eventos requeridos para inativação de TSGs em câncer. O gene que codifica a proteína p16 (CDKN2A) localizado no cromossomo 9p21, já citado, é considerado “hot spot” para inativação por LOH, ocorrendo freqüentemente em pulmão, pele e outras formas comuns de cânceres humanos²⁷ (Figura 4). Dois microssatélites estudados neste trabalho (D9S50 e D9S52) localizam-se nessa região.

Figura 4 – Localização dos genes CDKN2A e PTCH 1 e microssatélites estudados no cromossomo 9 humano, referidos neste estudo

Embora LOH em CDKN2A tenha sido mais descrito em CM, Mortier et al.¹⁹ sugeriram que a progressão de QA para CEC está relacionada com inativação da p16^{INK4a} em QA nos queratinócitos que já possuem TP53 mutado. Os dados de LOH, comparados aos imunológicos, demonstraram a presença de p16^{INK4a} em QA, mas sua ausência em CEC. Estes dados dão suporte à idéia que QA e CEC são a mesma doença, mas em diferentes estágios.

Mutações precoces em TP53 podem causar instabilidade genômica e facilitar a progressão carcinogênica. LOH tem sido encontrado principalmente no cromossomo 9q em CBC e nos cromossomos 3p, 9p, 9q, 13q, 17q e 17p em QA e CEC^{28,29,17,30,31}. Em QA, a incidência de mutações

em TP53 é 75-80 % em pacientes brancos. Esses dados sugerem que diversas alterações contribuem para o desenvolvimento de CEC e dão suporte à idéia que CEC é um clone derivado de uma lesão pré-cancerosa^{17,6,31}.

Em estudos anteriores do nosso grupo, foram observados LOH e/ou MSI em 36 % CBC, 25 % CEC e 57 % CM no microssatélite D9S50; e 28,5 % CBC, 42,8 % CEC e 71,4 % CM no D9S52. QA não apresentou alterações³². Microssatélites adjacentes ao gene PTCH1 e PTCH2, ambos envolvidos no desenvolvimento de CBC, foram investigados em dez CBCs. Quatro tumores apresentaram LOH no microssatélite D9S180, próximo ao gene PTCH1 (Figura 4)³³.

Os microssatélites D6S251 e D6S252 estudados neste trabalho localizam-se no cromossomo 6 (Figura 5). Nosso grupo encontrou em CBC mais alterações em D6S251 que em D6S252^{34,35}. Na região 6q existe um gene supressor de melanoma ainda em estudo³⁶.

Diversos métodos baseados na PCR (reação em cadeia da polimerase) têm sido desenvolvidos para detectar mutações, todos usando seqüências de genes conhecidos como “primers” para amplificação. Isto exclui a possibilidade de encontrar mutações em genes desconhecidos que podem estar envolvidos na tumorigênese. Por outro lado, o método de RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) é uma técnica de DNA “fingerprinting” baseada na PCR, que utiliza oligonucleotídeos curtos (10 bases) escolhidos arbitrariamente para amplificação de DNA genômico ou cDNA. Os padrões de bandas gerados por RAPD podem ser usados para detectar diferenças

qualitativas e quantitativas no genoma inteiro de células normais e tumorais, assim como alterações genéticas em genes conhecidos e desconhecidos³⁷. Esta técnica vem sendo cada vez mais utilizada nos últimos anos. Após otimização, RAPD é reprodutível e tem potencial para detectar danos no DNA e mutações, podendo ser aplicada no estudo da carcinogênese e genotoxicidade³⁸.

Figura 5 - Cromossomo 6 humano mostrando a localização dos microssatélites D6S251 e D6S252

Padrões alterados de RAPD foram encontrados em 34,2% das amostras de câncer de mama. Uma banda que estava presente em 81% dos tumores foi isolada e seqüenciada, mostrando 93% de similaridade com uma seqüência de DNA (EST), específica de tumor de mama³⁷.

PAPADOPOULOS et al.³⁹, usaram 17 “primers” de RAPD, em 44

combinações diferentes, encontrando diferenças quantitativas em 45% das 6 amostras de câncer de mama e 18% nas 6 amostras de melanoma, quando comparadas ao tecido normal. A instabilidade genômica em CEC de cabeça e pescoço foi relacionada significativamente com o grau de diferenciação do tumor em estudo com 30 pacientes e dez “primers” de RAPD. Todos os tecidos tumorais apresentaram-se alterados com pelo menos um “primer”, sugerindo uma associação entre a instabilidade genômica e o potencial maligno⁴⁰.

Em estudo anterior do nosso grupo com CEC, CBC e MM, foram observadas alterações nos padrões de RAPD em todos os tumores quando comparados com o sangue, com tendência a ganhos de bandas em CBC e CEC³².

2 OBJETIVOS

Esta dissertação teve como objetivo investigar a instabilidade genômica na progressão tumoral de QA para CEC, e verificar se o perfil molecular de cada tipo de lesão estava ou não associado ao respectivo grau de diferenciação histológica. A possível obtenção de marcadores moleculares poderá auxiliar na clínica prognóstica e diagnóstica.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram estudados 35 lesões e seus respectivos controles (pele adjacente ao tumor e/ou sangue), provenientes de 27 pacientes diagnosticados e tratados no Ambulatório de Oncologia Cutânea e Cirurgia Dermatológica do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Após a cirurgia, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) foi mostrado ao paciente para ser assinado. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMUSP.

Os CECs foram classificados segundo Broders em graus I (diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (pobremamente diferenciado) pelo Laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia. Das 35 lesões, 10 foram diagnosticadas histologicamente como CEC I, 10 como CEC II, 4 como CEC III, 8 como QA e 3 como CBC. O histórico de cada paciente encontra-se no Anexo B.

Após cirurgia, as lesões foram colocadas em nitrogênio líquido e transportadas para o Laboratório de Genética do Instituto Butantan, onde foram armazenadas a -180 °C até sua utilização.

3.2 Extração e quantificação do DNA

O DNA de cada amostra de tecido fresco foi extraído utilizando-se o

protocolo corrente com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Anexo C). Já para a extração de DNA dos leucócitos do sangue foi utilizado protocolo semelhante, mas com lise prévia dos leucócitos (Anexo D).

Para quantificação, foi aplicado 1 µl de DNA de cada amostra e DNA lambda (Gibco BRL®) em quantidade conhecida em gel de agarose (Gibco BRL®) 1% corado com brometo de etídio (Anexo E). Os géis foram analisados e as imagens capturadas sob transiluminador UV no aparelho Gel Logic 100 Imaging System Kodak. Os DNAs foram quantificados segundo o programa Kodak 3.6.

3.3 Microssatélites

Foram utilizados 8 marcadores de microssatélites, localizados nos cromossomos humanos 6 e 9 (Tabela 1). Em cada reação de PCR (50µl) foram necessários 100 ng de DNA, 1 µl dNTP mix 10 mM (Amersham); 1,5 µl MgCl₂ 50 mM, 0,75 µl de cada “primer” 10 pM (OPERON), tampão 10X e 1 unidade de Taq DNA polimerase (New England BioLabs, USA). Para amplificação foram usados cerca de 30 ciclos de 94°C 1 min (desnaturação); temperatura de anelamento variável, conforme o “primer” (Tabela 1), 1 min 72°C (extensão). A análise inicial dos resultados foi feita em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. As amostras foram colocadas em gel de acrilamida 7% (Anexo F) e fotografadas em transiluminador com luz branca. Todas as amostras aparentemente alteradas foram feitas em duplicata para confirmação dos resultados.

O número de lesões estudadas por microssatélite, em cada tipo histológico, consta da Tabela 2. Todas as amostras foram analisadas quanto

a MSI e LOH, utilizando-se como controle normal a pele adjacente ao tumor e/ou sangue dos pacientes portadores das lesões estudadas. A perda igual o maior que 50 % na intensidade da banda no tumor foi considerada como LOH. Diminuição ou aumento no tamanho das bandas foi considerado como MSI.

Tabela 1 - Lista dos “primers” que foram usados na obtenção de padrões de microssatélites

Microssa-télite	Locali-zação	T ° anelamento	Repetição (pb)	“Primers” direto (D) e reverso (R) (5’ – 3’)
D6S251	6q14-16	52°C	(GT)n 144-162 pb	D-TTCCTAACCAGGTTTCAATG R-ATATTTTAAAGTAAGTTGCAC
D6S252	6q14-16	54°C	(GT)n 154-166 pb	D-ATGGCTCAGGATTCACATTG R-TGAAAGGAAAGTCCTGCTTC
D9S50	9p21	52°C	(CA/GT)n 76 -100 pb	D-GATCCTTTTCATCTTCTGAC R-GAGGGACGGAGCAACTGAT
D9S52	9p21	54°C	(ATTT) n 213-229 pb	D-GCTAGAGGGAGGTTTAATTG R-AATTAGCCAGGTGTTGTGGT
D9S15	9q13-21	55°C	(CA)n 195-209 pb	D-TAAAGATTGGGAGTCAAGTA R-TTCACTTGATGGTGGTAATC
D9S180	9q33	55°C	(CA)n 220-230 pb	D-CAGTGGTTTGAATCGAACC R-AGCTATTTTGGGGGCTGAG
D9S287	9q22.3	55°C	(CA)n 168-180 pb	D-GGATGCTCCTCACGC R-ACCACTACATTGTTCAAGGG
D9S280	9q22.3	55°C	(CA)n 140-160 pb	D-TTTCGCTTCCCACCCA R-CACGCCACTGATCTAGGCT
D9S196	9q22.9	55°C	(CA)n 254-260 pb	D-GGGATTACACCTCAAAACCA R-ACCACACTGCGGGACTT

Tabela 2 - Total de lesões estudadas por tipo histológico com cada microssatélite.

	D6S251	D6S252	D9S50	D9S52	D9S15	D9S180	D9S287	D9S280	D9S196
QA	8	8	7	6	8	6	7	4	8
CEC I	8	9	9	9	9	9	8	8	9
CEC II	10	9	9	9	9	9	9	9	9
CEC III	4	4	4	4	4	4	4	4	4
CBC	-	3	2	3	3	2	3	1	2
TOTAL	30	33	31	31	33	30	31	26	32

3.4 RAPD

Oito tipos diferentes de “primers” (Tabela 3) foram utilizados (kit Operon A e B) para amplificação por PCR. As reações continham 50 ng DNA, tampão 10X, 1,5 µl MgCl₂ 50 mM, 1 µl dNTP mix 10 mM, 1 µl de cada “primer” 10 pM, 1 unidade de Taq DNA polimerase (New England BioLabs) e água para 50 µl. Cada reação foi submetida a 45 ciclos de 94°C 1 min, temperatura de anelamento variável de acordo com o “primer” usado (Tabela 3) por 1 min e 72°C 2 min.

Tabela 3 - Seqüência dos “primers” usados para obtenção dos padrões de RAPD e temperatura de anelamento

“primer” RAPD	Seqüência	T^a anelamento
OPA-2	5' - TGCCGAGCTG - 3'	34 °C
OPA-7	5' - GAAACGGGTG - 3'	40 °C
OPA-13	5' - CAGCACCCAC - 3'	34 °C
OPA-17	5' - GACCGCTTGT - 3'	32 °C
OPB-8	5' - GTCCACACGG - 3'	34 °C
OPB-13	5' - TTCCCCCGCT - 3'	32 °C
OPB-11	5' - GTAGACCCGT - 3'	32 °C
OPB-19	5' - ACCCCCGAAG - 3'	34 °C

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1-2%, corados com brometo de etídio, fotografados sob luz UV. A intensidade das bandas foi verificada com o programa Kodak 3.6. Foram feitas comparações entre o tecido normal e tumoral quanto ao ganho ou perda de bandas. Foi considerado como ganho de bandas a presença de uma banda de tamanho inexistente no controle ou de intensidade pelo menos 50 % maior do que a banda do correspondente controle. Foi considerada como perda de bandas a ausência no tumor de banda presente no tecido normal, ou a presença de uma banda com intensidade menor que 50 % que a sua correspondente no tecido normal. O teste de Fisher contido no programa GraphPad InStat 3 foi utilizado para a análise das tabelas de contingência. O número de lesões estudadas com cada “primer” está listado na Tabela 4.

Tabela 4 - Total de lesões estudadas por “primer” para RAPD

	OPA-2	OPA-7	OPA-13	OPA-17	OPB-8	OPB-11	OPB-13	OPB-19	Total¹
QA	7	7	6	3	7	6	5	7	7
CEC I	7	7	7	5	7	6	4	7	7
CEC II	8	8	9	6	9	9	8	8	9
CEC III	4	4	2	4	2	4	4	4	4
CBC	2	1	0	1	2	0	0	0	3
Total	28	27	24	19	27	25	21	26	30

¹ Número total de lesões analisadas, que não incluem os controles de pele normal e sangue, não sendo correspondente ao total de pacientes, alguns dos quais apresentaram mais de uma lesão.

4 RESULTADOS

Alguns exemplos de DNAs extraídos e quantificados em gel de agarose 1 %, tendo por base concentrações conhecidas de DNA de fago λ , constam da Figura 6.

Figura 6 - Quantificação do DNA em gel de agarose através do programa Kodak 3.6. A concentração de cada amostra está indicada abaixo (ng/ μ l). Foi aplicado 1 μ l de cada amostra. Os números e letras acima de cada "slot" identificam os pacientes e respectivas lesões. (?) DNA de fago lambda; (N) tecido normal

4.1 Microssatélites

Após amplificação por PCR com os "primers" específicos para cada microssatélite, foram aplicados 13 μ l de cada reação em gel de agarose 1,5 % para verificação dos produtos. Os resultados obtidos com os microssatélites D9S180 e D6S252 referentes a alguns pacientes mostraram padrões iguais em tumor e controle, com produtos variando entre 220 -230 pb (Figura 7A) e 154-156 pb (Figura 7B), respectivamente.

Figura 7 - Padrão dos microssatélites D9S180 (A) e D6S252 (B). Nestas amostras não foram observadas diferenças entre os padrões das lesões e dos tecidos controles. Os números e letras acima de cada “slot” identificam os pacientes e respectiva lesão. (S) sangue, (N) tecido normal.

A relativamente baixa resolução do gel de agarose muitas vezes dificulta a observação de possíveis alterações como MSI e LOH. Portanto, alíquotas de todas as amostras foram também submetidas à migração em gel de poliacrilamida 7 % corado com nitrato de prata para melhorar a resolução dos produtos amplificados e confirmar os resultados. As porcentagens descritas abaixo referem-se aos números de pacientes estudados em cada caso, conforme Tabela 2. Bandas adicionais acima dos padrões representam conformações alternativas do DNA amplificado, subprodutos da PCR.

4.1.1 Alterações detectadas nos microssatélites com cada “primer”

4.1.1.1 D6S251

Foi observada LOH em três amostras com o microssatélite D6S251: CEC I (paciente 21), CEC II (paciente 22) e CEC II (paciente 234). Três amostras apresentaram MSI: QA (paciente 201), CEC III (paciente 258) e CEC II (paciente 258), totalizando 20 % de alterações (ver Tabela 2) quanto a este microssatélite (Figura 8). A análise estatística comparando-se alterações na progressão de QA para CEC (I, II e III) foi significativa ($p=0.0398$), assim como de QA e CEC I para CEC II e CEC III ($p=0.0075$) (Anexo H).

Figura 8 - Alterações encontradas no microssatélite D6S251. As setas mostram LOH (pacientes 21, 22 e 234) e a cabeça da seta mostra MSI (pacientes 201 e 258). (M) Marcador de peso molecular 50 ou 100 bp (BioLabs), (N) tecido normal.

4.1.1.2 D6S252

O microssatélite D6S252 apresentou apenas um MSI (3,33 %) no CEC III do paciente 258 (Figura 9).

Figura 9 – A seta indica MSI em D6S252 no CEC III do paciente 258. (M) Marcador 50 bp (BioLabs), (N) tecido normal

4.1.1.3 D9S50

A QA do paciente 261 mostrou MSI no microssatélite D9S50 (Figura 10), que apresentou 3,45 % de amostras alteradas.

Figura 10 - Presença de MSI na QA do paciente 261 (veja seta). (M) Marcador 100 bp (BioLabs), (N) tecido normal

4.1.1.4 D9S180

O microssatélite D9S180 apresentou-se alterado em 7,14 % das lesões, sendo MSI em CEC I (paciente 21) e em CEC III (paciente 258) (Figura 11).

Figura 11 – Pacientes 21 e 258 mostram MSI no padrão do microssatélite D9S180, indicados pelas setas. (M) Marcador 100 bp (BioLabs), (S) sangue, (N) tecido normal

4.1.1.5 D9S287

D9S287 mostrou somente um LOH (3,57 %) no CEC I do paciente 21 (Figura 12).

Figura 12 – A seta mostra LOH no CEC I (paciente 21) referente ao microssatélite D9S287. (M) marcador 100 bp (BioLabs), (S) sangue.

4.1.1.6 D9S280

O CEC I (paciente 21) e o CEC III (paciente 239) apresentaram MSI no microssatélite D9S280 (Figura 13), totalizando 8 % de amostras alteradas.

Figura 13 – Padrão do microssatélite D9S280. A seta indica MSI nos pacientes 21 e 239. (S) sangue, (N) tecido normal, (M PCRM) Marcador PCR Marker (BioLabs)

4.1.2 Alterações gerais obtidas nos microssatélites

Os microssatélites D9S52, D9S15 e D9S196 geraram produtos de 213-229 pb, 195-209 pb e 254-260 pb, respectivamente, e apresentaram padrões iguais nas lesões e tecidos controle em todos os pacientes estudados (Anexo G). O microssatélite D6S251 gerou produto de 144-162 pb, tendo evidenciado alterações em 20 % das lesões (Tabela 5).

No total, foram detectadas treze alterações, incluindo 4 LOH e 9 MSI. Deste total, o CEC I (paciente 21) apresentou quatro microssatélites alterados (2 LOH e 2 MSI), e o CEC III (paciente 258) apresentou três alterações (MSI), dentre os nove microssatélites estudados nos dois casos.

Cerca de 25 % das QAs e 25 % dos CECs apresentaram LOH e/ou MSI evidenciados com pelo menos um microssatélite. Não houve associação entre o grau histológico dos tumores e a presença de LOH ou MSI.

Nenhuma amostra de CBC mostrou-se alterada, comparada ao respectivo controle.

Tabela 5 - Total de pacientes, LOH e MSI em cada paciente por microssatélite estudado

D6S	251				252		
	n¹	LOH²	MSI³	%⁴	n¹	MSI³	%⁴
QA	8	-	1 ₂₀₁	12,5	8	-	-
CECI	8	1 ₂₁	-	12,5	9	-	-
CECII	10	2 _{22, 234}	1 ₂₅₈	30	9	-	-
CECIII	4	-	1 ₂₅₈	25	4	1 ₂₅₈	25
CBC	0	-	-	-	3	-	-

D9S	15	50			52	180			196
	n¹	n¹	MSI³	%⁴	n¹	n¹	MSI³	%⁴	n¹
QA	8	7	1 ₂₆₁	14	6	6	-	-	8
CECI	9	9	-	-	9	9	1 ₂₁	11	9
CECII	9	9	-	-	9	9	-	-	9
CECIII	4	4	-	-	4	4	1 ₂₅₈	25	4
CBC	3	2	-	-	3	2	-	-	2

D9S	280			287		
	n¹	MSI³	%⁴	n¹	LOH²	%⁴
QA	4	-	-	7	-	-
CECI	8	1 ₂₁	12,5	8	1 ₂₁	12,5
CECII	9	-	-	9	-	-
CECIII	4	1 ₂₃₉	25	4	-	-
CBC	1	-	-	3	-	-

¹ N° de tumores estudados por grau histológico em cada microssatélite

² N° de lesões com LOH (os números subscritos referem-se aos pacientes portadores da alteração)

³ N° de lesões com MSI (os números subscritos referem-se aos pacientes portadores da alteração)

⁴ Porcentagem de pacientes que apresentaram alterações (LOH + MSI), submetidos a teste estatístico (Anexo H)

4.2 RAPD

De maneira geral, os padrões de tecido normal, adjacente ao tumor, e tumor são mais comparáveis entre si do que com o padrão de RAPD obtido dos leucócitos. Isto pode estar relacionado à heterogeneidade de tipos de leucócitos presentes no sangue.

4.2.1 “Primer” OPA-2

As lesões dos pacientes 274 QA, 234 QA, 275 QA, 252 QA, 233 CEC I, 221 CEC II, 234 CEC II E 249 CEC II (Figura 14) apresentaram padrões iguais aos respectivos controles com este “primer”. Os CBCs dos pacientes 261 e 275 também apresentaram padrões iguais aos seus respectivos controles.

O Gráfico 1 mostra uma comparação entre os diferentes tipos histológicos quanto aos padrões obtidos com OPA-2, evidenciando que o número de CECs que apresentam diferenças entre o tecido normal e tumoral é maior que o de QAs.

Na Figura 14 são apresentados alguns padrões de RAPD obtidos com o “primer” OPA-2. Observou-se que uma banda de 1,7 Kb mostrou-se alterada em diversas amostras, estando presente apenas nos CECs (não nos controles) em 21%; apenas nos controles em 11 % e em controles e tumores em 25 % das amostras.

Figura 14 - Exemplos de padrões RAPD obtidos com o “primer” OPA-2. As setas mostram ganho ou perda da banda de 1, 7 Kb. (M) Marcador 100 bp (LGC), (S) sangue, (N) tecido normal

Gráfico 1 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes, em cada tipo de lesão, usando o “primer” OPA-2

4.2.2 “Primer” OPA-7

As lesões que mostraram padrão de bandas muito semelhante com relação ao controle foram QA (paciente 274) (Figura 15 A), CEC I (paciente 223) e CEC II (paciente 221) (não mostrado). Todos os CEC III apresentaram padrões RAPD OPA-7 diferentes dos controles (Gráfico 2). Os padrões RAPD obtidos com o “primer” OPA-7 mostraram principalmente ganho de uma banda de aproximadamente 1,4 Kb em 26 % das amostras de tumor, perda em 4 % dos tumores e estava presente em controles e tumores em 25 % das amostras (Figura 15 B).

Gráfico 2 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPA-7

Figura 15 – Padrão RAPD obtido com o “primer” OPA-7 em gel de agarose 1,5 % (A) e em gel de poliacrilamida 7 % (B). QA (paciente 274) mostrou padrão igual ao tecido normal (A). As setas indicam ganho ou perda da banda de 1,4 Kb (B). (M) Marcador 100 bp BioLabs, (N) tecido normal, (S) sangue

4.2.3 “Primer” OPA-13

Este “primer” mostrou-se pouco discriminativo. Não foram encontradas perdas ou ganhos de bandas conservadas, comuns a diversas lesões. As lesões que apresentaram padrão de bandas igual ao controle foram: 274 QA, 245 CEC I, 223 CEC I, 241 CEC I e 227 CEC II. Alguns exemplos são mostrados na Figura 16. Nenhuma amostra de CEC III apresentou padrão de bandas igual ao normal (Gráfico 3).

Figura 16 – Padrão RAPD obtido com o “primer” OPA-13 em gel de agarose 1,5 %. Os pacientes 274, 223 e 227 apresentam padrão de bandas igual ao normal. (M) Marcador 1 Kb (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue

Gráfico 3 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPA-13

4.2.4 “Primer” OPA-17

O “primer” OPA-17 mostrou-se bem discriminativo; apenas amostras de QA (pacientes 201 e 261) e CEC I (paciente 261) apresentaram padrão de bandas semelhantes ao controle. Houve perda e ganho de diversas bandas (Figura 17). O CBC do paciente 261 mostrou padrão de bandas diferente em

relação ao controle (não mostrado).

Gráfico 4 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPA-17

Figura 17 – Padrão RAPD obtido com o “primer” OPA-17 em gel de agarose 1,5 %. O paciente 201 apresentou padrão de bandas igual ao normal. As setas indicam algumas perdas/ganhos de diferentes bandas. (M) Marcador 2-Log ladder (BioLabs), (N) tecido normal

4.2.5 “Primer” OPB-8

Houve diminuição do número de amostras com padrão de bandas semelhante ao controle em tipos histológicos mais graves (Gráfico 5). Os padrões obtidos com o “primer” OPB-8 mostraram perda de uma banda de aproximadamente 500 a 520 pb em 26 % dos tumores, a qual estava presente em controles e tumores em 18,5 % das amostras (Figura 18). Os dois CBCs estudados mostraram padrão diferente de bandas com relação aos respectivos controles.

Gráfico 5 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-8

Figura 18 - Padrão RAPD obtido com o “primer” OPB-8 em gel de agarose 1,5 %. As setas indicam uma banda de aproximadamente 520 pb presente no tecido normal, e perdida em 26 % das lesões. M 1 Kb: marcador 1 Kb DNA Ladder (Ultraclean); M pBR Hinf I: marcador plasmídeo pBR322 clivado com a enzima de restrição Hinf I; (N) tecido normal

4.2.6 “Primer” OPB-11

Em sete lesões (28 %) houve ganho de uma banda com aproximadamente 1,8 Kb, perda da mesma em seis tumores (24 %) e presença no controle e tumor em 3 amostras (12 %) (Figura 19). Este “primer” mostrou-se bastante discriminativo: 22 amostras apresentaram diferença entre o tumor e o controle; apenas duas amostras de QA (33,33 %) e uma de CEC I (16,66 %) mostraram padrões de bandas semelhantes aos seus controles (Gráfico 6).

Figura 19 - Padrão RAPD obtido com o "primer" OPB-11 em gel de agarose 1,5 %. O CEC I (paciente 223) e o CEC II (paciente 234) apresentaram padrão de bandas igual ao controle. As setas indicam perda ou ganho da banda de aproximadamente 1,8 Kb. (M) Marcador 1 Kb (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue

Gráfico 6 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-11

4.2.7 “Primer” OPB-13

O padrão obtido com o “primer” OPB-13 apresentou muitas bandas conservadas na maioria das amostras (Anexo I), das quais podemos destacar bandas de 1 Kb, 800 pb e 600 pb, observando-se ganhos e perdas das mesmas em diversos pacientes (Figura 20), sendo que 43 %, 28,5 % e 28,5 % dos tumores apresentaram ganho dessas bandas, respectivamente. Somente a amostra do paciente 241 de CEC I apresentou padrão igual ao controle (Figura 20). Todas as outras amostras estudadas mostraram padrões diferentes (Gráfico 7).

Figura 20 - Padrão RAPD obtido com o "primer" OPB-13 em gel de agarose 1,5 %. As setas indicam perda ou ganho de bandas de 1,8 Kb, 1 Kb, 800 pb e 600 pb. O paciente 241 apresentou padrão igual ao controle. M 1 Kb: marcador 1 Kb (BioLabs); M LMW: Marcador Low Molecular Weight (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue

Gráfico 7 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-13

4.2.8 “Primer” OPB-19

Apenas o CEC I do paciente 250 apresentou padrão de bandas igual ao controle (Gráfico 8 e Figura 21). Foram observados ganhos (15 %) e perdas (19 %) de uma banda conservada de aproximadamente 1,3 Kb, que estava presente em 27 % das amostras nos controles e tumores (Figura 21).

Gráfico 8 - Número de amostras com padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes em cada tipo de lesão usando o “primer” OPB-19

Figura 21 - Padrão RAPD obtido com o “primer” OPB-19 em gel de agarose 1,5 %. As setas indicam perda ou ganho de bandas de 1,3 Kb. M 1 Kb L: marcador 1 Kb Ladder (BioLabs); M 50 bp: Marcador 50 bp (BioLabs), (N) tecido normal, (S) sangue

4.2.9 Padrões gerais obtidos com a técnica RAPD

Vinte e sete por cento das QAs apresentaram padrões iguais quando comparados à pele normal, considerando-se todos os “primers”. Quanto aos CECs graus I e II, essa porcentagem caiu para 24 % e 9 % das amostras, respectivamente. Nenhuma amostra de CEC III mostrou padrão RAPD igual ao controle (Gráfico 9). Usando como base os casos em que o padrão obtido em tumor foi igual ao controle com pelo menos um “primer”, os resultados obtidos foram: 6/7 QA (85 %), 7/7 CEC I (100 %), 4/10 CEC II (44 %) e 0/4 CEC III. Estes resultados sugerem uma associação entre o grau de diferenciação histológica dos CECs e um aumento da instabilidade genômica

(Tabela 7). Os dados estatísticos constam do Anexo H.

Gráfico 9 - Porcentagem de padrões RAPD de tumor e controle iguais e diferentes obtidos com a técnica RAPD em cada tipo histológico de lesão

Em geral houve uma tendência a ganho de bandas em 45 % das QAs, 44 % dos CECs I, e 57 % dos CECs III, excetuando-se os CECs II, em que 43 % das amostras mostraram perdas e 35 % ganhos (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de lesões apresentando perda, ganho ou igual número de bandas nos padrões RAPD alterados.

Lesão	Perda de bandas		Ganho de bandas		Igual nº de ganho/perda	
QA	12	25%	22	46 %	1	2 %
CEC I	10	20 %	22	44 %	3	6 %
CEC II	28	43 %	23	35 %	8	12 %
CEC III	9	32 %	16	57 %	3	11 %
Total	59	31 %	83	43,5 %	15	8 %

Todos os “primers” mostraram-se discriminativos em diversos tipos de comparações estatísticas entre os graus histológicos (Anexo H), ficando evidente que os tumores de graus mais severos possuem uma quantidade maior de alterações (Tabela 7).

As bandas de tamanhos conservados nos padrões obtidos com todos os “primers” foram tabeladas quanto à perda e ganho das mesmas em relação ao controle (Anexo I).

As três amostras de CBC estudadas apresentaram alterações com pelo menos um “primer” (Tabela 7).

Tabela 7 - Total de lesões que apresentaram padrão de bandas igual ou diferente do controle com cada “primer” de RAPD

OPA	2				7				13				17			
	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴
QA	7	4	3	12	7	1	6	85	6	1	5	83	3	2	1	33
CECI	7	1	6	85	7	1	6	85	7	3	4	57	5	1	4	80
CECII	8	3	5	62	8	1	7	87	9	1	8	88	6	0	6	100
CEC III	4	0	4	100	4	0	4	100	2	0	2	100	4	0	4	100
CBC	2	1	1	100	1	0	1	100	0	-	-	-	1	-	1	-

OPB	8				11				13				19			
	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴	n ¹	= ²	# ³	%# ⁴
QA	7	3	4	57	6	2	4	66	5	0	5	100	7	0	7	100
CECI	7	3	4	57	6	1	5	83	4	1	3	75	7	1	6	85
CECII	9	1	8	88	9	0	9	100	8	0	8	100	8	0	8	100
CECIII	2	0	2	100	4	0	4	100	4	0	4	100	4	0	4	100
CBC	2	-	2	100	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-

¹ Número de tumores estudados

² Número de tumores que apresentaram padrão de bandas igual ao controle

³ Número de tumores que apresentaram padrão de bandas diferente do controle

⁴ % de tumores com padrão de bandas diferente do controle, submetida a teste estatístico (Anexo H)

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigadas as alterações no DNA repetitivo em QA e CEC de três graus histológicos. A literatura é bem variada no que diz respeito ao número de amostras analisadas e à quantidade de “primers” utilizados. O número de pacientes e de “primers” usados nesta pesquisa foi o maior possível, dentro da disponibilidade de casos clínicos, com o intuito de se poder fazer análise estatística. Algumas dificuldades surgiram principalmente na obtenção das QAs, que muitas vezes são retiradas por criocirurgia (queima por nitrogênio líquido), impossibilitando seu estudo. A obtenção de CECs III também foi difícil devido às políticas de prevenção, em que o tratamento/cirurgia prévio diminui o número de casos disponíveis.

5.1 Microssatélites

Os microssatélites D6S251 e D6S252 localizam-se no cromossomo 6q14-16, uma região altamente repetitiva. Neste estudo observou-se que D6S251 foi o mais alterado dentre os microssatélites estudados, apresentando 20 % (6/30) de tumores com alterações, sendo apenas 12,5 % (1/8) nas QAs (MSI). Este microssatélite já havia sido estudado por nosso grupo em pacientes portadores de CBC. Um dos estudos encontrou 60% (6/10)³⁴ e outro 23 % (6/26)³⁵ de LOH e/ou MSI em D6S251. A discrepância dos resultados em CBC pode ter sido causada pelo número diferente de pacientes portadores de CBC estudados. Esses resultados, incluindo os

dados desta dissertação, sugerem que essa região cromossômica (6q14-16) pode estar envolvida com o desenvolvimento de CEC e CBC. Mais estudos são necessários para confirmar a influência dessa região na progressão tumoral de QA para CEC.

Ao contrário, D6S252 apresentou-se alterado (MSI) em apenas um CEC I (paciente 21). A lesão deste paciente foi a que mais apresentou alterações: quatro dos nove microssatélites estudados estavam alterados (Tabela 5). Inclusive foi detectada alteração no espaçador intergênico dos cístrons ribossômicos nessa mesma lesão desse paciente⁴¹. Em CBC, D6S252 também se mostrou pouco alterado (1/10³⁴; 0/15³⁵), indicando que este microssatélite não é um bom marcador para CBC, QA e CEC.

Os microssatélites D9S52 e D9S50 estão localizados na região 9p21, onde se localiza o locus CDKN2A, cujos produtos (p16^{ink4a} e p14^{ARF}) são supressores de tumor regulando o ciclo celular nas vias de rb e p53, respectivamente (Figura 2). Dados da literatura mostram que este locus é mais freqüentemente alterado em CEC do que em QA. Foi demonstrada LOH de diversos microssatélites em 46 % CEC e 10 % QA¹⁹; 32,5 % LOH em CECs nos microssatélites D9S171, D9S1748 e D9S974⁴². Ainda foi detectada LOH em 52 % dos CECs de pacientes gregos em pelo menos um microssatélite (D9S50, D9S270, D9S171, D9S259 e D9S161), sendo D9S50 o mais informativo, apresentando 38 % LOH¹⁰. Outros estudos também têm apontado LOH em 9p em QA e CEC^{17,29,43}.

Neste trabalho, D9S52 não apresentou alterações nas 31 lesões estudadas. D9S50 apresentou MSI em 14 % QAs; nenhuma amostra de

CEC foi portadora de LOH ou MSI neste microssatélite. D9S50 e D9S52 já haviam sido estudados por nosso grupo utilizando um pequeno número de amostras de CEC (quatro e sete, respectivamente), tendo-se detectado somente uma LOH em D9S50 (25 %)³².

O estudo de outros microssatélites, em outras populações, mostrou que pacientes japoneses apresentaram LOH em 19 % QA, 7 % CEC e nenhuma MSI. Como foi encontrado LOH em baixa frequência em todos os loci estudados (D3S1923, D9S160, D9S162, D13S170, D17S796 e D17S785), esse resultado foi atribuído a uma diferença regional e/ou racial. Baseados nesses resultados, os autores contestaram se a QA é realmente uma lesão pré-maligna que progride para CEC⁴⁴.

Diferenças também ficaram evidentes em estudos de mutações no gene TP53. Este gene estava mutado em 0,3 % e 40 % das amostras de QAs, em populações coreanas e japonesas, respectivamente, comparadas com 60 % a 80 % na América. A incidência de mutações em TP53 em CECs também se mostrou variável: 15 % em franceses, 30 % em japoneses e 58-90 % em americanos⁴⁴.

Os microssatélites D9S287, D9S180, D9S15, D9S280 e D9S196 localizam-se no cromossomo 9, próximo ao gene PTCH 1 situado na região 9q22.3. Este gene PTCH está particularmente envolvido no desenvolvimento de CBC. Mutações nesse gene foram encontradas nos CECs de indivíduos com histórico de múltiplos CBCs⁴⁵.

Os microssatélites D9S15 e D9S196 não apresentaram LOH ou MSI. D9S180 mostrou MSI em um CEC I (paciente 21) e um CEC III (paciente

258). O microssatélites D9S287 também sofreu LOH na amostra CEC I do paciente 21. D9S280 apresentou um MSI em CEC III (paciente 239) e outro MSI em CEC I (paciente 21) (Tabela 5). Todos os pacientes CEC que apresentaram alterações neste locus possuem histórico de CBC (Anexo B). Esse fato sugere uma associação direta entre o desenvolvimento de CBC e CEC e a presença de alterações no DNA repetitivo desta região (9q). Essas alterações podem influenciar a expressão do gene PTCH 1 e seu papel na carcinogênese de CEC, como sugerido por Hussein¹².

Dados da literatura mostram D9S180 e D9S109 apresentando alterações (LOH e /ou MSI) em 20 % e 60 % de CECs, respectivamente²⁸. D9S180 mostrou LOH em 50 % das amostras, incluindo todos os tipos de lesões escamosas (4 QAs, 11 CECs e 13 doenças de Bowen), em contraste com D9S287, que apresentou apenas 6 % de LOH nas mesmas lesões⁴⁶. D9S280 apresentou maior número de LOH nos CECs em áreas não expostas ao sol (80 %) do que em áreas expostas (29,5 %) em pacientes japoneses. O mesmo aconteceu com o uso de outros “primers”, sugerindo que a via carcinogênica pode ser diferente entre áreas expostas ao sol e áreas não-expostas⁴⁷.

Neste estudo não foi possível o estabelecimento de uma diferenciação molecular entre QA e CEC com os microssatélites D6S251, D6S252, D9S15, D9S50, D9S52, D9S180, D9S196, D9S287 e D9S280, levando em consideração que foram encontradas 25 % de alterações nos dois tipos de lesão. Analisando isoladamente o D6S251, foi verificada uma diferença significativa ($p=0,0398$) comparando-se o número de alterações encontradas

em QA (1/8) e CEC (5/22), assim como em QA+CEC I (2/16) comparando-se com CEC II + CEC III (4/14) ($p=0,0075$), o que demonstra aumento da instabilidade nos graus histológicos mais severos. Quando MSI e LOH são analisados separadamente, LOH foi observado apenas em CEC (em quatro microssatélites, em três lesões diferentes), enquanto que MSI foi observada em ambos os tipos de lesões (QA e CEC). Isto sugere que MSI pode ser um evento mais precoce que LOH, acometendo lesões precursoras, além dos CECs, concordando com aos resultados encontrados por Saridaki, et al.¹⁰, que encontraram MSI somente em doença de Bowen e não em CEC.

MSI pode ser um bom marcador genético no prognóstico, influenciando na decisão de opções de tratamento. MSI tem sido usado no prognóstico de malignidades sólidas, como câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) e pulmão⁴⁸.

5.2 RAPD

As mutações e rearranjos podem afetar o padrão RAPD de bandas, alterando a distância entre dois “primers”, o que aumenta ou diminui o tamanho das bandas ou modificando a seqüência de anelamento do “primer”, gerando a perda e/ou ganho de bandas. Neste estudo, QA e CEC foram observados quanto à perda, ganho e mobilidade das bandas, assim como aumento ou diminuição de sua intensidade. A perda de alelos pode resultar na diminuição da intensidade das bandas, enquanto que o aumento da intensidade pode ter relação com a amplificação gênica e aneuploidias cromossômicas⁴⁰.

O método de RAPD gera padrões tipo impressão digital (“DNA

fingerprint”) que podem detectar diferenças estruturais entre as células normais e tumorais. Muitas vezes, os controles usados (sangue e tecido normal) apresentam diferenças entre si, que podem ser devidas a alterações na pele “normal” exposta aos raios UV e também à grande heterogeneidade das células sanguíneas (leucócitos). Neste trabalho, sempre que disponível, o tumor foi comparado à pele normal adjacente, ambos sujeitos às mesmas condições ambientais.

Cada indivíduo tem seu próprio padrão, tanto em relação aos microssatélites quanto aos padrões RAPD. Alguns “primers” são mais informativos que outros, pois detectam regiões mais variáveis no genoma. Algumas bandas podem ser conservadas em muitos pacientes, inclusive nas lesões, possivelmente devido ao seu conteúdo gênico fundamental para a sobrevivência das células.

Neste estudo, foram usados oito “primers” para obtenção de padrões RAPD. Em todas as lesões de QA e CEC foi identificada instabilidade genômica com pelo menos um “primer”. Foi possível estabelecer uma correlação significativa (Anexo H) entre a frequência de instabilidade genômica e o grau histológico de diferenciação do tumor.

Considerando-se as amostras que apresentaram padrões de bandas iguais entre tumor e controle com pelo menos um “primer”, QA apresentou 85 %, CEC I 100 %, CEC II 44 % e CEC III zero. Estes resultados mostram que o uso de diferentes “primers” pode diferenciar as lesões com grau histológico mais severo (Tabela 7).

A QA do paciente 236 foi a única que apresentou padrões RAPD

diferentes entre tumor e controle com todos os oito “primers” usados. Este paciente possui o histórico mais grave de lesões dentre aqueles com QA (Anexo B). Esse fato indica uma maior quantidade de desordens genéticas neste indivíduo e os padrões RAPD obtidos complementam o diagnóstico médico.

Os padrões obtidos com os “primers” OPA-2 e OPB-15 foram estudados anteriormente em QA, CEC, CBC, CM e NM (nevo melanocítico) de um número relativamente pequeno de pacientes, com exceção de CBC (14 casos). 100 % das amostras estavam alteradas com pelo menos um “primer”³². De modo similar, todas as amostras de QA e CEC estudadas no presente trabalho estavam alteradas com pelo menos um “primer”, embora os únicos dois CBCs estudados com o “primer” OPA-2 tenham apresentado padrão de bandas igual no tumor e controle.

Em geral, foi observada uma tendência de maior número de bandas (ganho) nos padrões RAPD das lesões, com exceção de CEC II, que apresentou maior perda (Tabela 6). Estes resultados sugerem um preferencial aumento do material genético na maioria dos pacientes que poderia ser devido a poliploidias, amplificações gênicas, mutações e rearranjos. CBC também mostrou tendência a ganho de bandas, ao contrário de CM que apresentou maior quantidade de perdas nos padrões RAPD³².

Alterações nos padrões RAPD têm sido descritas em diversos outros tipos de câncer, como pulmão, mama, fígado e CEC de cabeça e pescoço^{49,40,39,50}.

A análise dos microssatélites pode detectar mudanças em regiões

específicas conhecidas do genoma. Outras alterações que envolvem DNA repetitivo podem ocorrer em regiões desconhecidas do genoma. O método RAPD pode detectar essas alterações no genoma de maneira abrangente, de forma simples e rápida. Entretanto, as seqüências envolvidas nos rearranjos genômicos que ocorrem não podem ser definidas por este método⁴⁰. É necessária a seleção de bandas de interesse nos padrões RAPD obtidos, sempre em comparação com os controles. Essas bandas podem ser eluídas do gel, clonadas e seqüenciadas. Após submissão dessas seqüências aos bancos de dados disponíveis é possível estabelecer possíveis associações entre supostos genes e a progressão tumoral. Desta forma foi estabelecida correlação entre os graus de diferenciação tumoral e os padrões RAPD obtidos com certos “primers” em carcinoma hepatocelular. Uma banda de 480 pb foi selecionada do padrão, eluída do gel, clonada e seqüenciada. Essa seqüência mostrou homologia com um gene da família homeobox, cujo papel é de atuar no desenvolvimento morfológico durante a fase embrionária⁵⁰.

Neste trabalho, as bandas alteradas em mais de 5 amostras foram selecionadas como candidatas à clonagem e seqüenciamento (Anexo I). São elas: 1700 pb (OPA-2), 1400 pb (OPA-7), 500-520 pb (OPB-8), 1800 pb (OPB-11), 1000, 800 e 600 pb (OPB-13) e 1350 pb (OPB-19). A análise da seqüência dessas bandas é uma tentativa de descobrir quais genes estão alterados no genoma desses tumores, o que servirá como ponto de partida para a continuidade deste projeto, e obtenção de marcadores moleculares eficientes.

Por enquanto, o microssatélite D6S251 e os “primers” OPA-2, OPA-7, OPA-13, OPA-17, OPB-8, OPB-11, OPB-13 e OPB-19 geradores de padrões RAPD são sugeridos como possíveis marcadores moleculares para diagnóstico de QA e CEC.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram encontradas diversas alterações no DNA repetitivo de QA e CEC. Como estas seqüências possuem papel importante na organização e funcionamento do genoma, estes resultados confirmam que a desordem genômica está associada à tumorigênese.

O alto número de MSI e LOH encontrado em lesões de alguns pacientes em particular pode auxiliar o prognóstico e diagnóstico médico nestes casos.

A detecção de alterações nos microssatélites próximos ao gene PTCH 1 em CEC, pode ter influenciado a estrutura/função deste gene, afetando o desenvolvimento dos tumores.

A técnica RAPD mostra-se efetiva para avaliar alterações genéticas em QA e CEC e os “primers” aqui utilizados podem servir como potenciais ferramentas para auxiliar no diagnóstico e prognóstico médicos.

7 ANEXOS

Anexo A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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:

“A instabilidade genômica como fator prognóstico e diagnóstico na progressão de queratose actínica para carcinoma espinocelular humano”

2. PESQUISADOR: Dr. Cyro Festa Neto / Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz

CARGO/FUNÇÃO: Dermatologista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 27-716

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência - Sim
 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. - Sim
 4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. – não se aplica
 5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. – não se aplica.
-

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

Dr. Cyro Festa-Neto – Depto. Dermatologia, HC-FMUSP Tel: (11) 3088.4894 ramal 34

Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz – Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Tel: (11) 3726.7222 ramal 2076

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: -

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

Lista de lesões estudadas por paciente

PACIENTE ¹	LESÃO	GRAU	DATA ²	IDADE/SEXO	LOCAL DA LESÃO	TOTAL DE LESÕES ³
3	CEC	I	1995	76/F	lábio inferior	...
21	CEC	I	27/10/95	56/F	lobo inf. orelha dir.	1 CEC e 1 CBC (95) ⁴
22	CEC	II	13/11/95	84/M	lábio superior	2 CEC (95) ⁴
25	CEC	I	19/10/95	73/F	perna	...
199	CEC	II	17/12/04	73/M	braço direito	...
201	QA	-	2004	70/F	antebraço esq.	...
218	QA	-	15/04/05	80/F	braço esq.	2 QA e 2 CBC (05) ⁴
221	CEC	II	03/01/05	82/F	frontal esq.	...
261	CBC	X	2005	82/F	orelha esq.	...
261	QA	-	2005	82/F	dorso	...
261	CEC	I	2005	82/F	cervical dir.	...
274	CBC	X	02/04/05	61/M	malar dir.	...
274	QA	-	02/04/05	61/M	frontal esq.	...
176	CEC	II	03/05/00	48/F	frontal	7 QA, 8 CEC e 3 CBC (99-05) ⁴
245	CEC	I	25/05/05	58/F	braço esquerdo	3 QA, 5 CEC e 7 CBC (00-05) ⁴
202	CEC	II	22/12/04	78/F	braço	...
202	CEC	III	22/12/04	78/F	braço	...
223	CEC	I	27/05/03	70/F	antebraço esq.	1 QA, 3 CEC e 2 CBC (03) ⁴
227	CEC	II	05/02/04	77/M	fúrcula	2 QA, 1 CEC e 2 CBC (02-05) ⁴
233	CEC	I	28/08/03	75/M	pele	Não
236	QA	-	06/03/03	60/F	sobrancelha	9 QA, 3 CEC e 17 CBC (92-05) ⁴
239	CEC	III	26/08/03	77/F	fúrcula	4 CEC e 3 CBC (03) ⁴
255	CEC	III	14/07/03	80/F	preauricular	1 QA e 2 CEC (03-05) ⁴
234	QA	-	14/08/03	74/F	braço esquerdo	2 QA, 1 CEC e 4 CBC (02-03) ⁴
234	CEC	II	14/08/03	74/F	mão esquerda	2 QA, 1 CEC e 4 CBC (02-03) ⁴
275	CBC	X	28/01/05	89/F	região frontal	2 QA e 1 CEC (05) ⁴
275	QA	-	28/01/05	89/F	antebraço esq.	2 QA e 1 CEC (05) ⁴

continua

241	CEC	I	14/10/03	84/M	parietal esq.	7 CEC (02-03) ⁴
258	CEC	III	2005	62/M	antebraço dir.	12 CBC (2005) ⁴
258	CEC	II	2005	62/M	frontal esq.	12 CBC (2005) ⁴
228	CEC	II	15/05/03	72/M	região cervical	6 QA, 8 CEC, 8 CBC e 1 CM (00-05) ⁴
250	CEC	I	02/08/06	86/M	antebraço	3 CEC (2006) ⁴
250	CEC	I	02/08/06	86/M	região frontal	3 CEC (2006) ⁴
252	QA	-	02/09/06	67/M	antebraço dir.	...
249	CEC	II	02/07/06	84/F	perna esq.	5 QA, 12 CEC e 1 CBC (04-06) ⁴

¹ A numeração foi dada pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan e refere-se a cada paciente.

² Data referente ao dia da cirurgia ou do exame histológico da lesão estudada.

³ Quantidade de lesões prévias ou posteriores a este estudo (QA, CEC, CM e CBC) que foram retiradas em cirurgia no HC-FMUSP.

⁴ Período de retirada das lesões com base no histórico do paciente registrado no hospital.

Dir. – Direito

Esq. – Esquerdo

M – Sexo masculino

F – Sexo feminino.

Anexo C

Extração de DNA de material fresco

1. Biopulverizar a amostra congelada em nitrogênio líquido, em uma bandeja com gelo seco;
2. Colocar o material macerado no tubo Corex® contendo 3 ml de solução de lise¹ com proteinase K 100 **mg/ml**;
3. Colocar em banho-maria a 50 °C, 2 a 4 h;
4. Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (12,5 / 12 / 0,5) em igual volume da solução anterior;
5. Agitar 15 minutos por inversão;
6. Centrifugar a 4 °C em 10 000 rpm por 20';
7. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo;
8. Adicionar acetato de sódio 500 mM (concentração final em relação ao volume do sobrenadante).
9. Adicionar 2,5 volumes de etanol absoluto gelado (em relação ao volume do sobrenadante).
10. Inverter o tubo lentamente (observar a “nuvem” de DNA).
11. Colocar no freezer -20 °C “overnight”, ou -70 °C por 2 h.
12. Centrifugar a 10 000 rpm 4 °C por 10' e descartar o sobrenadante;
13. Adicionar 2 volumes de etanol 70% gelado;
14. Centrifugar a 10 000 rpm, a 4 °C por 10 min. e descartar o sobrenadante;
15. Secar o “pellet” (DNA) no vácuo por 20 min. exatos;
16. Ressuspender em H₂O_{milliq} ou TE² e armazenar a 4°C.

¹Solução de lise (TES) = TRIS (10 mM), EDTA (10 mM), SDS (0,6 %)

²TE = EDTA (1 mM) + TRIS (10mM)

Anexo D

Extração de DNA de leucócitos

1. Colocar 10 ml de sangue em um tubo de ensaio (Corex®);
2. Adicionar 5 ml de Solução Tampão de Lise* e completar com 20 ml de H₂O_{MiliQ} estéril;
3. Homogeneizar, deixar no gelo por duas horas;
4. Centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C por 10 min. e descartar o sobrenadante;
5. Colocar 2,5 ml de TES + proteinase K a 100 *mg*/mL, e agitar o tubo até dissolução total das células (sem deixar que ocorra a formação de espuma);
6. Colocar o tubo em banho-maria a 50 °C por 2 h;
7. Adicionar igual volume de fenol hidratado contendo 6 % de TRIS em tubo Corex®;
8. Agitar 15 minutos por inversão.
9. Colocar igual volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), agitar por 15';
10. Centrifugar a 10 000 rpm, 4 °C por 20 min.;
11. Retirar o infranadante com micropipeta pasteur e deixar a interfase;
12. Repetir os passos 10, 11 e 12;
13. Retirar o sobrenadante já sem a interfase e transferir para um tubo Corex® limpo;
14. Adicionar acetato de sódio 3 M, na concentração final de 500 mM em relação ao volume do sobrenadante;
15. Adicionar 2,5 volumes de etanol absoluto gelado (em relação ao volume

do sobrenadante);

16. Inverter o tubo lentamente (observar a “nuvem” de DNA);
17. Colocar no freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ “overnight”, ou $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas;
18. Centrifugar a 10 000 rpm $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10' e descartar o sobrenadante;
19. Adicionar 2 volumes de etanol 70 % gelado;
20. Centrifugar a 10 000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10' e descartar o sobrenadante;
21. Secar o pellet (DNA) no vácuo por 20 min. exatos;
22. Ressuspender em $\text{H}_2\text{O}_{\text{milliq}}$ ou TE e armazenar a 4°C .

*Solução Tampão de Lise = NH_4Cl (1 550 mM), KHCO_3 (100 mM), EDTA (10 mM).

Anexo E

Gel de agarose

- Colocar em um erlenmyer:

- 1 Agarose (Gibco BRL®) em quantidade variável nas concentrações 1 %, 1,5 % e 2 %;
- 2 Adicionar TEB¹ 1X para 40, 80 ou 100 ml, dependendo do tamanho da cuba de eletroforese usada;

- Ferver até completa dissolução da agarose;

- Colocar o gel para polimerizar, adicionando brometo de etídio;

- Aplicar as amostras nos “slots”;

- Ligar a fonte de eletroforese a 80 V e 250 A;

- Fotografar o gel usando transluminador UV.

¹TEB 10X = 0,9 M de TRIS [NH₂C (CH₂OH)] + 0,02 M de EDTA + 55 g de Ácido Bórico + H₂O para 1 L.

Anexo F

Gel de Poliacrilamida 7% (50ml)

Colocar em uma proveta:

1. 38 ml H₂O
2. 7 ml Instagel¹ 50 %
3. 2,5 ml Glicerol
4. 2,5 ml TEB 10 X
5. 180 μ l persulfato de amônio 10 %
6. 25 μ l TEMED
7. Imediatamente transferir o gel para as placas de vidro, colocar o pente e deixar polimerizar;

¹ Acrilamida (49g) + bis-acrilamida (1 g).+ H₂O q.s.p. 100 ml

Coloração do Gel por Nitrato de Prata

Solução fixadora:

- 1 60 ml etanol absoluto
- 2 4,5 ml ácido acético glacial
- 3 Completar com H₂O para 600 ml

Colocar essa solução sobre o gel, até cobrí-lo e deixar em agitação por 10 min.

Solução de Nitrato de Prata:

- 1 0,30 g AgNO₃
- 2 10 ml H₂O_{destilada}

Adicionar essa solução à solução anterior, deixar sob agitação por mais 10

min.

Retirar as soluções, descartar e lavar o gel com $\text{H}_2\text{O}_{\text{destilada}}$ rapidamente.

Solução Reveladora:

- 1 4,5 g NaOH (3%) em 100 ml de água, até dissolver completamente
- 2 Adicionar 450 μl formaldeído (0,3%)
- 3 Completar com $\text{H}_2\text{O}_{\text{destilada}}$ para 150 ml

Cobrir o gel com essa solução, deixando sob agitação até a coloração das bandas. Depois descartar essa solução e adicionar novamente a solução fixadora, para fotografar.

Anexo G

Exemplos de géis de acrilamida com os microssatélites D9S52 (A), D9S15 (B) e D9S196 (C)

(A)

(B)

(C)

Anexo H

Tabela contendo comparações estatísticas com os diferentes “primers”

Marcador	Comparações	Nº alterações/total	Probabilidade
D6S251	QA x CEC I/II/III	1/8 x 5/22	P=0.0398
	QA/CEC I x CEC II/III	2/16 x 4/14	P=0.0075
		Porcentagens	
OPA-2	QA x CEC I	12 x 85	P<0.0001
	QA x CEC II	12 x 62	P<0.0001
	QA x CEC III	12 x 100	P<0.0001
	QA x CEC média	12 x 82	P<0.001
	CEC I x CEC II	85 x 62	P=0.0004
	CEC II x CEC III	62 x 100	P<0.0001
	CEC I x CEC III	85 x 100	P<0.0001
OPA-7	QA/CEC I/II x CEC III	85/85/87 x 100	P=0.0002
OPA-13	QA x CEC I	83 x 57	P<0.0001
	QA x CEC II	83 x 88	não significativa
	QA/CEC II x CEC III	83/88 x 100	P=0.0003
OPA-17	QA x CEC I	33 x 80	P<0.0001
	CEC I x CEC II/III	80 x 100/100	P<0.0001
OPB-8	QA/CEC I x CEC II	57 x 88	P<0.0001
	CEC II x CEC III	88 x 100	P=0.0003
OPB-11	QA x CEC I	66 x 83	P=0.009
	CEC I x CEC II/III	83 x 100/100	P<0.0001

Anexo I

Quantidade de perdas e ganhos de bandas conservadas no padrão de cada “primer” de RAPD

“Primer”	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	pb¹ (Nº) ²	Pb¹ (Nº) ²
OPA-2	1700 (9)	900 (3)	850- 800 (1)	600 (1)	500 (2)	-	-	-	-	-
OPA-7	1400 (8)	1000 (1)	850 (1)	700 (7)	600 (3)	520 (3)	400 (3)	300 (4)	-	-
OPA-13	1300 (4)	700 (2)	600 (1)	550 (1)	500 (3)	450- 400 (2)	-	-	-	-
OPA-17	1200 (4)	1000 (1)	800 (3)	700 (2)	650 (1)	600 (3)	500 (3)	300 (2)	< 300 (2)	-
OPB-8	1000 (4)	900 (3)	800 (3)	700 (1)	520- 500 (7)	450- 400 (2)	300 (2)	-	-	-
OPB-11	1800 (13)	12001 000 (5)	950 (3)	900 (3)	700 (5)	650 (2)	500- 400 (5)	< 300 (4)	-	-
OPB-13	1800 (5)	1000 (9)	800 (9)	600 (9)	550 (1)	500 (3)	450 (6)	-	-	-
OPB-19	1350 (9)	1000 (5)	913 (4)	900 (5)	850 (2)	750 (2)	700 (4)	650- 600 (5)	450 (4)	300 (2)

¹Tamanho da banda em pb

²Número de amostras que apresentaram ganho e/ou perda da respectiva banda
As bandas em negrito foram consideradas candidatas

8 REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000; 339p.
2. Méliissopoulos CL, Levacher C. *La peau - Struture et physiologie*. Éditions médicales internationals; 1998, 152p.
3. Martinez, MAR, Francisco G, Cabral LS, Ruiz IRG, Festa Neto C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(5): 405-19.
4. Yokota J. *Tumor progression and metastasis*. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 497-505.
5. Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy HN. *Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation*. Frontiers Bioscience. 1997; (2): 538-51.
6. Ortonne J-P. *From actinic keratosis to squamous cell carcinoma*. BR. J. Dermatol. 2002; 146 (suppl 61): 20-2.
7. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biologia Celular e Molecular*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda.; 2002. 1084p.
8. Kamb A, Shattuck-Eidens D. *Analyses of p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus*. Nat Genet. 1994; 8: 23-6.
9. Boukamp P. *Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression?* Carcinogenesis. 2005; 26 (10): 1657-67.
10. 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. 2003;148: 638-48.
11. Lewin B. *Genes VII*. Oxford New York, NY: University Press; 2000; 990p.
 12. Hussein MR. *Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms*. J Cutan Pathol. 2005; 32: 191–205.
 13. Cucé LC, Festa-Neto C. *Manual de Dermatologia*. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2001, 656p.
 14. INCA. Ministério da Saúde. *Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2006* [on-line]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2006 [acesso 20 Jan 2007]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>
 15. Burnworth B, Arendt S, Muffler S, Steinkraus V, Brocker EB, Birek C, Hartscuh W, Jauch A, Boukamp P. *The multi-step process of human skin carcinogenesis: A role for p53, cyclin D1, h Tert, p16, and TSP-1*. Eur J Cell Biol. In press 2006.
 16. Barksdale SK, O'Connor N, Barnhill R. *Prognostic factors for cutaneous squamous cell and basal cell carcinoma*. Prognostic Indicators for Cancer. 1997; 6 (3): 625-37.
 17. Rehman I, Quinn AG, Healy E, Rees JL. *High frequency of loss of heterozygosity in actinic keratoses, a usually benign disease*. The Lancet. 1994; 344 (17): 788-89.
 18. Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RSC. *Inflammation is*

- associated with progression of actinic keratosis to squamous cell carcinomas in humans.* Br J Dermatol. 2002; 146: 810-15.
19. Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, Lassalle ML, Thomas P, Piette F, Formstecher P, Polakowska R, Danzé PM. *Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16INK4a tumor suppressor.* Cancer Letters, 2002, 176: 205-14.
 20. Takata M, Saída T. Early cancers of the skin: clinical, histopathological, and molecular characteristics. Int J Clin Oncol. 2005; 10: 391-97.
 21. Ehrig T, Cockerell C, Piacquadio D, Dromgoole S. *Actinic Keratoses and the Incidence of Occult Squamous Cell Carcinoma: A Clinical-Histopathologic Correlation.* Dermatol Surg. 2006; 32:1261-65.
 22. Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. Br J Dermatol. 2006; 155: 9–22.
 23. Cleaver JE, Crowley E. *UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis.* Front Biosci. 2002; Apr 1; 7: d1024-43.
 24. 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: 149-65.
 25. Hussein MR, Wood GS. *Microsatellite instability and its relevance to cutaneous tumorigenesis.* J Cutan Pathol. 2002; 29: 257-67.
 26. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics 2.* 2nd ed. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd; 1999, 576p.

27. 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.
28. Zaphiropoulos PG, Soderkvist P, Hedblad MA, Toftgard R. Genetic instability of microsatellite markers in region q22.3-q31 of chromosome 9 in skin squamous cell carcinomas. Biochem Biophys Res Commun. 1994; 201: 1495-501.
29. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. *Delineation of two distinct deleted regions on chromosome 9 in human non-melanoma skin cancers.* Genes Chromosomes Cancer. 1994; 11(4): 222-5.
30. Gruijl FR, Kranen HJV, Mullenders LHF. *UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer.* J Photochem Photobiol B. 2001; Oct; 63 (1-3): 19-27.
31. Bäckvall H, Asplund A, Gustafsson A, Sivertsson A, Lundeberg J, Ponten F. Genetic tumor archeology: microdissection as genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. Mutat Res. 2005; 571: 65-79.
32. 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.
33. 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, Universidade Estadual Paulista, 2003.

34. Francisco G, Ruiz IRG, Festa Neto C, Sanches Jr JA. *Genomic instability in basal cell carcinomas*. J Dermatol Sci. 2005; 39: 186-88
35. Martinez MAR. *Estudo das alterações dos microssatélites D6S251 e D6S252 no carcinoma basocelular esporádico*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
36. Wilkie PJ, Polymeropoulos MH, Trent JM, Small KW, Weber JL. *Genetic and Physical Map of 11 Short Tandem Repeat Polymorphisms on Human Chromosome 6*. Genomics. 1993; 15: 225-7
37. Singh KP, Roy D. Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. Gene. 2001; 269: 33-43.
38. Atienzar FA, Jha AN. *The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review*. Mut Res. In press 2006.
39. Papadopoulos S, Benter T, Anastassiou G, Pape M, Gerhard S, Bornfeld N, Ludwig WD, Dorken B. *Assessment of genomic instability in breast cancer and uveal melanoma by random amplified polymorphic DNA analysis*. Int. J. Cancer. 2002; 99: 193-200
40. Maeda T, Jikko A, Hiranuma H, Fuchihata H. *Analysis of genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck using the random amplified polymorphic DNA method*. Cancer Letters. 1999; 138: 183-88.

41. Corrêa RF, Maria DA., Soma M, Sotto MN, Sanches Jr JA , Festa Neto C, Ruiz IRG. *Nucleolar organizer region staining patterns in paraffin-embedded tissue cells from human skin cancers*. J Cutan Pathol. 2005; 32: 323–8.
42. Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DP, Proby CM. *p16^{ink4a} and p14^{ARF} tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma*. J Invest Dermatol. 2004; 122:1284-92.
43. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. *Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss*. Cancer Res. 1994; 54: 4756-59.
44. Kushida Y, Miki H, Ohmori M. *Loss of heterozygosity in actinic keratosis, squamous cell carcinoma and sun-exposed normal-appearing skin in Japanese: difference between Japanese and Caucasians*. Cancer Lett. 1999; Jun 1, 140 (1-2): 169-75.
45. Ping XL, Ratner D, Zhang H, Wu XL, Zhang MJ, Chen FF, Silvers DN, Peacocke M, Tsou HC. *PTCH mutations in squamous cell carcinoma of the skin*. J Invest Dermatol. 2004; 122:1284-92
46. Holmberg E, Rozell BL, Toftgard R. *Differential allele loss on chromosome 9q22.3 in human non-melanoma skin cancer*. Br J Cancer. 1996; 74 (2): 246-50.
47. Hayashi M, Tamura G, Kato N, Ansai S, Kondo S, Motoyama T. *Genetic analysis of cutaneous squamous cell carcinomas arising from different areas*. Pathol Inter. 2003; 53: 602-7.

48. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. *The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer.* Euro J Surg Oncol. 2003; 29: 201-12.
49. Ong T, Song B, Qian H, Wu ZL, Whong W. *Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis.* Carcinogenesis. 1998; 19 (1):.233–5.
50. Xian Z-H, Cong W-M, Zhang S-H, Wu M-C. *Genetic alterations of hepatocellular carcinoma by random amplified polymorphic DNA analysis and cloning sequencing of tumor differential DNA fragment.* World J Gastroenterol. 2005; 11(26): 4102-7.