JULIANA SILVA CAPITANIO

Instabilidade genômica em carcinoma basocelular humano revelada através da análise de seqüencias repetitivas

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

São Paulo

2008

JULIANA SILVA CAPITANIO

Instabilidade genômica em carcinoma basocelular humano revelada através da análise de sequencias repetitivas

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Capitanio, Juliana Silva.
Instabilidade genômica em carcinoma basocelular humano revelada através da análise de seqüência repetitivas / Juliana Silva Capitanio. - - São Paulo, 2009.

Orientador: Itamar Romano Garcia Ruiz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia Molecular.

Versão do título para o inglês: Genomic instability in basal cell carcinoma revealed by repetitive sequences analysis.

Descritores: 1. Oncologia 2. Biologia Molecular 3.Sequenciamento genético 4. Carcinoma basocelular 5. Marcador molecular 6. Reação em cadeia da polimerase I. Ruiz, Itamar Romano Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB206/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Juliana Silva Capitanio.

Título da Dissertação: Instabilidade genômica em carcinoma basocelular humano revelada através da análise de seqüência repetitivas .

Orientador(a): Itamar Romano Garcia Ruiz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

À minha família, com gratidão e admiração por
todo apoio, compreensão e incansáveis
incentivos durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz, por abrir as portas de seu laboratório para realização deste trabalho e pelo incansável auxílio durante o desenrolar de todo este estudo.

Ao Dr. Marcos Martinez pela obtenção dos tecidos e dados pessoais dos pacientes aqui avaliados.

Aos demais membros do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração constante com o presente trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética do Instituto Butantan pela grande troca de conhecimentos, científicos e pessoais, ocorrida ao longo destes anos.

À Universidade de São Paulo, em especial aos membros do Programa Interunidades em Biotecnologia, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

"Acho que só há um caminho para a ciência: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonarmo-nos por ele; casarmo-nos com ele, até que a morte nos separe — a não ser que obtenhamos uma solução. Mas ainda que encontremos uma solução, poderemos descobrir, para nossa satisfação, a existência de toda uma família de encantadores, se bem que talvez difíceis, problemas-filhos, para cujo bem-estar poderemos trabalhar, com uma finalidade em vista, até ao fim dos nossos dias."

Karl R. Popper

RESUMO

Capitanio JS. Instabilidade genômica em carcinoma basocelular humano como fator diagnóstico e prognóstico, [Dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Programa Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo; 2008.

O carcinoma basocelular é o tipo de câncer mais freqüente da atualidade. Apesar de raramente metastatizar-se ele pode ser muito destrutivo localmente. A radiação solar UV é um importante fator no desenvolvimento deste tipo de tumor, sendo que seus efeitos são ainda mais visíveis em populações de pele e olhos claros. Quando este tipo de radiação atinge a pele pode causar mutações nas moléculas de DNA que se não reparadas podem atingir protoncogenes ou genes supressores de tumores influenciando na tumorigênese celular. Dois genes estão conhecidamente envolvidos com o surgimento do carcinoma basocelular, PTCH1 e CDKN2A, alterações em suas vias de sinalização podem induzir a progressão do ciclo celular e a proliferação. Este estudo avalia sequencias repetitivas (microssatélites) próximas a estes genes e sequencias repetitivas dispersas por todo o genoma humano (RAPD) na busca de marcadores moleculares (diagnósticos e/ou prognósticos) e de outros genes possivelmente envolvidos com o surgimento deste tipo de tumor. Os microssatélites e os padrões de RAPD utilizados neste trabalho foram obtidos através de reações de PCR que utilizavam como molde DNA genômico. Os padrões obtidos para os tumores foram comparados com os obtidos a partir do DNA genômico de pele normal e leucócitos. Foram avaliados 34 tumores provenientes de 19 pacientes. Alterações nos microssatélites foram correlacionadas com o CBC esclerodermiforme, tanto considerados em conjunto como considerando apenas o microssatélite D9S52. Alterações nos padrões de RAPD OPB-08 foram correlacionadas com tumores micronodulares. Estes seriam possíveis marcadores diagnósticos para CBCs esclerodermiformes e micronodulares (formas mais severas) de difícil identificação histopatológica. Os microssatélites também apresentam possível indicação prognóstica, pois quando suas alterações (tanto em conjunto quanto apenas o marcador D9S50) apresentaram correlação com o maior número de lesões em um mesmo paciente. O mesmo ocorre com as alterações totais encontradas em RAPDs e nas alterações detectadas com os primers OPB-19, OPA-07, OPB-13 e OPA-11, todas se correlacionam com o aumento no número de lesões do paciente indicando um acompanhamento mais atento ao surgimento de novos tumores. A busca de novos genes possivelmente envolvidos no CBC resultou na identificação de duas sequencias. Um destes genes (DENND1A) foi identificado no cromossomo 9 e parece ser putativamente menos expresso em cânceres de pele, no entanto, o mecanismo de sua relação com a carcinogênese permanece indeterminado. O segundo gene, BANP/SMAR1, é um supressor tumoral que atua na via do p53, afeta a transcrição da ciclina D1 e inibe a sinalização da via TGFb. Alterações neste gene podem promover a carcinogênese e já foram relacionadas ao câncer de mama.

Palavras-chave: Carcinoma basocelular; Marcador molecular; DNA repetitivo.

ABSTRACT

Capitanio JS. Genomic instability in human basal cell carcinomas as a diagnostic and prognostic factor, [Masters thesis]. São Paulo: Programa Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo; 2008.

Basal cell carcinoma is curently the most commom cancer. Although it seldom metastatizes, it may be very localy distructive. The solar UV radiation is an important factor in the development of this type of tumor, its effects are even stronger on White populations. When the UV reaches the skin it may cause mutations on DNA moleculaes, if these aren't repared the may alter protoncogenes or tumor supressor genes influencing tumorigenesis. Two genes are known to be involved in the development of BCCs, PTCH1 and CDKN2A, alterations on their signaling pathways may induce cell cycle progression and proliferation. This study evaluates repetitive sequences (microsatellites) located in close proximity to these genes as well as repetitive sequences spread throughout the genome in search of molecular markers and other genes possibly involved with this tumor. Microssatelites and RAPD patterns were obtained by PCR reaction utilizing genomic DNA as template. Tumoral patterns were compared to the the ones obtained from normal skin and leucocytes. 39 tumors from 19 pacients were evaluated. Microssatelite alterations were correlated to sclerosing BCC, either when considered as a grou por considering only D9S52. Alterations on OPB-08 RAPD patterns were correlated to micronodular BCCs. These are possible diagnostic markers for the more severe types of BCCs. Microssatelites also present a possible prognostic marker (as a group or considering only D9S50) correlated to an increase in the number of tumors present in the same pacient. This correlation is also present on RAPD patterns alterations (as a group or with primers OPB-19, OPA-07, OPB-13 and OPA-11). This would suggest a more frequent examination of this patients since they're prone to developing multiple tumors. RAPD patterns also allowed the identification of 2 genes involved with the BCC. The first one is DENND1A, from chromossome 9, that seems to be less expressed in skin cancers. The second one, BANP/SMAR1, is a tumor supressor that acts on the p53 pathway, afects the transcription of cyclin D1 and inhibits the TGFb pathway. Alterations on this gene may induce carcinogenesis and it has been previously described in breast cancer.

Keywords: Basal cell carcionoma; Molecular marker; Repetitive DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da pele. Podem-se observar as três camadas presentes na pele, em detalhe observa-se a epiderme com seus três tipos celulares (Adaptado de Skin Layers, A.D.A.M. Inc, http://health.allrefer.com/pictures-images/skin-layers.html). 18

Figura 2: Tipos histológicos de CBCs. Em A, observa-se o padrão de um CBC nodular, representando a epiderme normal com massas tumorais na área da derme. Notar a palissada de células na periferia do tumor e a retração das ilhas tumorais no interior da derme. Em B, corte histológico de um CBC superficial mostrando grande extensão da lesão, porém pouca profundidade de invasão. Em C, observa-se um CBC esclerodermiforme apresentando ilhas de células tumorais invadindo regiões profundas da derme. Corados com HE, aumento 100X (Adaptado de Landes Biosciences / Eurekah.com).....20

Figura 3: Exemplos de lesões causadas por diferentes tipos de CBC. A) CBC nodular na região da testa de um homem de pele clara. Trata-se de um nódulo translúcido com umbilicação central e talangiectasia nas bordas da lesão. B) CBC superficial em crescimento na região do queixo, a lesão apresenta atrofia central com formação de crostas focais e ulcerações. C) CBC esclerodermiforme infiltrativo; a lesão envolve a maior parte do couro cabeludo de um homem negro (Adaptado de Skin cancer recognition and management – Robert A. Schwartz). 22

Figura 4: Danos produzidos no DNA pela radiação UV. A extensão da distorção causada na cadeia de DNA pelos CPDs pode ser observada na figura acima. Neste CPD (T-T) o anel ciclobutano (azul) deve conter laterais de comprimento semelhante. Para isto as pirimidinas adjacentes são forçadas a tornarem-se mais próximas que no DNA normal. No diagrama à direita há um 6-4PP T-C. O grupo amino originalmente na posição 4 da citosina acaba na posição 5 da timina. A distorção da fita de DNA gerada pelos 6-4PPs (44°) é maior que a gerada pelos CPDs (30°) (Adaptado de http://asajj.roswellpark.org/huberman/DNA_Repair/DNA_Repair.htm).....25

Figura 5: Mutações induzidas pela radiação UV. Fotoprodutos 6-4 ocasionam transições C-T em sítios dipirimidina. CPDs de citosinas resultam nas transições CC-TT em tandem, enquanto os de timina não geram mutações, pois são substituídos por adeninas na fita oposta de DNA (Adaptado de Landes Biosciences / Eurekah.com). 26

Figura 6: Esquema da via de sinalização Sonic Hedgehog. A) Ausência do fator SHH, PATCHED reprime SMOTHENED, transdutora do sinal de SHH. B) Ligação de SHH em PTCH impede que ele reprima SMO. Ativação da transcrição de genes alvo do GLI. C) Modificações da via em carcinomas basocelulares. Mutações germinativas em PTCH, SHH e SMO são encontradas em pacientes com Síndrome de Gorlyn, CBCs esporádicos

ou de Xeroderma Pigmentoso. (Adaptado de Leela Daya-Grosjean e Sophie Couve´-Privat, Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. Cancer Letters 225 (2005) 181–192). 28
Figura 7: Esquematização do cromossomo 9. Em vermelho estão indicados dois dos principais genes associados a tumores de pele (CDKN2A e PTCH1); em verde estão localizados os microssatélites de interesse (Adaptado de NCBI). 30
Figura 8: O ciclo celular e a regulação em *checkpoints*. O esquema demonstra como os produtos p16 e p14 do gene CDKN2A afetam este processo (Adaptado de Human Molecular Genetics 2, Tom Strachan e Andrew P. Read em NCBI Books). 31
Figura 9: Alterações do tipo instabilidade de microssatélite presentes nos pacientes 262 e 273 com o microssatélite D9S15 (grifo vermelho). Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata. 44
Figura 10: Alterações no padrão do microssatélite D9S15 presentes em tumores únicos ou múltiplos. 45
Figura 11: Alterações no padrão do microssatélite D9S15 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva. 45
Figura 12: Alterações do tipo MSI dos pacientes 262, 267 e 268 com o microssatélite D9S50 (grifo vermelho). Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata. 46
Figura 13: Alterações no padrão do microssatélite D9S50 presentes em tumores únicos ou múltiplos. 47
Figura 14: Alterações no padrão do microssatélite D9S50 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva. 47
Figura 15: Alterações (grifo vermelho) apresentadas com o microssatélite D9S52 pelo paciente 262. Perda de heterozigosidade nas amostras 2 e 4 e instabilidade de microssatélite na amostra 6. Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata. 48
Figura 16: Alterações no padrão do microssatélite D9S52 presentes em tumores únicos ou múltiplos. 49
Figura 17: Alterações no padrão do microssatélite D9S52 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva. 49
Figura 18: Alterações encontradas no microssatélite D9S180 (grifo vermelho). No paciente 262 temos a presença de LOH nas amostras 5 e 7. Nos pacientes 268 e 279 temos instabilidade de microssatélite nas amostras 2. Géis de poliacrilamida 7% corados com nitrato de prata. 50
Figura 19: Alterações no padrão do microssatélite D9S180 presentes em tumores únicos ou múltiplos. 51
Figura 20: Alterações no padrão do microssatélite D9S180 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva. 51
Figura 21: Perda de heterozigosidade apresentada pelo paciente 260 com o microssatélite D9S196 (grifo vermelho). Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata. 52

Figura 22: Alterações no padrão do microssatélite D9S196 presentes em tumores únicos ou múltiplos. 53
Figura 23: Alterações no padrão do microssatélite D9S196 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva. 53
Figura 24: Alterações presentes no microssatélite D9S280 (grifo vermelho). No paciente 262 temos um CBC esclerodermiforme da face (lesão 4) apresentando perda de heterozigosidade. Na paciente 275 encontramos instabilidade de microssatélite num CBC micronodular também da face. Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata. 54
Figura 25: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores únicos ou múltiplos. 55
Figura 26: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva. 55
Figura 27: Alteração apresentadas no microssatélite D9S287 (grifo vermelho). A paciente 269 apresenta perda de heterozigosidade e o paciente 266 apresenta instabilidade de microssatélite na lesão 3, CBC micronodular da face. Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata. 56
Figura 28: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores únicos ou múltiplos. 57
Figura 29: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva. 57
Figura 30: Distribuição da quantidade de MSI e LOH encontradas nos diferentes microssatélites, a média total e o erro padrão estão plotados no gráfico. 58
Figura 31: Gráfico da alterações em padrões de microssatélites de tumores com diferentes riscos de recidiva. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os microssatélites avaliados e as barras apresentam o erro padrão. 59
Figura 32: Gráfico da porcentagem média de alteração encontrada em lesões de diferentes tipos histológicos, as linhas em preto representam o erro padrão. 59
Figura 33: Gráfico da alterações em padrões de microssatélites de tumores de pacientes com diferentes números de CBCs. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os microssatélites avaliados e as barras apresentam o erro padrão. 61
Figura 34: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPA-2. Em A, as amostras do paciente 262 apresentanm padrões semelhantes para este primer. Em B as amostras do paciente 267 apresentamo padrões diferentes. As amostras 4 e 6 apresentam ganho de bandas, enquanto as amostras 5 e 7 apresentam redução no número de bandas. 64
Figura 35: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPA-7. Em A, temos as amostras do paciente 262 apresentando ganhos de bandas nos tecidos tumorais. Em B, temos as amostras do paciente 273 apresentando padrões conservados, com alteração apenas na intensidade das bandas presentes. 65

Figura 36: *Fingerprint* gerado pelo primer de RAPD OPA-5. Em A, temos as amostras do paciente 277 apresentando padrão conservado de bandas nos tecidos. Em B, temos as amostras do paciente 264 apresentando padrões alterados com ganho de bandas nos tecidos tumorais. 66
Figura 37: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPA-11. Em A, temos as amostras do paciente 262 apresentando perda de bandas nos tecidos tumorais. Em B, temos as amostras do paciente 267 apresentando padrões alterados com ganho de bandas nos tecidos tumorais. 68
Figura 38: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPA-13. Em A, temos as amostras do paciente 267 apresentando ganho de bandas nos tecidos tumorais. Em B, temos as amostras do paciente 277 apresentando padrões conservados de bandas nos tecidos tumorais, com variações apenas na intensidade. 69
Figura 39: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPA-17. Em A, temos as amostras do paciente 276 apresentando padrões conservados de bandas nos tecidos. Em B, temos as amostras do paciente 271 apresentando variações no padrão de bandas para este primer. 70
Figura 40: Padrões de RAPD apresentando perda constante nos tecidos tumorais de uma banda de tamanho próximo a 500 pb (marcada nos retângulos azuis). Observar que no paciente 262 a amostra número 5 não apresentou perda desta banda, assim como a amostra 5 do paciente 267. 71
Figura 41: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPB-08. Em A, temos as amostras do paciente 273 apresentando ganho de bandas no CBC micronodular. Em B, temos as amostras do paciente 277, apresentando padrão de bandas conservado entre CBC adenóide e pele normal para este primer. 72
Figura 42: Padrões de RAPD apresentando perda constante nos tecidos tumorais de duas bandas de tamanhos próximos a 250 e 300 pb (marcadas nos retângulos vermelhos). Observar que nos pacientes 260, 261, 262 e 269 ocorreu perda das duas bandas indicadas. Nos pacientes 265 e 267 ocorreu a perda da banda menor (250 pb) e nos pacientes 264 e 274 ocorreu a preda da banda maior (300 pb). 74
Figura 43: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPB-13. Em A, temos as amostras do paciente 272 apresentando ganho de bandas no CBC nodular. Em B, temos as amostras do paciente 267, apresentando padrão de bandas alterado em todas as suas lesões. 79
Figura 44: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPB-19. Em A, temos as amostras do paciente 262 apresentando perda de bandas na maioria de suas lesões, exceto na amostra 3. Em B, temos as amostras do paciente 277, apresentando ganho de bandas em sua única lesão. 80
Figura 45: Gráficos da distribuição da quantidade de lesões alteradas ou normais encontradas com diferentes primers de RAPD, as linhas determinam as médias e as barras o erro padrão. 81

Figura 46: Gráficos da distribuição dos perfis de bandeamento encontrados nos diferentes primers de RAPD. Em A são apresentados ganhos e perdas separadamente e em B o total de alterações encontradas.....82
Figura 47: Gráfico da alterações em padrões de RAPDs de tumores com diferentes riscos de recidiva. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os primers avaliados e as barras apresentam o erro padrão.....83
Figura 48: Gráfico das alterações encontradas em lesões de diferentes tipos histológicos, as linhas em preto representam o erro padrão. 83
Figura 49: Gráfico da alterações em padrões de RAPDs de tumores de pacientes com diferentes quantidades de tumores. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os primers avaliados e as barras apresentam o erro padrão. 85
Figura 50: Gráfico d a porcentagem média de alteração encontrada em pacientes com diferentes números de tumores, as linhas em preto representam o erro padrão.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos tumores e pacientes estudados. Os tumores foram classificados quanto a sua localização e seu risco de recidiva, enquanto os pacientes pelo número de tumores que apresentaram, sua idade, gênero e fotótipo. A distribuição destas classificações está apresentada em porcentagem. 36
Tabela 2 - Detalhes dos microssatélites avaliados e *primers* usados para amplificação por PCR. 38
Tabela 3 - Seqüência dos *primers* usados para obtenção dos padrões de RAPD e temperatura de anelamento 39
Tabela 4 - Padrões de microssatélites obtidos para as diferentes classes de tumores avaliados. 42
Tabela 5 - Padrões de microssatélites obtidos para as tumores de pacientes com 1 ou múltiplos CBCs. 43
Tabela 6 - Padrões de RAPD obtidos para as diferentes classes de tumores avaliados. 62
Tabela 7 - Padrões de RAPD obtidos para tumores de pacientes com 1 ou múltiplos CBCs. 63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 A pele e o carcinoma basocelular 18

1.2 Radiação UV e reparo do DNA 23

1.3 Alterações genéticas no CBC 27

2 OBJETIVOS 18

3 MATERIAIS E MÉTODOS 34

3.1 Casuística 36

3.2 Extração e quantificação do DNA 37

3.3 Microssatélites 37

3.4 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 38

3.5 Clonagem e seqüenciamento de bandas de interesse 39

3.6 Análises estatísticas 40

4 RESULTADOS 41

4.1 Marcadores Microssatélites: 42

4.1.1 D9S15 43

4.1.2 D9S50 46

4.1.3 D9S52 48

4.1.4 D9S180 50

4.1.5 D9S196 52

4.1.6 D9S280 54

4.1.7 D9S287 56

4.1.8 Análise conjunta dos marcadores microssatélites 58

4.2 *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD): 61

4.2.1 OPA-02 64

4.2.2 OPA-07 65

4.2.3 OPA-05 66
4.2.4 OPA-11 67
4.2.5 OPA-13 68
4.2.6 OPA-17 69
4.2.7 OPB-01 70
4.2.8 OPB-08 72
4.2.9 OPB-11 73
4.2.10 OPB-13 79
4.2.11 OPB-19 80
4.2.12 Alterações gerais de RAPDs 81
5 DISCUSSÃO 86
6 CONCLUSÕES 93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95
ANEXOS 99

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pele e o carcinoma basocelular

A pele é formada de 3 camadas: a hipoderme, a derme e a epiderme (Fig. 1). A epiderme é a camada mais superficial e contém queratinócitos, células basais e melanócitos (Fig. 1). As células basais constituem a camada basal e se dividem para garantir a renovação da pele. Com as consecutivas divisões, parte das células permanecem nesta camada, mantendo-a enquanto outras células filhas migram para as camadas superiores da pele ao mesmo tempo em que se diferenciam em queratinócitos produzindo novos tipos e maiores quantidades de queratina. A camada mais superficial da pele é composta apenas de células mortas e grandes quantidades de queratina e é denominada camada córnea. Intercalados às células basais e também adjacentes à lâmina basal encontram-se os melanócitos. Estas células sintetizam melanina e a distribuem através da secreção de melanossomos aos queratinócitos(1).

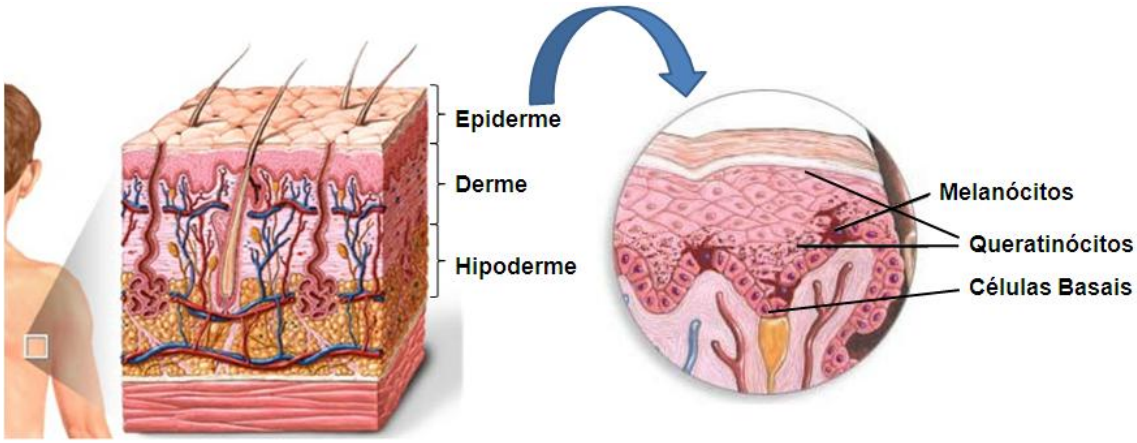

Figura 1: Estrutura da pele. Podem-se observar as três camadas presentes na pele, em detalhe observa-se a epiderme com seus três tipos celulares (Adaptado de Skin Layers, A.D.A.M. Inc, http://health.allrefer.com/pictures-images/skin-layers.html).

O carcinoma basocelular (CBC) origina-se a partir das células basais da epiderme. É o câncer de pele mais freqüente, representando cerca de 70% do total. As maiores incidências são encontradas em países e regiões de população branca, sendo que há predominância em países próximos ao Equador. Sua ocorrência é mais comum em homens, após os 40 anos de idade, principalmente em pessoas de pele clara.

A probabilidade de ocorrência de CBC em um dado indivíduo é determinada por fatores hereditários e constitutivos expostos a determinantes ambientais. A cor da pele e sua resposta à luz solar são exemplos de fatores genéticos. Caucasianos que apresentem uma combinação de pele clara, cabelos loiros ou ruivos e olhos claros normalmente apresentam queimaduras, e não bronzeado, quando expostos à luz solar(2). Estes indivíduos representam a maior parte dos casos de CBC. Os cânceres não melanoma, que incluem além dos CBCs os carcinomas espinocelulares (CEC), são mais raros em populações negras, asiáticas e hispânicas(3, 4).

A exposição à luz solar é a principal causa de CBCs(2). O componente UV da luz, em especial UVB é considerado carcinogênico. Exposição durante a infância ou exposições intermitentes intensas são um grande fator de risco. As regiões da face, pescoço e braços são as mais acometidas por este tipo de câncer, sendo, geralmente, também as mais expostas à radiação solar.

O aumento da idade traz aumento da exposição cumulativa à radiação UV, além de redução na capacidade de reparo de danos ao DNA(5). Estes são alguns dos fatores responsáveis pelo aumento exponencial do risco de CBCs com o avançar da idade. A presença de CBCs prévios também é um importante fator de risco para o surgimento de novos CBCs, especialmente no ano seguinte ao aparecimento do primeiro tumor.

Acredita-se que 90% dos cânceres de pele não melanoma podem ser atribuídos à exposição solar excessiva(6). O principal meio de prevenção a este tipo de câncer é a limitação da exposição aos raios UV. A detecção precoce das lesões também é considerada como uma prevenção secundária.

O CBC, por ser um tumor que raramente metastatiza, é o de melhor prognóstico entre os cânceres da pele. No entanto, pode apresentar característica invasiva e destruir os tecidos que o rodeiam atingindo até mesmo as cartilagens e os ossos.

O CBC é originário de células-tronco (não diferenciadas e pluripotentes) do epitélio. Sua característica típica é um estroma fibroso circundando ilhas dependentes de células tumorais. Estas células são relativamente regulares, apresentando núcleo arredondado e pouco citoplasma. As células proliferativas normalmente encontram-se nas chamadas ‘palissadas’ formadas ao redor das

margens de cada ilha tumoral. Este fenômeno pode ser responsável pelo tipo de crescimento lento, progressivo e localmente invasivo apresentado pelo tumor(7, 8).

O padrão de crescimento do CBC também é muito influenciado pelo tecido conjuntivo adjacente. Este tipo tumoral não é capaz de se desenvolver na ausência de um estroma ao seu redor. O estroma é geralmente frouxo e rico em mucina, constituindo a maior parte do volume tumoral (Fig. 2)(9).

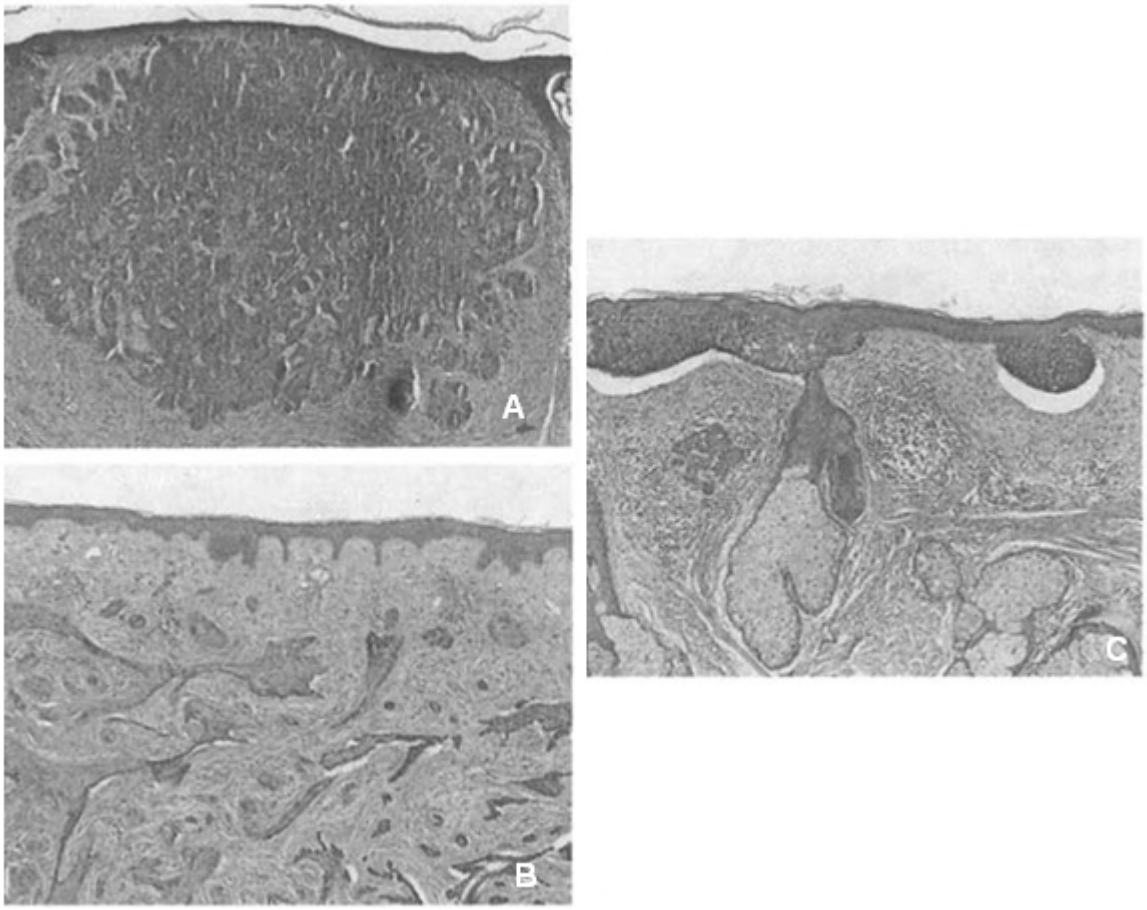

Figura 2: Tipos histológicos de CBCs. Em A, observa-se o padrão de um CBC nodular, representando a epiderme normal com massas tumorais na área da derme. Notar a palissada de células na periferia do tumor e a retração das ilhas tumorais no interior da derme. Em B, corte histológico de um CBC superficial mostrando grande extensão da lesão, porém pouca profundidade de invasão. Em C, observa-se um CBC esclerodermiforme apresentando ilhas de células tumorais invadindo regiões profundas da derme. Corados com HE, aumento 100X (Adaptado de Landes Biosciences / Eurekah.com).

Uma das classificações histológicas do CBC tem como base o padrão de crescimento destes tumores, sendo atualmente aceita pelo Colégio Real de Patologistas do Reino Unido e com grande significância biológica. Esta classificação

(Fig. 3) considera a existência dos CBCs tipo nodular, superficial, micronodular, esclerodermiforme e inúmeras outras menos comuns(10).

A apresentação mais típica, CBC nodular, inicia-se como pequena lesão consistente, de cor rósea ou translúcida e aspecto "perolado", liso e brilhante, com finos vasos sanguíneos na superfície e que cresce progressiva e lentamente. É possível que pequenos nódulos tumorais sejam encontrados próximos ao tumor central, dificultando sua remoção cirúrgica (CBC micronodular).

Algumas lesões crescem em extensão atingindo vários centímetros sem aprofundar-se nos tecidos abaixo dela (CBC superficial). A forma mais agressiva acontece quando o tumor invade os tecidos em profundidade, com grande potencial destrutivo principalmente se atingir o nariz ou os olhos (CBC esclerodermiforme).

Considerando-se a biologia tumoral, principalmente o padrão de crescimento destes tumores, podemos separá-los em lesões de alto ou baixo risco para o paciente. Os carcinomas metatípicos, os CBCs esclerodermiformes e micronodulares são considerados de alto risco, por apresentarem maior probabilidade de recidiva, enquanto os CBCs nodulares, superficiais e adenóides são considerados de baixo risco.

Figura 3: Exemplos de lesões causadas por diferentes tipos de CBC. A) CBC nodular na região da testa de um homem de pele clara. Trata-se de um nódulo translúcido com umbilicação central e talangiectasia nas bordas da lesão. B) CBC superficial em crescimento na região do queixo, a lesão apresenta atrofia central com formação de crostas focais e ulcerações. C) CBC esclerodermiforme infiltrativo; a lesão envolve a maior parte do couro cabeludo de um homem negro (Adaptado de Skin cancer recognition and management – Robert A. Schwartz).

Existem inúmeras modalidades de tratamentos disponíveis para o CBC. O objetivo de todas é erradicar o tumor com mínima deformidade ou perda de habilidade. As quatro principais opções terapêuticas são excisão cirúrgica, criocirurgia, curetagem ou eletrodisecção. Todas estas técnicas levam à cura desde que compreendam toda a extensão tumoral. A escolha da técnica a ser utilizada depende do local da lesão, de sua extensão, de características clínicas e histológicas e do possível potencial metastático do tumor.

Alguns tipos histológicos como o CBC micronodular ou esclerodermiforme podem apresentar altas taxas de recidiva devido à remoção cirúrgica incompleta do tumor pela dificuldade na identificação de uma borda cirúrgica adequada. As recidivas tumorais levam a um aumento na destruição local causada por estes tumores. A cirurgia micrográfica de Mohs tornou-se um importante método de

excisão cirúrgica para estes tipos de CBCs, assim como para lesões avançadas ou com bordas pouco definidas.

Para CBCs superficiais 5-fluorouracil(11, 12) ou imiquimod(13, 14) são boas opções. Cremes preparados com estes princípios podem ser aplicados diariamente até a cura da lesão. São geralmente bem tolerados e produzem bom resultado cosmético final.

1.2 Radiação UV e reparo do DNA

O carcinoma basocelular é o cancer mais comum em caucasianos, com sua incidência aumentando mundialmente. A exposição ao UV é provavelmente o principal fator patogênico deste tipo de câncer, mas ainda não foi determinada uma relação específica entre tempo, quantia ou padrão de exposição ao UV e o risco de CBC.

Este tipo de lesão afeta principalmente áreas da face com maior concentração de glândulas sebáceas, o tronco e os membros. Ocorrências nas costas das mãos são muito raras. Com isso notamos que a distribuição anatômica não pode ser explicada exclusivamente por exposição cumulativa ao UV(15).

Assim como ocorre no melanoma, exposição solar excessiva na infância e adolescência são maiores fatores de risco para o surgimento do CBC. O uso de protetores solares já na idade adulta é capaz de prevenir o surgimento de CECs, mas não de CBCs(16, 17).

As estratégias de nossa pele contra a radiação UV consistem principalmente de síntese de melanina e mecanismos ativos de reparo. O DNA é o principal alvo de dano direto ou indireto causado por radiação UV.

O espectro solar de radiação UV consiste de UVC (<280 nm), UVB (280 – 315 nm) e UVA (315 – 400 nm). As ondas mais destrutivas do espectro UV, que tem até 310 nm, não atingem a superfície terrestre sendo absorvidas pela camada de ozônio. O restante do espectro UV é responsável pelos efeitos biológicos, presentes na pele humana.

A luz UV penetra apenas na pele e é absorvida por suas diferentes camadas, dependendo do comprimento de onda da radiação incidente. UVB é quase

totalmente absorvido na epiderme: apenas 10% atingem a camada basal. UVA penetra mais profundamente na pele e deposita 50 % de sua energia na região da derme. Estas radiações UV são capazes de causar rearranjos moleculares no DNA da pele, levando à formação de fotoprodutos específicos e conhecidamente mutagênicos.

Caso estas mutações induzidas por UV ocorram em genes de vias de sinalização específicas da célula, como genes envolvidos no controle do ciclo celular, da proliferação, de apoptose ou do reparo do DNA, podem ocorrer o surgimento de um tumor maligno. Múltiplas mutações são necessárias para o surgimento do tumor.

A radiação UV também apresenta efeitos imunossupressores, sendo capaz de gerar tolerância contra tumores de pele imunogênicos. Os raios UVB e UVC atuam diretamente sobre o DNA. A luz ultravioleta é absorvida pelas bases dos ácidos nucléicos e o influxo de energia resultante pode induzir alterações químicas. Os fotoprodutos mais comumente gerados são conseqüência da formação de uma ligação entre pirimidinas adjacentes de uma mesma fita do DNA. Os CPDs (dímeros pirimidínicos ciclobutano) são os produtos mais freqüentes, sendo as formações T-T as primeiras, seguidas pelas formações T-C e C-T, enquanto formações C-C são mais raras(18, 19). Outra formação dimérica típica presente nos sítios dipirimidínicos são os fotoprodutos 6-4. Estes dímeros são formados por uma única ligação covalente entre a posição 6 de uma pirimidina e a posição 4 da pirimidina adjacente no lado 3'. O fotoproduto pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PPs) predominante é T-C, seguido por C-C, T-T e C-T. A formação de qualquer destes fotoprodutos leva à distorção da estrutura normal do DNA(20), conforme representado na figura 4.

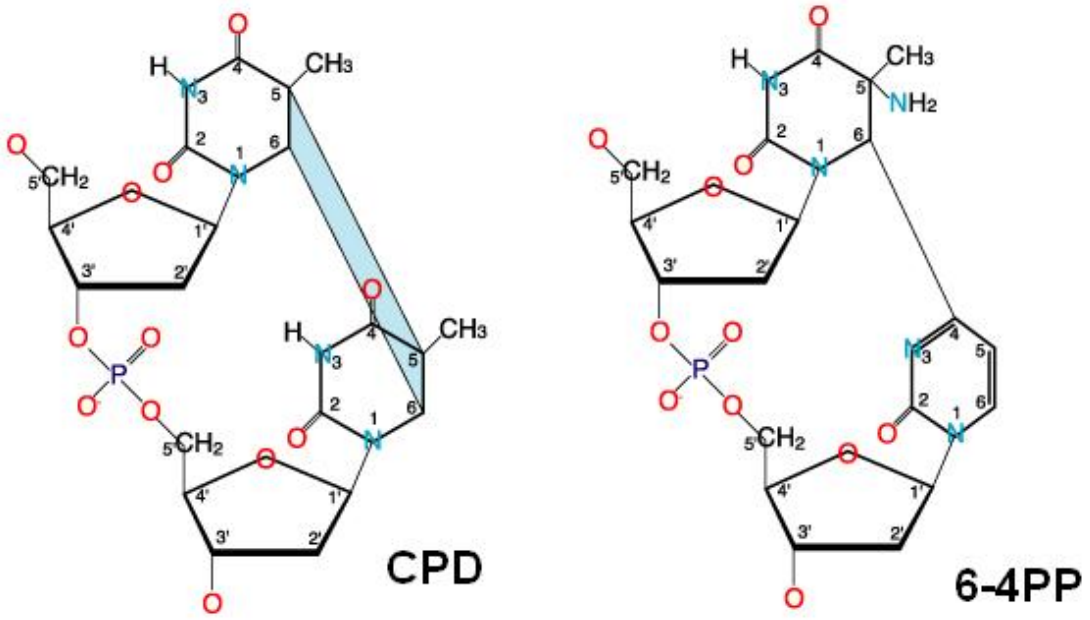

Figura 4: Danos produzidos no DNA pela radiação UV. A extensão da distorção causada na cadeia de DNA pelos CPDs pode ser observada na figura acima. Neste CPD (T-T) o anel ciclobutano (azul) deve conter laterais de comprimento semelhante. Para isto as pirimidinas adjacentes são forçadas a tornarem-se mais próximas que no DNA normal. No diagrama à direita há um 6-4PP T-C. O grupo amino originalmente na posição 4 da citosina acaba na posição 5 da timina. A distorção da fita de DNA gerada pelos 6-4PPs (44°) é maior que a gerada pelos CPDs (30°) (Adaptado de http://asajj.roswellpark.org/huberman/DNA_Repair/DNA_Repair.htm).

Os efeitos biológicos da radiação UVA no DNA diferem dos efeitos do UVB/UVC e são, predominantemente, indiretos. A energia ultravioleta A é absorvida por outros cromóforos, como NADH e algumas drogas, levando ao surgimento de espécies reativas de oxigênio (ROS). As moléculas resultantes desta reação são capazes de interagir com o DNA(21), levando a quebras em suas fitas ou a ligações entre proteínas e DNA. Além disso, parte da radiação UVA também é capaz de gerar CPDs e 6-4PPs.

As lesões ao DNA descritas podem interferir nos processos de morte celular, envelhecimento, mutagênese e carcinogênese caso não sejam corrigidas pela maquinaria nuclear de reparo do DNA.

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é o principal sistema responsável por corrigir os danos diretos gerados ao DNA pela radiação UV(22). Os danos indiretos podem ser reparados via NER ou via reparo por excisão de base (BER).

Falhas no NER ou quantia de lesões acima de sua capacidade de reparação são etapas patogênicas importantes no surgimento de cânceres de pele associados

à radiação UV. Quando não reparadas estas lesões levam a mutações conhecidas como assinatura UV(23). Estas mutações podem ser encontradas em genes conhecidamente envolvidos com o desenvolvimento de cânceres de pele, como os genes TP53 e PTCH(24, 25). A figura 5 representa as principais assinaturas UV encontradas nos cânceres de pele não melanoma.

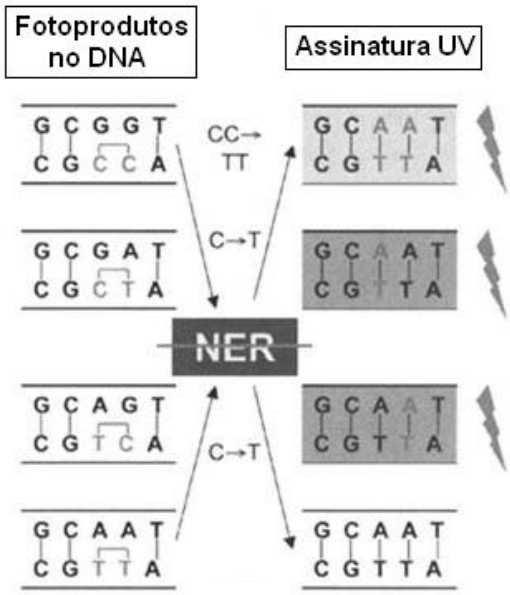

Figura 5: Mutações induzidas pela radiação UV. Fotoprodutos 6-4 ocasionam transições C-T em sítios dipirimidina. CPDs de citosinas resultam nas transições CC-TT em tandem, enquanto os de timina não geram mutações, pois são substituídos por adeninas na fita oposta de DNA (Adaptado de Landes Biosciences / Eurekah.com).

Outro sistema de reparo do DNA, conhecido como MMR (*methyl-derived mammalian mismatch repair*) também pode ser relacionado ao surgimento de cânceres de pele causados por UV. Este sistema geralmente atua durante a replicação do DNA. Ao identificar erros de pareamento nas novas fitas sendo sintetizadas, este sistema promove a excisão do fragmento alterado e sua ressíntese usando a fita oposta como *template(26, 27)*.

Defeitos neste sistema de reparo podem ser evidenciados pela instabilidade de microssatélites, causada por erros não corrigidos durante a replicação destas seqüências. Isto demonstra uma relação entre a instabilidade genômica e o reparo insuficiente do DNA(28, 29). Um estudo recente, utilizando cânceres de pele não melanoma verificou os níveis citoplasmáticos e nucleares de proteínas MMR nestes tumores. Foi determinado que o CBC apresenta menos expressão de proteínas

MMR que o CEC, isto pode indicar vias moleculares diferentes para o surgimento destes tumores(30).

1.3 Alterações genéticas no CBC

Microssatélites são seqüências de DNA repetitivo, de 1-6 pares de bases, arranjadas como repetições *in tandem* espalhadas por todo o genoma em posições conhecidas. O padrão de microssatélites é altamente polimórfico, por isso em geral apresentam-se em condição heterozigota nos indivíduos. Alterações dessas regiões podem influenciar a atividade de promotores, sítios de recombinação e ligação de topoisomerases de DNA, etc(31, 32). Existem dois tipos principais de alterações possíveis em microssatélites. Uma delas é a instabilidade de microssatélites (MSI, *Microsatellite Instability*), que decorre da variação do número de repetições internas, devido a erros durante a replicação(33, 34). A segunda alteração é conhecida como LOH (*Loss of Heterozygosity*). Trata-se da perda do microssatélite inteiro devido a deleções, translocações, não disjunções, etc. em cromossomos, resultando na perda de heterozigosidade.

Estas seqüências repetitivas do genoma podem ser usadas como marcadores genéticos em diversos tipos de cânceres. É possível que os microssatélites citados na figura 7 sejam bons marcadores para o CBC por localizarem-se em regiões frequentemente acometidas por perdas de heterozigosidade em cânceres de pele(35).

Em CBCs esporádicos, mapeamentos genéticos revelam que a principal região cromossômica a apresentar perda de heterozigosidade é a 9q22. Esta é a região onde se localiza o gene supressor tumoral PTCH1. Alterações neste gene, e em outros pertencentes à mesma via, podem levar à indução do aumento de expressão de genes alvo desta via. O próprio PTCH é um destes genes, e encontra-se superexpresso tanto em CBCs esporádicos quanto familiares(36). A ativação da via de sinalização Hedgehog parece ser chave no desenvolvimento deste tipo tumoral (Fig. 6)(37).

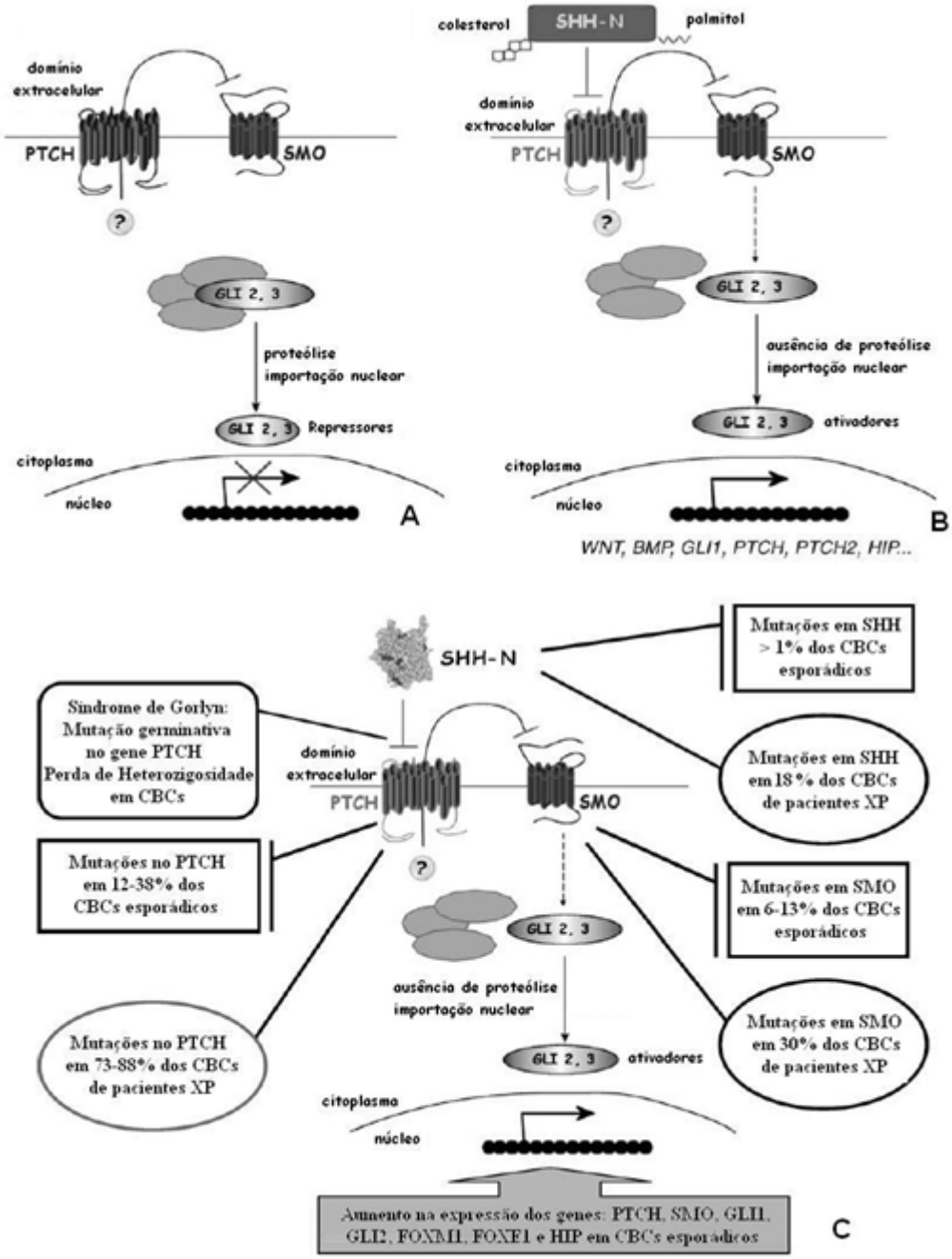

Figura 6: Esquema da via de sinalização Sonic Hedgehog. A) Ausência do fator SHH, PATCHED reprime SMOTHENED, transdutora do sinal de SHH. B) Ligação de SHH em PTCH impede que ele reprima SMO. Ativação da transcrição de genes alvo do GLI. C) Modificações da via em carcinomas basocelulares. Mutações germinativas em PTCH, SHH e SMO são encontradas em pacientes com Síndrome de Gorlyn, CBCs esporádicos ou de Xeroderma Pigmentoso. (Adaptado de Leela Daya-Grosjean e Sophie Couve´-Privat, Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. Cancer Letters 225 (2005) 181–192).

O gene PTCH1 está localizado na região 9q22.34. Esta região é freqüentemente acometida por perda de heterozigosidade tanto em CBCs esporádicos quanto em tumores associados à Síndrome de Gorlyn. Em um estudo de 42 CBCs esporádicos, mais de 50% dos carcinomas apresentaram alterações por

mutação somática e/ou deleção em ambos os alelos do gene PTCH1. A inativação deste gene foi a alteração genética mais comum nestes tumores(38).

As mutações detectadas no gene PTCH1 estão distribuídas por toda a seqüência codificante do gene, sem evidência para presença de uma região de *hotspot* mutacional. A maioria das mutações apresentadas resultava em proteínas truncadas ou com atividade alterada(38).

Em CBCs esporádicos também são encontradas mutações em outros genes da via de sinalização SHH, no entanto, estas são muito mais raras e geralmente restritas a casos específicos(39). Outra evidência do papel da sinalização aberrante da via SHH em CBCs é o aumento na expressão de genes alvo desta via, como PTCH1, HIP (*hedgehog interacting protein*), GLI (*glioma-associated oncogene*) 1 e GLI2 em quase todos os carcinomas deste tipo(40).

Avaliações de CBCs usando hibridização genômica comparativa indicam que este tipo de câncer é pouco geneticamente instável. Poucas aberrações no número de cópias de cromossomos foram detectadas. A perda de material genético é geralmente restrita a região 9q. Ganhos já foram detectados em algumas outras regiões, como 6p, 9q, 7 e X(41).

A perda da região 9q foi confirmada através de análises de perda de heterozigosidade (LOH). A região envolvida neste tipo de câncer foi mais precisamente determinada, sendo a região 9q22.3(42), especialmente entre os marcadores de microssatélite D9S196 e D9S287, a mais alterada(43). Além destes, existem inúmeros outros marcadores microssatélites flanqueando esta região. A localização dos microssatélites D9S180, D9S196, D9S280 e D9S287, de interesse neste estudo, pode ser vista na figura 7.

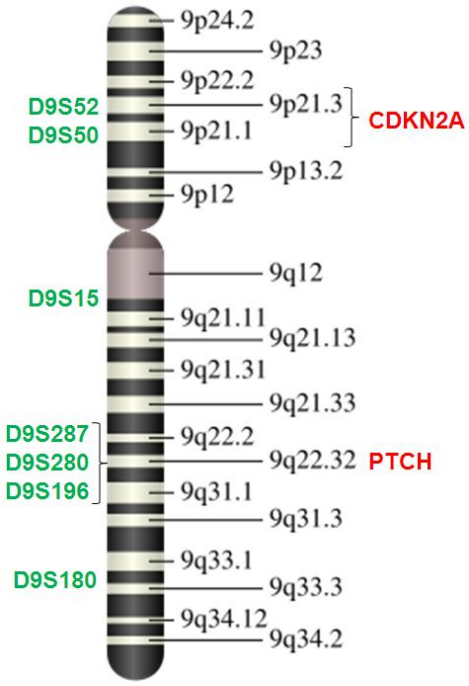

Figura 7: Esquematização do cromossomo 9. Em vermelho estão indicados dois dos principais genes associados a tumores de pele (CDKN2A e PTCH1); em verde estão localizados os microssatélites de interesse (Adaptado de NCBI).

Em cânceres de pele também é frequente a perda da região 9p21(35). Os microssatélites D9S52 e D9S50 localizam-se nessa região (Fig. 7) e também foram avaliados neste estudo. O gene CDKN2A também está neste mesmo lócus cromossômico.

Um estudo avaliou alteração em microssatélites na região 9p21-p22 e alterações no gene CDKN2A em tumores de pele malignos e benignos. Foram encontradas alterações em microssatélites apenas em CBCs (20% dos casos), enquanto o gene CDKN2A apresentava-se normal. Isto sugere que as mutações podem estar afetando regiões reguladoras deste gene, também é possível que possam existir outros genes na região que estejam envolvidos com o surgimento e progressão deste tipo de câncer(44).

O CDKN2A pertence a uma família de genes que codifica proteínas chamadas inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKI). Eles regulam negativamente o ciclo celular através de interação com os complexos CDK - ciclinas. O CDKN2A, que codifica as proteínas p16 e p14, age num *checkpoint* importante do ciclo celular, impedindo a progressão da fase G1 para fase S. Este efeito é mediado pela ligação entre p16, ciclina D1/CDK4 e pRB, inibindo a fosforilação deste último e

a liberação do fator E2F, o que impede a indução da transcrição de genes essenciais para síntese de DNA.

A proteína p14 também é originada pelo mesmo gene, através de um quadro de leitura alternativo. Ela age através da via da proteína p53 inibindo a proteína MDM2 que a degrada, favorecendo a parada do ciclo celular e a apoptose (Fig. 8).

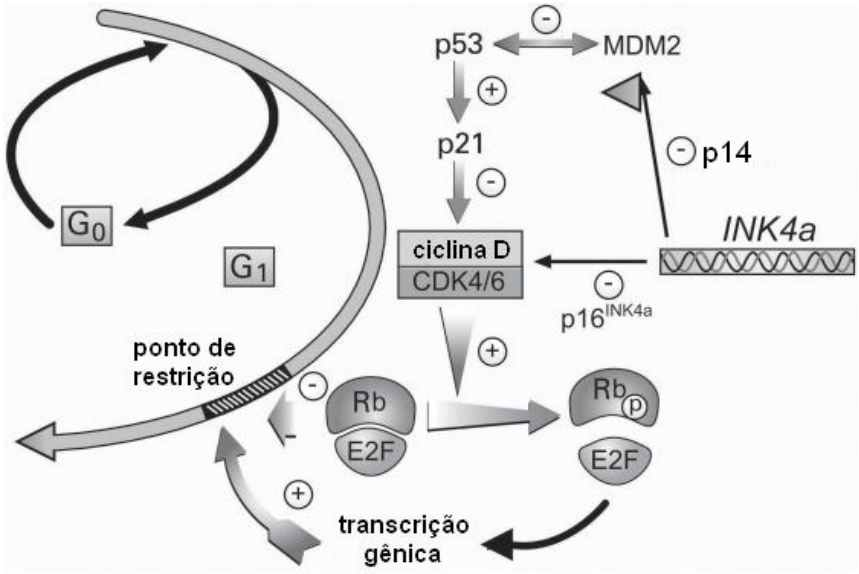

Figura 8: O ciclo celular e a regulação em *checkpoints*. O esquema demonstra como os produtos p16 e p14 do gene CDKN2A afetam este processo (Adaptado de Human Molecular Genetics 2, Tom Strachan e Andrew P. Read em NCBI Books).

Num estudo utilizando marcadores microssatélites em CBCs, 55% das lesões apresentaram LOH na região 9p21-22. No entanto, o seqüenciamento do gene CDKN2A não revelou mutações em sua seqüência. Isto pode ser uma indicação de que nesses casos as alterações estejam presentes em regiões reguladoras próximas a este gene(44).

Outras seqüências repetitivas podem ser usadas como marcadores genéticos, como, por exemplo, os padrões RAPD. Esta técnica permite a observação de diversas regiões do genoma, gerando *fingerprints* individuais. A comparação entre os padrões gerados pelos tecidos tumoral e normal de um mesmo paciente pode revelar marcadores genéticos ainda desconhecidos.

Em trabalhos prévios do laboratório de Genética, foram observados LOH e/ou MSI em 36 % dos CBC, 25 % dos CECs e 57 % dos melanomas (MM) com o microssatélite D9S50; e 28,5 % CBC, 42,8 % CEC e 71,4 % MM com D9S52. Queratose Actinica não apresentou alterações. No mesmo trabalho CEC, CBC e MM

foram avaliados com relação a seus padrões de RAPD, tendo sido encontradas alterações em todos os tumores quando comparados com o sangue, com tendência a ganhos de bandas nos padrões de RAPD(45). Também foram estudadas 10 amostras de CBCs utilizando 10 *primers* de RAPD e 3 *primers* de microssatélites, encontrando 100 % de alterações nos padrões RAPDs com 8 dos 10 *primers*; não houve prevalência de ganho ou perda de banda nos padrões obtidos. Quanto aos microssatélites, 20 % das lesões apresentaram alterações no microssatélite D9S15, 10% no D6S252 e 60 % no D6S251(46). Microssatélites adjacentes ao gene PTCH1 e PTCH2, ambos envolvidos no desenvolvimento de CBC, também foram investigados. Das 10 lesões avaliadas, quatro tumores apresentaram LOH no microssatélite D9S180, próximo ao gene PTCH1(47).

Martinez (Dissertação de Mestrado, 2006) estudou os microssatélites D6S251 e D6S252, presentes no cromossomo 6, em amostras de CBC. Nenhuma alteração foi encontrada no marcador D6S252, enquanto 23 % de alterações estavam presentes no microsatélite D6S251, ocorrendo principalmente em CBCs esclerodermiformes e micronodulares, mais agressivos.

No presente estudo pretendemos avaliar as alterações nos microssatélites citados acimas, conhecidamente alterados no câncer de pele, e as alterações em padrões de RAPD em um número maior de amostras, focando a atenção apenas para o carcinoma basocelular. Elucidando melhor a biologia deste tipo tumoral, poderemos determinar os fatores genéticos responsáveis pelo surgimento do tumor e de seus diferentes perfis de agressividade. A obtenção de marcadores genéticos a partir de alterações em microssatélites ou padrões de RAPD poderá futuramente auxiliar nas condutas médicas, visando principalmente diminuir o alto número de recidivas apresentado pelo CBC e minimizar o dano local causado ao paciente.

Além do auxílio que a técnica pode proporcionar à clínica médica, este estudo também promoveu a identificação de novas alterações neste tipo tumoral pela identificação de bandas particularmente afetadas em vários pacientes, a partir de padrões RAPD (através de clonagem e seqüenciamento).

2 OBJETIVOS

Estudar as alterações em padrões de microssatélites e seqüências de DNA polimórfico amplificadas randomicamente (RAPD) em carcinomas basocelulares através de:

- Comparação com as características dos tumores;
- Comparação com dados dos pacientes portadores destes CBCs;
- Estabelecimento de possíveis marcadores moleculares para o CBC;
- Determinação de novas seqüências ou genes envolvidos na tumorigênese da célula basal;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram estudados 19 pacientes, portadores de 34 carcinomas basocelulares esporádicos e seus respectivos controles (pele adjacente ao tumor e/ou sangue). Os pacientes foram diagnosticados, cirurgiados 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 (HCFMUSP).

Foram obtidos principalmente CBCs: nodular (sólido), micronodular e esclerodermiforme. Estes foram agrupados em tumores de alto (carcinoma metatípico, CBCs esclerodermiforme e micronodular) ou baixo risco (CBCs nodulares, superficiais e adenóides) de acordo com sua probabilidade de recidiva. Os tumores avaliados também foram classificados em único (um tumor presente no paciente) ou múltiplos (diversos tumores no mesmo paciente). As características dos pacientes e tumores estudados estão descritas na tabela 1 (detalhes no ANEXO A).

Tabela 1 – Caracterização dos tumores e pacientes estudados. Os tumores foram classificados quanto a sua localização e seu risco de recidiva, enquanto os pacientes pelo número de tumores que apresentaram, sua idade, gênero e fotótipo. A distribuição destas classificações está apresentada em porcentagem.

Parâmetro	Classificação	Porcentagem
Total de tumores (paciente)	Único	63,16%
	Múltiplos	36,84%
Localização (tumor)	Face	75,00%
	Outras	25,00%
Risco de recidiva (tumor)	Alto	43,75%
	Baixo	56,25%
Idade (paciente)	antes 60	34,38%
	após 60	65,63%
Gênero (paciente)	M	68,42%
	F	31,58%
Fotótipo (paciente)	pele clara	78,95%
	pele escura	10,53%
	não informado	10,53%

Após cirurgia, as lesões e peles normais foram colocadas em nitrogênio líquido e transportadas para o Laboratório de Genética do Instituto Butantan, onde foram armazenadas a -180 ºC até sua utilização. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA e processadas o mais rapidamente possível.

3.2 Extração e quantificação do DNA

Cada amostra de tecido fresco congelado foi biopulverizado e o DNA extraído, usando proteinase K e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (ANEXO B). As amostras de sangue sofreram lise prévia das hemácias com tampão $KHCO_3$ 10 mM, NH_4Cl 155 mM, EDTA 1 Mm (ANEXO C), seguindo-se o protocolo acima para extração do DNA dos leucócitos.

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. Os géis foram analisados e fotografados sob transiluminador UV (*Gel Logic 100 Imaging System Kodak*) e os DNAs quantificados pelo programa Kodak 1D 3.6 *Scientific Imaging System*®.

3.3 Microssatélites

Foram utilizados 7 microssatélites, localizados no cromossomo humano 9 (Tab. 2). A reação de PCR foi feita com 100 ng de DNA, 1 µl dNTP mix 10 mM (*Amersham*); 1,5 µl $MgCl_2$ 50 mM, 1 µl de cada *primer* 10 pM (OPERON), 5 uL tampão 10X e 1 unidade de Taq DNA polimerase (*New England BioLabs, USA*) em 50 µl de reação. A amplificação foi feita em 35 ciclos de 94 °C 1 min (desnaturação); temperatura de anelamento conforme o *primer* (tab. 7) por 1 min, extensão de 1 min 72 °C e 5 min de extensão 72 °C ao final total da reação.

A análise inicial dos resultados foi em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. As amostras positivas foram novamente submetidas a eletroforese, desta vez em gel de acrilamida 7-8%, corado com nitrato de prata (ANEXO D) e fotografado em transiluminador com luz branca. As amostras foram analisadas quanto a MSI (diminuição ou aumento no tamanho das bandas) e LOH (perda igual ou maior que 50% na intensidade da banda), utilizando-se como controle normal a pele adjacente ao tumor e/ou sangue dos pacientes portadores das lesões estudadas. A quantificação das bandas avaliadas foi feita pelo programa Kodak 1D 3.6 *Scientific Imaging System*®.

Tabela 2 - Detalhes dos microssatélites avaliados e *primers* usados para amplificação por PCR.

Microssatélite	Lócus	Anelamento (°C)	Repetição	Banda esperada	*Primers* (5' – 3')
D9S15	9q13-21	55ºC	(CA)n	195-209 pb	D-TAAAGATTGGGAGTCAAGTA R-TTCACTTGATGGTGGTAATC
D9S50	9p21	52ºC	(CA/GT)n	76 -100 pb	D-GATCCTTTTCATCTTCTGAC R-GAGGGACGGAGCAACTGAT
D9S52	9p21	54ºC	(ATTT) n	213-229 pb	D-GCTAGAGGGAGGTTTAATTG R-AATTAGCCAGGTGTTGTGGT
D9S180	9q33	55ºC	(CA)n	220-230 pb	D-CAGTGGTTTGGAATCGAACC R-AGCTATTTTTGGGGGCTGAG
D9S196	9q22.9	55ºC	(CA)n	254-260 pb	D-GGGATTACACCTCAAAACCA R-ACCACACTGCGGGACTT
D9S280	9q22.3	55ºC	(CA)n	140-160 pb	D-TTTCGCTTCCCACCCA R-CACGCCACTGATCTAGGCT
D9S287	9q22.3	55ºC	(CA)n	168-180 pb	D-GGATGCTCCTCACGC R-ACCACTACATTGTTCAAGGG

3.4 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Onze *primers* referentes aos kits A e B Operon (tab. 8) foram utilizados para os RAPDs. As reações de PCR foram realizadas com 50 ng de DNA, 3 uL de tampão 10X, 1,5 µl de MgCl2 50 mM, 1 µl de dNTP mix 10 mM, 1 µl de um só *primer* 10 pM, 1 unidade de Taq DNA polimerase (*New England BioLabs*) e água para 30 µl.

Cada reação passou por 45 ciclos de desnaturação 94 ºC 1 min, temperatura de anelamento variável de acordo com o *primer* usado (tab. 8) por 1 min e extensão 72 ºC 1,5 min. Um passo extra de extensão 72 ºC 5 min foi adicionado ao final dos ciclos.

Tabela 3 – Seqüência dos *primers* usados para obtenção dos padrões de RAPD e temperatura de anelamento

Primer RAPD	Seqüência	Anelamento (°C)
OPA-2	5’ - TGCCGAGCTG - 3’	34 °C
OPA-7	5’ - GAAACGGGTG - 3’	35 °C
OPA-5	5’ - AGGGGTCTTG - 3’	32 °C
OPA-11	5’- CAATCGCCGT - 3'	41 °C
OPA-13	5’ - CAGCACCCAC - 3’	34 °C
OPA-17	5’ - GACCGCTTGT - 3’	32 °C
OPB-1	5’- GTTTCGCTCC - 3'	32 °C
OPB-8	5’ - GTCCACACGG - 3’	34 °C
OPB-11	5’ - GTAGACCCGT - 3’	32 °C
OPB-13	5’ - TTCCCCCGCT - 3’	32 °C
OPB-19	5’ - ACCCCCGAAG - 3’	34 °C

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo, fotografados sob luz UV. Foram feitas comparações entre o tecido normal e tumoral quanto ao ganho ou perda de bandas.

Bandas de interesse foram identificadas nos padrões de RAPD que apresentaram a mesma alteração em múltiplos pacientes. Estas bandas foram eluídas do gel de agarose (ANEXO E) para clonagem e seqüenciamento.

3.5 Clonagem e seqüenciamento de bandas de interesse

As bandas de interesse selecionadas nos padrões de RAPD foram reamplificadas, purificadas novamente e inseridas no plasmídeo pGEM T-*easy* (*Promega*) conforme instruções do fabricante. Os insertos foram ligados aos plasmídeos abertos em presença de ligase e posteriormente inseridos em *E. coli DH5α* competentes, que sofreram choque térmico e osmótico com $CaCl_2$ para permeabilizar sua membrana.

Os clones foram selecionados em meio LB (*Luria-Bertani*) contendo ampicilina e submetidos à mini-preparação para extração dos plasmídeos

recombinantes. Para caracterizar o inserto, os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *Eco* RI, e também submetidos a PCR usando os *primers* T7 e SP6 (*Promega*) que anelam nas seqüências do plasmídeo (ANEXO F).

O seqüenciamento dos clones selecionados foi feito utilizando o seqüenciador automático *ABI Applied Biosystems* e kit de seqüenciamento *BigDye Teminator v3.1 Cycle* (ANEXO G).

As seqüências obtidas foram comparadas entre si e submetidas ao programa BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) para pesquisa em banco de dados, buscando identificar o conteúdo das bandas que sofreram alteração nos tumores. O objetivo foi encontrar um marcador capaz de distinguir os diferentes tipos histológicos de CBC ou capaz de indicar novos genes envolvidos com a gênese e progressão destes tumores.

3.6 Análises estatísticas

As avaliações estatísticas foram feitas através dos programas SPSS (*Service Pack for Social Sciences)* versão 16.0 e *GraphPad Prism* versão 5.

Para avaliações de correlações significantes entre cada um dos microssatélites ou *primers* de RAPD com as características dos pacientes ou CBCs estudados foram utilizadas tabulações cruzadas associadas ao teste Chi-quadrado.

Para avaliações dos resultados conjuntos obtidos para microssatélites ou RAPDs, cada um dos primers foi considerado como uma replicata do grupo de dados e foram utilizados os testes estatísticos ANOVA para uma ou duas variáveis ou teste T (não pareado).

Valores de $p<0,05$ foram considerados estatísticamente significantes e testes de dois lados (*two-sided*) foram realizados para todas as amostras.

4 RESULTADOS

4.1 Marcadores Microssatélites:

Foram avaliados 7 marcadores microssatélites do cromossomo 9, D9S15, D9S50, D9S52, D9S180, D9S196, D9S280 e D9S287 (ANEXO H).

A tabela 4 apresenta o número de tumores de alto ou baixo risco que foram informativos com cada um dos microssatélites, assim como as alterações encontradas. O mesmo aparece na tabela 5 para tumores únicos ou múltiplos.

Tabela 4 – Padrões de microssatélites obtidos para as diferentes classes de tumores avaliados.

Microssatélite	Padrão	Alto risco	Baixo risco	Total
D9S15	informativos	13	16	29
	LOH	0	0	0
	MSI	3	1	4
D9S50	informativos	14	18	32
	LOH	0	0	0
	MSI	1	2	3
D9S52	informativos	13	17	30
	LOH	2	0	2
	MSI	0	1	1
D9S180	informativos	13	17	30
	LOH	1	1	2
	MSI	0	2	2
D9S196	informativos	12	17	29
	LOH	0	1	1
	MSI	0	0	0
D9S280	informativos	13	17	30
	LOH	1	0	1
	MSI	0	0	0
D9S287	informativos	14	17	31
	LOH	1	0	1
	MSI	1	0	1
Totais	informativos	92	119	211
	LOH	5	2	7
	MSI	5	6	11

Tabela 5 – Padrões de microssatélites obtidos para as tumores de pacientes com 1 ou múltiplos CBCs.

Microssatélite	Padrão	Único	Múltiplo	Total
D9S15	informativos	13	16	29
	LOH	0	0	0
	MSI	1	3	4
D9S50	informativos	13	19	32
	LOH	0	0	0
	MSI	0	3	3
D9S52	informativos	13	17	30
	LOH	0	2	2
	MSI	0	1	1
D9S180	informativos	13	17	30
	LOH	0	2	2
	MSI	1	1	2
D9S196	informativos	12	18	30
	LOH	1	0	1
	MSI	0	0	0
D9S280	informativos	13	17	30
	LOH	0	2	2
	MSI	1	0	1
D9S287	informativos	13	18	31
	LOH	0	2	2
	MSI	1	0	1
Totais	informativos	90	122	212
	LOH	1	8	9
	MSI	4	8	12

4.1.1 D9S15

Foram encontradas um total de 4 alterações do tipo MSI, três das quais estavam presentes em diferentes tumores do paciente 262. A outra MSI foi detectada no tumor único da paciente 273 (Fig. 9). Não foram encontradas correlações relevantes entre este tipo de tumor e as características do paciente ou da lesão.

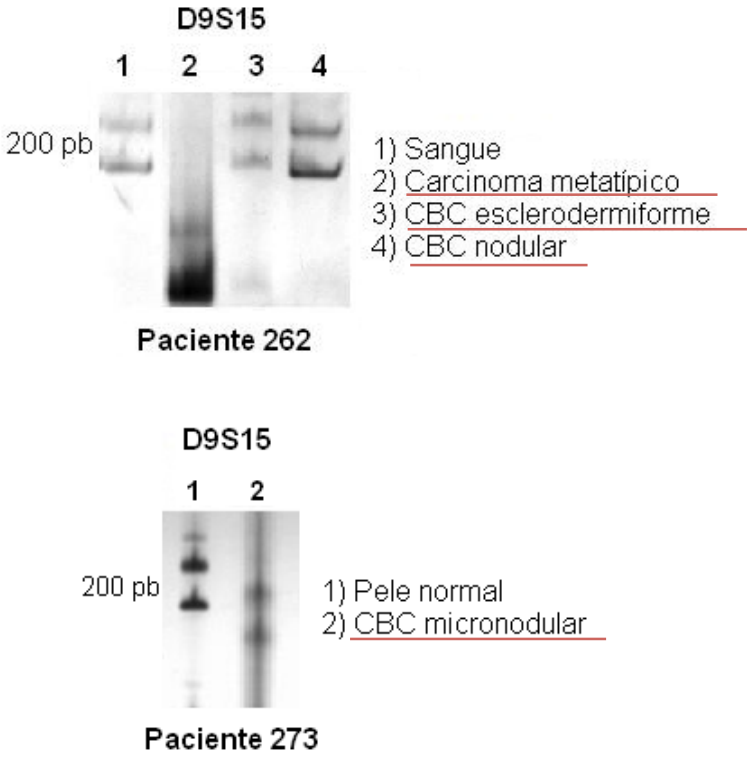

Figura 9: Alterações do tipo instabilidade de microssatélite presentes nos pacientes 262 e 273 com o microssatélite D9S15 (grifo vermelho). Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata.

O total de alterações encontradas foi de 13,75% com este microssatélite. Sendo que os tumores múltiplos apresentaram mais alteração (18,75%) do que os únicos (7,69%), como demonstrado na figura 10. Assim como tumores de baixo risco apresentaram-se mais alterados (23,07%) que os de alto risco (6,25%), figura 11.

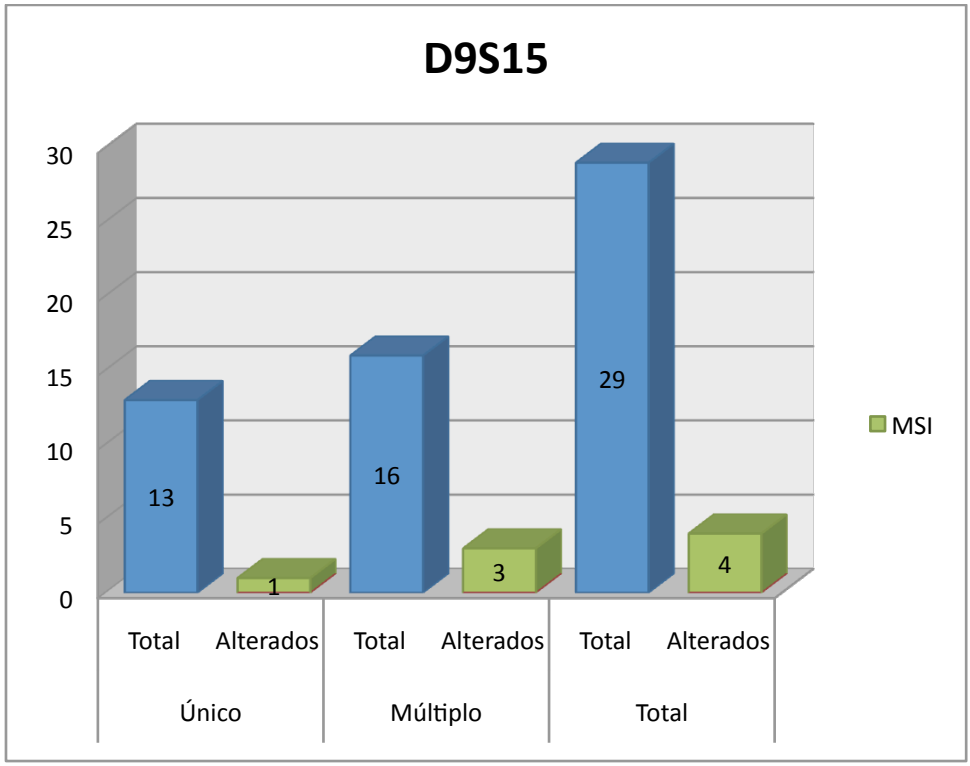

Figura 10: Alterações no padrão do microssatélite D9S15 presentes em tumores únicos ou múltiplos.

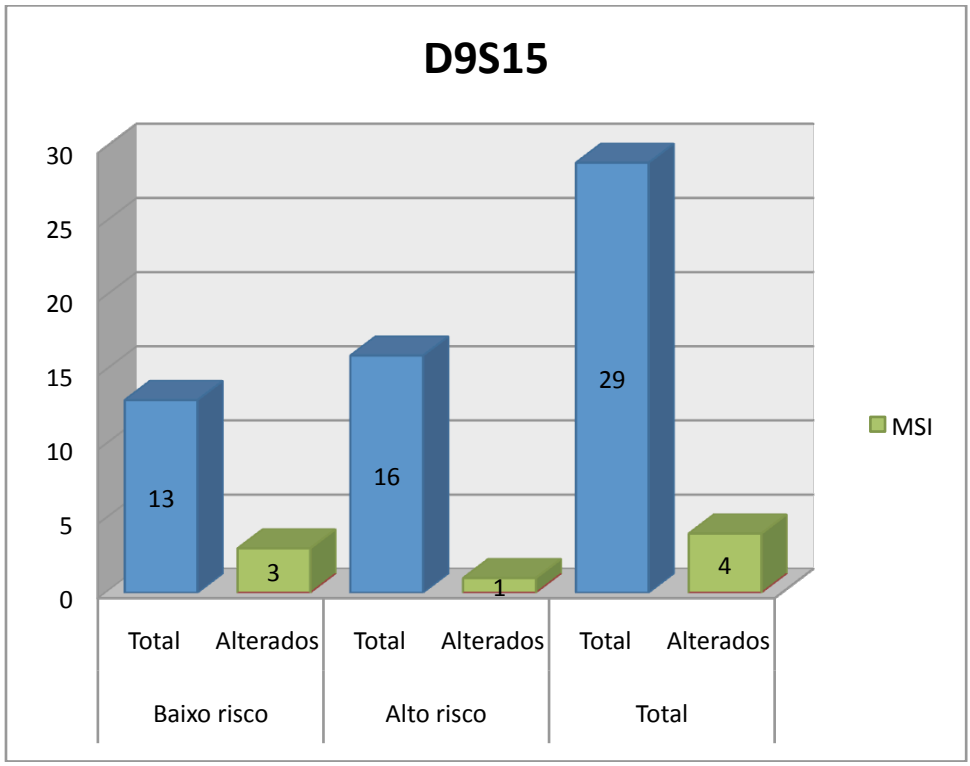

Figura 11: Alterações no padrão do microssatélite D9S15 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva.

4.1.2 D9S50

Foram encontradas três MSIs para este microssatélite (Fig.12), em três pacientes diferentes que apresentavam múltiplos tumores. O paciente 262 apresentou MSI no CBC esclerodermiforme apresentado em seu braço, 267 em um CBC nodular da região toráxica e 268 em um CBC nodular da face.

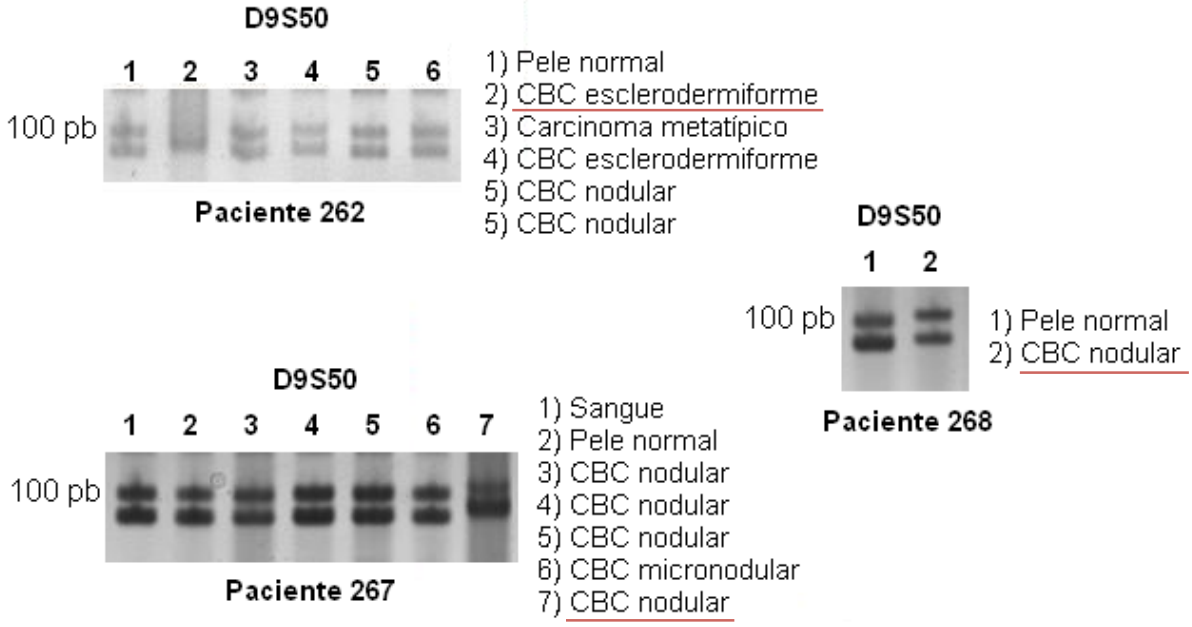

Figura 12: Alterações do tipo MSI dos pacientes 262, 267 e 268 com o microssatélite D9S50 (grifo vermelho). Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata.

Alterações neste microssatélite parecem estar correlacionadas com a ocorrência de tumores em regiões diferentes da face.

O total de alterações encontradas foi de 9,37% com este microssatélite. Sendo que os tumores múltiplos apresentaram mais alteração (15,79%) do que os únicos que não se apresentaram alterados, como demonstrado na figura 13. Tumores de baixo risco apresentaram-se menos alterados (7,14%) que os de alto risco (11,11%), figura 14.

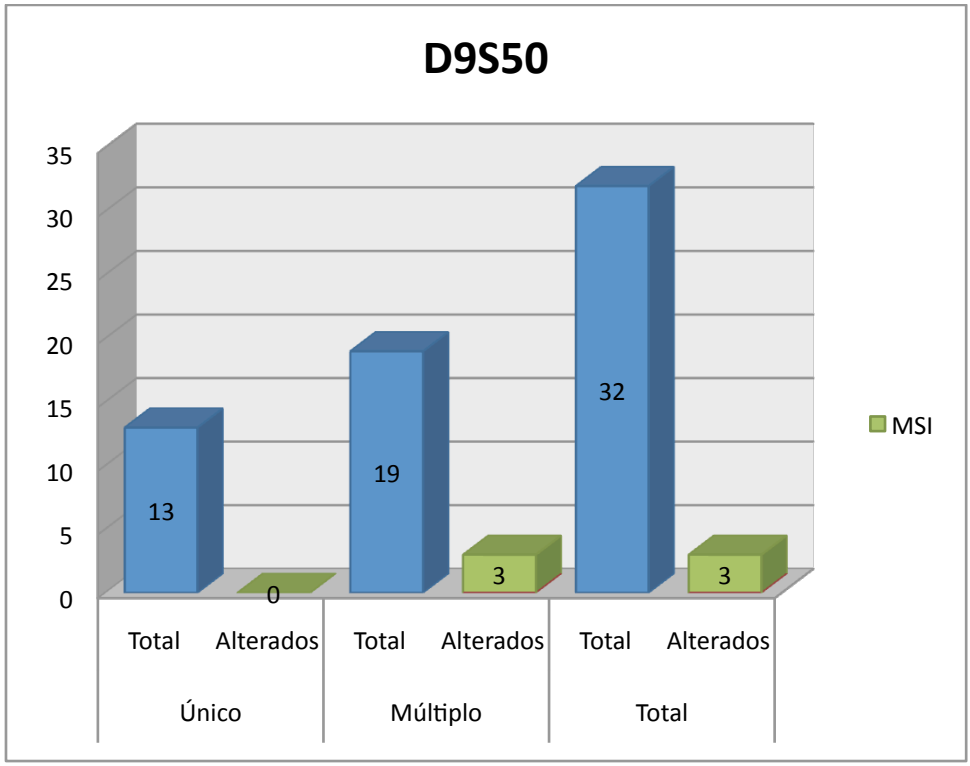

Figura 13: Alterações no padrão do microssatélite D9S50 presentes em tumores únicos ou múltiplos.

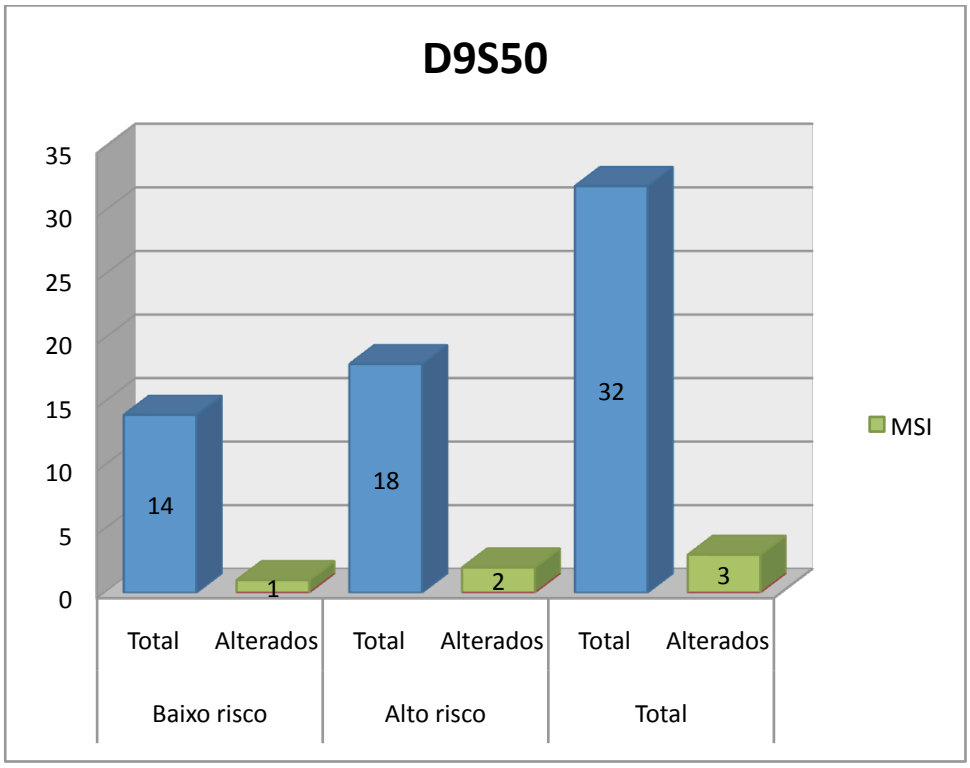

Figura 14: Alterações no padrão do microssatélite D9S50 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva.

4.1.3 D9S52

O microssatélite D9S52 foi estudado em 30 lesões tumorais. Foram encontradas alterações em 3 CBCs (Fig. 15)., todos pertencentes ao mesmo paciente, novamente o 262.

Foram encontradas 2 LOH e 1 MSI. As 2 LOH foram encontradas em CBCs esclerodermiformes, da face e do braço. O MSI estava presente num CBC nodular da face. Não foram encontradas correlações significantes com alterações neste microssatélite.

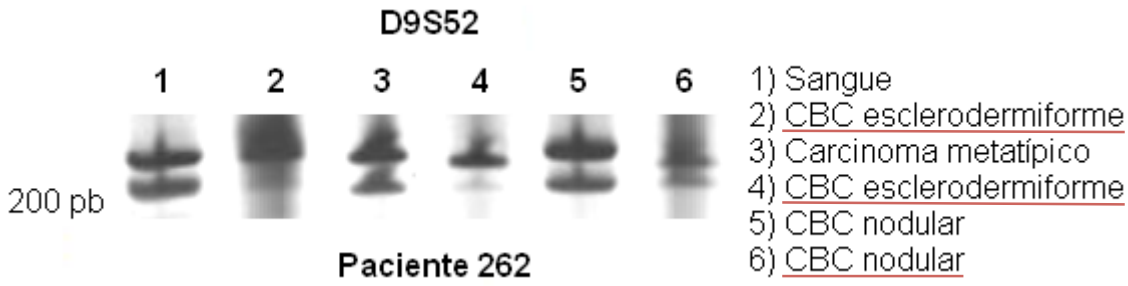

Figura 15: Alterações (grifo vermelho) apresentadas com o microssatélite D9S52 pelo paciente 262. Perda de heterozigosidade nas amostras 2 e 4 e instabilidade de microssatélite na amostra 6. Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata.

O total de alterações encontradas foi de 6,66% com este microssatélite. Sendo que os tumores múltiplos apresentaram mais alteração (17,64%) do que os únicos que não se apresentaram alterados, como demonstrado na figura 16. Tumores de alto risco apresentaram-se menos alterados (5,88%) que os de baixo risco (15,38%), figura 17.

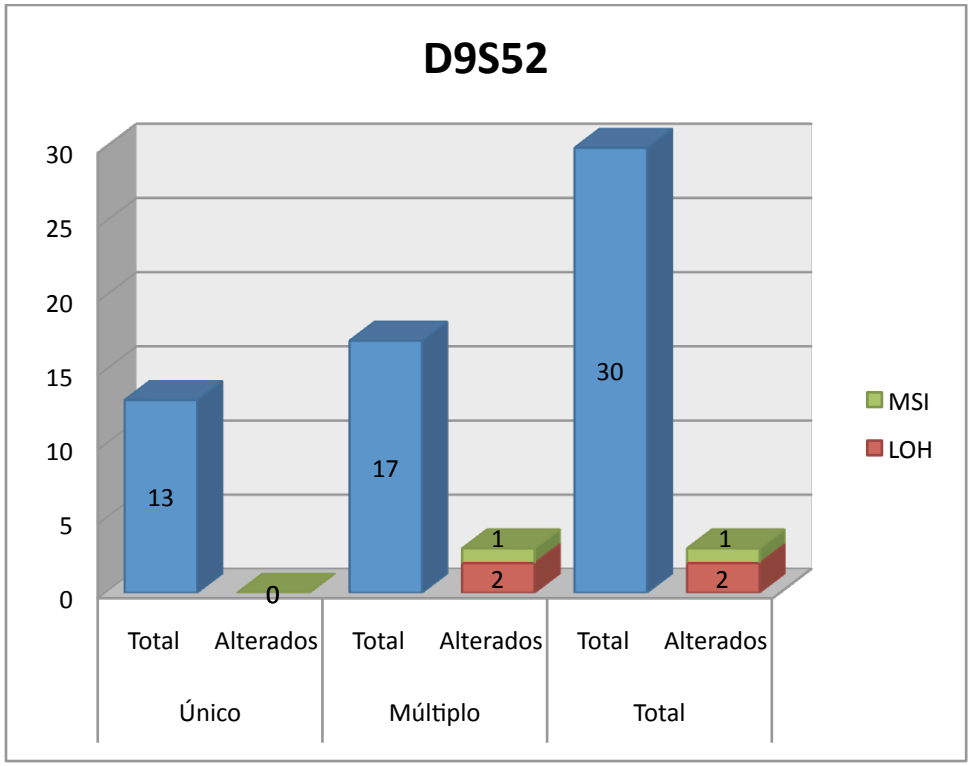

Figura 16: Alterações no padrão do microssatélite D9S52 presentes em tumores únicos ou múltiplos.

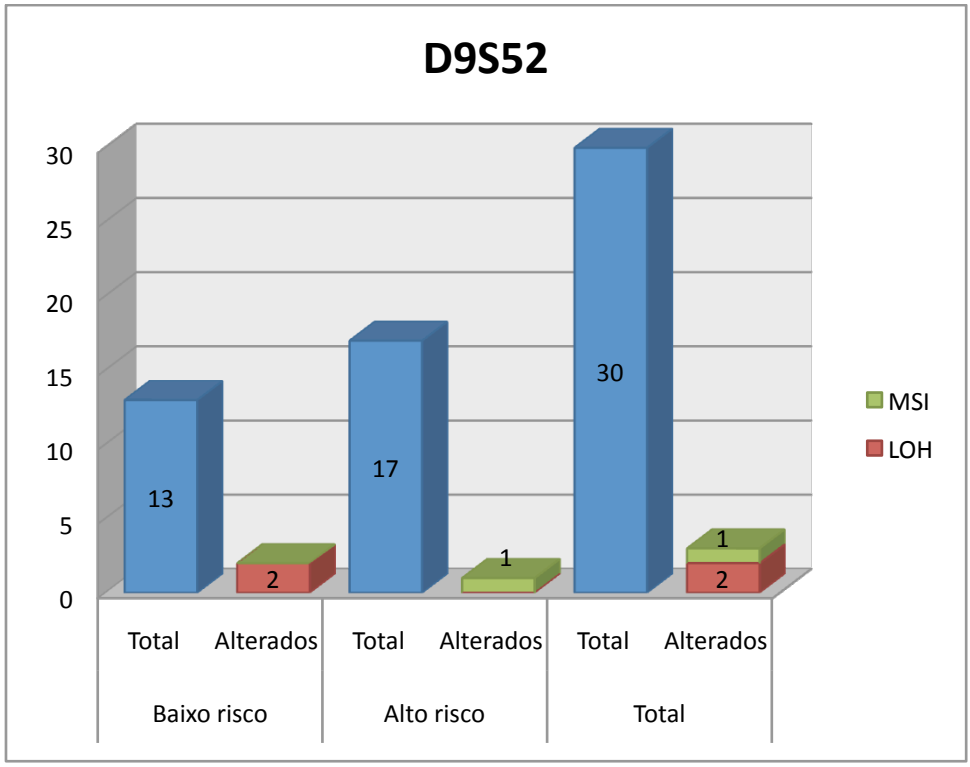

Figura 17: Alterações no padrão do microssatélite D9S52 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva.

4.1.4 D9S180

Foram estudados 32 CBCs, sendo encontradas 4 alterações no total, 2 MSI e 2 LOH (Fig. 18). Não foram encontradas correlações entre estas alterações e os parâmetros das lesões alteradas.

As 2 LOH encontradas estavam presentes nos tumores do paciente 262, sendo um CBC esclerodermiforme e um CBC nodular, ambos na face

Uma das lesões que apresentou MSI estava presente no paciente 268, num CBC nodular da face. A outra lesão com MSI foi apresentada pelo paciente 279, em um CBC nodular na região da face.

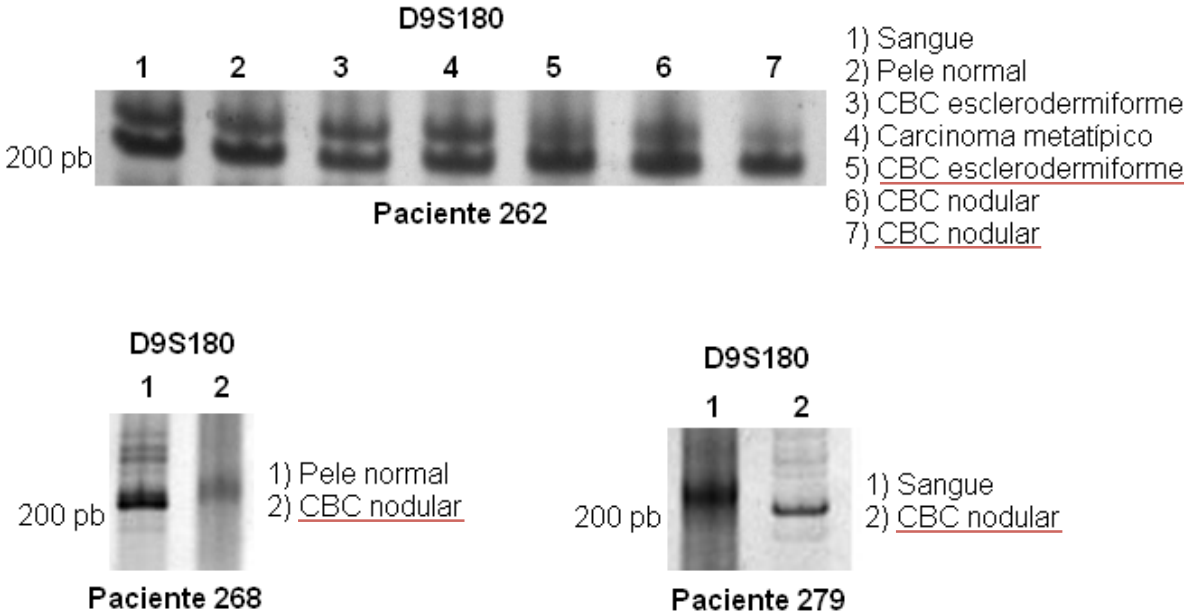

Figura 18: Alterações encontradas no microssatélite D9S180 (grifo vermelho). No paciente 262 temos a presença de LOH nas amostras 5 e 7. Nos pacientes 268 e 279 temos instabilidade de microssatélite nas amostras 2. Géis de poliacrilamida 7% corados com nitrato de prata.

O total de alterações encontradas foi de 13,33% com este microssatélite. Sendo que os tumores múltiplos apresentaram mais alteração (17,65%) do que os únicos (7,69%), como demonstrado na figura 19. Tumores de alto risco apresentaram-se mais alterados (17,65%) que os de baixo risco (7,69%), figura 20.

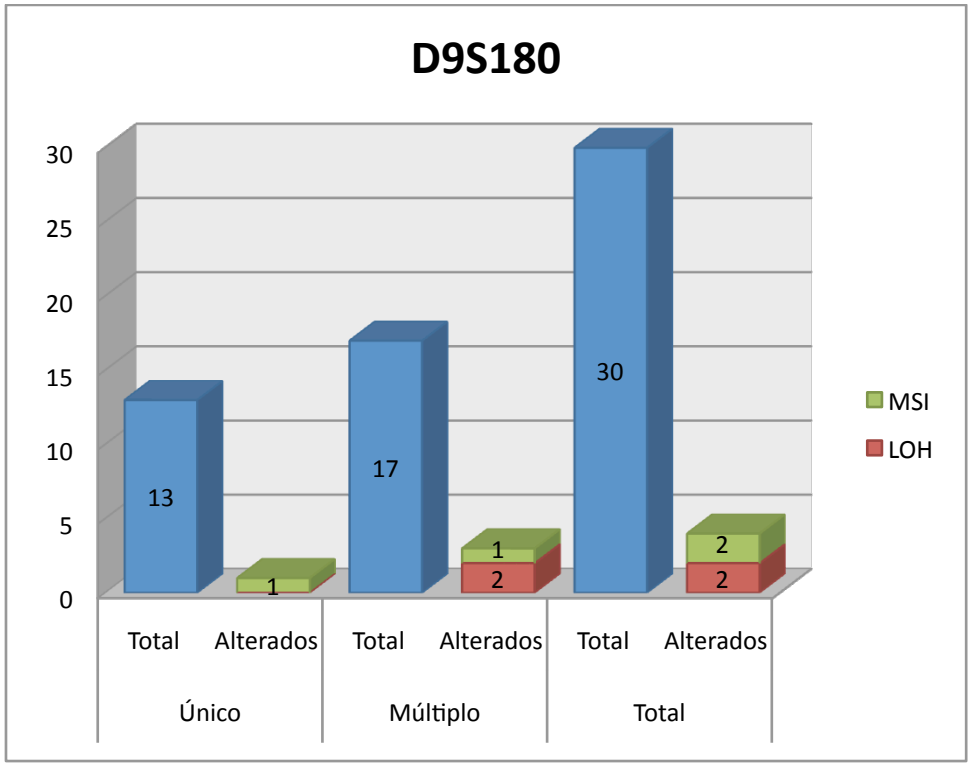

Figura 19: Alterações no padrão do microssatélite D9S180 presentes em tumores únicos ou múltiplos.

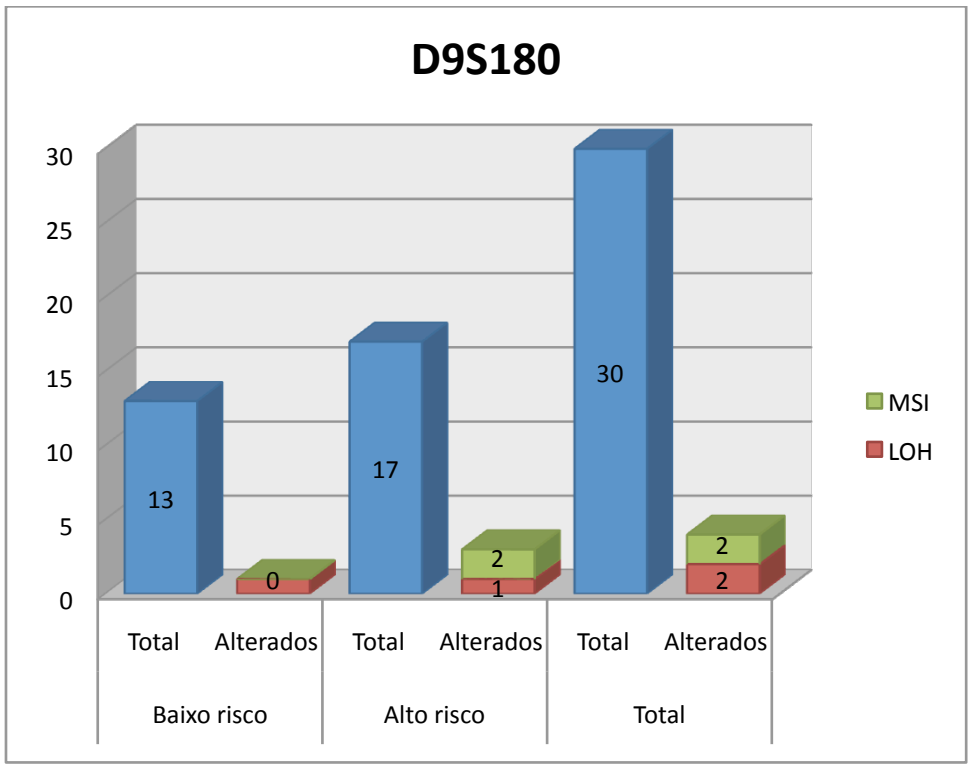

Figura 20: Alterações no padrão do microssatélite D9S180 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva.

4.1.5 D9S196

Foram estudados 17 pacientes apresentando um total de 31 CBCs com relação a este microssatélite. Apenas 1 alteração do tipo LOH foi encontrada.

O paciente alterado (260) era do sexo masculino, com 83 anos de idade na época da cirurgia. Ele apresenta fotótipo 3 e desenvolveu uma única lesão do tipo CBC nodular na região da face (Fig. 21).

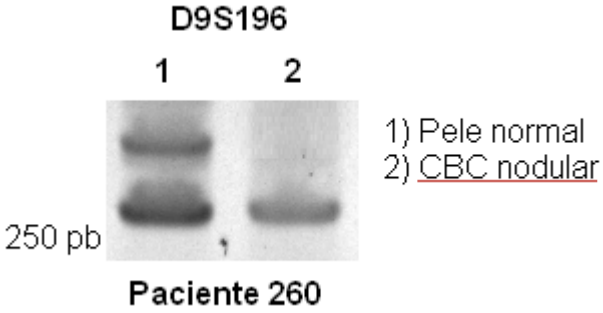

Figura 21: Perda de heterozigosidade apresentada pelo paciente 260 com o microssatélite D9S196 (grifo vermelho). Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata.

Não foi encontrada correlação entre este marcador microssatélite e qualquer das características do paciente ou da lesão tumoral.

O total de alterações encontradas foi de 3,33% com este microssatélite. Sendo que os tumores múltiplos não apresentaram alteração e os únicos 8,33%, como demonstrado na figura 22. Tumores de alto risco apresentaram-se mais alterados (5,88%) que os de baixo risco que não apresentaram alteração, figura 23.

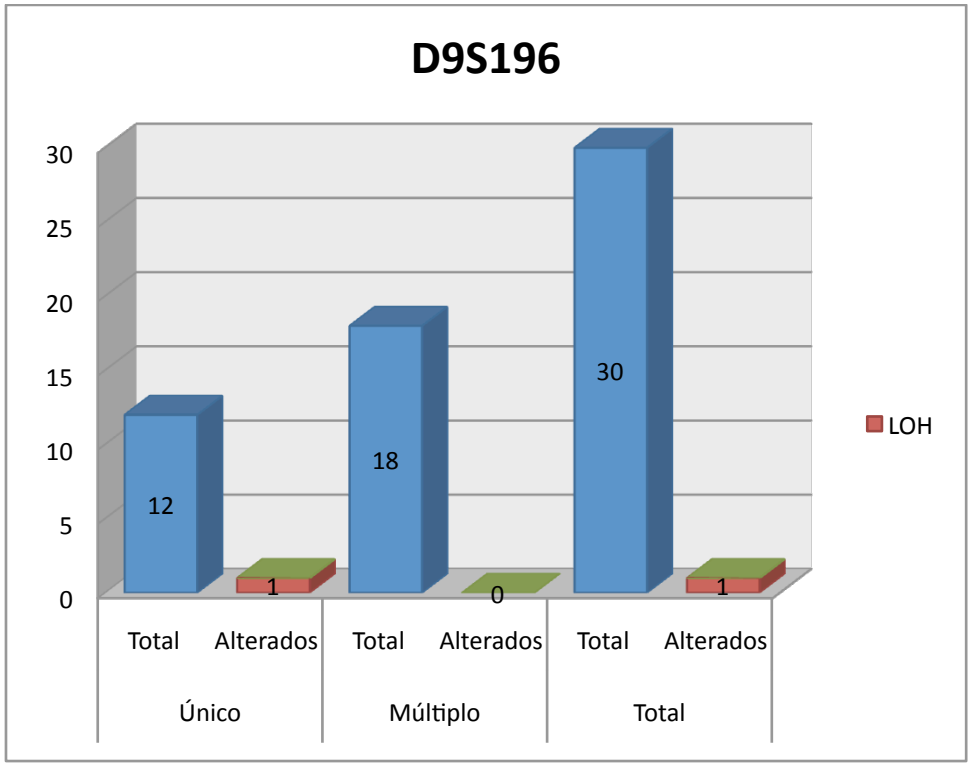

Figura 22: Alterações no padrão do microssatélite D9S196 presentes em tumores únicos ou múltiplos.

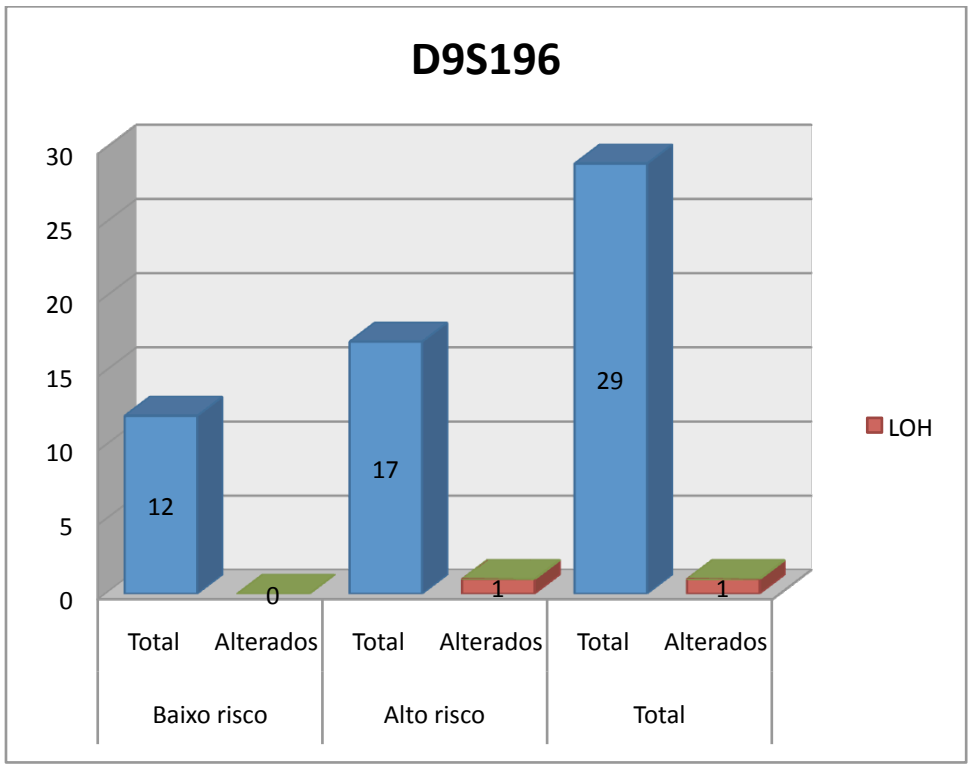

Figura 23: Alterações no padrão do microssatélite D9S196 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva.

4.1.6 D9S280

O microssatélite D9S280 foi estudado em 32 CBCs. Foram encontrados dois CBCs alterados quanto a este microssatélite (Fig. 24). A primeira alteração foi encontrada novamente no paciente 262, trata-se da LOH em um CBC esclerodermiforme presente na face.

A segunda alteração, MSI, estava presente na paciente 275, em um CBC micronodular na região da face.

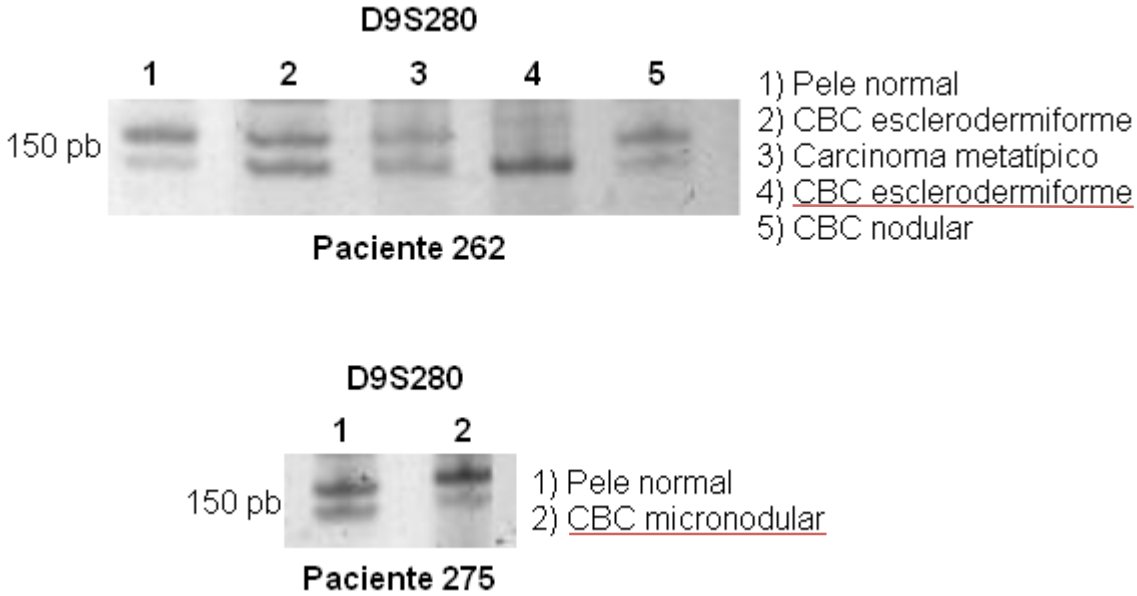

Figura 24: Alterações presentes no microssatélite D9S280 (grifo vermelho). No paciente 262 temos um CBC esclerodermiforme da face (lesão 4) apresentando perda de heterozigosidade. Na paciente 275 encontramos instabilidade de microssatélite num CBC micronodular também da face. Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata.

As alterações neste microssatélite não apresentam correlação significante com as características avaliadas.

O total de alterações encontradas foi de 10% com este microssatélite. Sendo que os tumores múltiplos apresentaram mais alteração (11,76%) que os únicos (7,69%), como demonstrado na figura 25. Tumores de alto risco não apresentaram-se alterados, enquanto os de baixo risco que apresentaram 7,69% de alteração, figura 26.

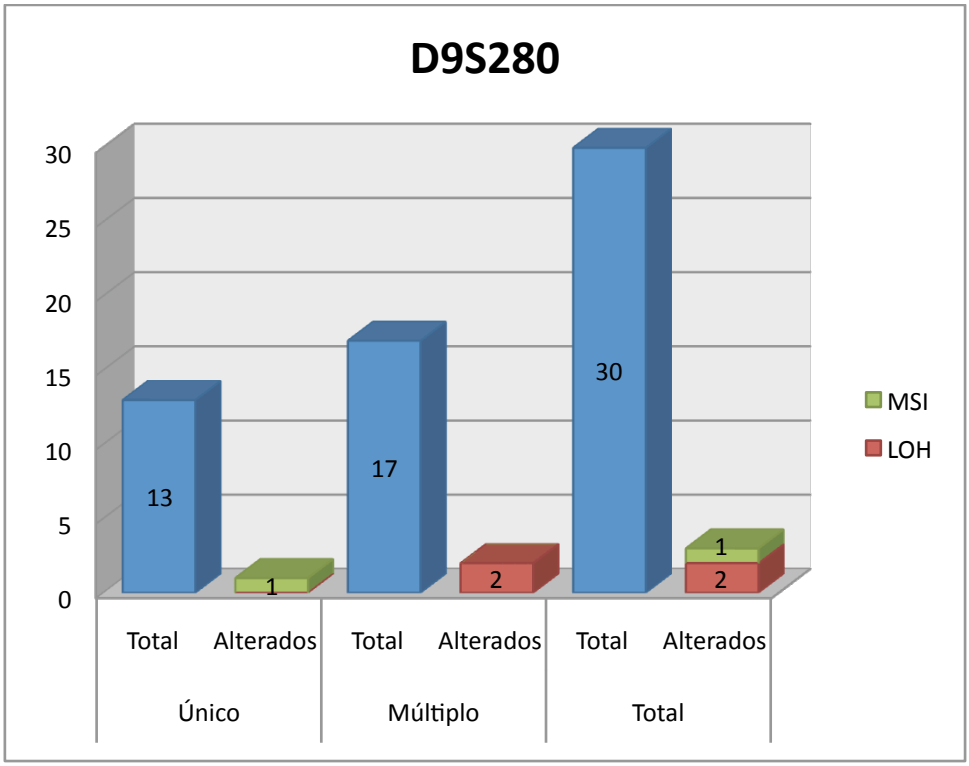

Figura 25: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores únicos ou múltiplos.

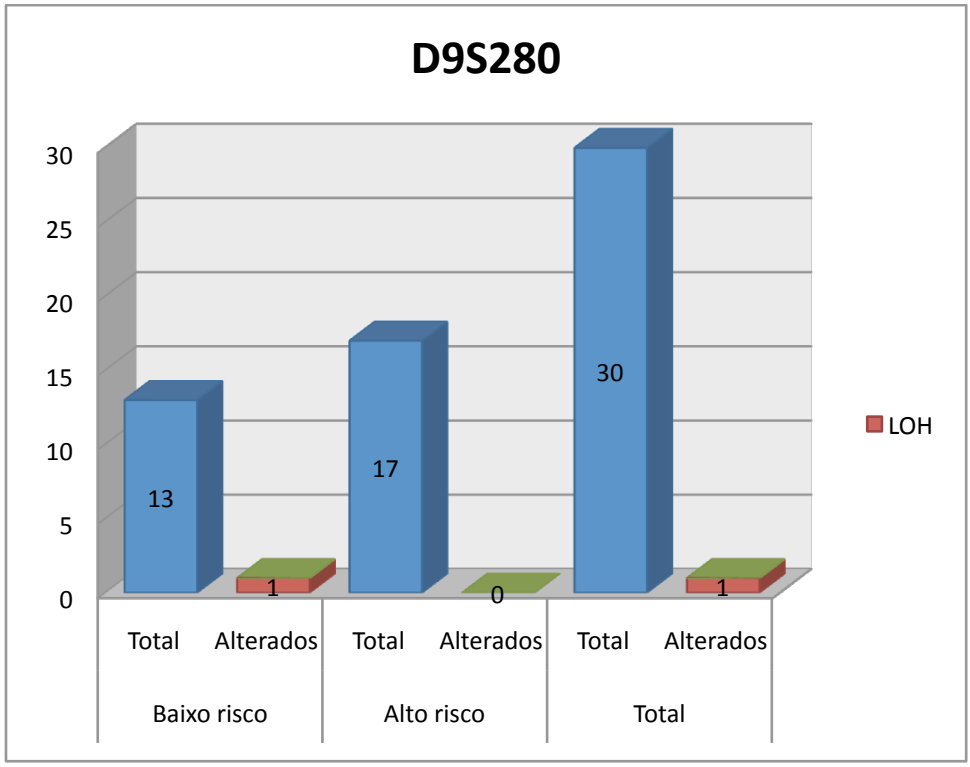

Figura 26: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva.

4.1.7 D9S287

Foram estudados CBCs com este microssatélite. Foram encontradas duas alterações em dois pacientes diferentes, sendo uma do tipo LOH e a outra do tipo MSI (Fig.27).

A primeira alteração, LOH, foi encontrada na paciente 266 em um CBC micronodular da região da face. A segunda alteração, MSI, estava presente no paciente 269, num CBC micronodular, na região da face.

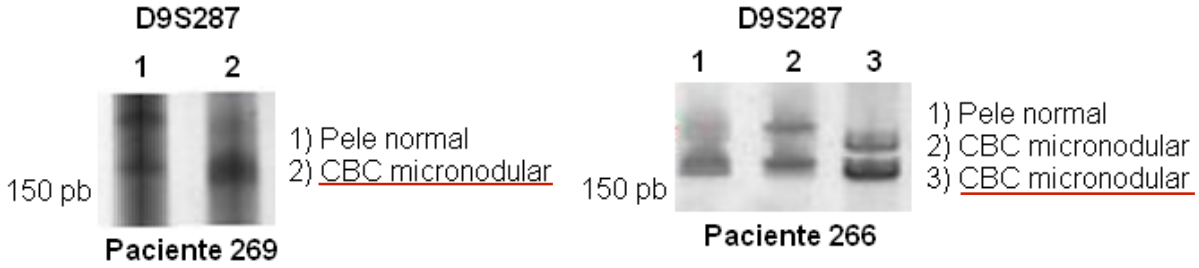

Figura 27: Alteração apresentadas no microssatélite D9S287 (grifo vermelho). A paciente 269 apresenta perda de heterozigosidade e o paciente 266 apresenta instabilidade de microssatélite na lesão 3, CBC micronodular da face. Gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata.

Não foram encontradas correlações significantes entre as alterações descritas e as características avaliadas.

O total de alterações encontradas foi de 9,67% com este microssatélite. Sendo que os tumores múltiplos apresentaram mais alteração (11,11%) que os únicos (7,69%), como demonstrado na figura 28. Tumores de alto risco não se apresentaram alterados, enquanto os de baixo risco que apresentaram 14,28% de alteração, figura 29.

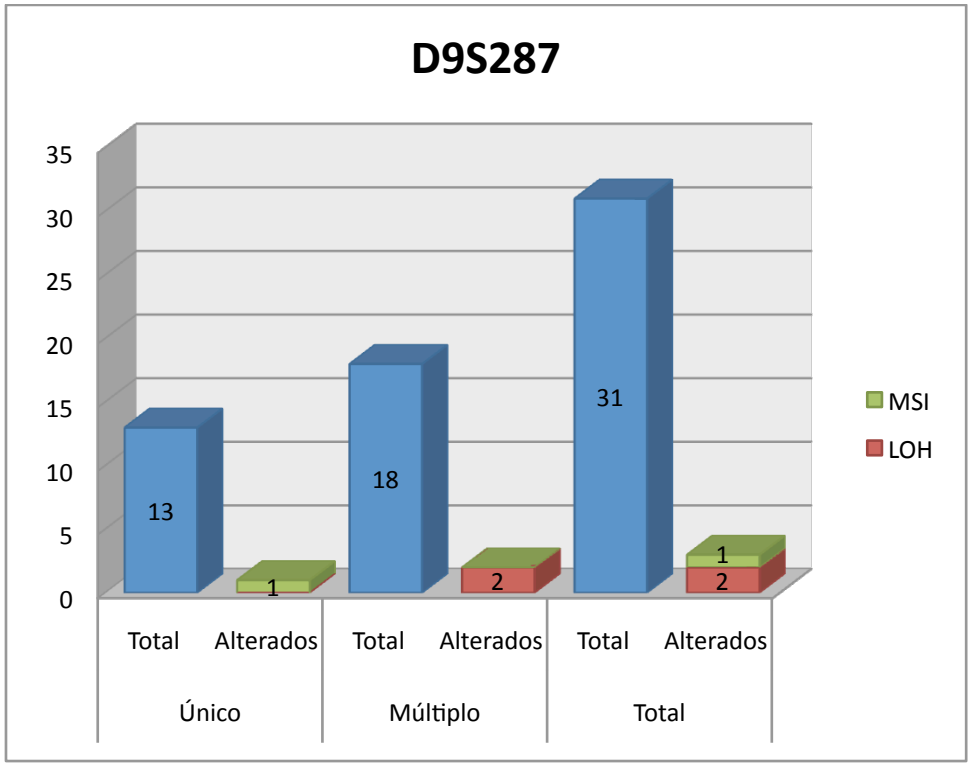

Figura 28: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores únicos ou múltiplos.

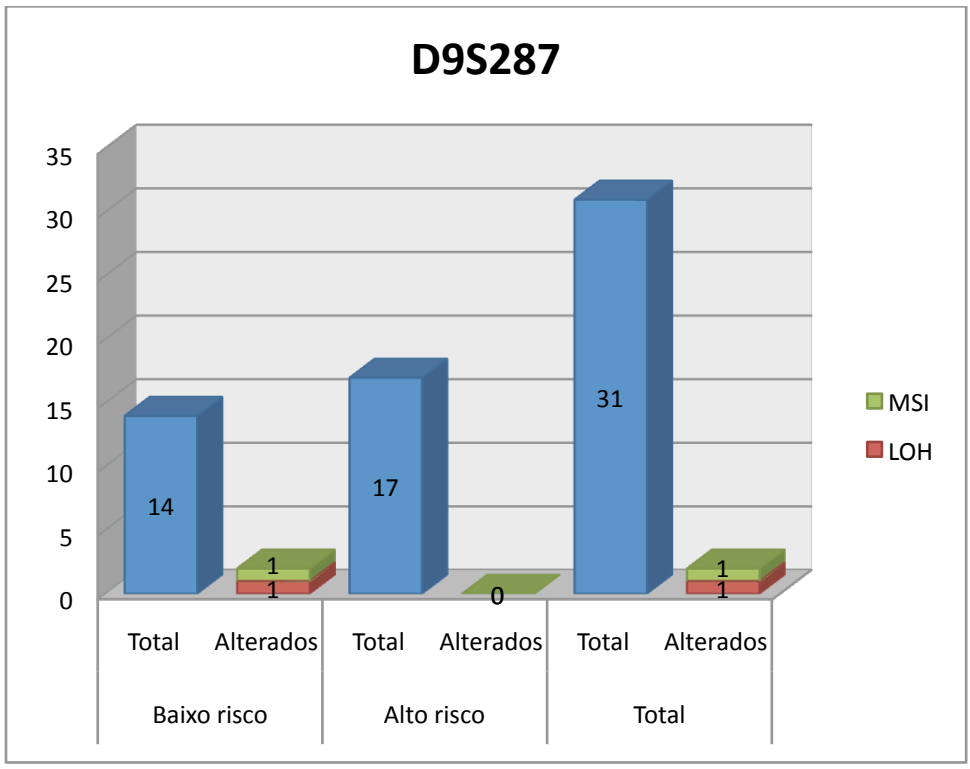

Figura 29: Alterações no padrão do microssatélite D9S280 presentes em tumores de alto ou baixo risco de recidiva.

4.1.8 Análise conjunta dos marcadores microssatélites

Ao comparar conjuntamente as alterações presentes nos microssatélites, podem-se perceber que a alteração predominante é a instabilidade de microssatélites. A perda de heterozigosidade aparece em menor número, embora, esta diferença não seja estatisticamente significante (Fig. 30).

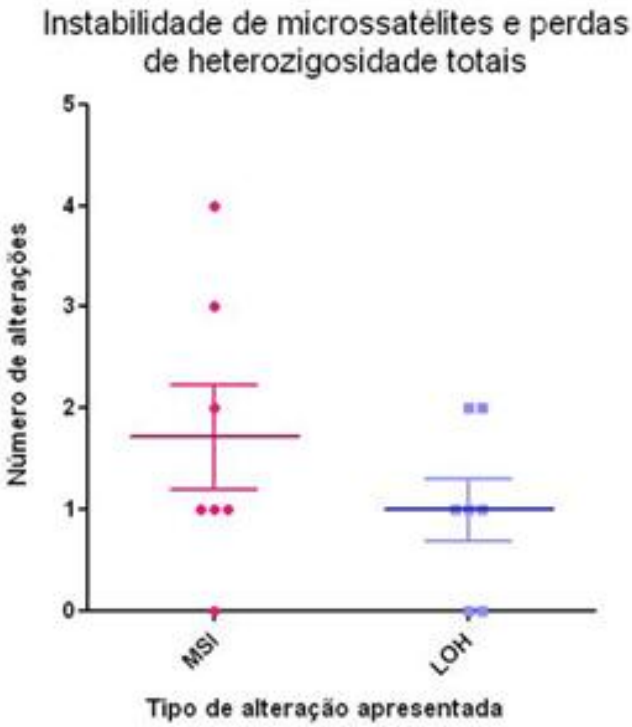

Figura 30: Distribuição da quantidade de MSI e LOH encontradas nos diferentes microssatélites, a média total e o erro padrão estão plotados no gráfico.

O microssatélite que apresentou maior número de alterações foi o D9S15 (4 MSI), seguido de D9S180 (2 LOH, 2 MSI). O microssatélite menos alterado foi o D9S196 (1 LOH). Não foi encontrada correlação entre o tipo de alteração apresentada e o microssatélite avaliado. As alterações encontradas também foram relacionadas com o risco de recidiva do tumor (alto e baixo). Os CBCs de alto risco (6,72%) apresentam-se menos alterados que os de baixo risco (10,86%), porém a diferença não tem significância estatística (Fig. 31). Avaliando-se os tipos histológicos separadamente o CBC esclerodermiforme é o que apresenta maior número de alterações (4 LOH e 2 MSI), há uma correlação estatisticamente

significante (p=0,03) entre o tipo histológico do tumor e a porcentagem de alteração apresentada (Fig. 32), independente desta ser LOH ou MSI.

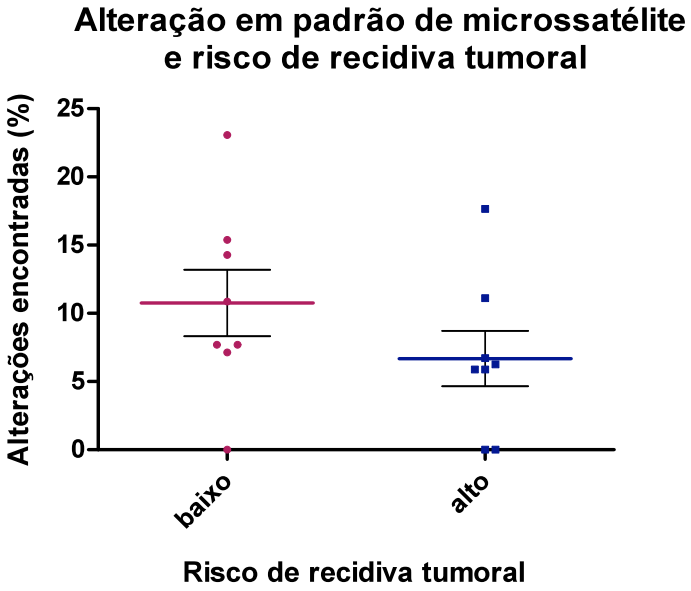

Figura 31: Gráfico da alterações em padrões de microssatélites de tumores com diferentes riscos de recidiva. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os microssatélites avaliados e as barras apresentam o erro padrão.

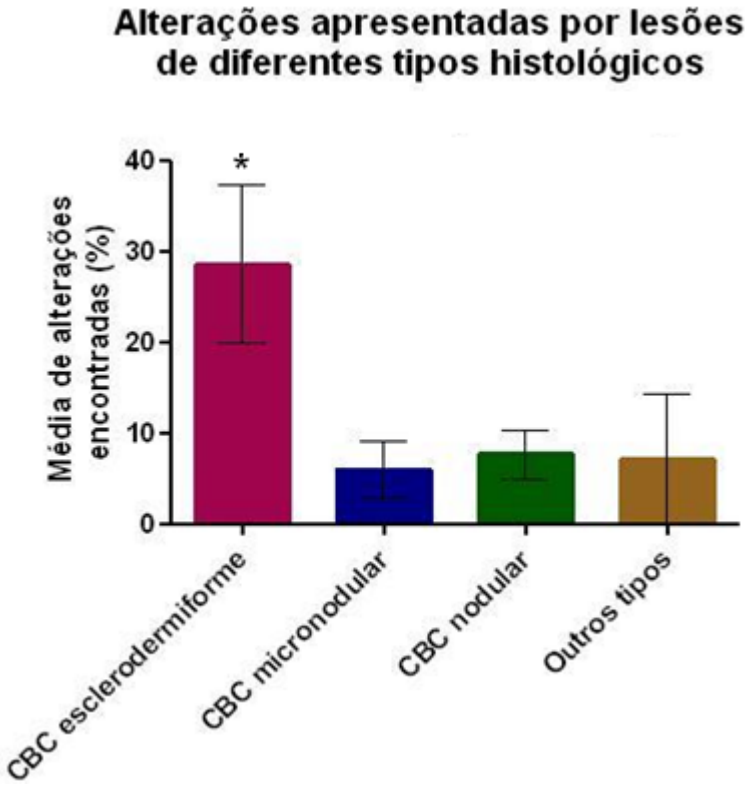

Figura 32: Gráfico da porcentagem média de alteração encontrada em lesões de diferentes tipos histológicos, as linhas em preto representam o erro padrão.

Os fotótipos dos pacientes que apresentaram lesões também foram relacionados às alterações. Há aumento crescente de alterações conforme os fotótipos tornam-se mais escuros, no entanto, esta relação não foi estatisticamente significante. Também não foi encontrada relação significante entre o tipo de alteração (MSI ou LOH) e o fotótipo do paciente.

Pacientes do sexo masculino e feminino apresentaram predominância de MSI. Foram avaliados mais pacientes do sexo masculino, no entanto, a proporção de alterações totais encontradas foi muito semelhante. As diferentes alterações também parecem não estar relacionadas com nenhum dos gêneros em especial

A idade de manifestação da lesão foi relacionada com as alterações apresentadas nos microssatélites. Pacientes mais jovens apresentam maior quantia de alterações, embora esta relação não tenha apresentado significância estatística. Apesar da predominância de MSI, especialmente em pacientes mais jovens, também não foi encontrada correlação significante entre os diferentes tipos de alteração e a faixa etária do indivíduo.

A maioria dos tumores apresentados estava localizada na região da face. Esta região é também a que apresenta maior número de alterações. Entretanto não houve relação estatisticamente significante entre o total de alterações e a localização tumoral.

A última comparação foi feita entre o número de tumores apresentado pelo paciente e as alterações presentes. CBCs provenientes de pacientes com tumores múltiplos apresentam-se mais alterados (13,11%) que os de pacientes com tumores únicos (5,56%) de maneira estatisticamente significante (p=0,008), como visto na figura 33.

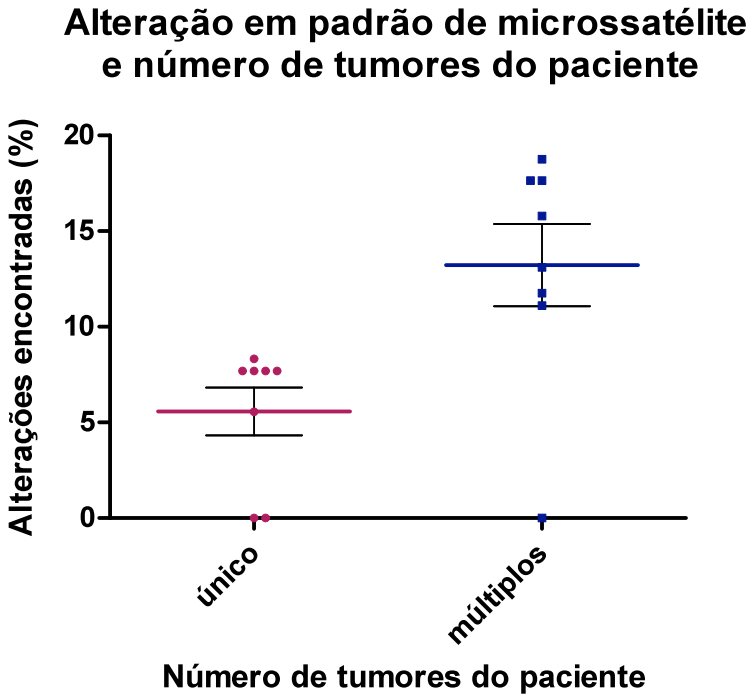

Figura 33: Gráfico da alterações em padrões de microssatélites de tumores de pacientes com diferentes números de CBCs. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os microssatélites avaliados e as barras apresentam o erro padrão.

4.2 *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD):

Foram estudados 11 padrões de RAPD gerados por *primers* do kit OPA e OPB da *Operon* (OPA-2, OPA-7, OPA-5, OPA-11, OPA-13, OPA-17, OPB-1, OPB-8, OPB-11, OPB-13 e OPB-19) (ANEXO I).

As tabelas 6 e 7 apresentam o número de tumores com os diferentes padrões de bandeamento. Os tumores foram separados de acordo com seu risco de recidiva e de acordo com o número de CBCs que estavam presentes no paciente. As alterações encontradas, bem como as bandas de interesse para determinação de um futuro marcador serão discutidas separadamente para cada *primer*.

Tabela 6 - Padrões de RAPD obtidos para as diferentes classes de tumores avaliados.

Primer	Padrão	Alto risco	Baixo risco	Total
OPA-2	não alterado	4	7	11
	ganho	3	3	6
	perda	6	5	11
OPA-7	não alterado	6	8	14
	ganho	5	6	11
	perda	3	1	4
OPA-5	não alterado	1	6	7
	ganho	8	3	11
	perda	1	6	7
OPA-11	não alterado	1	3	4
	ganho	4	5	9
	perda	8	8	16
OPA-13	não alterado	4	2	6
	ganho	6	7	13
	perda	3	7	10
OPA-17	não alterado	4	11	15
	ganho	4	1	5
	perda	3	2	5
OPB-1	não alterado	2	3	5
	ganho	6	4	10
	perda	5	7	12
OPB-8	não alterado	3	6	9
	ganho	7	6	13
	perda	3	5	8
OPB-11	não alterado	6	3	9
	ganho	2	6	8
	perda	5	6	11
OPB-13	não alterado	3	3	6
	ganho	3	7	10
	perda	2	4	6
OPB-19	não alterado	2	0	2
	ganho	3	5	8
	perda	3	6	9
Totais	não alterado	36	52	88
	ganho	51	53	104
	perda	42	57	99

Tabela 7 - Padrões de RAPD obtidos para tumores de pacientes com 1 ou múltiplos CBCs.

Primer	Padrão	Único	Múltiplos	Total
OPA-2	não alterado	6	5	11
	ganho	3	4	7
	perda	5	7	12
OPA-7	não alterado	10	6	16
	ganho	2	9	11
	perda	2	2	4
OPA-5	não alterado	5	2	7
	ganho	4	7	11
	perda	3	4	7
OPA-11	não alterado	4	0	4
	ganho	4	7	11
	perda	7	9	16
OPA-13	não alterado	4	3	7
	ganho	5	8	13
	perda	5	6	11
OPA-17	não alterado	9	6	15
	ganho	3	3	6
	perda	1	4	5
OPB-1	não alterado	4	1	5
	ganho	5	7	12
	perda	5	7	12
OPB-8	não alterado	3	6	9
	ganho	7	6	13
	perda	4	6	10
OPB-11	não alterado	6	5	11
	ganho	3	5	8
	perda	5	6	11
OPB-13	não alterado	3	4	7
	ganho	6	4	10
	perda	2	4	6
OPB-19	não alterado	0	2	2
	ganho	6	2	8
	perda	3	6	9
Totais	não alterado	54	40	94
	ganho	48	62	110
	perda	42	61	103

4.2.1 OPA-02

Este *primer* foi utilizado em 28 lesões provenientes de 18 pacientes. Onze destas lesões, pertencentes a um total de oito pacientes, não apresentaram alterações nos padrões de RAPD com este.

Das 17 lesões alteradas, 6 apresentaram ganho de bandas (provenientes de 5 pacientes diferentes) e 11 apresentaram perda de bandas (provenientes de 7 pacientes diferentes, no total, 7 pacientes que não apresentaram qualquer alteração em suas lesões e 11 pacientes que apresentaram ao menos uma de suas lesões alteradas. As alterações com este *primer* não apresentaram correlação significante com nenhuma das características das lesões ou dos pacientes. Nenhuma banda de interesse foi encontrada nos padrões gerados por estes primers..

A figura 34 apresenta exemplos de padrões de RAPDs obtidos com este *primer*. Em A as amostras do paciente 262 têm padrões semelhantes e em B as amostras do paciente 267 têm padrões bastante diferentes.

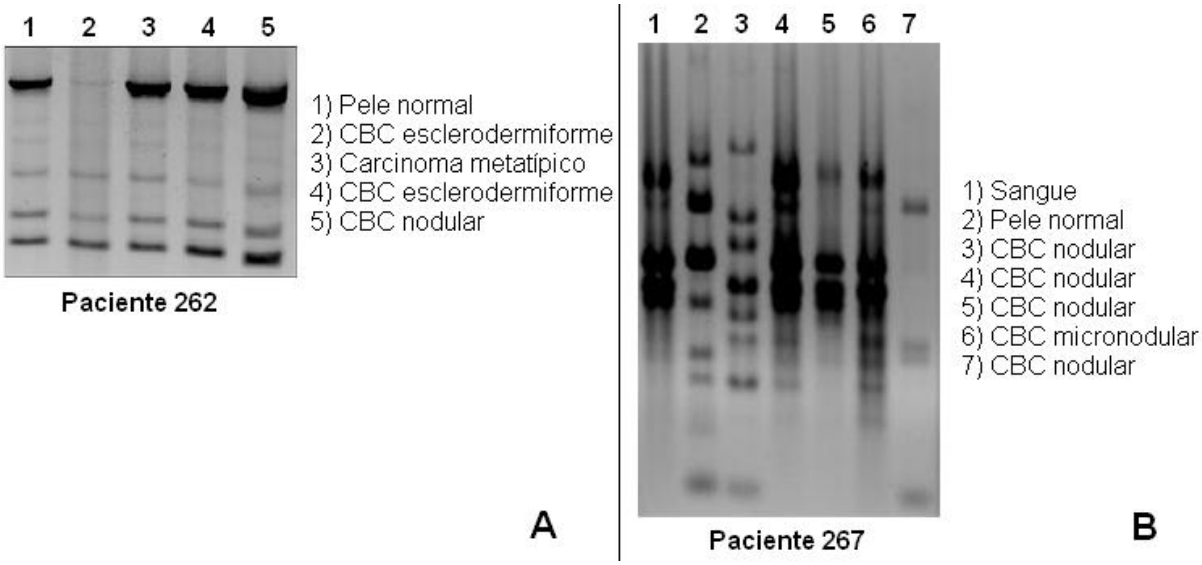

Figura 34: ***Fingerprint*** **gerado pelo** ***primer*** **de RAPD OPA-2. Em A, as amostras do paciente 262 apresentanm padrões semelhantes para este primer. Em B as amostras do paciente 267 apresentamo padrões diferentes. As amostras 4 e 6 apresentam ganho de bandas, enquanto as amostras 5 e 7 apresentam redução no número de bandas.**

4.2.2 OPA-07

Foram estudados 18 pacientes com o *primer* OPA-07, totalizando 29 tumores.

Destas, 14 lesões não apresentaram alterações (pertencentes a 12 pacientes diferentes). Onze lesões de 4 pacientes diferentes apresentaram ganho de bandas e 4 lesões de 4 pacientes diferentes apresentaram perda de bandas.

No total, onze paciente não apresentaram alteração e sete pacientes estavam alterados quanto a este padrão de RAPD.

O ganho de bandas nos padrões gerados por este *primer* parece estar relacionado com o maior número de lesões presentes no paciente (p=0,006). No entanto, nenhuma banda específica apareceu repetidamente alterada.

A figura 35 exemplifica um paciente com múltiplas lesões apresentando ganho de bandas e um paciente com uma única lesão apresentando os padrões parecidos em todos os tecidos avaliados.

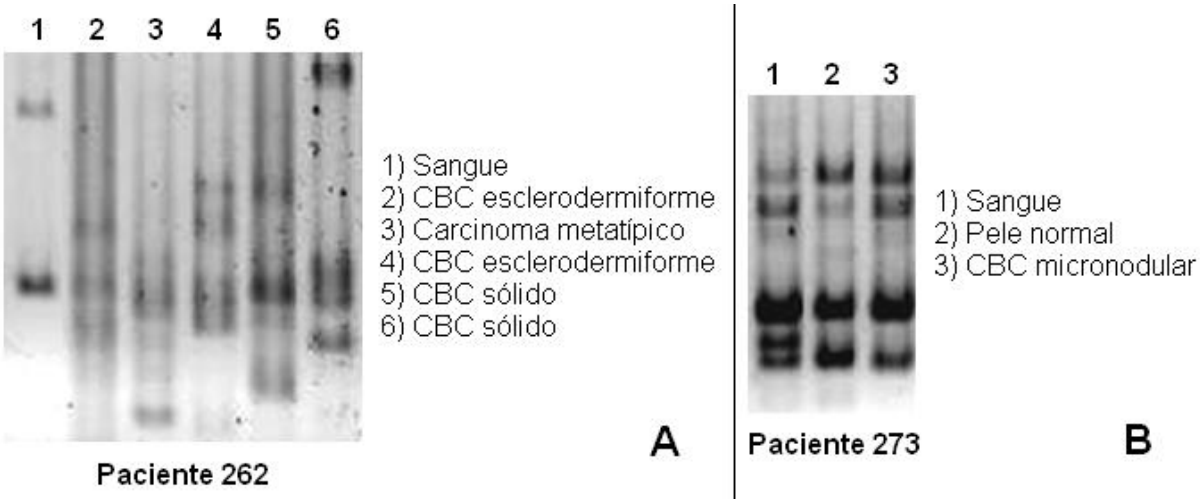

Figura 35: ***Fingerprint*** **gerado pelo** ***primer*** **de RAPD OPA-7. Em A, temos as amostras do paciente 262 apresentando ganhos de bandas nos tecidos tumorais. Em B, temos as amostras do paciente 273 apresentando padrões conservados, com alteração apenas na intensidade das bandas presentes.**

4.2.3 OPA-05

Utilizando o primer OPA-05 foram estudados 26 CBCs pertencentes a 16 pacientes. Oito CBCs de oito pacientes diferentes não apresentaram alteração. Dentre os CBCs alterados, 11 apresentaram ganho de bandas (pertencentes a 6 pacientes diferentes) e 7 tumores apresentaram perda de bandas (também pertencentes a 6 pacientes diferentes).

Avaliando todos os CBCs presentes nos pacientes, 6 pacientes não tiveram alterações e 10 pacientes apresentaram ao menos um tumor alterado.

Não foram encontradas relações significantes entre as alterações presentes com este *primer* e as principais características dos pacientes e de seus tumores. Dentre as bandas alteradas também não foi encontrado nenhum padrão de alteração que indicasse um prospectivo marcador.

Na figura 36 são mostrados exemplos de um paciente que apresentou alterações nos padrões de bandas, assim como de um paciente que não apresentou alterações nos diferentes tecidos.

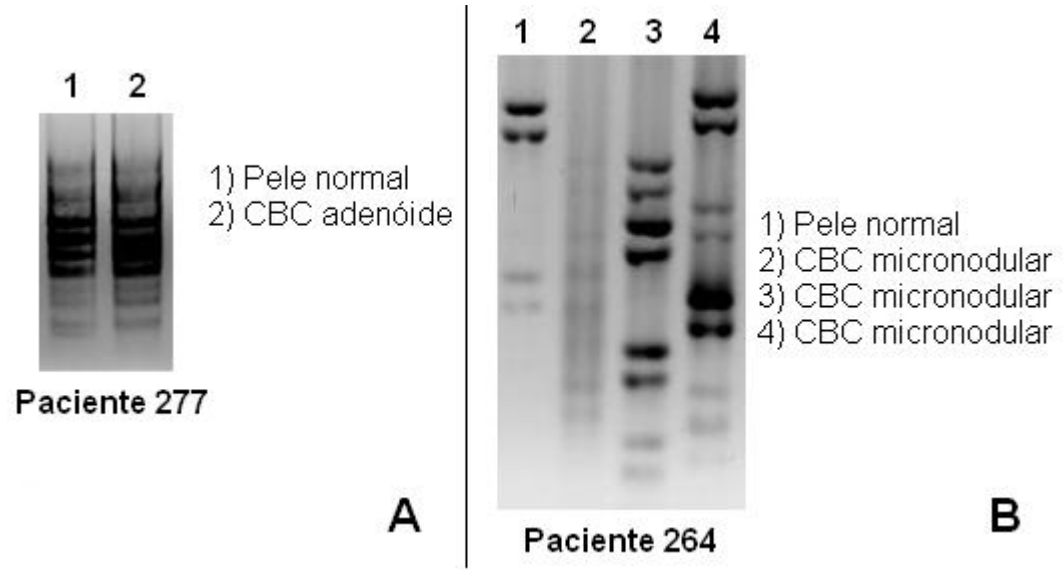

Figura 36: ***Fingerprint*** **gerado pelo primer de RAPD OPA-5. Em A, temos as amostras do paciente 277 apresentando padrão conservado de bandas nos tecidos. Em B, temos as amostras do paciente 264 apresentando padrões alterados com ganho de bandas nos tecidos tumorais.**

4.2.4 OPA-11

Este *primer* foi utilizado na avaliação de 29 tumores pertencentes a 18 pacientes diferentes. Houve uma predominância na perda de bandas, ocorrendo em 16 tumores de 10 pacientes. O ganho de bandas foi encontrado em 9 lesões de 5 pacientes diferentes. Quatro tumores de 4 pacientes diferentes não apresentaram alterações. Do total de pacientes avaliados, 14 apresentaram alterações e 4 não estavam alterados em nenhuma de suas lesões. Alterações encontradas com este *primer* estão correlacionadas com o maior número de tumores presentes no mesmo paciente (p=0,015). A idade de detecção do tumor no paciente também está relacionada com alterações neste *primer*. Pacientes que tiveram tumores detectados antes dos 60 anos apresentam uma prevalência no ganho de bandas e pacientes que apresentaram lesões após os 60 anos têm prevalência de perda de bandas (p=0,042). A última correlação encontrada indica que tumores encontrados em mulheres apresentam um ganho significante de bandas, enquanto os encontrados em homens apresentam prevalência de perda de bandas (p=0,043).

Apesar das correlações entre alterações com este primer e diversas características dos pacientes estudados não foi detectada nenhuma banda específica que sofresse alterações em número consistente de pacientes, que indicasse um possível marcador tumoral.

A figura 37 traz um exemplo de padrões com perdas de bandas (paciente 262) e um exemplo de padrão com ganhos de bandas (paciente 267) nos tecidos tumorais.

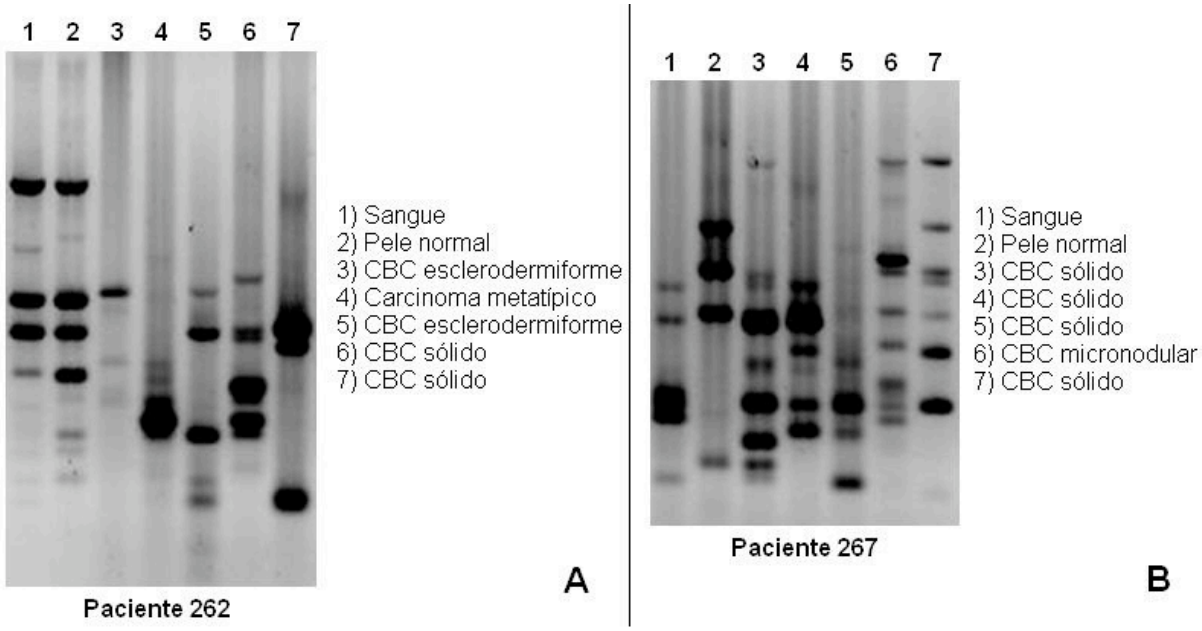

Figura 37: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPA-11. Em A, temos as amostras do paciente 262 apresentando perda de bandas nos tecidos tumorais. Em B, temos as amostras do paciente 267 apresentando padrões alterados com ganho de bandas nos tecidos tumorais.

4.2.5 OPA-13

O *primer* OPA-13 foi utilizado na avaliação de 29 tumores pertencentes a 18 pacientes. De todos os tumores avaliados, 6 não estavam alteradas, pertencentes a 4 pacientes diferentes. Das demais lesões alteradas, 13 apresentaram ganho de bandas, pertencentes a 8 pacientes diferentes. A perda de bandas foi detectada em 10 tumores de 6 pacientes.

De todos os pacientes avaliados apenas 3 não apresentaram alterações em nenhuma de suas lesões, enquanto 15 pacientes estavam alterados em ao menos um de seus tumores. A figura 38 apresenta exemplos de paciente sem alterações e paciente apresentando ganho de bandas. As alterações encontradas não foram correlacionadas com nenhuma das características dos pacientes ou de seus tumores. Nenhuma das bandas alteradas foi indicativa de um possível marcador.

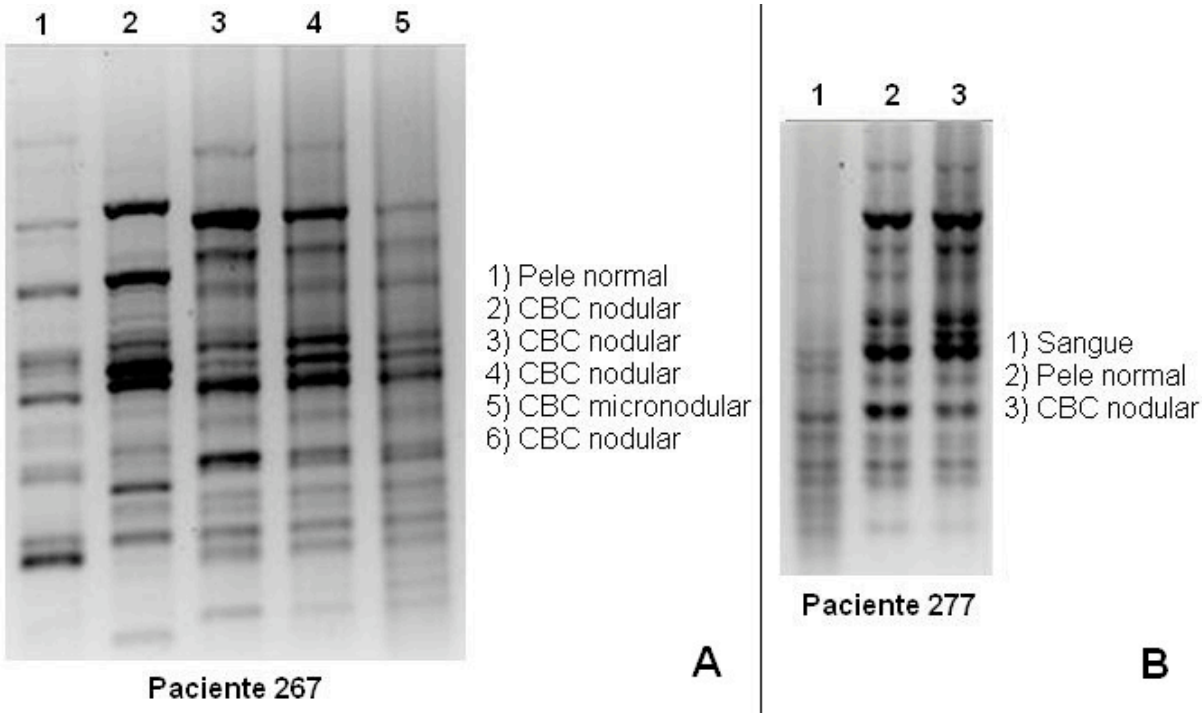

Figura 38: ***Fingerprint*** **gerado pelo** ***primer*** **de RAPD OPA-13. Em A, temos as amostras do paciente 267 apresentando ganho de bandas nos tecidos tumorais. Em B, temos as amostras do paciente 277 apresentando padrões conservados de bandas nos tecidos tumorais, com variações apenas na intensidade.**

4.2.6 OPA-17

Foram avaliados 18 pacientes portadores de 25 tumores utilizando este *primer*. Destas lesões 15 não apresentaram alterações, pertencentes a 13 pacientes diferentes. Das 10 lesões alteradas, 5 apresentaram ganho (pertencentes a 3 pacientes diferentes) e 5 apresentaram perda de bandas (pertencentes a 2 pacientes). No total, 12 pacientes não apresentaram qualquer alteração em suas lesões tumorais enquanto 6 pacientes apresentaram ao menos uma lesão alterada.

A figura 39 traz um exemplo de paciente não alterado nos tecidos tumorais e um exemplo de paciente apresentando alteração no seu padrão de bandeamento.

Não foi possível traçar qualquer correlação entre as alterações apresentadas utilizando este *primer* e as características dos pacientes ou de suas lesões. Também não foi encontrada nenhuma banda que apresentasse a mesma alteração em mais de um paciente, não originando nenhum possível novo marcador.

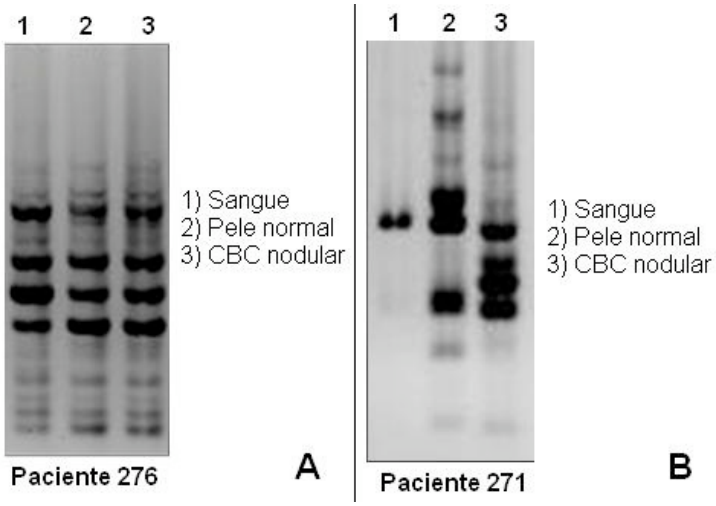

Figura 39: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPA-17. Em A, temos as amostras do paciente 276 apresentando padrões conservados de bandas nos tecidos. Em B, temos as amostras do paciente 271 apresentando variações no padrão de bandas para este primer.

4.2.7 OPB-01

Foram estudados 17 pacientes com este *primer*. O total de tumores avaliados foi de 27. Destes, 5 não estavam alterados e pertenciam a 5 pacientes diferentes. Das 22 lesões alteradas, 10 apresentaram ganhos e 12 perdas de bandas no padrão de RAPD. Os tumores pertenciam a 6 e 8 pacientes diferentes, respectivamente. No total, apenas 4 pacientes não apresentaram nenhuma alteração, enquanto 13 estavam alterados.

Ao compararmos as características dos pacientes e seus tumores com as alterações geradas por este *primer* não foi possivel encontrar nenhuma correlação estatisticamente significante.

Na avaliação de bandas ganhas ou perdidas consistentemente, isto é, evento ocorrido em vários pacientes, foi detectada uma banda de interesse com tamanho em torno de 500 pb, ausente em 8 dos 17 pacientes estudados (Fig. 40).

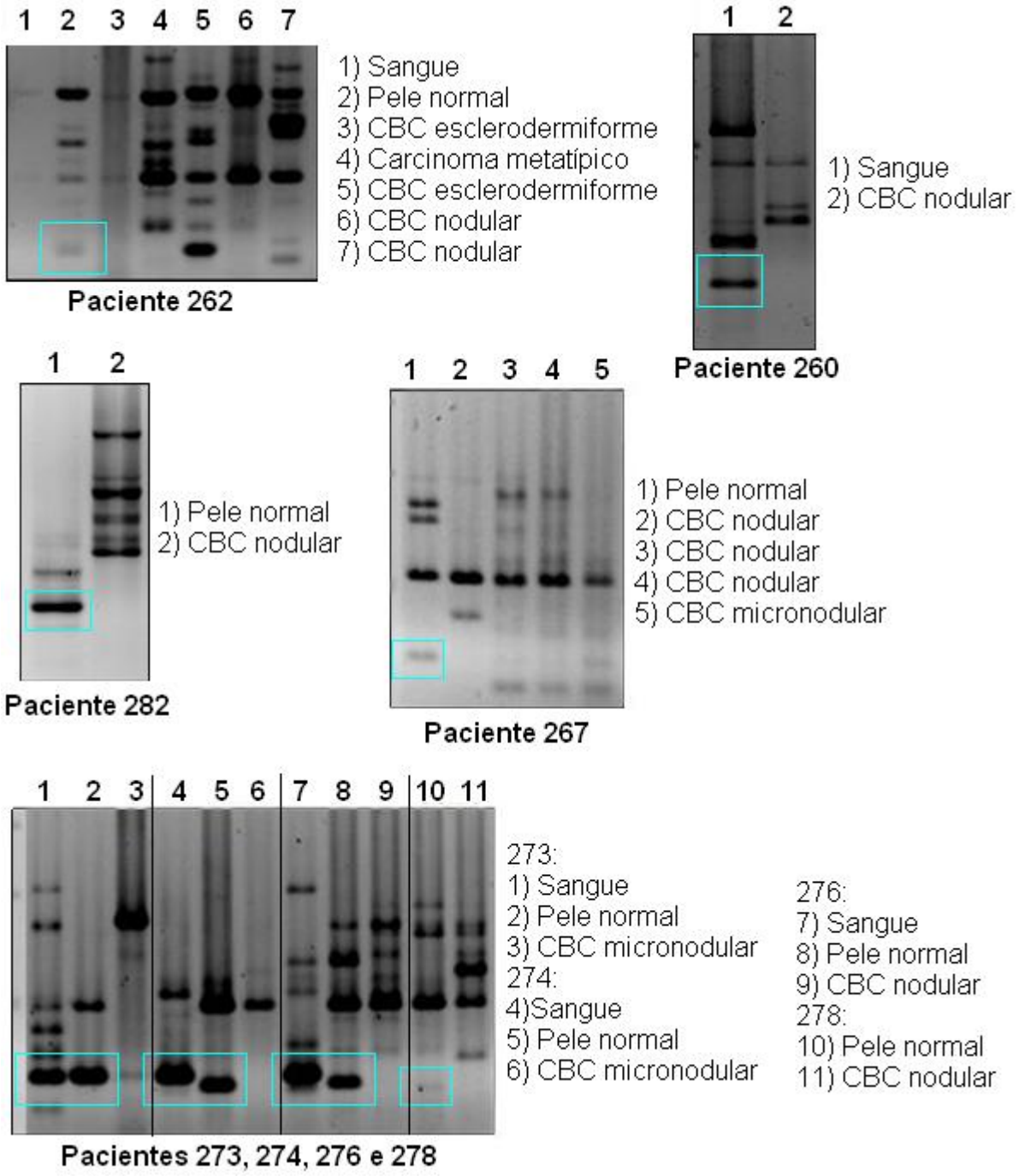

Figura 40: Padrões de RAPD apresentando perda constante nos tecidos tumorais de uma banda de tamanho próximo a 500 pb (marcada nos retângulos azuis). Observar que no paciente 262 a amostra número 5 não apresentou perda desta banda, assim como a amostra 5 do paciente 267.

Para possibilitar melhor análise da banda destacada ela foi eluída do gel, a partir das reações de RAPD das amostras de sangue dos pacientes 273, 274 e 276. Após purificação esta banda foi clonada e seqüenciada. Os resultados destes seqüenciamentos foram submetidos a bancos de dados, (BLAST) e alinhados entre si. No entanto, não foram encontradas similaridades entre as seqüencias ou

similaridades com o banco de dados humano presente no BLAST, as demais bandas ainda devem ser avaliadas.

4.2.8 OPB-08

Este primer foi usado na avaliação de 32 lesões tumorais pertencentes a 18 pacientes. Onze lesões (pertencentes a 7 pacientes diferentes) não apresentaram alterações. Treze lesões de 10 pacientes apresentaram ganho de bandas e 8 lesões de 4 pacientes apresentaram perda de bandas. No total, 13 pacientes apresentaram alteração em ao menos um de seus tumores enquanto 5 pacientes não estavam alterados em nenhuma de suas lesões.

As alterações observadas com este *primer* foram correlacionadas positivamente com o grau histológico do tumor, CBCs micronodulares apresentam ganho de bandas (p=0,039).

A figura 41 apresenta exemplos de um paciente, portador de um CBC adenóide, que manteve padrão constante de bandeamento entre a pele normal e o tumor e de um paciente portador de um CBC micronodular que apresentou ganho de bandas na amostra tumoral.

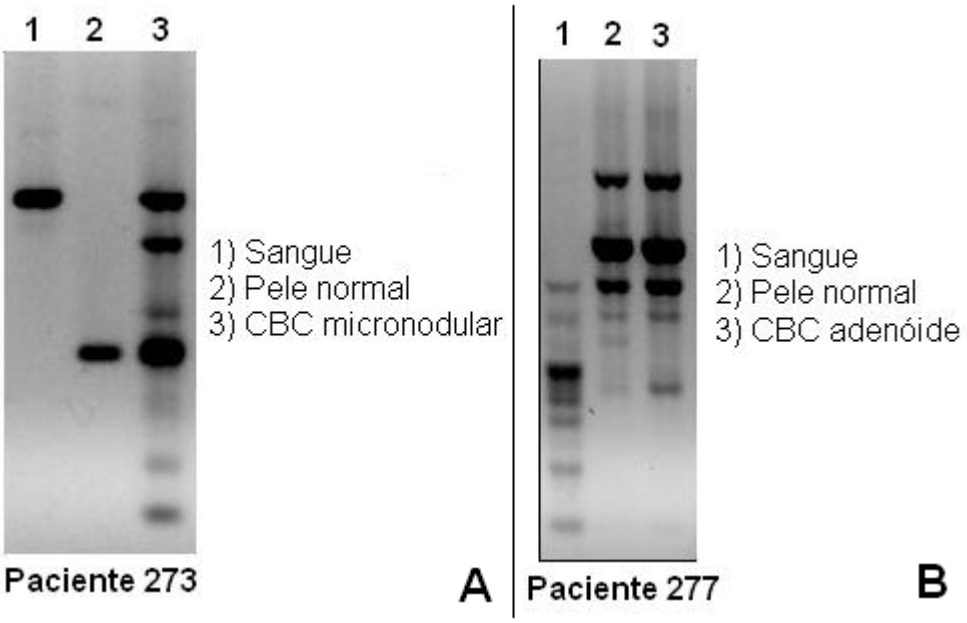

Figura 41: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPB-08. Em A, temos as amostras do paciente 273 apresentando ganho de bandas no CBC micronodular. Em B, temos

as amostras do paciente 277, apresentando padrão de bandas conservado entre CBC adenóide e pele normal para este primer.

4.2.9 OPB-11

O *primer* OPB-11 foi utilizado na avaliação de 28 tumores pertencentes a 18 pacientes. Não foram encontradas alterações em 9 lesões de 7 pacientes diferentes. Dentre as lesões alteradas 11 apresentaram perda de bandas (9 pacientes) e 8 tumores apresentaram ganho de bandas (5 pacientes). No total, 13 pacientes apresentaram alteração e 5 pacientes não tiveram nenhuma de suas lesões alteradas.

Com este primer, a perda de bandas em lesões tumorais está correlacionada à idade do paciente, sendo predominante em lesões presentes após os 60 anos de idade (p=0,003). Foram detectadas duas bandas de interesse com este primer, com tamanhos próximos a 250 e 300 pb. Estas bandas estavam presentes nos tecidos normais e não nos tecidos tumorais de oito pacientes (Fig. 42).

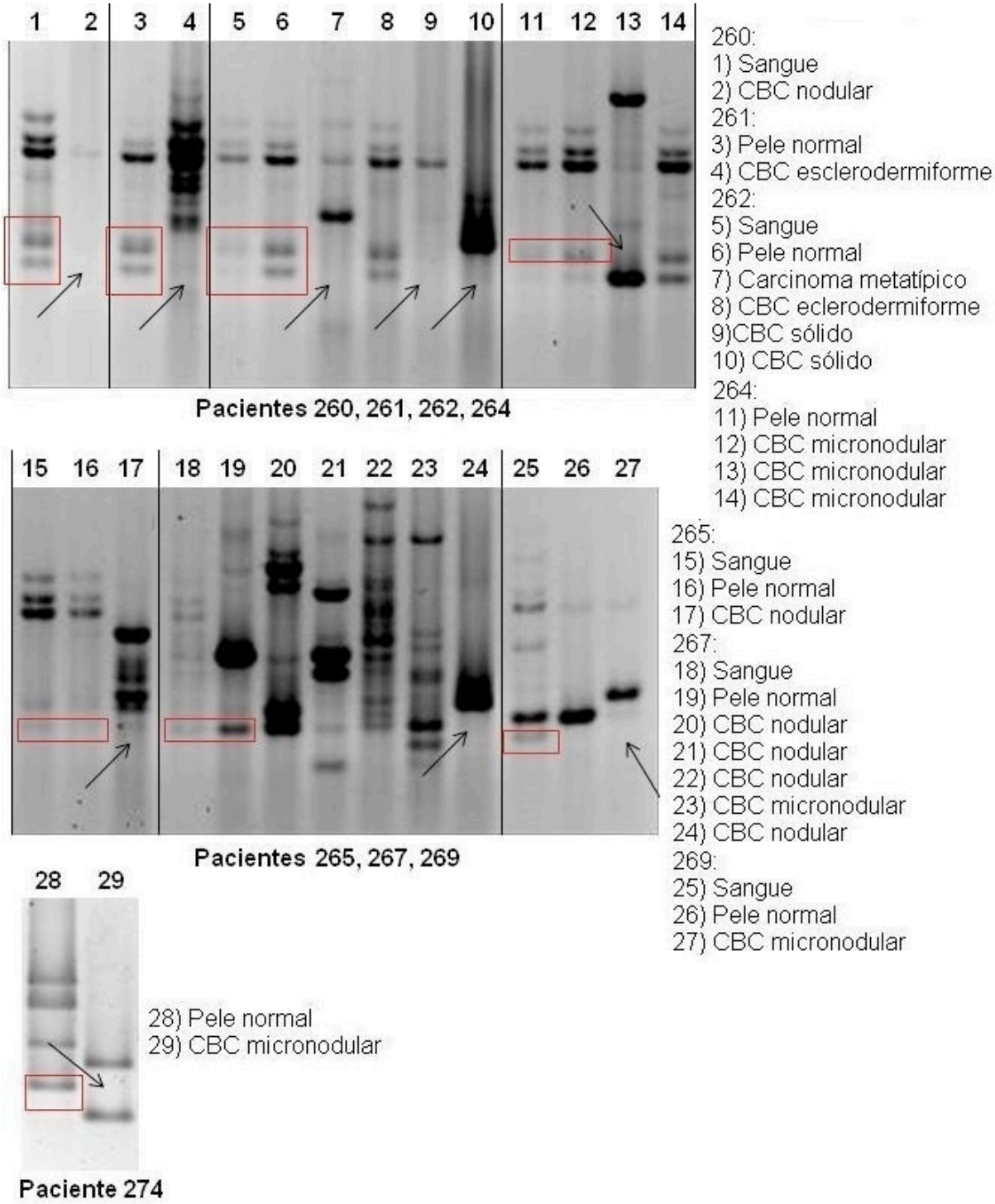

Figura 42: Padrões de RAPD apresentando perda constante nos tecidos tumorais de duas bandas de tamanhos próximos a 250 e 300 pb (marcadas nos retângulos vermelhos). Observar que nos pacientes 260, 261, 262 e 269 ocorreu perda das duas bandas indicadas. Nos pacientes 265 e 267 ocorreu a perda da banda menor (250 pb) e nos pacientes 264 e 274 ocorreu a preda da banda maior (300 pb).

A banda maior (300 pb) não estava presente em ao menos uma lesão de 6 de 17 pacientes (pacientes 260, 261, 262, 264, 269 e 274). A banda menor também não estava presente em 6 de 17 pacientes (pacientes 260, 261, 262, 265, 267 e

269). No total, 8 de 17 pacientes avaliados apresentaram alteração nesta banda em ao menos um de seus tumores.

Para melhor avaliação desta alteração, as bandas presentes nos padrões de RAPD das amostras de sangue dos pacientes 260, 269, 261 e 265 e das amostras de pele normal dos pacientes 264, 262, 274 e 269 foram eluídas do gel e purificadas. Após purificação, foram clonadas e seqüenciadas. Os resultados obtidos foram alinhados entre si e cruzados com bancos de dados da seqüencia genômica humana (BLAST). As seqüencias obtidas a partir das amostras de sangue dos pacientes 269, 261 e 265 e de pele normal dos pacientes 264 e 262 apresentaram homologia com o íntron 4 do gene que codifica as isoformas do gene BANP (*BTG3 associated nuclear protein isoform a/b*) do cromossomo 16. A identidade destas seqüencias com este gene variou entre 95 e 98%. Abaixo temos os alinhamentos obtidos entre as diferentes seqüencias e as informações do banco de dados BLAST:

```
                                  10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Intron4_21830pb_BANP     GACTCAATGAAGGAGAAATTTTTCTTTTCCTCAGAACTGACTGTTGACCCGTGGATAATTGAATATTTGTTGTGGTGTTATGTAGAGCTAGGCCTCGTTC
265S                     ----------------------------------------GTAGACCCGT-GGACAATTGAATATTTGTTGTGGTGTTATGCAGAGCTAGGCCTCGTTC
269S                     ----------------------------------------GTAGACCNTCCNGACAATTGAATATTTGCTGTGGTGCTATGTAGAGCTAGGCCTCGTTC
262N                     -------------------------------------------GACCCGT-GGATAATTGAATATTTGTTGTGGTGTTATGTAGAGCTAGGCCTCGTTC
264N                     ------------------------------------------------------------------------------------GTAGAGCTAGGCCTCGTTC
261S                     ----------------------------------------GTAGANCCCCTGGACAATTGAATATTTGTTGGGGTGTTATGTAGAGCTAGGCCTCATTC
Clustal Consensus                                                                                            * ************* ***

                                 110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Intron4_21830pb_BANP     TGAGCATCTCTGTTCTGGCACGGGAGCACAAGAGGTCTTGGCCAGGGTAAACCAGTTTTTTCAGTTTTGGGTCATTGATATTCTCAGTCAAAATTATAGC
265S                     CGAGCATCTCTGTTCTGGCACGGGAGCACAAGAGGTCTTGGCCAGGGTAGACCAGTTTTTTCAGTTTTGGGTCATTGATATTCTCAGTCAAAATTATAGC
269S                     TGAGCATCNCTGTTCTGGCACGGGAGCACAAGAGGTCTTGGCCAGGGTAAACCAGTCTTTCCAGTTTTGGGTCATTGATATTCTCAGTCANAATTATAGC
262N                     TGAGCATCTCTGTTCTGGCACGAGAGCACAAGAGGTCTTGGCCAGG-TAAACCAGTTTTTTCAGTTTTGGGTCATTGATATTCTCAGTCAAAATTATAGC
264N                     TGAGCATCTCTGTTCTGGCACGGGAGCACAAGAGGTCTTGGCCAGGGTAAACCAGTTTTTTCAGTTTTGGGTCATTGATATTCTCAGTCAAAATTATAGC
261S                     TGGGCACCTCTGTTCTGGCACGGGAGCACAAGAGGTCTTGGCCAGGGTAAACCAGTTTTTTCAGTTTTGGGTCATTGATATTCTCAGTCAAAATTATAGC
Clustal Consensus         * *** * ************* ************************ ** ****** *** ****************************** *********

                                 210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Intron4_21830pb_BANP     ATTTCATAGGCTTTAGAATCTGACAAACTCAAGGGAGAGCTGCGTGAATTGTGAAGAAATGGTTTGGTCTCACCTAAGATGGTTTTGTTTAATTCTTTTC
265S                     ATTTCATAGGCTTTAGAATCTGACAAACTCAAGGGAGAGCTGCGTGA-------------------------------------------------------
269S                     ATTTCATAGGCTTTAGAATCTGACAAACTCAAGGGAGAGCTGCGAGAATTGTGAAGAAGTGGTTTGGTCACACCT-----------------------------
262N                     ATTTCATAGGCTTTAGAATCTGACAAACTCAAGGGAGAGCTGCGTGAATTGTGAAGAAATGGTTTGGTCTCACCTGAGATGGTTTTGCTTAATTCCTTTC
264N                     ATTTCATAGGCTTTAGAATCCGACAAACTCAAGGGAGAGCTGCGTGAATTGTGAAGAAATGGTTTGGTCTCAGCTAAGATGGTTTTGTTTAATTCTTTTC
261S                     ATTTCATAGGCTTTAGAATCTGACAAACTCAAGGGAGAGCTGCGTGAATTGTGAAGAA-TGGTTTGGTCTCACCTGAGGTGGTTTTGTTTAATTCTTTTC
Clustal Consensus        ******************** ************************ **

                                 310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                         ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Intron4_21830pb_BANP     TTATTTAATATTGAATTTTGGTTGCTTTCGTTTAATTTCGTGTACATGTGATTTCTCTTCCTGACTGGTCTATACTACCTTGCACAGCTGCATACTTTTG
265S                     ----------------------------------------------------------------------------------------------------
269S                     ----------------------------------------------------------------------------------------------------
262N                     TTATNGGNTAAAAAATTTTGGTTGCTTTCGTTTAATTTCGTGTACAT-------------------------------------------------------
264N                     TTATTTAATATTGAATTTTGGTTGCTTTCGTTTAATTTCGTGTACATGTGATTTCTCTTCCTGACGGGTCTAC-----------------------------
261S                     TTATTTAATATTGAATTTTGGTTGCTTTCGTTTGATTTCGTGTGCATGTGATTTCTCTTCCTGACGGGTCTAC-----------------------------
Clustal Consensus
```

As seqüencias obtidas a partir das amostras de sangue do paciente 260 e de pele normal dos pacientes 269 e 274 apresentaram homologia com as isoformas do domínio DENN/MADD do gene DENND1 presente no cromossomo 9. A identidade das amostras com esta região foi de 98 a 99%. Abaixo temos os alinhamentos entre as amostras e as informações do banco de dados.

É importante ressaltar que do início até cerca de metade da seqüencia (em torno de 170 pb) houve pareamento com a região próxima a posição 5331 do íntron 10 do gene DENND1A, enquanto o restante da seqüencia não apresentou boa identidade com a seqüência publicada.

```
                                   10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
260S                      ---------------------------------AGACCCGTG--ATGGGGAGGCGGGAGTGGATTTCTGCATGCTTTTTATTTTCCACATTTTCCAATAT
269N                      ---------------------------------AGACCCGTG--ATGGGGAGGCGGGAGTGGATTTCTGCATGCTTTTTATTTTCCACATTTTCCAATAT
274N                      -------------------------------GTAGACCCNCCGCATGGGGAGGCGGGAGAGGATTTCTGCATGCTTTTTATTTTCCACATTTTCCAATAT
Intron-10_5301pb_DENND    ATCTGGAAAGAAATACACCAAAATGTTTAACAGAGACCCGTG--ATGGGGAGGCGGGAGTGGATTTCTGCATGCTTTTTATTTTCCACATTTTCCAATAT
Clustal Consensus                                        ******     *************** ****************************************

                                  110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
260S                      TTCTACACTGAAAAAGTATGGTTTTTATAATTAAAAGCTTTATTTTCACAAATCAGTGTTATAATATTCTGTTTCTTACTTTGTGGTTACTATTACCAGG
269N                      TTCTACACTGAAAAAGTATGGTTTTTATAATTAAAAGCTTTATTTTCACAAATCAGTGTTATAATATTCTGTTTCTTACTTTGTGGTTACTATTACCAGG
274N                      TTCTACACTGAAAAAGTATGGTTTTTATAATTAAAAGCTCTATTTTCACAAATCAGTGTTATAATATTCTGTTTCTTACTTTGTGGTTACTATTACCAGG
Intron-10_5301pb_DENND    TTCTACACTGAAAAAGTATGGTTTTTATAATTAAAAGCTTTATTTTCACAAATCAGTGTTTTTTCTAGCCAATTGTT-CTTCCCAGCTGCCATTCATTTC
Clustal Consensus         ************************************** ******************** *      *   ** ** ***    * * * ***

                                  210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
260S                      GACTTTT-------------------------------------------------------------------------------------------
269N                      GACTTTT-------------------------------------------------------------------------------------------
274N                      GACTTTT
Intron-10_5301pb_DENND    TCCTTTCATGTTTTCTTGGAGATACATTAGATGTTTTATTTTCCTGTGAAAGC---------------------------------------------
Clustal Consensus           ****
```

4.2.10 OPB-13

Este *primer* foi usado para avaliar 15 pacientes portadores de 22 lesões. Seis destas lesões, pertencentes a 5 pacientes, não apresentaram alterações. Dentre as lesões alteradas, 10 apresentaram ganho de bandas (7 pacientes) e 6 apresentaram perda de bandas (4 pacientes). No total, 5 pacientes não apresentaram alterações em suas lesões enquanto 10 pacientes apresentaram ao menos uma de suas lesões alteradas.

A figura 43 abaixo apresenta um paciente com uma única lesão apresentando ganho de bandas e um paciente com múltiplos tumores apresentando todas as suas lesões alteradas.

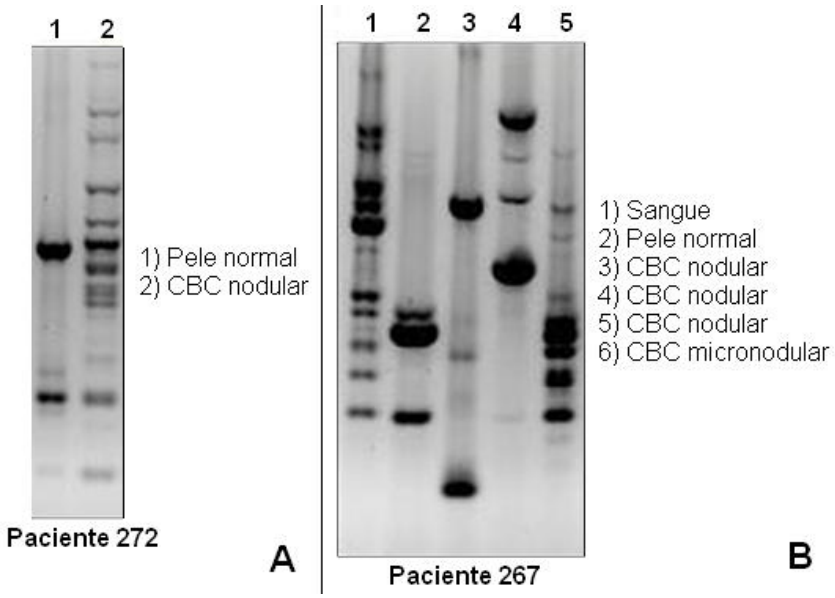

Figura 43: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPB-13. Em A, temos as amostras do paciente 272 apresentando ganho de bandas no CBC nodular. Em B, temos as amostras do paciente 267, apresentando padrão de bandas alterado em todas as suas lesões.

As alterações apresentadas com este marcador foram relacionadas com o número de lesões apresentadas pelo paciente. Pacientes com mais de 5 lesões apresentam maior número de alterações, pacientes com 2 ou 3 lesões são os menos alterados e pacientes com apenas 1 lesão apresentam predominância de ganho de bandas (p=0,018).

Não foi encontrada nenhuma banda de interesse, que apresentasse alterações semelhantes, com este primer.

4.2.11 OPB-19

O primer OPB-19 foi usado em 19 lesões pertencentes a 12 pacientes. Das lesões avaliadas apenas 2 lesões, pertencentes ao mesmo paciente, não apresentaram alterações. Oito lesões de 7 pacientes apresentaram ganho de bandas em seus padrões enquanto nove lesões de cinco pacientes apresentaram perda de bandas. No total, apenas 1 paciente não apresentou alteração, enquanto 11 pacientes estavam alterados em o menos uma de suas lesões.

As alterações encontradas com este *primer* foram correlacionadas com o número de lesão apresentadas pelos pacientes. Pacientes com uma única lesão apresentam ganho de bandas enquanto pacientes com múltiplos tumores apresentam perda de bandas.

A figura 44 apresenta um paciente com várias lesões apresentando perda de bandas na maioria de seus tumores (A) e um paciente com uma única lesão apresentando ganho de bandas (B).

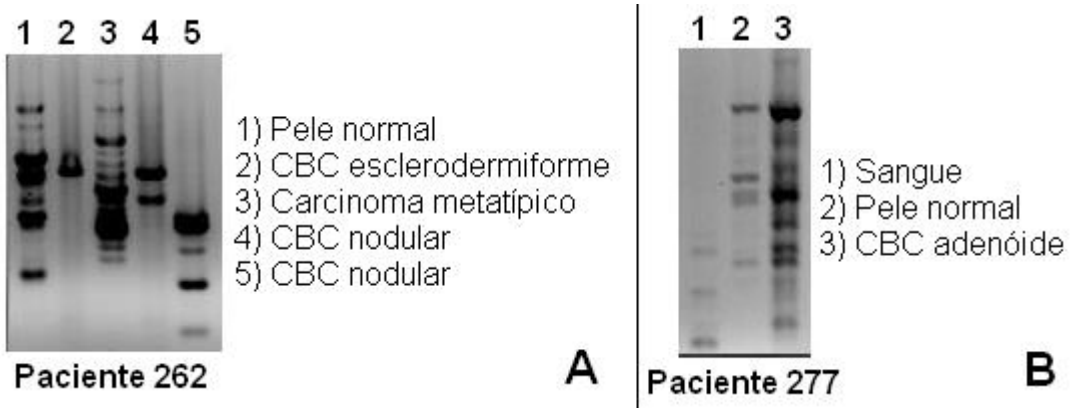

Figura 44: *Fingerprint* gerado pelo *primer* de RAPD OPB-19. Em A, temos as amostras do paciente 262 apresentando perda de bandas na maioria de suas lesões, exceto na amostra 3. Em B, temos as amostras do paciente 277, apresentando ganho de bandas em sua única lesão.

4.2.12 Alterações gerais de RAPDs

Avaliando os *fingerprints* gerados por todos os *primers* estudados em conjunto percebe-se que há uma diferença estatisticamente significante ($p<0,001$) entre a quantia de lesões alteradas e normais (Fig. 45B), predominando a alteração nos tumores. No entanto, não há diferença significante entre a quantia de lesões que perdem ou ganham bandas (Fig. 45A).

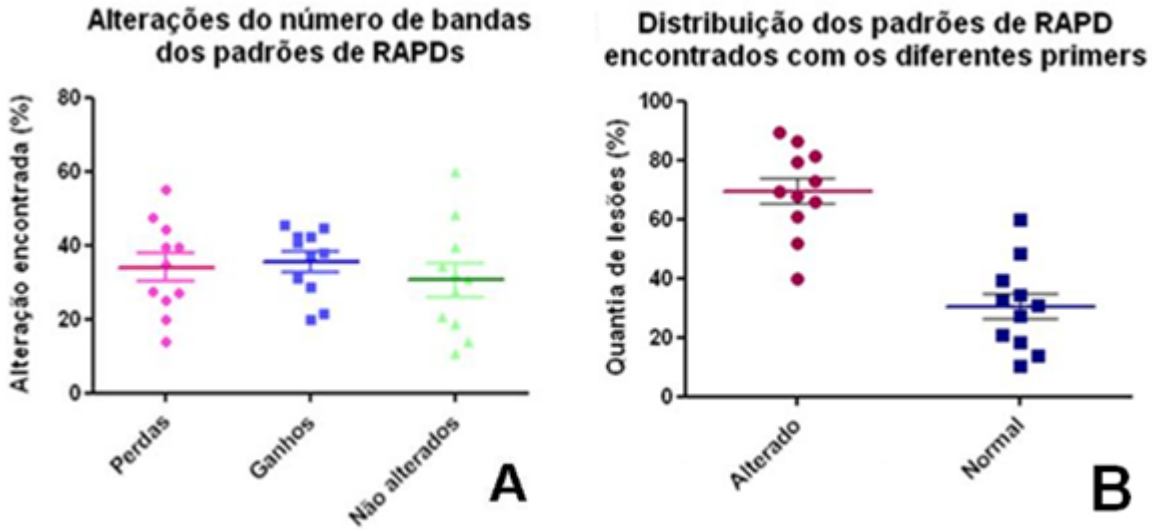

Figura 45: Gráficos da distribuição da quantidade de lesões alteradas ou normais encontradas com diferentes primers de RAPD, as linhas determinam as médias e as barras o erro padrão.

O *primer* que identificou maior alteração nos tumores foi o OPB-19, com quase 90% das lesões avaliadas alteradas. O *primer* OPA-17, por outro lado, foi o que apresentou menos padrões alterados nas lesões. Em torno de 60% dos tumores avaliados com este *primer* não apresentaram alterações. Em todos os demais *primers* a porcentagem de lesões alteradas foi maior que a de lesões com bandeamento normal.

Avaliando mais detalhadamente as alterações encontradas em cada *primer*, observa-se que o *primer* OPA-11 apresentou a maior porcentagem de perda de bandas (55,17%), enquanto a maior porcentagem de ganhos foi encontrada com o primer OPB-13 (45,45%). A figura 46 traz os gráficos representativos das análises descritas acima.

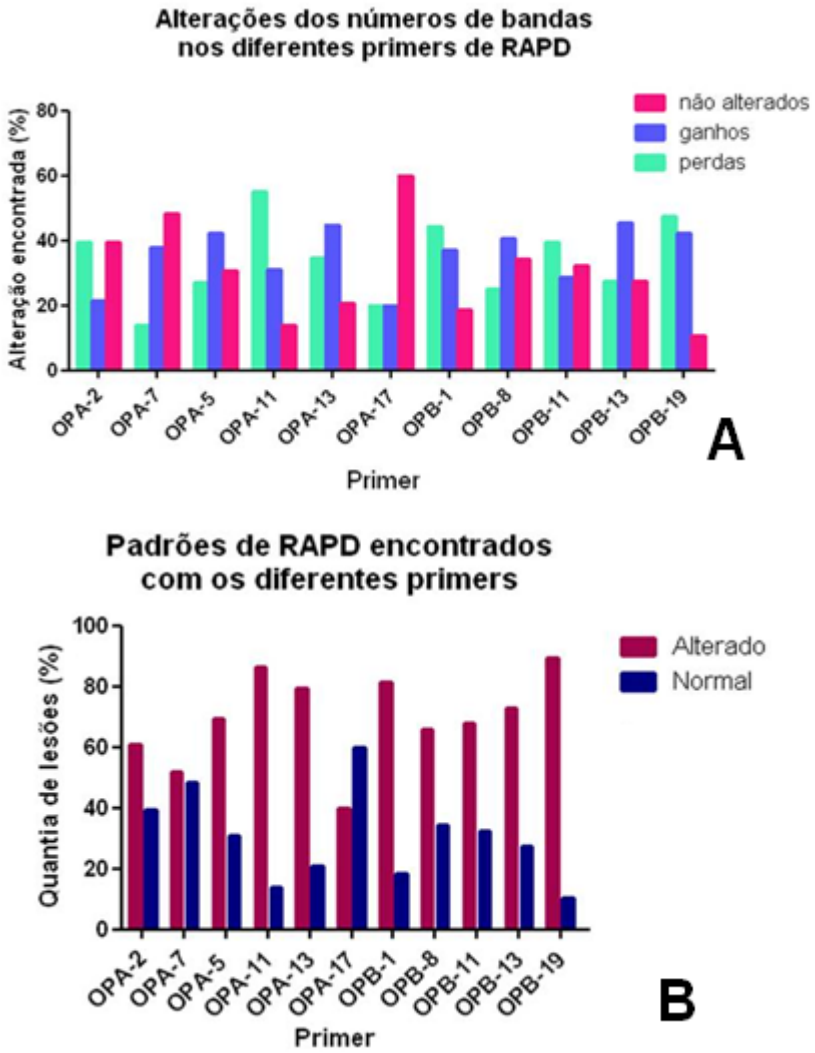

Figura 46: Gráficos da distribuição dos perfis de bandeamento encontrados nos diferentes primers de RAPD. Em A são apresentados ganhos e perdas separadamente e em B o total de alterações encontradas.

O risco de recidiva dos tumores foi comparado com a alteração no padrão de bandeamento, sem apresentar relação estatística (Fig.47). A histologia dos tumores avaliados também foi comparada com as alterações totais encontradas, notando-se que o CBC esclerodermiforme é a lesão que apresenta maior alteração, embora sem significância estatística (Fig 48).

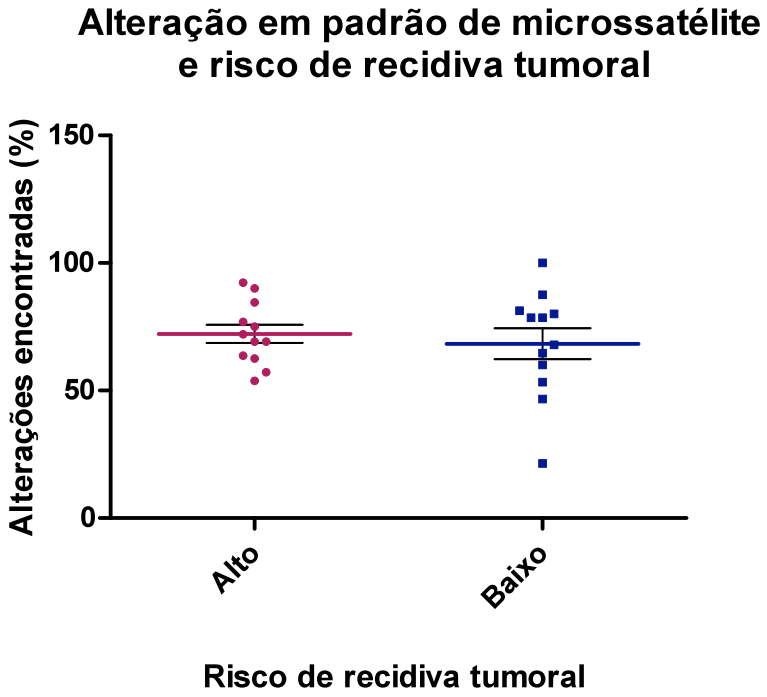

Figura 47: Gráfico da alterações em padrões de RAPDs de tumores com diferentes riscos de recidiva. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os primers avaliados e as barras apresentam o erro padrão.

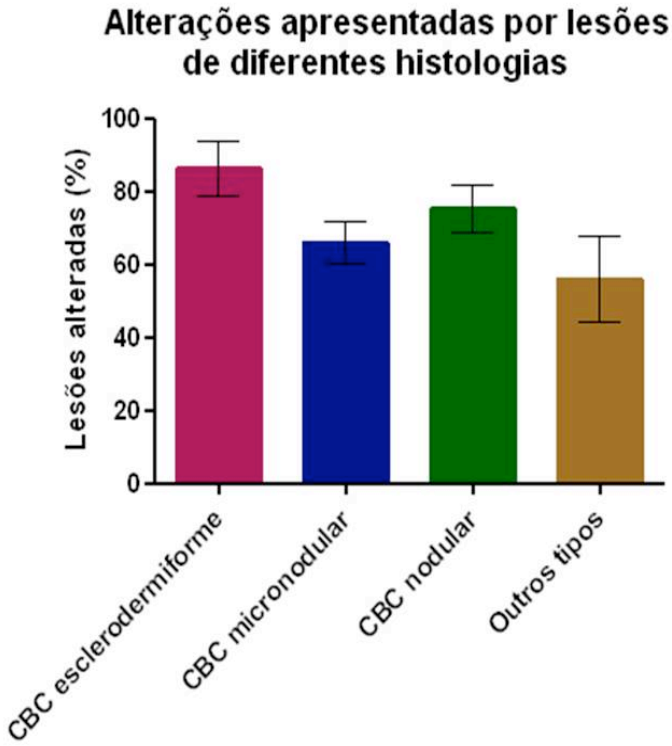

Figura 48: Gráfico das alterações encontradas em lesões de diferentes tipos histológicos, as linhas em preto representam o erro padrão.

Os fotótipos dos pacientes que apresentaram lesões também foram relacionados às alterações apresentadas nos RAPDs, o fotótipo 3 é o mais alterado e o 2 o menos, porém sem diferirem significantemente Não foi encontrada relação significante entre o tipo de alteração e o fotótipo do paciente, no entanto, o fotótipo 2 é o único a apresentar mais perdas do que ganho de bandas.

Para pacientes dos sexos masculino e feminino a proporção de alterações totais encontradas foi muito semelhante. Ao avaliar as alterações separadamente, o gênero feminino apresenta predominância no ganho de bandas, enquanto o sexo masculino apresenta predominância na perda de bandas. No entanto, a relação não apresenta significância estatística.

A idade de manifestação da lesão foi relacionada com as alterações apresentadas nos padrões de RAPD. Observamos que os pacientes mais velhos apresentam maior quantia de alterações, embora esta não tenha apresentado significância estatística. A faixa etária de 61 a 70 anos de idade apresenta a menor quantia de alterações, sendo também a faixa de idade onde prevalecem as perdas de bandas, diferente dos demais grupos, que apresentam predominância no ganho de bandas. Não foi encontrada correlação significante também entre os diferentes tipos de alteração e a faixa etária do indivíduo

A maioria dos tumores apresentados estava localizada na região da face. No entanto, esta região não é a que apresenta maior número de alterações. Não há relação estatisticamente significante entre o total de alterações e a localização tumoral. Não há predominância do tipo de alteração encontrada nas diferentes localizações tumorais. Tanto perdas quanto ganhos de bandas aparecem igualmente distribuídos.

A última comparação foi feita entre padrões alterados de tumores provenientes de pacientes com um único ou múltiplos CBCs. Os tumores de pacientes com múltiplas lesões apresentam-se mais alterados (Fig.49), sem significância estatística. No entanto, avaliando-se o número de tumores apresentado pelo paciente e as alterações presentes notamos que pacientes com 5 tumores apresentam lesões significantemente mais alteradas (Fig. 50). Ao avaliarmos as alterações separadamente notamos que há uma predominância de ganho de bandas nos pacientes com 3 lesões, enquanto a perda de bandas é predominante em pacientes com 5 tumores. Estas relações, no entanto, não apresentam significância estatística.

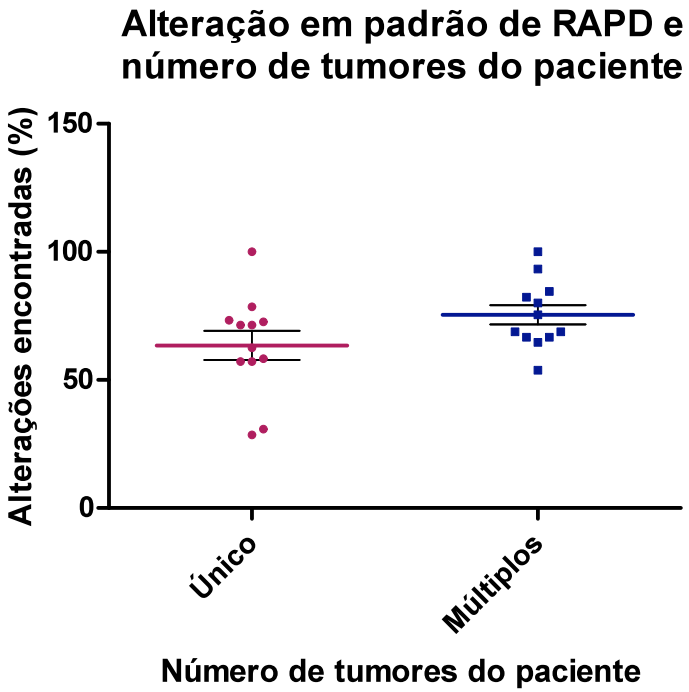

Figura 49: Gráfico da alterações em padrões de RAPDs de tumores de pacientes com diferentes quantidades de tumores. As linhas coloridas representam a média de alteração encontrada com todos os primers avaliados e as barras apresentam o erro padrão.

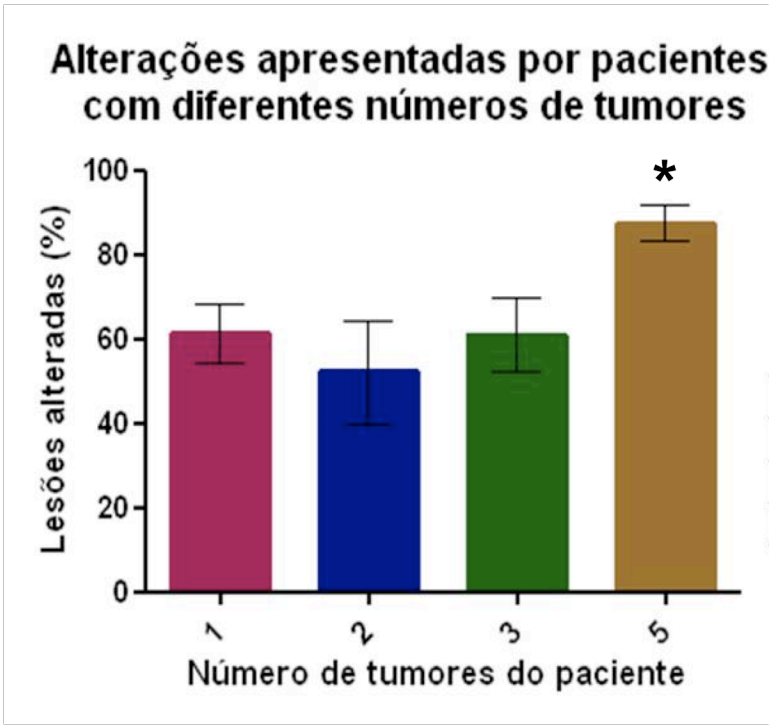

Figura 50: Gráfico d a porcentagem média de alteração encontrada em pacientes com diferentes números de tumores, as linhas em preto representam o erro padrão.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados carcinomas basocelulares esporádicos de diversos pacientes. O perfil genético de DNAs repetitivos destes tumores foi comparado com tecidos controles (pele normal e/ou sangue) na busca de marcadores.

É importante ressaltarmos que os controles utilizados (pele norma e leucócitos) já podem apresentar diferentes perfis de DNA repetitivo. Os leucócitos sofrem grandes rearranjos do DNA durante sua maturação, na formação de suas cadeias variáveis por exemplo. A pele está muito exposta a radiação UV do sol, o que pode ocasionar mutações no DNA. A pele normal que utilizamos é uma borda cirúrgica do tumor removido, portanto em alguns casos é possível que existam células tumorais ainda nestas bordas.

Esperamos que estes sejam úteis futuramente na clínica, pois quanto mais elucidada a biologia tumoral, melhor será determinado o prognóstico dos pacientes portadores destes tumores, indicando maior ou menor agressividade da lesão e possibilidade de ocorrência de outros tumores no mesmo paciente.

Também foram identificados possíveis genes alterados em número significante de pacientes, tanto para utilizações futuras como marcadores quanto para elucidar um pouco mais a biologia do surgimento deste tipo tumoral.

As análises iniciais visaram o uso de marcadores microssatélites presentes no cromossomo 9. Os marcadores microssatélites são utilizados na detecção de inúmeros tipos de cânceres, como colorretal(48), endometrial(49) e ovariano(50), a alta presença de alteração (MSI ou LOH) nestes marcadores indica deficiências no sistema de reparo do DNA e perda de regiões cromossômicas.

Já é conhecido o envolvimento de alterações no cromossomo 9 no surgimento do CBC, tanto de pacientes portadores da Síndrome de Gorlyn (principalmente no gene PTCH1)(51) quanto de lesões esporádicas(52). Trabalhos prévios do próprio laboratório já demonstraram taxas de alteração de microssatélites neste cromossomo em até 40% dos tumores avaliados(47). O presente trabalho aumenta o número da amostra de CBCs esporádicos avaliados e busca determinar correlações entre as alterações encontradas e as características destas lesões ou dos pacientes portadores dos tumores.

Dos 7 marcadores microssatélites avaliados, o mais alterado foi o D9S15 (13,79%), seguido pelo D9S180 (13,33%). Trabalhos prévios com CBC indicam alteração no microssatélite D9S15 em 2 de 10 pacientes(46), resultado próximo ao

obtido neste trabalho. Já trabalhos prévios avaliando microssatélite D9S180 apresentaram 40% de alteração(47), porém os tumores deste estudo eram tanto esporádicos quanto provenientes de pacientes com Síndrome de Gorlyn, o que poderia justificar o maior número de alterações encontradas. Alterações do microssatélite D9S15 não apresentaram correlação com qualquer dos parâmetros dos pacientes ou das lesões avaliadas. Já alterações do microssatélite D9S180 apresentaram uma correlação com o fotótipo apresentado pelo paciente (p=0,001), LOH foi encontrada em pacientes de fotótipo 2 (pele clara) enquanto MSI estava presente em pacientes de fotótipo 4 (pele escura). D9S180 é um indicativo de possíveis alterações distintas em mecanismos moleculares de tumores presentes em pacientes de diferentes fotótipos. Sabemos que a perda de heterozigosidade, predominante em pacientes de pele clara, pode ser ocasionada por deleção em uma região cromossômica, perda de um braço do cromossomo, perda total do cromossomo e recombinações cromossômicas durante a mitose. Enquanto a instabilidade de microssatélite, encontrada em paciente de pele escura, é ocasionada por erros não corrigidos durante a replicação do DNA.

Também foi encontrada uma correlação relevante entre alterações no microssatélite D9S50 (9,38%) e a presença de múltiplas lesões no paciente (p=0,022) e entre alterações em D9S52 (10%) e a histologia esclerodermiforme (p=0,003). Trabalhos prévios com carcinomas basocelulares apresentaram 6 de 21 lesões alteradas para o microssatélite D9S52 e 4 lesões alteradas de 11 para D9S50(45). No entanto, este trabalho também utilizou tumores provenientes de pacientes sindrômicos e, portanto, possivelmente mais alterados.

É possível que estes dois microssatélites sejam bons marcadores moleculares. O primeiro (D9S50) pode ser um indicador prognóstico, pacientes que apresentem alterações neste marcador devem ser acompanhados quanto ao surgimento de múltiplas lesões. O segundo (D9S52) têm alterações relacionadas com lesões esclerodermiformes, a forma mais invasiva e severa deste tipo tumoral.

É importante ressaltarmos que 52,63% das alterações encontradas estavam presentes em um mesmo paciente (262). Para confirmarmos a utilidade dos microssatélites descritos acima como marcadores, é necessário aumento da amostra.

Quando os microssatélites avaliados foram considerados conjuntamente (replicatas), encontramos uma correlação relevante entre a presença de alterações e

a histologia tumoral esclerodermiforme, forma mais grave (p=0,03). Ao avaliarmos o risco de recidiva dos tumores, separando-os em alto e baixo risco, há uma prodominancia de alterações em tumores de alto risco, mas a diferença não é estatisticamente. O aumento nas alterações de microssatélites também foi relacionado com a presença de tumores múltiplos nos pacientes

As correlações encontradas indicam novamente o uso da presença de alterações em microssatélites como marcadores moleculares. O aumento da quantia de alterações relaciona-se com a presença de múltiplos tumores no paciente, podendo ser utilizados para prognóstico, indicando maior possibilidade de ocorrência de novas lesões.

As alterações são predominantes em lesões esclerodermiformes, indicando uma correlação entre agressividade da biologia tumoral e alterações de microssatélites. O cromossomo 9 está envolvido na tumorigênese do carcinoma basocelular esclerodermiforme, apenas o microssatélite D9S196 não apresentou alterações neste tipo tumoral, sendo que 2/3 dos CBCs esclerodermiformes apresentaram alteração em ao menos 1 dos microssatélites do cromossomo 9 avaliados.

Para avaliarmos seqüencias repetitivas presentes nos demais cromossomos utilizamos a técnica de RAPD. Esta técnica é capaz de detectar diversos danos do DNA (adutos, quebras, etc.) assim como mutações (pontuais ou grandes rearranjos), podendo ser utilizada em estudos de carcinogênese.

A avaliação de bandas relevantes geradas por padrões de RAPDs também permite a identificação de eventos moleculares envolvidos na instabilidade genômica, assim como a descoberta de genes com papéis chave no surgimento e desenvolvimento da malignidade(53).

Foram utilizados 11 primers de RAPD neste estudo. O primer que apresentou maior alteração nas lesões tumorais foi o OPB-19 (89,47% das lesões alteradas), enquanto o primer que apresentou padrões mais conservados foi o OPA-17 (quase 60% das lesões com padrões conservados). Apenas 3 lesões não apresentaram alteração em seus padrões de RAPD, no entanto estas lesões foram estudadas somente com 2 primers. Isto demonstra a presença de instabilidade genômica em 90,9% das lesões avaliadas.

As alterações encontradas com o primer OPB-19 podem ser correlacionadas com o número de tumores apresentados pelo pacientes. Há uma

predominância no ganho de bandas em pacientes com lesão única e predominância de perda de bandas em pacientes com múltiplas lesões (p=0,005).

O primer OPA-07 também está correlacionado com o número de lesões presentes no paciente, no entanto, neste caso o ganho de bandas é predominante em pacientes com maior número de tumores (p=0,006).

As alterações avaliadas com o primer OPB-13 são predominantes em pacientes com 5 lesões. Se considerarmos ganhos e perdas de bandas separadamente, percebemos que há uma predominância no ganho de bandas em pacientes com apenas 1 lesão (p=0,018).

Alterações obtidas com o primer OPA-11 foram correlacionadas com diversas características dos pacientes. O número de lesões apresentadas pelo paciente foi novamente uma delas (p=0,015), pacientes com mais lesões estavam mais alterados. Assim como a idade de detecção do tumor, com ganho de bandas em pacientes com menos de 60 anos e perda de bandas em pacientes com mais de 60 anos (p=0,042), e finalmente diferenças apresentadas entre pacientes de diferentes gêneros, mulheres apresentando predominância no ganho de bandas e homens predominância de perdas.

Avaliações feitas com OPB-11 também indicaram predominância de perda de bandas em pacientes com mais de 60 anos (p= 0,003).

O primer OPB-08 apresentou alterações correlacionadas com o tipo histológico do tumor, sendo o ganho de bandas predominante em CBCs micronodulares (p=0,039). Este primer é o único possível marcador diagnóstico para CBCs micronodulares.

Alterações nos padrões obtidos com os primers OPB-19, OPA-07, OPB-13 e OPA-11 correlacionam-se com maior número de lesões presentes no paciente, indicando pior prognóstico e acompanhamento clínico mais intenso.

Ao analisarmos os padrões obtidos com todos os primers de RAPD em conjunto (replicatas), a única relação significante encontrada indica maior número de alterações em pacientes com 5 tumores (p=0,003). Isto, possivelmente, indica que inúmeros primers deste tipo poderiam ser utilizados em conjunto como marcador prognóstico.

Na busca de identificar mecanismos moleculares ou genes envolvidos com este tipo de câncer foram avaliadas alterações constantes em diversos pacientes. Foram encontradas duas bandas de interesse com o primer OPB-11, 250 e 300 pb,

dos 17 pacientes avaliados com este primer quase metade apresentou alteração em ao menos uma das bandas, sendo que 4 perderam as duas bandas nos tecidos tumorais, 2 perderam apenas a banda de 250 pb e 2 perderam apenas a banda de 300 pb.

Estas bandas de interesse foram clonadas e seqüenciadas, permitindo a identificação de dois genes possivelmente envolvidos com o surgimento e progressão do carcinoma basocelular.

O primeiro gene identificado no cromossomo 16q24.2 foi *BTG3 associated nuclear protein* (BANP), também conhecido como SMAR1 (*Scaffold/Matrix Associated Region*). Trata-se de um gene supressor de tumor, conhecidamente envolvido com o cancer de mama.

SMAR1 interage e estabiliza p53 através de fosforilação. Sua transcrição é regulada pelo próprio p53, esta proteína é acetilada na presença de danos ao DNA e é recrutada ao promotor de SMAR1, ativando sua transcrição. Uma vez que a proteína SMAR1 é induzida observamos parada do ciclo celular, correlacionada com o aumento de p53 fosforilada e a diminuição de sua forma acetilada(54).

SMAR1 também é capaz de reprimir a transcrição de ciclina D1, a proteína interage com HDAC1 (*histone deacetilation complex 1*), SIN3 e *pocket retinoblastomas*, formando um complexo repressor multiproteínas. SMAR1 direciona este complexo repressor para o promotor do gene da ciclina D1 reprimindo sua transcrição(55).

Também é possível que esta proteína seja capaz de inibir a migraçào de células tumorais e conseqüente metastatização das lesões, através da inibição da via de sinalização do TGFb e de seus genes alvo, por exemplo, moléculas de adesão focal(56).

Como as alterações encontradas nos CBCs indicavam a perda da banda, é possível que este gene tenha sofrido deleções nestes pacientes. Caso estas alterações alterem ou impeçam as funções das proteínas codificadas isto poderia afetar as vias de sinalização descritas acima, culminando no impedimento da parada do ciclo celular nestas lesões tumorais. É possível que este supressor tumoral esteja envolvido no surgimento ou progressão do CBC.

Mais estudos são necessários para confirmar o envolvimento deste gene com esta patologia, seria indicado verificar se a expressão da proteína SMAR1

também encontra-se alterada. Caso isto seja detectado, as alterações no p53, na ciclina D1 e na via TGFb também devem ser avaliadas.

O segundo gene detectado por alterações no primer OPB-11 foi DENND1A (*DENN/MADD domain containing 1A isoforme 1/2*). Este gene está localizado no cromossomo 9q33.2, e ainda é pouco estudado atualmente. É interessante notarmos a proximidade deste lócus com o do microssatélite D9S180, o segundo marcador mais alterado neste estudo. Isto pode reforçar a indicação do envolvimento desta região no surgimento e progressão do CBC, seja ela através do gene DENND1A encontrado ou de outro gene importante na região.

Não foram encontradas referencias bibliográficas referentes a este gene específico, apenas algumas informações nos sites EC Gene (http://genome.ewha.ac.kr/cgi-bin/ECquery.cgi?organism=human&query=DENND1A) e Gene Card (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DENND1A).

Estas bases de dados indicam a possibilidade de inúmeros transcritos diferentes para este gene (entre 10 e 123 transcritos), resultando em 13 a 37 proteínas possíveis distintas.

Estimativas de expressão diferencial deste gene por EST (*expressed sequence tag*) indicam que canceres de pele apresentariam uma expressão reduzida quando comparados a tecidos normais, sendo esta diferença ainda mais significante em melanomas. Avaliações de expressão feitas por SAGE (serial analysis of gene expression) também indicam resultados semelhante com uma das sequencias utilizadas, no entanto, uma *tag* diferente apresentou resultados contrários sendo expressa apenas nos cânceres de pele e não nos tecidos normais (proveniente de transcritos putativos distintos).

Considerando que as bandas referentes a uma região deste gene não eram encontradas no tecido tumoral, este resultado pode ser correlacionado as avaliações feitas por EST e SAGE, que indicam redução de expressão deste gene em tumores de pele.

De modo geral, os estudos realizados demonstram a importância do estudo de regiões repetitivas do DNA na tentativa de melhor elucidarmos os mecanismos envolvidos no surgimento e progressão do câncer. Estas sequencias podem apresentar pistas sobre novos genes alterados neste processo, podem facilitar o diagnóstico de lesões e auxiliar na determinação do prognóstico do paciente.

6 CONCLUSÕES

1. A instabilidade genômica neste tipo de câncer parece ser predominante nas formas mais severas e em lesões múltiplas de um mesmo paciente.

2. Alterações nos microssatélites foram correlacionadas com a histologia tumoral esclerodermiforme, tanto considerados em conjunto como quando consideramos apenas o microssatélite D9S52.

3. Alterações no primer de RAPD OPB-08 foram correlacionadas com tumores micronodulares.

4. Os microssatélites do cromossomo 9 apresentam possível indicação prognóstica, pois suas alterações (tanto em conjunto quanto apenas o marcador D9S50) apresentaram correlação com o maior número de lesões em um mesmo paciente.

5. Alterações totais encontradas em RAPDs e (totais e com os primers OPB-19, OPA-07, OPB-13 e OPA-11) se correlacionam com o aumento no número de lesões do paciente indicando um acompanhamento mais atento ao surgimento de novos tumores.

6. Dois novos genes envolvidos na tumorigênese da célula basal foram identificados:

   A) DENND1A foi identificado no cromossomo 9, corroborando o envolvimento deste cromossomo na carcinogênese da célula basal da epiderme. Este gene ainda não foi muito estudado e parece ser putativamente menos expresso em cânceres de pele, no entanto, o mecanismo de sua relação com a carcinogênese permanece indeterminado.

   B) BANP/SMAR1 é um supressor tumoral que atua na via do p53, afeta a transcrição da ciclina D1 e inibe a sinalização da via TGFb. Alterações neste gene podem promover a carcinogênese e já foram relacionadas ao câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Souto LR, Rehder J, Vassallo J, Cintra ML, Kraemer MH, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. Sao Paulo Med J. 2006 Mar 2;124(2):71-6.

2. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Solar and ultraviolet radiation. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1992;55:1-316.

3. Koh D, Wang H, Lee J, Chia KS, Lee HP, Goh CL. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968-97. Br J Dermatol. 2003 Jun;148(6):1161-6.

4. Pennello G, Devesa S, Gail M. Association of surface ultraviolet B radiation levels with melanoma and nonmelanoma skin cancer in United States blacks. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Mar;9(3):291-7.

5. Stern RS, Nichols KT, Vakeva LH. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). The PUVA Follow-Up Study. N Engl J Med. 1997 Apr 10;336(15):1041-5.

6. Koh HK, Geller AC, Miller DR, Grossbart TA, Lew RA. Prevention and early detection strategies for melanoma and skin cancer. Current status. Arch Dermatol. 1996 Apr;132(4):436-43.

7. Grimwood RE, Ferris CF, Mercill DB, Huff JC. Proliferating cells of human basal cell carcinoma are located on the periphery of tumor nodules. J Invest Dermatol. 1986 Feb;86(2):191-4.

8. Mitschele T, Diesel B, Friedrich M, Meineke V, Maas RM, Gartner BC, et al. Analysis of the vitamin D system in basal cell carcinomas (BCCs). Lab Invest. 2004 Jun;84(6):693-702.

9. Jones JC, Steinman HK, Goldsmith BA. Hemidesmosomes, collagen VII, and intermediate filaments in basal cell carcinoma. J Invest Dermatol. 1989 Nov;93(5):662-71.

10. Saldanha G, Fletcher A, Slater DN. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. Br J Dermatol. 2003 Feb;148(2):195-202.

11. Klein E, Stoll HL, Jr., Milgrom H, Case RW, Traenkle HL, Graham S, et al. Tumors of the Skin. Iv. Double-Blind Study on Effects of Local Administration of Anti-Tumor Agents in Basal Cell Carcinoma. J Invest Dermatol. 1965 May;44:351-3.

12. Gross K, Kircik L, Kricorian G. 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial Basal cell carcinoma: efficacy, tolerability, cosmetic outcome, and patient satisfaction. Dermatol Surg. 2007 Apr;33(4):433-9; discussion 40.

De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – Available from: http://www.icmje.org [2004 May 06].

13. Choontanom R, Thanos S, Busse H, Stupp T. Treatment of basal cell carcinoma of the eyelids with 5% topical imiquimod: a 3-year follow-up study. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007 Aug;245(8):1217-20.

14. Vanaclocha F, Dauden E, Badia X, Guillen C, Conejo-Mir JS, Sainz de Los Terreros M, et al. Cost-effectiveness of treatment of superficial basal cell carcinoma: surgical excision vs. imiquimod 5% cream. Br J Dermatol. 2007 Apr;156(4):769-71.

15. Armstrong BK, Kricker A. The epidemiology of UV induced skin cancer. J Photochem Photobiol B. 2001 Oct;63(1-3):8-18.

16. Corona R, Dogliotti E, D'Errico M, Sera F, Iavarone I, Baliva G, et al. Risk factors for basal cell carcinoma in a Mediterranean population: role of recreational sun exposure early in life. Arch Dermatol. 2001 Sep;137(9):1162-8.

17. Green A, Williams G, Neale R, Hart V, Leslie D, Parsons P, et al. Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. Lancet. 1999 Aug 28;354(9180):723-9.

18. Beukers R, Berends W. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. Biochim Biophys Acta. 1960 Jul 15;41:550-1.

19. Setlow RB, Carrier WL. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. J Mol Biol. 1966 May;17(1):237-54.

20. Varghese AJ, Patrick MH. Cytosine derived heteroadduct formation in ultraviolet-irradiated DNA. Nature. 1969 Jul 19;223(5203):299-300.

21. Peak JG, Peak MJ. Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays. Mutat Res. 1991 Jan;246(1):187-91.

22. Setlow RB, Carrier WL. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 1964 Feb;51:226-31.

23. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov 15;88(22):10124-8.

24. Sarasin A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. Mutat Res. 1999 Jul 16;428(1-2):5-10.

25. Ziegler AL, D.J.; Kunala, S.; Sharma, H.W.; Gailani, M.; Simon, J.A.; Halperin, A.J.; Baden, H.P.; Shapiro, P.E.; Bale, A.E.; et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(9):4216-20.

26. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell. 1993 Dec 3;75(5):1027-38.

27. Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. Cancer Res. 1994 Oct 1;54(19):5059-63.

28. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. Science. 1993 May 7;260(5109):810-2.

29. Palombo F, Hughes M, Jiricny J, Truong O, Hsuan J. Mismatch repair and cancer. Nature. 1994 Feb 3;367(6462):417.

30. Young LC, Listgarten J, Trotter MJ, Andrew SE, Tron VA. Evidence that dysregulated DNA mismatch repair characterizes human nonmelanoma skin cancer. Br J Dermatol. 2008 Jan;158(1):59-69.

31. Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T, Seidman M, Stollar BD. Characterization of genomic poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequences: structure, organization, and conformation. Mol Cell Biol. 1984 Dec;4(12):2610-21.

32. Spitzner JR, Chung IK, Muller MT. Eukaryotic topoisomerase II preferentially cleaves alternating purine-pyrimidine repeats. Nucleic Acids Res. 1990 Jan 11;18(1):1-11.

33. Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. J Cutan Pathol. 2005 Mar;32(3):191-205.

34. Hussein MR, Wood GS. Microsatellite instability and its relevance to cutaneous tumorigenesis. J Cutan Pathol. 2002 May;29(5):257-67.

35. Thiagalingam S, Foy RL, Cheng KH, 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 Jan;14(1):65-72.

36. Madan V, Hoban P, Strange RC, Fryer AA, Lear JT. Genetics and risk factors for basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2006 May;154 Suppl 1:5-7.

37. Daya-Grosjean L, Couve-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. Cancer Lett. 2005 Jul 28;225(2):181-92.

38. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Kohler B, Schonicke A, Scharwachter C, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. Br J Dermatol. 2005 Jan;152(1):43-51.

39. Dlugosz A, Merlino G, Yuspa SH. Progress in cutaneous cancer research. J Investig Dermatol Symp Proc. 2002 Dec;7(1):17-26.

40. Gomes GP, Moraes AM, Stoff HO, Ward LS. Allelic imbalance studies of chromosome 9 suggest major differences in chromosomal instability among nonmelanoma skin carcinomas. Sao Paulo Med J. 2004 Jan 8;122(1):18-21.

41. Ashton KJ, Weinstein SR, Maguire DJ, Griffiths LR. Molecular cytogenetic analysis of basal cell carcinoma DNA using comparative genomic hybridization. J Invest Dermatol. 2001 Sep;117(3):683-6.

42. Happle R. Loss of heterozygosity in human skin. J Am Acad Dermatol. 1999 Aug;41(2 Pt 1):143-64.

43. Holmberg E, Rozell BL, Toftgard R. Differential allele loss on chromosome 9q22.3 in human non-melanoma skin cancer. Br J Cancer. 1996 Jul;74(2):246-50.

44. Saridaki Z, Koumantaki E, Liloglou T, Sourvinos G, Papadopoulos O, Zoras O, et al. High frequency of loss of heterozygosity on chromosome region 9p21-p22 but lack of p16INK4a/p19ARF mutations in greek patients with basal cell carcinoma of the skin. J Invest Dermatol. 2000 Oct;115(4):719-25.

45. Ribeiro GR, Francisco G, Teixeira LV, Romao-Correia RF, Sanches JA, Jr., Neto CF, et al. Repetitive DNA alterations in human skin cancers. J Dermatol Sci. 2004 Nov;36(2):79-86.

46. Francisco G, Neto CF, Sanches JA, Jr., Ruiz IR. Genomic instability in basal cell carcinomas. J Dermatol Sci. 2005 Sep;39(3):186-8.

47. Santos DCC, Zaphiropoulos PG, Festa Neto C, Pimentel ERA, JA. SJ, Ruiz IRG. PTCH1 gene mutations in exon 17, and LOH on D9S180 microsatellite in human sporadic and inherited BCCs. J Dermatol Sci submetido 2008.

48. Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. Gut. 2008 Jul;57(7):941-50.

49. Velasco A, Pallares J, Santacana M, Yeramian A, Dolcet X, Eritja N, et al. Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. Int J Gynecol Pathol. 2008 Jul;27(3):305-17.

50. Pal T, Permuth-Wey J, Sellers TA. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. Cancer. 2008 Aug 15;113(4):733-42.

51. Boonen SE, Stahl D, Kreiborg S, Rosenberg T, Kalscheuer V, Larsen LA, et al. Delineation of an interstitial 9q22 deletion in basal cell nevus syndrome. Am J Med Genet A. 2005 Jan 30;132A(3):324-8.

52. Lupi O. Correlations between the Sonic Hedgehog pathway and basal cell carcinoma. Int J Dermatol. 2007 Nov;46(11):1113-7.

53. Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. Mutat Res. 2006 Nov-Dec;613(2-3):76-102.

54. Jalota A, Singh K, Pavithra L, Kaul-Ghanekar R, Jameel S, Chattopadhyay S. Tumor suppressor SMAR1 activates and stabilizes p53 through its arginine-serine-rich motif. J Biol Chem. 2005 Apr 22;280(16):16019-29.

55. Rampalli S, Pavithra L, Bhatt A, Kundu TK, Chattopadhyay S. Tumor suppressor SMAR1 mediates cyclin D1 repression by recruitment of the SIN3/histone deacetylase 1 complex. Mol Cell Biol. 2005 Oct;25(19):8415-29.

56. Singh K, Mogare D, Giridharagopalan RO, Gogiraju R, Pande G, Chattopadhyay S. p53 target gene SMAR1 is dysregulated in breast cancer: its role in cancer cell migration and invasion. PLoS ONE. 2007;2(7):e660.

ANEXOS

ANEXO A – Tabelas descritivas dos pacientes avaliados.

Total de CBCs no paciente	Número de pacientes	Porcentagem (%)
1	12	63,16
2	3	15,79
3	2	10,53
5	2	10,53

Localização	Número de tumores	Porcentagem (%)
Face	26	76,47
Braços	2	5,88
Tórax	2	5,88
Outros	4	11,76

Diagnóstico histológico	Número de tumores	Porcentagem (%)
Nodular	15	44,12
Micronodular	10	29,41
Esclerodermiforme	3	8,82
Outros	6	17,65

Gênero	Número de tumores	Porcentagem (%)
Feminino	9	26,47
Masculino	25	73,53

Idade de detecção	Número de tumores	Porcentagem (%)
40 – 50	6	17,65
51 – 60	5	14,71
61 – 70	12	35,29
71 – 80	2	5,88
81 – 90	7	20,59
não informado	2	5,88

Fototipo	Número de tumores	Porcentagem (%)
2	12	35,29
3	17	50,00
4	3	8,82
não informado	2	5,88

ANEXO B – Extração de DNA de tecidos

- *Preparo do tecido fresco:*

Lavar o Biopulverizador com H_2O, detergente, $H_2O_{destilada}$ e álcool, secar bem. Biopulverizar a amostra congelada em nitrogênio líquido, em uma bandeja com gelo seco. Transferir o material biopulverizado para um tubo de ensaio Corex®. Seguir a extração de DNA.

- *Extração de DNA*

Adicionar aproximadamente 2,5 ml TES e proteinase K 100μg/μl, em um tubo Corex®. Colocar em banho-maria a 37 ºC *overnight* ou 50ºC por 2 a 4 hrs.Fenol/Clorofórmio/ Álcool Isoamílico (50 %/ 48 %/ 2 %) em igual volume da solução anterior. Agitar 15 min. por inversão, e depois centrifugar a 4 ºC em 10.000 r.p.m. por 20 min. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo

- Precipitação do DNA

Adicionar o acetato de sódio 500 mM (concentração final em relação ao volume do sobrenadante). Adicionar 2,5 volumes de etanol absoluto gelado (em relação ao volume do sobrenadante). Inverter o tubo lentamente (observar a "nuvem" de DNA). Colocar no freezer –20 ºC overnight, ou –70 ºC por 2 hrs. Centrifugar a 10.000 r.p.m. 4 ºC por 10 min. e descartar o sobrenadante. Adicionar 2 volumes de etanol 70 % gelado. Centrifugar a 10.000 r.p.m., a 4 ºC por 10 min. e descartar o sobrenadante. Secar o pellet (DNA) no vácuo por 20 min. exatos. Ressuspender em H_2O_{milliq} ou TE e armazenar a 4 ºC

ANEXO C – Preparo das amostras de sangue para extração de DNA

- *Lise de Hemácias*

Colocar 10 ml de sangue em um tubo de ensaio Corex®. Adicionar 5 ml de Solução Tampão de Lise e completar com 20 ml de H_2O Milliq estéril. Homogeneizar, deixar no gelo por 2 hrs. Centrifugar a 10000 r.p.m. a 4 ºC por 10 min. e descartar o sobrenadante. Seguir a extração de DNA padrão

ANEXO D – Preparo de gel de poliacrilamida para amostras de DNA

- Gel de poliacrilamida 7 %

Colocar em uma proveta:

38 ml de H_2O, 7 ml de Instagel 50%, 2,5 ml de Glicerol, 2,5 ml de TEB 10X, 180μl de persulfato de amônio 10%*, 25 μl de TEMED*

* Adicionar por último, essas soluções iniciam a polimerização do gel

- Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata

- Solução Fixadora

  60 ml de etanol absoluto

  4,5 ml de ácido acético glacial

  Completar com H_2O para 600 ml

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

- Solução de Nitrato de Prata

  0,30 g de $AgNO_3$

  10 ml de $H_2O_{destilada}$, em um bécker pequeno e dissolver a prata

  Adicionar essa solução a solução anterior, deixar sobre agitação por mais 10min.

  Retirar as soluções, descartar e lavar o gel com $H_2O_{destilada}$ rapidamente.

- Solução Reveladora

  4,5 g de NaOH (3%) em 100 ml de água, até dissolver completamente

  Adicionar 450 μl de formaldeído (0,3%)

  Completar com $H_2O_{destilada}$ 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 sob luz branca (capturador de imagens Kodak 1D 3.6 *Scientific Imaging Sistem*®).

ANEXO E – Eluição de bandas de DNA de géis de agarose

- Eluição de bandas de gel de agarose

Recortar a banda selecionada com espátula ou bisturi evitando exposição ao UV. Colocar o material em eppendorf de 1,5 ml e cobrir com TE. Deixar a -20º C *overnight.* Preparar envelopes de parafilme cuidando para que as laterais estejam bem unidas para evitar extravasamento do material. Colocar o gelo que se formou do congelamento de agarose e TE dentro do envelope de parafilme. Fechar a parte superior do envelope de parafilme. Triturar o gelo contido no envelope de parafilme até que só reste líquido dentro do mesmo. Com o auxílio de uma pipeta, retirar o líquido de dentro do envelope e transferir para um *eppendorf* limpo. Deverão sobrar pequenos fragmentos de gel de agarose dentro do envelope que não são sugados pela pipetagem.

- Precipitação do fragmento de DNA

Adicionar 500 mM de acetato de sódio ao volume obtido. 2,5 vezes o volume inicial de etanol absoluto. Deixar -20 ºC *overnight.* Centrifugar a 15000 r.p.m. durante 15 min. Observar se há formação de *pellet* e descartar o sobrenadante. Adicionar o mesmo volume de etanol 75 % e centrifugar em seguida a 15000 r.p.m. durante 15 min. Descartar o sobrenadante. Ressuspender o *pellet* em 30 µl de H_2O_{milliQ} autoclavada.

ANEXO F – Processos de clonagem e transformação de fragmento de DNA em bactérias

- Clonagem molecular

Ligação do inserto ao plasmídeo pGEM T Easy Vector (Promega)

Reagentes	Reação Teste	*C +	*C -
2x buffer DNA ligase	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
pGEM T EasyVector (50ng/µl)	0,5 µl	1,0 µl	1,0 µl
Produto do PCR	1 µl (25 ng/µl)	-	-
Control insert DNA	-	2,0 µl	-
T4 DNA ligase (3 weiss units/ µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
$Água_{milliQ}$ - Vol. Final	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl

* Controles positivo e negativo.

Misturar a reação pipetando e incubar a reação *overnight* a 15 ºC.

- Preparação de bactérias competentes:

Colocar uma pequena colônia de *Escherichia coli DH5α* em 5,0 ml de meio LB sem antibiótico, manter a 37 ºC sob agitação, *overnight*. Após o crescimento, inocular 10 µl desta em 50 ml de meio LB, manter sob agitação 22 r.p.m. a 37 ºC, até atingir $D.O._{600nm}$, próximo a 0,3. Incubar por 1 hr a 0 ºC. Transferir para um tubo Falcon de 50 ml. Centrifugar a 5000 r.p.m. por 5 min. para sedimentar as bactérias. Descartar o sobrenadante e ressuspender em 25 ml de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 50 mM gelado. Incubar 30 min. no gelo. Centrifugar novamente a 5000 r.p.m. por 5 min. Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 1,25 ml de $CaCl_2$ 50 mM. As bactérias competentes podem ser estocadas em geladeira por até 1 semana ou a -70 ºC em 15 % de glicerol por períodos mais longos, porém foi observada a queda da eficiência da transformação após longo tempo de armazenagem (mais de 3 meses).

- Transformação bacteriana

Antes de serem utilizadas, as placas devem ser mantidas invertidas na estufa 37 ºC por 30 min. A 2 µl da reação de ligação (plasmídeo + inserto) foram acrescentados 100 µl de TE e 100 µl de *E. coli* competentes. Incubar por 20 min. a 0 ºC. Submeter a um choque térmico (42 ºC) por 5 min. Colocar 800 µl de meio LB pré-aquecido (37

ºC) as células. Manter sob agitação de 22 r.p.m. a 37 ºC por 45 min. Realizar 3 controles simultaneamente:

1. Eficiência da transformação (meio de cultura com antibiótico): substituir a mistura de ligação por 10 ng de *pUC* íntegro.
2. Viabilidade das bactérias após a competência (meio de cultura sem antibiótico): plaquear apenas bactérias competentes sem plasmídeo
3. Eficiência da Ampicilina (meio com antibiótico + bactéria competente).

- Preparo de Placas:

Placa LB: 100 µl só de bactéria competente, controle da viabilidade bacteriana.
Placas LB ampicilina: 100 µl de plasmídio recombinantes (testes), 100 µl só de bactéria competente (controle da ampicilina), plasmídeos íntegros, *pUC* (controle da transformação), plasmídeos abertos, **C-** (controle interno do Kit de clonagem), plasmídeos íntegros, **C+** (controle interno do Kit de clonagem).
Plaquear 100 µL dos controles e das demais transformações com auxílio da alça de Drigalski autoclavada. Manter as placas a 37ºC *overnight*. Realizar a contagem do número de colônias obtidas e calcular a eficiência da transformação.

- Cálculo da eficiência da transformação

Contar o número de colônias em uma amostragem da placa, calcular o número médio de colônias da placa. Esta número de colônias é referente a 10ng de plasmídeo íntegro, calcular o número de colônias por micrograma de plasmídeo.

- Mini Prep – extração de DNA plasmidial

Escolher uma colônia das bactérias transformadas a partir dos stabs ou placa com LB e colocar em um tubo de ensaio com 5 ml de LB com 5 µl de ampicilina, *overnight* no *shaker* a 37 ºC. 1,5 ml de cultura que estava no LB e colocar no tubo de 1,5 ml. Centrifugar 1 min. a 13000 r.p.m. e jogar o sobrenadante fora. Acrescentar ao *pellet* 300 µl da solução TSTE + 4 µl de lisozima concentrada 10 mg/ml. 1' a 100º C (furar a tampa do tubo com uma agulha incandescente). Centrifugar 10 min. (13000 r.p.m.). Retirar o DNA bacteriano com um palito. Adicionar 10 µl de DEPC, deixar 15 min. a 65 ºC (elimina as nucleases). Centrifugar 10 min. (13000 r.p.m.). Transferir o sobrenadante para um tubo novo. Adicionar ao

sobrenadante 100 mM de NaCl (concentração final) e colocar o mesmo volume do sobrenadante de isopropanol. Centrifugar 15min. 13000 r.p.m. e descartar o sobrenadante

Adicionar o mesmo volume de etanol 70 %. Centrifugar 15 min. a 13000 r.p.m., jogar o sobrenadante fora e secar bem para eliminar todo o etanol. Ressuspender em 30 µl de TE contendo RNAse com concentração final de 10 mg/ml (Um µl da solução mãe (10mg/ml) mais 0,9 µl de água $_{\text{Milli-Q}}$)

- PCR de DNA plasmidial

3,0 µl de buffer (10x)
1,5 µl de $MgCl_2$ (50 mM)
1,0 µl de dNTP mix (10 mM)
2,0 µl de *primer* SP6 (20 pmol)
2,0 µl de *primer* T7 (20 pmol)
0,3 µl de Taq (1,5 U)
1,0 µl de Mini Prep
19,2 µl de água $_{\text{Milli-Q}}$

Desnaturação: 94º C por 1 min.
Anelamento: 54º C por 1 min.
Extensão: 72º C por 1 min.
Extensão final: 72º C por 5 min.
35 ciclos

Primers
SP6: ATT TAG GTG ACA CTA TAG - Reverso
T7: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - Direto

- Digestão enzimática para isolamento do inserto

Colocar em um *eppendorf* no gelo:
3,0 µl de Tampão de Digestão 10x
100 ng da amostra da miniprep
0,3 µl de *EcoRI*

X µl de TE q.s.p 30 µl

Deixar em banho-maria a 37º C por 2 hrs. no mínimo e submeter a amostra a eletroforese em gel de agarose 1% com lambda 100 e 50 ng para avaliar a quantidade obtida de inserto.

ANEXO G – PCR para seqüenciamento de fragmentos de DNA

- PCR de seqüenciamento - Kit Big Dye Terminator - v3.1

3,0 µl *Save Money Buffer*

1,0 µl *Big Dye*

1,3 µl *primer* (1,6 pmol) T7 (direto) ou SP6 (reverso)

150 ng DNA

Completar com 10 µl de H_2O_{milliQ} autoclavada.

Desnaturação: 96 ºC por 10 seg.

Anelamento: 52 ºC por 20 seg.

Extensão: 60 ºC por 4 min.

40 ciclos.

4 ºC para parar a reação

- Purificação do PCR - DNA and Gel band purification Kit (GE)

Colocar a coluna dentro do tubo coletor. Colocar 500 µl de *Capture Buffer* na coluna. Colocar até 100 µl de reação de PCR. Pipetar de 4 a 5 vezes para misturar. Centrifugar a 13000 r.p.m. por 30 seg. Retirar a coluna e jogar fora o conteúdo do tubo coletor. Voltar a coluna para o tubo coletor. Colocar 500 µl de *Wash Buffer* e centrifugar a 13000 r.p.m. por 30 seg. Jogar fora o tubo coletor. Colocar um tubo de 1,5 ml novo em baixo da coluna. Colocar 50 µl de tampão de eluição (TE pH 8,0; Tris-HCl, água bidestilada autoclavada). Deixar 1 min. em temperatura ambiente. Centrifugar a 13000 r.p.m. por 1 min. Armazenar o produto da purificação sob refrigeração

ANEXO H – Tabela dos pacientes e respectivos tumores avaliados com cada microssatélite

Número	Histologia	Local	Idade	Sexo	Fototipo	D9S15	D9S50	D9S52	D9S180	D9S196	D9S280	D9S287
260	CBC NODULAR	FACE	83	M	3	OK	OK	OK	OK	LOH	OK	OK
261	CBC ESCLERODERMIFORME	FACE	82	F	3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
262	CBC ESCLERODERMIFORME	BRAÇOS	62	M	2	OK	MSI	LOH	OK	OK	OK	OK
262	METATÍPICO	FACE				MSI	OK	OK	OK	OK	OK	OK
262	CBC ESCLERODERMIFORME	FACE				MSI	OK	LOH	LOH	OK	LOH	OK
262	CBC NODULAR	FACE				MSI	OK	OK	OK	OK	OK	OK
262	CBC NODULAR	FACE				OK	OK	MSI	LOH	OK	OK	OK
264	CBC MICRONODULAR	FACE	65	M	2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
264	CBC MICRONODULAR	FACE				OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
264	CBC MICRONODULAR	FACE				NI	OK	NI	OK	OK	OK	OK
265	CBC NODULAR	FACE	82	M	4	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
266	CBC MICRONODULAR	FACE	52	F	3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	LOH
266	CBC MICRONODULAR	FACE				OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
267	CBC NODULAR	FACE	46	M	3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
267	CBC NODULAR	FACE				OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
267	CBC NODULAR	TÓRAX				OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
267	CBC MICRONODULAR	FACE				OK	OK	OK	OK	NI	OK	OK
267	CBC NODULAR	TÓRAX				OK	MSI	OK	OK	OK	OK	OK
268	CBC NODULAR	FACE	60	M	4	OK	MSI	OK	MSI	OK	OK	OK
268	CBC NODULAR					NI	OK	NI	NI	OK	NI	NI
269	CBC MICRONODULAR	FACE	81	M	3	OK	OK	OK	OK	NI	OK	MSI
271	CBC NODULAR	FACE	66	M	2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
272	CBC NODULAR	FACE	50	M	3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
273	CBC MICRONODULAR	FACE	55	F	3	MSI	OK	OK	OK	OK	OK	OK
274	CBC MICRONODULAR	FACE	61	M	2	OK	OK	OK	NI	OK	NI	OK
274	QUERATOSE ACTÍNICA	FACE				NI	OK	OK	OK	OK	OK	OK
275	CBC MICRONODULAR	FACE	89	F	3	OK	OK	OK	OK	OK	MSI	OK
276	CBC NODULAR			F		OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
277	CBC ADENÓIDE	FACE	77	M	3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
278	CBC NODULAR	FACE	66	M	2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
279	CBC NODULAR	FACE		M		OK	OK	OK	MSI	OK	OK	OK
282	CBC NODULAR	BRAÇOS	80	F	3	OK	OK	OK	OK	NI	OK	OK

ANEXO I – Tabelas dos pacientes e respectivos tumores avaliados com cada primer de RAPD

OPA:

Número	Histologia	Local	Idade	Sexo	Pele	OPA-2	OPA-7	OPA-5	OPA-11	OPA-13	OPA-17
260	CBC NODULAR	FACE	83	M	3	PERDA	GANHO	PERDA	PERDA	PERDA	OK
261	CBC ESCLERODERMIFORME	FACE	82	F	3	OK	GANHO	GANHO	PERDA	GANHO	GANHO
262	CBC ESCLERODERMIFORME	BRAÇOS	62	M	2	PERDA	PERDA	GANHO	PERDA	PERDA	PERDA
262	METATÍPICO	FACE				OK	PERDA	GANHO	PERDA	PERDA	PERDA
262	CBC ESCLERODERMIFORME	FACE				OK	GANHO	GANHO	PERDA	GANHO	GANHO
262	CBC NODULAR	FACE					GANHO	PERDA	PERDA	PERDA	PERDA
262	CBC NODULAR	FACE				OK	GANHO	OK	PERDA	PERDA	PERDA
264	CBC MICRONODULAR	FACE	65	M	2	OK	GANHO	PERDA	PERDA	OK	
264	CBC MICRONODULAR	FACE				GANHO	GANHO	GANHO	PERDA	OK	OK
264	CBC MICRONODULAR	FACE				GANHO	GANHO	GANHO	PERDA	GANHO	GANHO
265	CBC NODULAR	FACE	82	M	4	GANHO	PERDA	GANHO	PERDA	PERDA	OK
266	CBC MICRONODULAR	FACE	52	F	3	GANHO	OK		GANHO	PERDA	GANHO
266	CBC MICRONODULAR	FACE				PERDA	OK		GANHO	OK	
267	CBC NODULAR	FACE	46	M	3	GANHO	GANHO	PERDA	GANHO	GANHO	OK
267	CBC NODULAR	FACE				PERDA	GANHO	PERDA	GANHO	GANHO	
267	CBC NODULAR	TÓRAX				PERDA	GANHO	GANHO	PERDA	GANHO	OK
267	CBC MICRONODULAR	FACE				PERDA	OK	GANHO	GANHO	GANHO	OK
267	CBC NODULAR	TÓRAX				PERDA	OK		GANHO	PERDA	
268	CBC NODULAR	FACE	60	M	4	OK	OK	OK	GANHO	GANHO	OK
268	CBC NODULAR										
269	CBC MICRONODULAR	FACE	81	M	3		PERDA		PERDA		PERDA
271	CBC NODULAR	FACE	66	M	2	GANHO	OK	PERDA	PERDA	GANHO	OK
272	CBC NODULAR	FACE	50	M	3	OK		PERDA	OK	PERDA	
273	CBC MICRONODULAR	FACE	55	F	3	PERDA	OK	GANHO	OK	GANHO	OK
274	CBC MICRONODULAR	FACE	61	M	2	PERDA	OK			GANHO	
274	QUERATOSE ACTÍNICA	FACE									OK
275	CBC MICRONODULAR	FACE	89	F	3	PERDA	OK	OK	GANHO	OK	OK
276	CBC NODULAR			F		OK	OK	OK	OK	OK	OK
277	CBC ADENÓIDE	FACE	77	M	3	OK	OK	OK	PERDA	OK	OK
278	CBC NODULAR	FACE	66	M	2	OK	OK	OK	OK	GANHO	OK
279	CBC NODULAR	FACE		M		OK	OK	GANHO	PERDA	PERDA	OK
282	CBC NODULAR	BRAÇOS	80	F	3	PERDA	OK	OK	GANHO	GANHO	GANHO

OPB:

Número	Histologia	Local	Idade	Sexo	Pele	OPB-1	OPB-8	OPB-11	OPB-13	OPB-19
260	CBC NODULAR	FACE	83	M	3	PERDA	GANHO	PERDA		GANHO
261	CBC ESCLERODERMIFORME	FACE	82	F	3	PERDA	PERDA	GANHO		GANHO
262	CBC ESCLERODERMIFORME	BRAÇOS	62	M	2	PERDA	OK			PERDA
262	METATÍPICO	FACE				GANHO	OK	PERDA	GANHO	GANHO
262	CBC ESCLERODERMIFORME	FACE				GANHO	GANHO	OK	PERDA	
262	CBC NODULAR	FACE				PERDA	PERDA	PERDA	PERDA	PERDA
262	CBC NODULAR	FACE				GANHO	PERDA	PERDA	PERDA	PERDA
264	CBC MICRONODULAR	FACE	65	M	2	OK	GANHO	OK		
264	CBC MICRONODULAR	FACE				GANHO	GANHO	PERDA	OK	OK
264	CBC MICRONODULAR	FACE				GANHO	GANHO	OK	OK	OK
265	CBC NODULAR	FACE	82	M	4	GANHO	GANHO	PERDA	PERDA	
266	CBC MICRONODULAR	FACE	52	F	3	GANHO	PERDA	OK	OK	
266	CBC MICRONODULAR	FACE				GANHO	PERDA	OK		
267	CBC NODULAR	FACE	46	M	3	PERDA	PERDA	GANHO	PERDA	GANHO
267	CBC NODULAR	FACE				PERDA	PERDA	GANHO	GANHO	PERDA
267	CBC NODULAR	TÓRAX				PERDA	GANHO	GANHO	GANHO	PERDA
267	CBC MICRONODULAR	FACE				PERDA	GANHO	GANHO	GANHO	PERDA
267	CBC NODULAR	TÓRAX					OK	PERDA		
268	CBC NODULAR	FACE	60	M	4		OK	GANHO	OK	
268	CBC NODULAR									
269	CBC MICRONODULAR	FACE	81	M	3			PERDA		
271	CBC NODULAR	FACE	66	M	2	OK	GANHO	OK	OK	
272	CBC NODULAR	FACE	50	M	3	PERDA	GANHO	GANHO	GANHO	PERDA
273	CBC MICRONODULAR	FACE	55	F	3	PERDA	GANHO	OK	PERDA	PERDA
274	CBC MICRONODULAR	FACE	61	M	2	PERDA	OK	PERDA		
274	QUERATOSE ACTÍNICA	FACE					OK			
275	CBC MICRONODULAR	FACE	89	F	3	OK	GANHO	PERDA	GANHO	GANHO
276	CBC NODULAR			F		PERDA	OK	GANHO	GANHO	PERDA
277	CBC ADENÓIDE	FACE	77	M	3	OK	OK		GANHO	GANHO
278	CBC NODULAR	FACE	66	M	2	GANHO	OK	PERDA	OK	GANHO
279	CBC NODULAR	FACE		M		OK	PERDA	OK	GANHO	
282	CBC NODULAR	BRAÇOS	80	F	3	GANHO	GANHO	OK	GANHO	GANHO