ALBERTO EDUARDO OITICICA CARDOSO

Estudo clínico e de mutações no gene *PTCH1* em pacientes portadores de carcinomas basocelulares múltiplos familiares não sindrômicos

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

Programa de: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Cyro Festa Neto

SÃO PAULO

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cardoso, Alberto Eduardo Oiticica
Estudo clínico e de mutações no gene *PTCH1* em pacientes portadores de carcinomas basocelulares múltiplos familiares não sindrômicos / Alberto Eduardo Oiticica Cardoso. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.
Orientador: Cyro Festa Neto.

Descritores: 1.Carcinoma basocelular 2.Síndrome do nevo basocelular 3.Genes neoplásicos 4.Mutação em linhagem germinativa 5.Mutação 6.Éxons/genética

USP/FM/DBD-211/10

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Alberto e meu avô Aldo (*in memorian*) pelos ensinamentos, amor, inspiração para minha vida e profissão.

A minha mãe Silvana pelo exemplo de vida, sempre com amor e sabedoria, iluminando meus passos.

Aos meus amados irmãos Camila e Henrique pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos pelo estímulo constante

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cyro Festa Neto, meu grande mestre, orientador deste trabalho e amigo pela paciência, confiança e ensinamentos imprescindíveis para o término deste trabalho.

À Profa. Dra. Itamar Romano Ruiz, do laboratório de genética do Instituto Butantan, por todo o suporte e auxílio durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Evandro Rivitti, por todos os ensinamentos durante minha formação e pela oportunidade para realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. José A. Sanches Jr., Valéria Aoki e Itamar Ruiz, pela arguição no exame de qualificação, indicando-me os melhores caminhos para o aprimoramento e término desta dissertação.

À bióloga Alessandra Finardi pós-graduanda da USP, pelas orientações e grande ajuda na realização deste projeto.

Aos Profs Drs Luís Carlos Cucé, Walter Belda Jr e Dra Zilda Najjar Prado de Oliveira que sempre me incentivaram.

Ao Prof. Dr. Eugênio Pimentel, pelo ensinamento cirúrgico proporcionado.

Ao Dr Luís Guilherme Martins Castro pelos conhecimentos transmitidos e amizade ao longo dos anos nesses anos.

Ao Prof. Dr Alberto Ferraz pelo apoio em muitos momentos e grande amizade.

A todos os colegas do departamento de dermatologia pelo apoio, auxílio e incentivo.

Ao biólogo Ricardo Spina pelo auxílio na coleta de material.

À Sra. Eli Maria de Freitas Ferreira, pela ajuda nos assuntos burocráticos.

Aos colegas do Laboratório de Genética do Instituto Butantan pelo auxílio e
cordialidade durante a realização deste projeto.

A todos os funcionários do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e para todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Em especial a todos os pacientes, sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 3

3 REVISÃO DE LITERATURA 5

3.1 Carcinoma basocelular: aspectos epidemiológicos 6

3.1.1 Síndromes Associadas ao Carcinoma Basocelular Múltiplo 8

3.1.1.1 Síndrome de Bazex-Dupré-Christol 8

3.1.1.2 Síndrome de Rombo 8

3.1.1.3 Síndrome do Nevo Basocelular 8

3.1.2 Síndromes associadas a CBC múltiplos não definidas 9

3.1.2.1 Carcinomas Basocelulares Múltiplos Hereditários Infudibulocísticos (CBCMHI) 9

3.1.2.2 Carcinomas Basocelulares Múltiplos Familiares Não Sindrômicos (CBCMFNS) 10

3.2 Carcinogênese do CBC 10

3.2.1 Oncogenes e Genes Supressores Tumorais.....11

3.2.1.1 Proto-oncogenes:..... 12

3.2.1.1.1 Gene *SMO* 12

3.2.1.1.2 *Gene GLI1*..... 12

3.2.1.2 Genes supressores tumorais 13

3.2.1.2.1 Gene *CDKN2A* 13

3.2.1.2.2 *Gene TP53*..... 14

3.2.1.2.3 Gene *PTCH*..... 16

3.2.2 Carcinogênese e gene *PTCH1* 21

4 MÉTODOS..... 27

4.1 Casuística 28

4.2 Métodos 31

4.2.1 Extração do sangue total.....31

4.2.2 Extração do DNA genômico dos leucócitos de sangue total 31

4.2.3 Estratégia de amplificação 32

4.2.4 Eletroforese e eluição 34
4.2.5 Clonagem molecular 35
4.2.5.1 Preparação de bactérias competentes 36
4.2.5.2 Transformação de bactérias competentes 36
4.2.5.3 Plaqueamento 36
4.2.5.4 Obtenção de DNA de plasmídeo recombinante (Miniprep) 37
4.2.5.5 PCR dos clones para sequenciamento 37
4.3 Sequenciamento de DNA 38
4.4 Análise das sequências 38

5 Resultados 39

5.1 Quantificação do dna 40
5.2 Amplificação dos éxons analisados do gene *PTCH1* 40
5.3 Obtenção de DNA de plasmídeo recombinante (Miniprep) 42
5.4 PCR dos clones para sequenciamento 43
5.5 Seqüenciamento automático dos éxons e íntrons 44
5.5.1 Éxon 9 44
5.5.2 Íntron 10 45
5.5.3 Éxon 11 48
5.5.4 Íntron 15 48
5.5.5 Éxon 16 50
5.5.6 Íntron 16 50
5.5.7 Éxon 17 54
5.5.8 Íntron 17 54
5.5.9 Éxon 23 55

6 DISCUSSÃO 61

7 CONCLUSÃO 68

8 ANEXOS 70

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido 71

9 REFERÊNCIAS 75

RESUMO

Cardoso AEO. *Estudo clínico e de mutações no gene PTCH1 em pacientes portadores de carcinomas basocelulares múltiplos familiares não sindrômicos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 90p.

INTRODUÇÃO**:** O carcinoma basocelular (CBC) é o tipo de câncer cutâneo mais comum no ser humano. O aparecimento de CBC na maioria das vezes se dá de forma esporádica em indivíduos que se expõem cronicamente ao sol. Eventualmente pode estar associado a síndromes, como: Bazex-Dupré-Christol, Rombo e Gorlin-Goltz. Diferente do que ocorre nas síndromes, os casos de CBCs múltiplos familiares não sindrômicos(CBCMFNS) são poucos estudados, tendo na literatura somente cinco relatos de famílias com a doença. O fenótipo é de múltiplos CBCs superficiais sem presença de outras anormalidades. Devido os CBCs esporádicos e os CBCs presentes na Síndrome de Gorlin-Goltz apresentarem mutações no gene *PTCH1*, possivelmente os CBCs múltiplos também estejam associados a alterações neste gene. Este gene esta localizado na região 9q22.3 possuindo 23 éxons, tem um papel importante na formação embrionária e de supressão tumoral. OBJETIVO: Análise genética dos éxons 9,11, 16, 17 e 23 do *PTCH1* de oito componentes da mesma família, pertencentes a três diferentes gerações, sendo três portadores de CBCs múltiplos, e dentre estes dois suspeitos de CBCMFNS. MÉTODOS: Extração de DNA dos leucócitos do sangue periférico; PCR; clonagem dos produtos de amplificação (*pGEM T Easy Vector*) e seqüenciamento (*Big Dye Terminator Kit*). As mutações e polimorfismos encontrados foram comparados com a literatura e banco de dados de mutação do gene *PTCH1* (www.cybergene.se/PATCH). RESULTADOS: Duas novas mutações foram encontradas nos pacientes suspeitos de CBCMFNS: uma *frameshift* nt4130(del C) e uma *missense* nt4261(A→G). Nos familiares foram encontradas cinco novas mutações: Em um primeiro indivíduo uma *missense* nt1420(G→T); em um segundo a mesma *missense* nt1420(G→T) e mais uma *missense* nt2873(C→T); em um terceiro duas *frameshift* nt1443 (ins T) e nt1468 (ins T), em dois outros indivíduos, irmãos, uma outra mutação *missense* nt4130(C→T). Foram encontradas ainda dezoito mutações, não descritas anteriormente, nos íntrons 10,15,16 e 17, algumas se repetindo em todos os indivíduos analisados. CONCLUSÃO**:** Pela primeira vez estão sendo descritas mutações em éxons e íntrons do gene *PTCH1* em indivíduos portadores de CBCMFNS e em alguns de seus familiares.

Descritores: 1.Carcinoma basocelular 2.Síndrome do nevo basocelular 3.Genes neoplásicos 4.Mutação em linhagem germinativa 5.Mutação 6.Éxons/genética

SUMMARY

Cardoso AEO. *Clinical and PTCH1 gene mutations studies in patients bearing multiple familiar non-syndromic basal cell carcinomas* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 90p.

INTRODUCTION: Basal cell carcinomas (BCC) are the most usual skin cancer that affects human beings. Sporadic BCCs are prevalent, often arising in people chronically exposed to UV radiation from the sun. Eventually BCCs may be associated to different syndroms like Bazex-Dupré-Christol, Rambo and Gorlin. Contrarily to syndromic BCCs, the cases of multiple familiar nonsydromic BCCs(MFNSBCC) have only few studies found in the literature. Only five families have been described to date with the disease. Since sporadic and Gorlin BCCs are associated to many mutations in the *PTCH1* gene, we hypothesized that the multiple BCCs phenotype is also associated with mutations in this same gene. The *PTCH1* tumor suppressor gene is located in the 9q22.3 chromosomal region, contains 23 exons, and has an important role in embryogenesis. OBJETIVE: To perform genetic analysis of *PTCH1* exons 9, 11, 16, 17 e 23. METHODS: Eight individuals belonging to different generations from the same family were studied. Three of them bore multiple BCCs, and two of those were suspect to have MFNSBCC. DNA was extracted from blood leukocytes, submitted to PCR, and the PCR products were cloned (pGEM T Easy Vector, Promega) and sequenced (Big Dye Terminator Kit; ABI Prism 3100 sequencer; Applied Biosystems). The polymorphisms and mutations found were analyzed and compared to literature and *PTCH1*database (www.cybergene.se/*PTCH*/). RESULTS: In the patients suspect of MFNSBCC were found two new mutation: one *frameshift* nt4130(del C) and one *missense* nt4261(A→G). In the relatives were found five new mutation: Three *missense* nt1420(G→T); nt2873(C→T); nt4130(C→T); and two *frameshift* nt1443 (ins T) and nt1468 (ins T). In the introns 10,15,16 and 17 were found eighteen new mutations that were not previously reported. CONCLUSION: For the first time mutation in exons and introns of *PTCH1* gene have been described in patients bore MFNSBCC and some of their relatives.

Descriptors: 1.Carcinoma basal cell 2.Basal cell nevus syndrome 3.Genes neoplasm 4.Germ-line mutation 5.Mutation 6.Exons/Genetics

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma basocelular (CBC) é o tipo de câncer cutâneo mais comum no ser humano. Sua incidência vem aumentando muito nas últimas décadas. [1]

A etiologia do CBC é multifatorial, fatores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (do hospedeiro) influenciam o desenvolvimento do tumor[2] assim como seu comportamento biológico. Dentre os fatores extrínsecos, o de maior importância é a radiação ultravioleta (UV) responsável por cerca de 90% dos casos. Menos importantes são as radiações ionizantes (principalmente RX) e os carcinógenos químicos (arsênico).[3-9] Dos fatores intrínsecos, incluem-se os genéticos (mutação dos genes *PTCH1* e *TP53*) e a imunidade do hospedeiro (imunocomprometidos iatrogênicos, portadores de tumores ocultos ou de infecção pelo HIV). [10,11,12]

O CBC eventualmente pode estar associado a síndromes, como: Bazex-Dupré-Christol, Rombo e Gorlin-Goltz.[13,14,15,16,17] Diferente do que ocorrem nas síndromes, os casos de CBCs múltiplos familiares não sindrômicos (CBCMFNS) são poucos estudados, tendo na literatura somente cinco relatos de famílias com a doença. O fenótipo é de múltiplos CBCs superficiais sem presença de outras anormalidades.[18]

Devido os CBCs esporádicos e os CBCs presentes na Síndrome de Gorlin-Goltz apresentarem mutações no gene *PTCH1*, possivelmente os CBCs múltiplos também estejam associados a alterações neste gene. Este gene esta localizado na região 9q22.3 possuindo 23 exons, tem um papel importante na formação embrionária, de supressão tumoral, sendo um dos integrantes da via de sinalização *hedgehog*.[19,20]

A ausência de estudos relacionando os casos de CBCs múltiplos familiares não sindrômicos (CBCMFNS) e o gene *PTCH1* nos estimulou a realizar este estudo.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é:

Estudar uma família com múltiplos carcinomas basocelulares não sindrômicos tentando identificar mutações que possam existir nos éxons 9, 11, 16, 17 e 23, e parcialmente nos íntrons 10, 11,15,16,17, 22 e 23 do gene *PTCH1*, no DNA da linhagem germinativa, e estabelecer possível correlação entre as mutações presentes em indivíduos acometidos e seus familiares.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Carcinoma basocelular: aspectos epidemiológicos e clínicos

O carcinoma basocelular (CBC) é o tipo mais comum de tumor maligno que o ser humano adquire no curso de sua vida. [2,10,15] Estima-se que são diagnosticados ao ano 1.890.000 novos casos destes tumores em todo mundo que são responsáveis por aproximadamente 70% do número total dos cânceres cutâneos. Fator relevante é o significativo aumento da incidência nas últimas décadas.[1]

A incidência de CBC no Brasil é desconhecida. Dados isolados obtidos de registros hospitalares, bases populacionais ou inquéritos epidemiológicos de câncer não refletem a realidade do problema (Instituto Nacional do Câncer). Mesmo assim, tem-se notado, à semelhança com o restante do mundo, aumento no número de casos.[15]

Além da alta incidência é considerado hoje de grande importância médica, pois, embora com taxas de mortalidade relativamente baixas, associam-se freqüentemente com alta morbidade como perda de função e desfiguramento.

A etiologia do CBC é multifatorial, fatores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (do hospedeiro) influenciam o desenvolvimento do tumor, assim como, seu comportamento biológico.[2] Dos fatores extrínsecos, o de maior importância é a radiação UV responsável por cerca de 90% dos casos. Menos importantes são as radiações ionizantes (principalmente RX) e os carcinógenos químicos (arsênico).[3-9] Dentre os fatores intrínsecos, incluem-se os genéticos (mutação dos genes *PTCH1* e *TP53*) e a imunidade do hospedeiro (imunocomprometidos iatrogênicos, portadores de tumores ocultos ou de infecção pelo HIV).[10,11,15]

O CBC apresenta-se sob várias formas clínicas, todas elas com predileção por áreas de exposição solar, principalmente face. Essas formas são abordadas a seguir.

O CBC nodular ou nódulo-ulcerativo é o tipo clínico mais freqüente, caracteriza-se por pápula ou nódulo perláceo com telangiectasias e margens bem definidas. Com o crescimento a lesão pode ulcerar (CBC ulcerado). A melanina pode estar presente na lesão em quantidades variáveis, tornando o tumor de coloração marrom clara a negra (CBC pigmentado). O crescimento é lento podendo com o tempo adquirir grandes dimensões, invadindo estruturas profundas como osso, cartilagem ou músculo podendo destruir pálpebras, orelhas e nariz. Quando cresce em profundidade é chamado de CBC terebrante e em superfície, CBC fagedênico nunca perdendo suas características morfológicas, principalmente nas bordas do tumor.[21]

O CBC superficial multicêntrico é variante comum do CBC, mais freqüente no tronco, também encontrado na cabeça e pescoço. É lesão plana, eritematosa com discreta descamação, podendo mostrar nas bordas aspecto papuloso e perláceo. O diâmetro varia de um a vários centímetros. No início, o crescimento é horizontal e lento podendo infiltrar-se com ulcerações e formações de nódulos. O crescimento subclínico lateral é importante por ser responsável pelas freqüentes recidivas destes tumores.[21,22]

O CBC esclerodermiforme apresenta-se como lesão endurecida de cor marfínica, podendo apresentar telangiectasias na superfície. É importante, por seu crescimento subclínico e pela maior possibilidade de recidivas após o tratamento.[21,23]

O CBC metastático é extremamente raro, sendo os sítios mais freqüentes de metástases os linfonodos, pulmões e ossos.[24,25]

O diagnóstico destes tumores é realizado através do exame clínico e histológico. Os dados de histologia permitem não somente o diagnóstico como também avaliar os riscos de possíveis recidivas, assim como, o planejamento terapêutico.

O aparecimento de CBC na maioria das vezes se dá de forma esporádica em indivíduo predisposto que se expõe cronicamente ao sol, eventualmente pode estar associado a outras doenças ou síndromes. Dentre as doenças, as mais comuns são o xeroderma pigmentoso e o albinismo, e dentre as síndromes a de Bazex-Dupré-Christol, Rombo e mais freqüentemente na síndrome do nevo basocelular.[18]

3.1.1 Síndromes Associadas ao Carcinoma Basocelular Múltiplo

3.1.1.1 Síndrome de Bazex-Dupré-Christol

A síndrome de Bazex-Dupré-Christol descrita no começo da década de 60 é rara, de herança ligada a X, se caracteriza pela presença de atrofodermia folicular, anidrose, hipotricose e múltiplos CBCs. A atrofodermia folicular é comumente presente e apresenta-se como lesões do tipo *ice piks* no dorso das mãos e pés. Os CBCs são freqüentes e geralmente iniciam-se no início da idade adulta com tendência de acometimento facial.[26,27,28]

3.1.1.2 Síndrome de Rombo

Descrita em 1981 a Síndrome de Rombo aparentemente pode ser uma variante da síndrome de Bazex-Dupre-Christol. Caracteriza-se por atrofodermia vermiculatum da face, telangiectasias, eritema acral e propensão ao desenvolvimento de CBCs.[14]

3.1.1.3 Síndrome do Nevo Basocelular

A síndrome do nevo basocelular (SNBC) ou de síndrome de Gorlin foi inicialmente descrita em 1894 por Jarisch e White, porém somente delineada em 1960 por Gorlin e Goltz.[29,30,31,32] A SNBC é autossômica dominante de alta penetrância e expressividade variável, afetando principalmente indivíduos da raça branca que apresentam múltiplos CBCs em áreas fotoexpostas e não fotoexpostas.[32] A taxa de prevalência varia de 1/57.000 até 1/256.000

nascidos.[31] Essa síndrome está ligada a mais de 100 anormalidades diferentes, as mais comuns são múltiplos CBCs, *pits* palmo plantares, ceratocistos mandibulares e calcificação da foice do cérebro.[30,33]

Os CBCs normalmente se desenvolvem entre a puberdade e os 35 anos de idade, apesar de existirem relatos de casos a partir dos 3 anos de idade. Podem variar em numero de poucas até centenas de lesões. Clinicamente variam de forma desde pápulas eritematosas até placas ulceradas, sendo as vezes confundidas com nevus ou hemangiomas. São mais comuns em áreas fotoexpostas, mas ocorrem também áreas não fotoexpostas tais como face, dorso e região peitoral.[7] A presença dos *pits* palmoplantares é um sinal patognomônico da doença, geralmente medem de 1 a 2 mm e tem distribuição assimétrica. Os pacientes podem apresentar ainda espinha bífida, alterações das costelas, cifoescoliose, hipertelorismo além de outras alterações ósseas.[30]

Recentemente foram descobertas mutações na linhagem germinativa do gene *PTCH1* nos portadores desta síndrome, sendo estas responsáveis pelo surgimento deste quadro.[34]

3.1.2 Síndromes associadas a CBC múltiplos não definidas

3.1.2.1 Carcinomas Basocelulares Múltiplos Hereditários Infudibulocísticos (CBCMHI)

Carcinoma basocelular infudibulocístico é uma variante recentemente descrita do CBC. Pode ser encontrada como uma lesão esporádica ou de forma hereditária com múltiplos tumores.[35]

As lesões clinicamente se caracterizam por múltiplas pápulas perláceas espalhadas pela face, podendo ocorrer em outras regiões . Os tumores na CBCMHI parecem ser menos agressivos que os outros tipos de CBC. As lesões permanecem pequenas, tendem a crescer lentamente e raramente ulceram. A herança parece ser autossômica dominante.[36,37] Foi demonstrado através de análise do DNA que o cromossomo 9 e o gene *PTCH1* podem estar envolvidos na origem do quadro, sugerindo uma ligação na patogenia da CBCMHI e a SNBC.[38]

3.1.2.2 Carcinomas Basocelulares Múltiplos Familiares Não Sindrômicos (CBCMFNS)

Diferente do que ocorre nas síndromes previamente descritas, os casos de múltiplos CBCs familiares não associados a síndromes estão ainda muito pouco estudados. São muito raros ou raramente reportados, havendo na literatura descritos apenas cinco relatos de famílias com a doença, em três foi demonstrado pacientes em duas gerações e em dois em três. [14,18,39]

O fenótipo postulado para esse quadro seria caracterizado por múltiplos CBCs superficiais, de início precoce, sem a presença de outras anormalidades. A aparência clínica desses tumores se diferenciava daqueles observados nas síndromes de Gorlin, Rombo e Bazex porque eles são mais comumente do tipo superficial e localizados preferencialmente no tronco.[18]

Entre os relatos há um onde houve transmissão entre indivíduos do sexo masculino sugerindo origem autossômica dominante.[14] Até o momento não houve estudos genéticos das famílias reportadas na literatura nem a descrição destes casos em livros textos de dermatologia. É portando importante o estudo destas famílias para se determinar a existência dessa doença como identidade separada das demais síndromes e a realização de estudos genéticos destes pacientes para se tentar determinar a mutação que leva ao quadro, o que foi motivo deste estudo.

3.2 Carcinogênese do CBC

Carcinogênese é o processo através do qual uma célula normal transforma-se em tumoral e a partir desta forma-se um clone de células alteradas que irá subseqüentemente gerar o tumor.

Os fundamentos da carcinogênese compreendem eventos múltiplos que levam a alterações gênicas irreversíveis das células:

1. autonomia das células, desencadeada por fatores de estímulo à proliferação;

2. insensibilidade das células a fatores antiproliferativos ;
3. evasão da apoptose – *TP53* e produção de fatores de sobrevivência potencial ilimitado da proliferação;
4. angiogênese sustentada;
5. capacidade de invasão tissular – metástases;
6. escape da vigilância imunológica (perda ou ganho de reguladores imunes).[40,41]

A autonomia nas respostas celulares aos estímulos proliferativos ocorre pela ativação de oncogenes. A proliferação descontrolada das células tumorais ocorre por inativação de genes supressores.[42]

A evasão da apoptose decorre da inativação do gene *TP53*, supressor de tumor e pela produção de fatores de sobrevivência. Também contribui para a proliferação celular desordenada a ação de telomerases ativas. [43]

Algumas destas características são adquiridas pela célula após uma única mutação, enquanto outras requerem múltiplas mutações.[43]

A ordem que ocorrem esses fenômenos essenciais à carcinogênese é variável nos diferentes tumores. Portanto o fenômeno da transformação de uma célula normal a neoplásica reside em alterações gênicas e pode-se afirmar que o câncer é uma doença gênica caracterizada por instabilidade genômica. [43]

Os carcinógenos ambientais atuam através de alterações gênicas que podem ser de vários tipos, substituições de bases, inserções, deleções e anormalidades cromossômicas. [43]

3.2.1 Oncogenes e Genes Supressores Tumorais

Existem, basicamente, duas categorias de genes envolvidos nas formações neoplásicas: os *oncogenes* e os *genes supressores tumorais.*

3.2.1.1 Proto-oncogenes:

O controle das atividades celulares normais é feito por muitos tipos de genes, entre eles os *proto-oncogenes*. Os oncogenes são proto-oncogenes que sofreram mutações ativadoras, ou seja, que passaram a ter ganho de função ou hiperexpressão. Uma característica importante dos oncogenes é que eles têm efeito dominante na célula, ou seja, um único alelo mutado é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula normal para maligna. Esses genes são responsáveis por aumentar a proliferação celular, ao mesmo tempo em que inibem a apoptose, eventos que podem dar início a uma neoplasia. As mutações formadoras de oncogenes são adquiridas, uma vez que, se ocorrerem na linhagem germinativa (mutações herdadas), são letais para o embrião. São vários os tipos de mutações que formam oncogenes: mutações gênicas, mutações cromossômicas, amplificação gênica e superexpressão gênica.[43,44,45]

Os oncogenes conhecidos parecem ter um pequeno papel no desenvolvimento de CBCs, estão relacionados ao desenvolvimento dos CBCs os listados abaixo:

3.2.1.1.1 Gene *SMO*

Este gene codifica uma proteína chamada *smoothened*. Essa proteína tem papel importante na via de sinalização *hedgehog*, essa via participa do desenvolvimento embrionário e quando alterada pode levar ao aparecimento de tumores e malformações. Normalmente essa proteína está acoplada à proteína *patched*, regulando a proliferação celular. Esse mecanismo será explicado em detalhes adiante. *SMO* pode funcionar como um oncogene. Mutações neste gene podem levar uma ativação irregular da via de sinalização *hedgehog* e surgimento de tumores como CBCs.[46,47]

3.2.1.1.2 *Gene GLI1*

É responsável pela codificação de uma proteína *Gli*, juntamente com outras proteínas chamadas família de proteínas *Gli*, que têm participação ativa na via de sinalização *hedgehog*, está envolvida na proliferação e

formação de diversos órgãos durante a embriogênese. Os fatores de transcrição *Gli* ativam ou inativam a transcrição se ligando aos determinados genes interagindo com o complexo de transcrição. Mutações que levam a super-expressão de *GLI1* podem levar ao surgimento de CBCs, tornando esse gene um oncogene.[48-51]

3.2.1.2 Genes supressores tumorais

São genes que expressam produtos que regulam negativamente o ciclo celular. Quando mutados deixam de exercer seus papéis através de processos específicos para cada gene, que serão vistos adiante.

Hoje existem dois modelos para explicar a carcinogênese envolvendo genes supressores tumorais. O primeiro e mais difundido é a hipótese de Knundson, em que mutações devem provocar perda de função dos dois alelos. Essas mutações têm caráter recessivo, uma vez que um único alelo mutado não é capaz de induzir uma neoplasia.[52]

O segundo é o modelo da haploinsuficiência, em que apenas um alelo mutado, associado a eventos adicionais promotores de tumor, seria capaz de induzir a carcinogênese, mesmo com o outro alelo expressando-se normalmente.

Dentre os genes supressores os descritos como tendo relação com o desenvolvimento de CBCs são:

3.2.1.2.1 Gene *CDKN2A*

Está posicionado no cromossomo 9, e gera algumas transcrições que se diferem nos seus primeiros éxons. Pelo menos três variantes de proteínas codificadas por este gene já foram encontradas, duas das quais são isoformas relacionadas estruturalmente conhecidas por funcionarem como inibidoras da *CDK4* quinase. A codificação restante contém uma grade de leitura aberta (*ARF*) que especifica uma proteína sem relação estrutural com as demais. Esse produto da *ARF* funciona como um estabilizador da proteína *p53*, como se interagisse com ela, e sequestra, *MDM1*, a proteína responsável pela degradação da *p53*. Esse gene está freqüentemente mutado ou deletado

numa grande variedade de tumores, como em melanoma uveal, melanoma maligno cutâneo, síndrome de Li-Fraumeni, e alguns estudos sugerem que possa ter uma participação no desenvolvimento de CBCs.[53-56]

3.2.1.2.2 *Gene TP53*

Presente no cromossomo 17p.13.1 (Figura1), este gene está mutado em cerca de 2/3 dos casos de câncer. Ele é responsável pela interrupção do ciclo celular na fase G1 quando há qualquer alteração na sequência de DNA, a fim de que o dano seja reparado. Se o reparo não for feito, o gene induzirá a ativação do mecanismo de apoptose. A disfunção desse gene faz com que o ciclo celular prossiga mesmo que haja uma mutação no DNA, permitindo sua transmissão às células descendentes e iniciando um processo neoplásico. Um exemplo de doença causada por alterações no *TP53* é a Síndrome de Li-Fraumeni, condição em que ocorre predisposição a desenvolver câncer em vários locais, como mama, ossos, cólon, pâncreas, entre outros. [57]

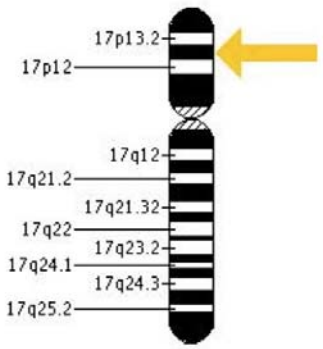

Figura 1. Localização do TP53 no cromossomo 17. 17p.13.1
(Adaptado de http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/tp53.jpeg)

Mutação de inativação do gene *TP53* é um dos defeitos mais frequentes encontrados nos tumores em geral.[58] As alterações genéticas mais aberrantes nos tumores cutâneos são encontradas associadas a alterações no gene *TP53*. Este gene codifica a proteína *p53*, que tem sido

denominada a “guardiã” do genoma, modulando múltiplas funções celulares entre elas a transcrição gênica, síntese e reparo de DNA, parada do ciclo celular e apoptose sendo responsável pela manutenção da estabilidade cromossômica. Mutações no gene *TP53* podem causar instabilidade genômica e facilitar a progressão carcinogênica.[59,60,61]

O gene *TP53* ativa seu efeito antiproliferativo em resposta a uma variedade de estímulos tais como dano ao DNA, por ação de radiação UV agentes químicos, ou ligação ativa do ligante CD95. A resposta ao dano no DNA pode ser tanto parada do ciclo celular ou apoptose. Quando o dano é pequeno ou moderado, as células permanecem em parada do ciclo celular para permitir o reparo no DNA, porém se os danos forem muito grandes a célula vai entrar em apoptose.[62,63] (Figura 2)

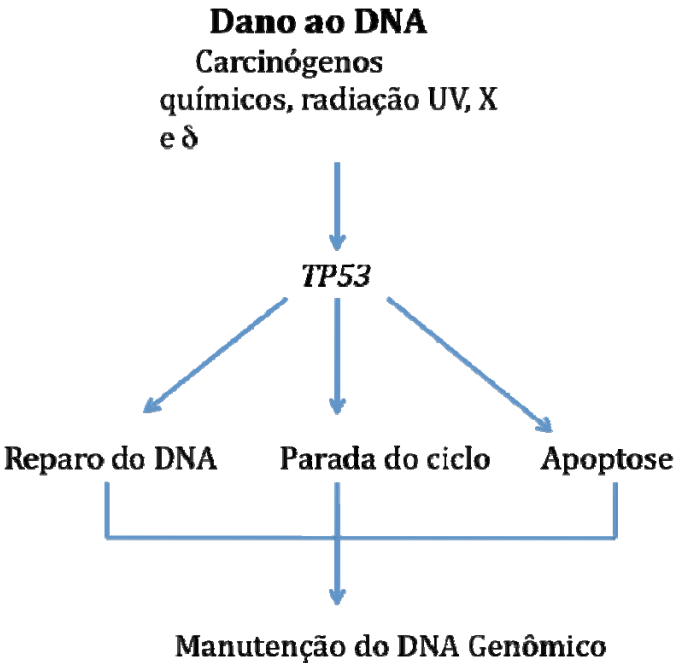

Figura 2. Via de ação esquemática da p53 sobre o ciclo celular, após agressão ao DNA.

Uma proteína p53 não-funcional ou mutada é incapaz de parar o ciclo celular quando o dano a célula é detectado, pode então ocorrer replicação de erros no DNA, levando a um acúmulo de mutações ativadoras de oncogenes e

perda de função supressora de tumor. A perda de função da p53 também pode levar a inibição da via de apoptose e dessa forma aumentar a sobrevivência de células anormais.[58]

Na pele normal a proteína *p53* não é detectada normalmente, porém ela já aparece 2h apos irradiação com UV, sendo detectada ainda 24h após a exposição e 36h depois se torna indetectável novamente.[64] A proteína *p53* mutante pode se acumular na pele, sendo detectado mutações no gene *TP53* em aproximadamente 50% dos CBCs.[65,66] Já foi demonstrado que CBCs histologicamente mais agressivos, estão associados a aumento na expressão do *TP53*. Porém na síndrome de *Li-Fraumeni* (múltiplos tumores por mutação autossômica do TP53) os pacientes não apresentam incidência aumentada de CBC sugerindo que estas mutações são provavelmente eventos secundários, ocorridos após o início do tumor.[67]

Considerando a contribuição aparentemente limitada do dano ao DNA e a instabilidade cromossômica para o fenótipo dos CBCs, a relevância das mutações do *TP53* para o desenvolvimento dos CBCs permanece ainda a ser demonstrada. Isso é de se esperar já que na ausência de dano genético a ativação da proteína *p53* não irá ocorrer, mais ainda uma das características principais da disfunção da proteína *p53*, mitoses aberrantes nunca foram observadas em CBCs.[68] *Hot spots* de mutação foram identificados com 2/3 das mutações ocorrendo em 9 diferentes sítios.[69] A inativação da proteína *p53* normalmente ocorre com uma mutação pontual em um dos alelos do gene, seguida por uma posterior perda do alelo restante.[52] O gene *TP53* apresenta mutações induzidas tipicamente por UV, predominando a mutação C(C)→T(T).[69,70,71]

3.2.1.2.3 Gene *PTCH*

O gene *PTCH1* foi inicialmente isolado, simultaneamente na Austrália e nos Estados Unidos, como o homólogo humano do gene *PTCH1* da *Drosophila* em 1996. Este gene foi mapeado no braço longo do cromossomo 9 (q22.3) (Figura 3) , possui 23 éxons , compreendendo 34 Kb de DNA genômico, codifica uma glicoproteína, chamada *patched*, que contém 1447

aminoácidos, com 12 domínios transmembrana e 2 grandes *loops* extracelulares.[19,20] (Figura 4)

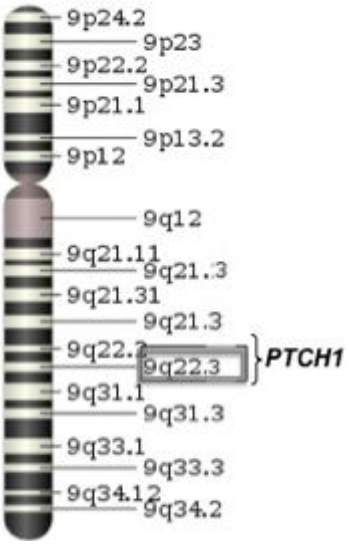

Figura 3. Localização do gene *PTCH1* no braço longo do cromossomo 9.

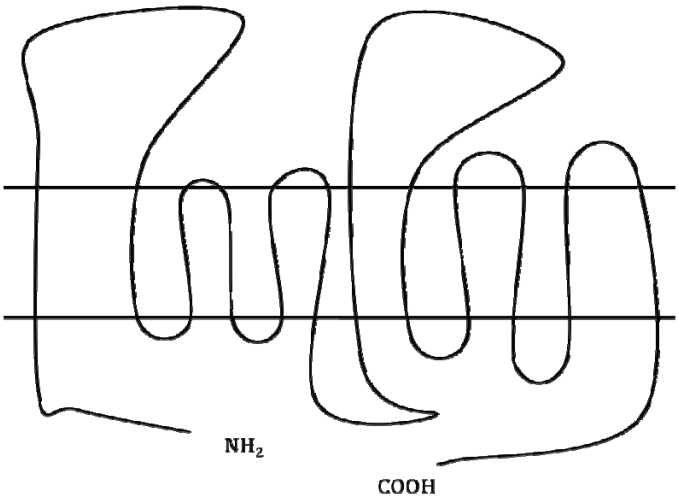

Figura 4. Proteína transmembrana *patched 1*. (Adaptado de Lindström E, Shimokawa T, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. *PTCH* mutations: distribution and analyses. Hum Mutat. 2006; 27(3):215-9)

Os estudos com *Drosophilas* mostraram que o gene *PTCH1*, tem papel importante no desenvolvimento celular e na diferenciação durante a embriogênese. Esses genes também, como já citado, são considerados supressores de tumor, ou seja fazem parte do grupo de genes que controlam o crescimento celular por inibirem o ciclo e a divisão celular, regulando negativamente os sinais de crescimento ou promovendo a morte celular. A inativação de um dos alelos do gene faz cessar o seu efeito supressor, permitindo o crescimento e a divisão celular, levando a malformações e desenvolvimento de tumores. [72]

A função fisiológica do *PTCH1* está diretamente relacionada à via de sinalização *Hedgehog* (*Hh*). Esta via de sinalização *Hh* é uma das mais fundamentais vias de sinalização no desenvolvimento embrionário. Entre os componentes centrais da via, o ligante secretado *hedgehog* (*Hh*), o receptor de membrana *patched* (*Ptc*), o transdutor de sinal de membrana *smoothened* (*Smo*) e o fator de transcrição *Ci/glioma* (*GLI*) são conservados evolutivamente dos insetos para os mamíferos. Porém há apenas um ligante secretado (*Hh*), um receptor (*Ptc*) e um fator de transcrição (*Ci*) em *Drosophila*, enquanto nos mamíferos existem três ligantes secretados *sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) e a *Desert hedgehog* (*Dhh*), membros da família *Hh*, dois receptores *patched* 1 e 2, e três fatores de transcrição (*GLI* 1 , 2 e 3). *Shh* é responsável por realizar muitas funções importantes, as quais incluem desenvolvimento do tubo neural e da simetria direita e esquerda. É responsável pela atividade de polarização dos membros, e participa da morfogênese de diversos órgãos, incluindo o esqueleto axial, membros, pulmões, pele cabelos e dentes. [72,73,74]

Na pele, a via de sinalização *Shh* é responsável por regular o desenvolvimento dos folículos pilosos e glândulas sebáceas.[75] A *Ihh* coordena a proliferação e maturação dos condrócitos.[76] A *Dhh*, por outro lado, regula a espermatogênese e ajuda na organização do perineuro.[77]

Dentre as três proteínas *Hh*, a *Shh* é a mais bem definida. Essa proteína é sintetizada como uma proteína precursora de 45 kDa, que através de um processo de auto-clivagem gera um fragmento de 20 kDa N-terminal, o

qual é responsável por toda atividade biológica da *Hh*. O fragmento N-terminal, com 2 tetralipídios, um acido palmítico e um colesterol, permanece associado à membrana plasmática. O receptor para *Shh* é produto do gene supressor de tumor *PTCH1*. A proteína *patched* age como um regulador negativo de *Shh* e na sua ausência, *patched* reprime a ativação de *Smo*, que por sua vez bloqueia a expresssão dos genes alvos dentre os quais *GLI*, *PTCH1* e membros da família do fator de transformação do crescimento beta(TGF-β). *Smo* é uma proteína de 115 kDa com uma estrutura semelhante a uma serpentina.[78,79] Existe um gene conhecido como gene humano *smoothened* (*SMO*), enquanto seu homologo da *Drosophila*, pertence à família *frizzled* (receptor *WNT*). Na ausência da proteína *Hh*, *Smo* e *patched* formam um complexo inativo. Quando *Hh* se liga ao *patched*, o complexo é alterado e *Smo* se torna livre para promover a transdução do sinal [80]

Estudos sugerem que *Hh* libera fisicamente *Smo* de *patched* e que a liberação dessa inibição reflete uma modificação ou mudança na conformação de *Smo***.** A liberação de *patched* a fosforilização e estabilidade de *Smo*. O ultimo membro da via de sinalização na *Drosophila*, como já citado, é *CI* um fator de transcrição de 155 kDa homologo a família *GLI* em vertebrados. Em células não expostas a *Hh, CI* forma um complexo tetrâmico com *costal-2, fused* e o *supressor fused* nos microtúbulos. Nessa forma, *CI* pode ser clivado em um fragmento N-terminal de 75 kDa que pode translocar-se para o núcleo e reprimir os genes alvos. Na presença de *Hh*, o complexo é dissociado e *CI* é transformado em um ativador transcricional de vida curta, o qual é translocado para o núcleo e ativa os genes alvos**.**[73,81,82,83] Acredita-se que *fused* é ativado pela sinalização de *Hh* levando a liberação de *CI*. A *fosfatoquinase* (*PKA*) independentemente inibe a via *Hh* e acredita-se que aja diretamente sobre *CI* contribuindo para sua degradação.[84] Por fim são ativados dentre outros os genes *WTN*, membros da família *TGF-β* e o próprio *PTCH1*. Levando à multiplicação celular (Figura 5). A ativação do gene *PTCH1* leva a célula a apresentar grandes quantidades de *patched* em sua membrana celular sequestrando *Hh* e limitando a sua difusão ao local onde é produzido.[85]

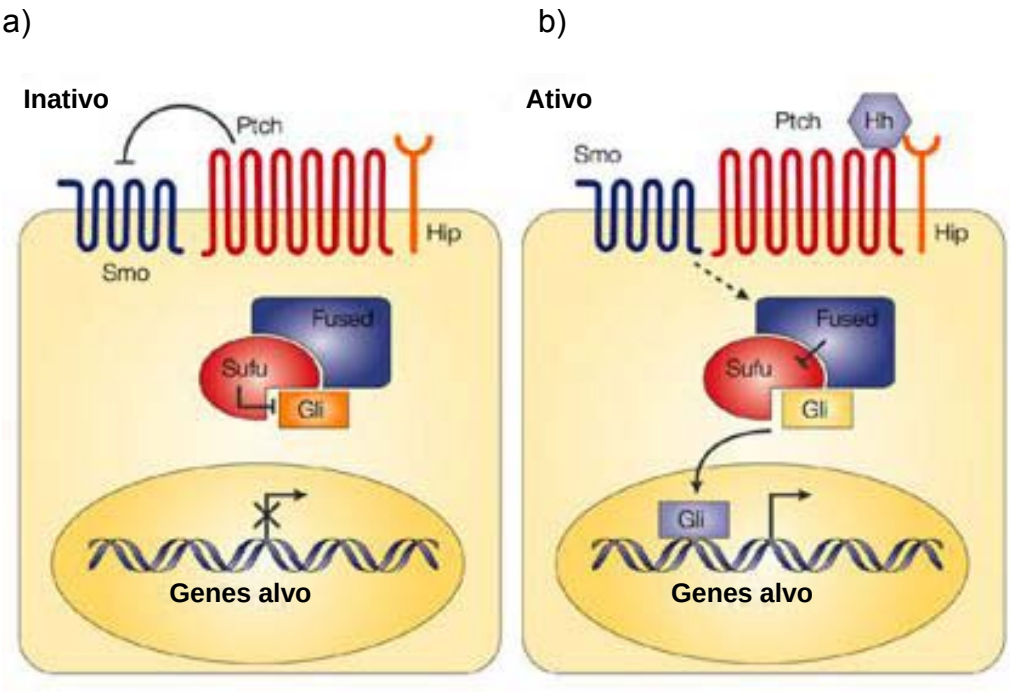

Figura 5. Via de sinalização hedgehog. **a)** *Patched* (*PTCH*) está ligada a *smo* e os genes alvos estão inativos **b)** Ocorre a ligação de *hedgehog(Hh)* ao *PTCH*, *smo* é liberada ocorre a transmissão do sinal e *gli* ativa a transcrição dos genes alvos. (adaptado de Marina Pasca di Magliano & Matthias Hebrok. *Nature Reviews Cancer.* 2003; 3, 903-911)

O gene *PTCH2*, considerado um gene similar ao *PTCH1,* foi identificado em 1999, localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p32.1-32.3).[86] Possui 23 éxons e compreende aproximadamente 15 Kb de DNA genômico. O *PTCH2* codifica uma proteína transmembrana de1203 aminoácidos. Esse gene é 57 % idêntico ao *PTCH1*, diferindo deste principalmente numa região hidrofílica entre os domínios transmembrana 6 e 7.[87,88] A função fisiológica do *PTCH2* ainda é desconhecida. Sabe-se que as proteínas *patched* 1 e 2 são diferentemente expressadas durante o desenvolvimento epidérmico.[89] *Patched2* é mais expressa na pele e nos testículos. Tanto o *PTCH1* quanto o *PTCH2* podem interagir com os membros da família *Hh* com afinidade similar e formar um complexo com a proteína *smoothened*.[90] Foi demonstrado que o promotor do gene *PATCH2* está sob o controle da via de sinalização *Hh*, o que dá suporte a um papel

funcional deste nesta via.[91] Porém as mutações no *PTCH2* são raras em CBCs e meduloblastomas.[92] Além disso, o fato do *PTCH1* mutado não poder se substituído por uma expressão do *PTCH2*, implica que este tem relação porém função distinta quando comparado com o *PTCH1*. Isso provavelmente se deve a uma a capacidade menor do *PTCH2* de influenciar a via de sinalização *Hh*. [91]

3.2.2 Carcinogênese e gene *PTCH1*

Muitas das vias de sinalização que tem um papel importante na embriogênese são desligadas na idade adulta. A ativação aberrante destas vias no tecido adulto é muitas vezes carcinogênica, como a via de sinalização *Hh* que tem pouca função nos tecidos adultos, e está ativada em muitas neoplasias. Os exemplos incluem CBCs, meduloblastomas, rabdomiosarcomas entre outros tumores associados a anormalidades na via *Hh*, incluindo mutações com ativação do protooncogene *SMO* ou com inativação do gene supressor *PTCH1*. Dentre as mutações são descritas as pontuais (troca de uma única base de nucleotídio), *missense* onde há a troca de um aminoácido por outro alterando a proteína, a *nonsense* quando a troca de base leva ao surgimento de um *stop-codon* resultando no truncamento da proteína, a *frameshift* quando há inserção ou deleção de uma base, fazendo com que a proteína fique alterada ou truncada a partir deste ponto, por conta de erro no quadro de leitura. Pode também levar a mutações no sítio de *splice* com a possibilidade do íntron não ser eliminado durante a transcrição do DNA, causando alteração na estrutura da proteína. Deleções cromossômicas impedindo a produção da proteína tem sido descritas.[93,94,95]

As mutações aumentam a atividade da via *Hh*. Os componentes chaves da via de sinalização *Hh* estão implicados tanto no desenvolvimento de anormalidades embrionárias, quanto nos CBCs. Os indivíduos com SNBC possuem uma cópia mutada do gene *PTCH1*, e essa heterigozidade é responsável pelo desenvolvimento de anormalidades vistas nessa síndrome. Acredita-se que a grande maioria das mutações na linhagem germinativa na

SNBC causa um anulamento de um dos alelos do *PTCH1* o que leva a proteína *patched* a se truncar.[96] A maior parte dos efeitos da mutação no *PTCH1* é causada por haploinsuficiência. Os tumores nos portadores de SNBC provavelmente, por sua vez, aparecem quando há inativação do segundo alelo em determinada célula, e a perda da sua função de supressor de tumor. Já nos indivíduos que apresentam tumores esporádicos é necessária a inativação dos dois alelos em uma mesma célula em seu período de vida, um evento bem menos comum que geralmente ocorre em idades bem mais avançadas, dependendo de outros fatores genéticos e ambientais.[96]

Diferentes tipos de mutações no gene *PTCH1* já foram descritas em pacientes portadores da SNBC, em CBCs esporádicos, em meningoblastomas e meningeomas.[97-141]

Em indivíduos portadores da SNBC foram encontradas várias mutações ao longo do gene *PTCH1*. Wicking em 1997 descreveu vinte e oito mutações, a maioria causando o truncamento da proteína. Em novo estudo os mesmos autores descreveram mais quatro novas mutações neste gene.[140,141] (Figura 7)

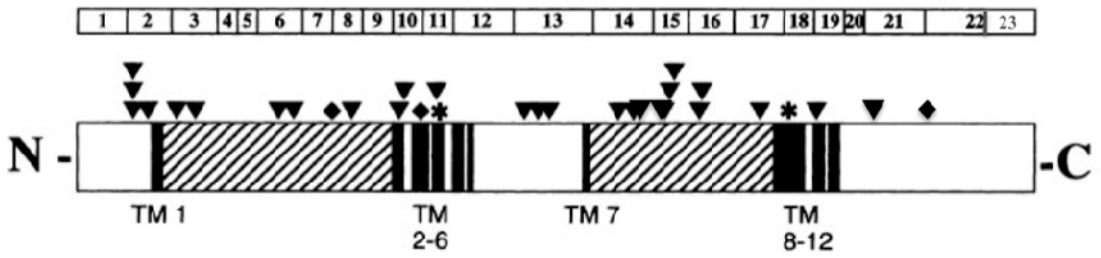

Figura 7. Diagrama esquemático da proteína *patched* e localização das mutações na linhagem germinativa. TM= domínios transmembrana; sombreado = *loops* extracelulares; * mutação *missense*; ▼ mutação *nonsense* ou *frameshift;* ◆ supostas variantes de *splicing.* (adaptado de Wicking C, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Negus K, Graham S, Suthers G, Haites N, Edwards M, Wainwright B, Chenevix-Trench G. Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident. Am J Hum Genet. 1997;60(1):21-6)

O estudo de 65 pacientes, 17 eram portadores de SNBC e 48 supostamente predispostos a desenvolver CBCs ou por apresentarem múltiplas lesões e/ou o primeiro CBC antes dos 40 anos e/ou casos familiares de CBCs demonstrou que 12 dos 17 pacientes com SNBC apresentaram mutações no *PTCH1*. Em contraste, no grupo com CBCs sem características da SNBC, somente uma mutação *missense* foi encontrada (G774R) em paciente com CBCs múltiplos.[113]

Em 1999 foi criado por Zaphiropoulos e cols. um banco de dados do gene *PTCH1* que contém todas as mutações e polimorfismos conhecidos até o momento, através de dados da literatura ou submetidas diretamente ao curador do banco de dados (www.cybergene.se/*PTCH*/). Em 2006 foi publicado um artigo analisando 284 mutações (264 exônicas e 20 de sitio de *splice*) e 48 polimorfismos (31 exônicos e 17 intrônicos) que foram incluídos no banco de dados de mutações do *PTCH1* até junho de 2005. Nesse estudo as mutações foram analisadas sobre a molécula prevista da proteína *patched* com 12 domínios transmembrana e 2 grandes *loops* extracelulares. Mostrando que a grande maioria das mutações (67 %) encontra-se nos *loops* extracelulares. Quando se separa por grupos, as mutações da linhagem germinativa (N=132), 73 % são *nonsense* ou *frameshift*, 17 % *missense* e 10 % em sítios de *splice*, concentradas nos 2 grandes *loops* extracelulares (Figura 8). Muitas mutações são ainda encontradas na região N-terminal e no grande *loop* intracelular. As mutações *missense* são na maioria encontradas nos domínios transmembrana, especialmente no quarto.[118]

Nos casos analisados de mutações em CBCs esporádicos (86 casos), a maioria (58 %) era do tipo *nonsense* ou *frameshift*, 35 % *missense*, 5 % em sitio de *splice* e em 2% *silent*, encontradas nos dois grandes *loops* extracelulares (Figura 9a). Essas mutações quando comparadas com as da linhagem germinativa tendem a se distribuir de forma diferente, com a grande maioria no primeiro *loop* extracelular (39 % vs 23 %) (Figura 9b). Nos casos de CBCs relacionados ao xeroderma pigmentoso (XP-CBC) (31 casos) mutações *missense* se concentram no

grande loop intracelular (Figura 9c). Apesar do pequeno número de casos de meduloblastomas (23 casos) um numero significativo de mutações foi encontrado nos domínios transmembrana (46%) quando se compara com as formas da linhagem germinativa (21 %) CBCs esporádicos(11 %) e XP-CBCs 13% (Figura 9d). [118]

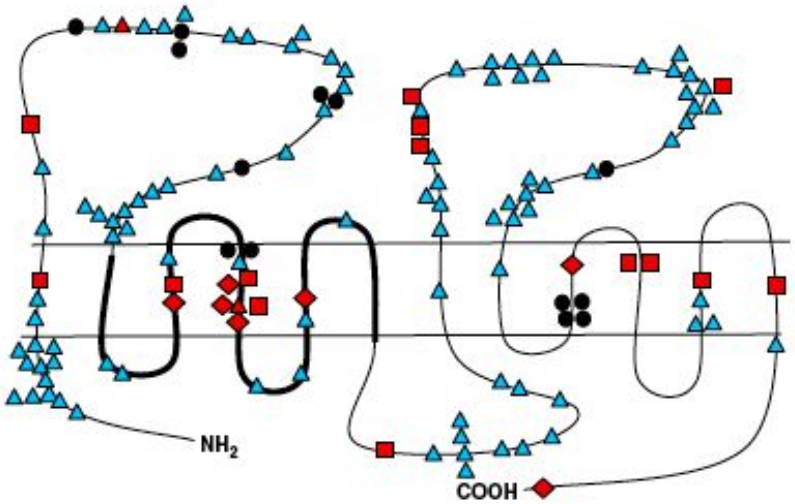

Figura 8. Distribuição das mutações da linhagem germinativa dos pacientes portadores de SNBC em relação ao domínio estrutural da proteína *patched*. Os círculos pretos indicam uma mutação no sítio de *splice* do éxon adjacente, os triângulos azuis indicam uma mutação *nonsense* ou *frameshift*, os triângulos vermelhos indicam uma mutação *missense* de novo, os quadrados vermelhos indicam mutação *missense* familiar, os losângulos vermelhos indicam uma mutação *missense* conservada na linhagem germinativa, e a linha grossa indica o domínio pontual esteróide-sensível. (Adaptado de Lindström E, Shimokawa T, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. *PTCH* mutations: distribution and analyses. Hum Mutat. 2006;27(3):215-9)

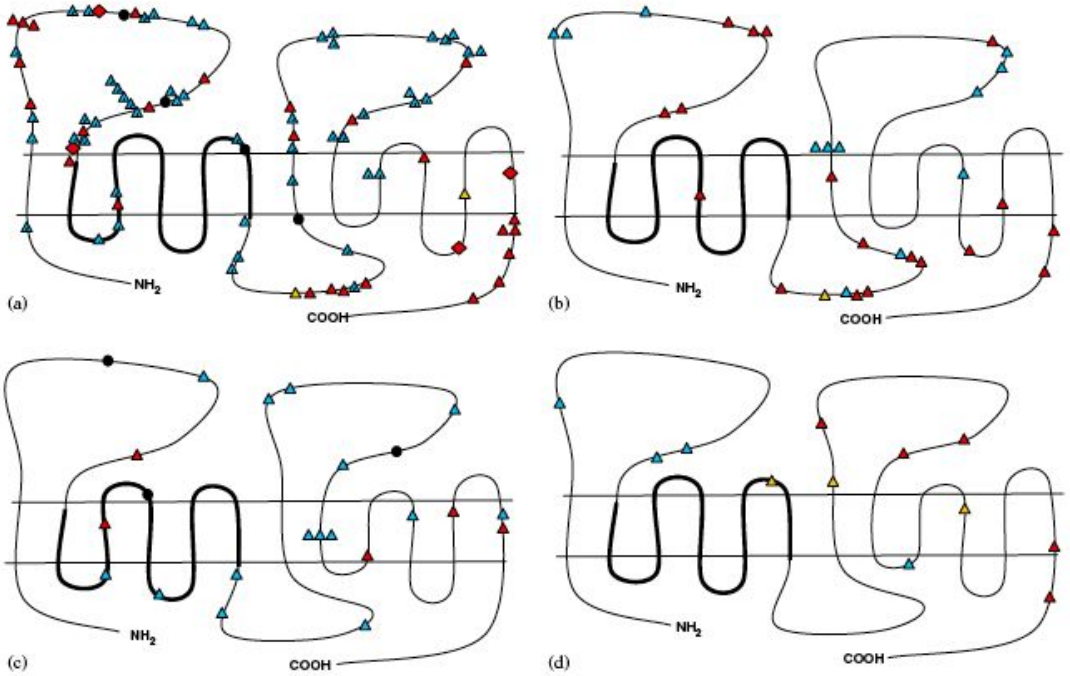

Figura 9. Distribuição de mutações em diferentes tumores esporádicos em relação ao domínio estrutural da proteína *patched*. **a)** CBCs esporádicos **b)** CBCs em xeroderma pigmentosos. **c)** Meduloblastomas esporádicos **d)** Outros tumores esporádicos. Os círculos pretos indicam uma mutação no sitio de *splice* do exon adjacente, os triângulos azuis indicam uma mutação *nonsense* ou *frameshift*, os triângulos vermelhos indicam mutação somática *missesne*, os quadrados vermelhos indicam uma mutação *missense* familiar, os losângulos vermelho indica uma mutação *missense* conservada na linhagem, o triângulo amarelos indicam uma mutação silenciosa e a linha grossa indica o domínio pontual esteróide-sensível**.** (Adaptado de Lindström E, Shimokawa T, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. *PTCH* mutations: distribution and analyses. Hum Mutat. 2006;27(3):215-9)

Em trabalho prévio de dissertação de mestrado realizado pelo grupo cooperativo (Ambulatório de Oncologia Cutânea do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e o Laboratório de Genética do Instituto Butantan) foram estudados os genes *PTCH1*, *PTCH2* e microssatélites em pacientes portadores de CBC esporádico e síndrome do nevo basocelular, e encontradas uma mutação *missense* em um CBC esporádico e uma mutação *nonsense* em amostras de sangue e de tumor de um paciente com SNBC no éxon 16 do gene *PATCH1*, sendo as primeiras descritas em pacientes brasileiros.[142]

Em recentes publicações foi sugerido que a variação dos alelos (polimorfismo) poderia influenciar a susceptibilidade ao CBC. Em particular alguns haplotipos de *PTCH1*, incluindo polimorfismos no éxon 23, íntron 15 (G^{2560+9}), ou éxon 12, aparentemente tem um efeito potencial efeito protetor contra o surgimento de CBCs.[142,143]

A ausência de estudos relacionando os casos de CBCs múltiplos familiares não sindrômicos(CBCMFNS) e o gene *PTCH1* nos estimulou a realizar este estudo.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

O trabalho se inicia do acompanhamento de duas pacientes (mãe e filha) portadoras de CBCs múltiplos não sindrômicos no Ambulatório de Oncologia Cutânea na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Utilizamos em nosso trabalho o conceito de CBC múltiplo, mais que 5 lesões em um mesmo indivíduo e CBC precoce o de início antes dos 30 anos de idade.

A mãe (caso II-2 Figura 10), com 81 anos, tinha história de CBCs múltiplos de início aos 26 anos e era acompanhada no ambulatório desde novembro de 2005. Apresentava inúmeros CBCs de tipos clínicos e histológicos variáveis (superficial, nodular e micronodular), embora a maioria deles do tipo superficial distribuídos na face e tronco (Fig. 1a-c). Quanto aos antecedentes, os pais já falecidos, não apresentavam consangüinidade e ambos tinham historia de câncer de pele. A paciente não cursava com comorbidade clínica ou dermatológica e os exames de Raio-X e ultrassonografia não demonstraram nenhuma alteração compatível com as síndromes descritas acima.

a) b) c)

Figura 10. a-c .Caso II-2. Placas eritemato-infiltradas com hipercromia, note a multiplicidade das lesões acometendo face , dorso e região cervical.

A filha (caso III-2), com 56 anos, relata aparecimento das lesões de CBC aos 20 anos sendo a exérese do primeiro tumor aos 23 anos. As lesões cutâneas eram muito semelhantes às da mãe e localizavam-se preferencialmente na face e dorso (Figura 11). Ao exame clínico e dermatológico não foram detectadas comorbidades e os exames de raio X e ultrassonografia não apresentaram alterações sugestivas das outras síndromes que se acompanham de CBCs múltiplos.

a) b)

Figura 11. Caso III-2. **a)** Duas placas eritemato-infiltradas na face. **b**) Multiplas cicatrizes de exérese de tumores no dorso.

A análise clínica das pacientes fez com que se pensasse na possibilidade de casos de CBCFMNS sendo então, convocados os familiares e realizado heredograma (Figura 12), e exame clínico.

Dentre os indivíduos examinados somente o caso de número II-4, com 65 anos, apresentava queratoses actínicas (QAs), CBCs múltiplos, carcinomas espinocelulares e esquizofrenia. O padrão clínico das lesões dos múltiplos CBCs diferia daqueles da irmã (caso II-2) e da sobrinha (caso III-2) (apresentação clínica com predomínio nodular, mais em áreas

expostas, acompanhado de fotodano importante e início após os 40 anos de idade).

Dentre os familiares foram ainda avaliados, os indivíduos II- 5 de 63 anos, II- 7 de 61 anos, IV- 1 de 28 anos, IV- 2 de 26 anos e o IV-3 de 22 anos. O exame físico e dermatológico destes indivíduos não mostrava alterações

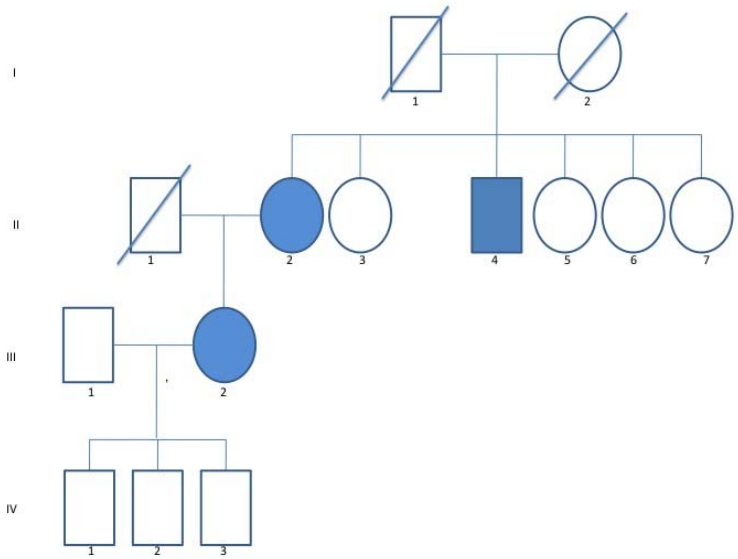

Figura 12. Heredograma da família estudada. Pacientes portadores de CBCs múltiplos estão assinalados em azul. Os pacientes I-1 e I-2 têm história de CBCs esporádicos. Os pacientes II- 2, 4, 5,7 ;III-2; IV-1,2 e 3 foram estudados clinica e geneticamente.

Os indivíduos analisados clinicamente foram submetidos a estudo genético após aprovação pela Comissão de Ética do Hospital (número 0220/09) e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. (Anexo A)

4.2 Métodos

4.2.1 Extração do sangue total

Dentre os pacientes e familiares convocados foram colhidas, após consentimento prévio, amostras de 8 ml de sangue periférico realizado por punção venosa para realização de exames genéticos. O sangue dos doentes foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA, e processado no Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

4.2.2 Extração do DNA genômico dos leucócitos de sangue total

A extração do DNA foi feita a partir dos leucócitos de sangue total. Utilizou-se uma solução para lise das hemácias (NH_4CL 1550 mM, $KHCO_3$ 100mM 10X , EDTA 10 mM), mais H2O mili-Q estéril, mais sangue total na proporção 1:4:2 respectivamente, sendo acondicionado em gelo por 2h, para remover as células sem núcleo. Posteriormente o sangue total foi centrifugado a 1000 rpm (centrífuga Sorvall RC5B, rotor AS 600) durante 10 minutos, 4° C. O soro foi desprezado. Ao *pellet* foram adicionados 10 ml de solução digestiva (NaCl 0,4 M; EDTA 0,1 M pH 8,0; proteinase K 100 µg/ml e SDS 1 %), e a suspensão foi incubada a 50° C por 3 h; em seguida a concentração de NaCl foi corrigida para 1M. Esta solução foi transferida para um tubo Corex e extraída com igual volume da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2). Em seguida, a solução ficou sob suave agitação por 30 min e foi centrifugada a 10.000 rpm, 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Corex e precipitado durante 12 horas a –20° C com dois volumes de etanol 100 %. Após este período, a solução foi novamente centrifugada a 10.000 rpm a 4° C por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 10 ml de etanol 70 %, centrifugado a 10.000 rpm a 4° C por 15 min e seco

em um sistema a vácuo. O *pellet* foi ressuspendido em 2 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), 1 µl de RNase 10 mg/ml e incubado a 37° C por 1 h. Em seguida foi adicionado NaCl para concentração final 1 M. A solução foi novamente extraída com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, e submetida a suave agitação manual por 30 min. Após isto, foi centrifugada a 10.000 rpm durante 15 min a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Corex, precipitado com 2 volumes de etanol 100 % e mantido a –20° C *overnight*, centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4° C, e desprezado o sobrenadante. O *pellet* foi finalmente lavado em etanol 70 %, centrifugado, seco nas mesmas condições acima, ressuspendido em TE, quantificado em espectrofotômetro e gel de agarose 1 %, aliquotado e mantido a 4° C.

4.2.3 Estratégia de amplificação

Os éxons 9, 10, 11, 16, 17 e 23 dentre os 23 éxons do gene *PTCH1*, além de porções parciais dos íntrons 10, 11, 15, 16, 17, 22, e 23, dos indivíduos estudados (Figura 13), foram amplificados pela técnica de PCR a partir de DNA genômico, utilizando *primers* desenhados conforme as regiões que codificam os, tendo por base as sequências publicadas do gene *PTCH1* do GenBank (Quadro 1). Apesar do éxon 10 ter sido amplificado junto com éxon 9, por dificuldades técnicas na confirmação dos resultados somente o éxon 9 foi considerado para o estudo. Foram utilizados os termocicladores *Gene* e *PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Eletronic Corporation)*. As condições do PCR estão descritas no quadro 2.

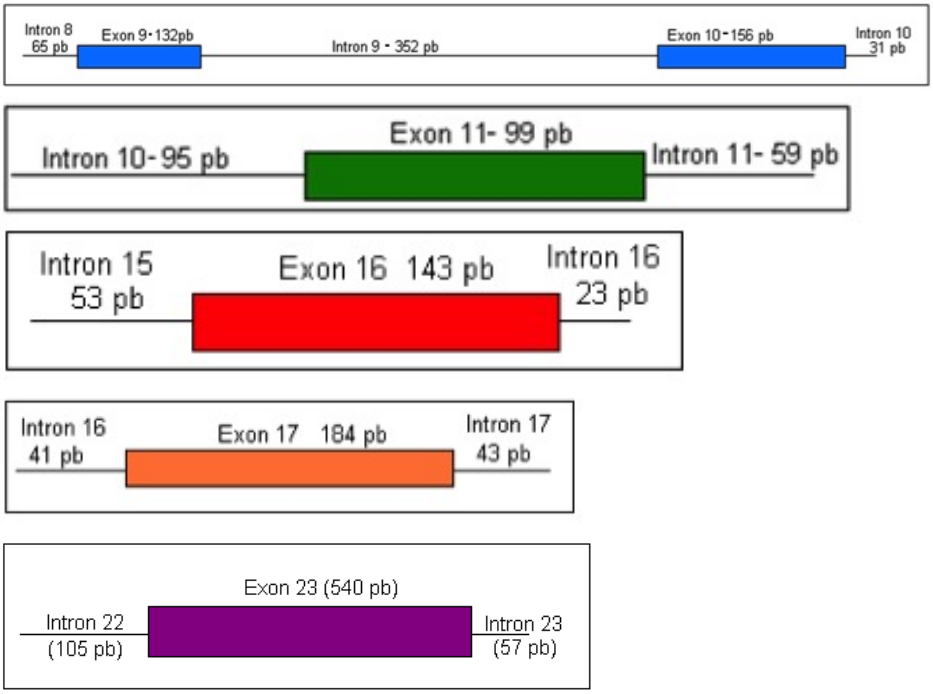

Figura 13. Esquema representando éxons e íntrons, demonstrando o total de pares de base(pb) de cada éxon, e as porções dos íntrons próxima a eles que foram analisadas no estudo.

Quadro 1. Os éxons 9 e 10 foram amplificados juntos pois o *primer* direto fica no intron 8 e o *primer* reverso localiza-se no íntron 10. Os *primers* do gene *PTCH* 1 dos éxons 9, 11, 16 e 17 foram desenhados por Hahn et al 1996[19] e do éxon 23 por Soulfir 2006.[113] As seqüências desses *primers* correspondem à região 5'e 3'dos íntrons adjacentes aos respectivos éxons

NÚMERO DOS ÉXONS DO *PTCH1*	SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS*
9 e 10	D 5' GTGCTGTCGAGGCTTGTG 3' R 5' ACGGACAGCATAAATGGC 3'
11	D 5' GTGTTAGGTGCTGGTGGCA 3' R 5' CTTAGGA ACAGAGGAAGCTG 3'
16	D 5' AGGGTCCTTCTGGCTGCGAG 3' R 5' TCAGTGCCCAGCAGCTGGAGTA 3'
17	D 5' AACCCCATTCTCAAAGGCCTCTGTTC 3' R 5' CACCTCTGTAAGTTCCCAGACCT 3'
23	D 5' GGTTGACTGAGTCTTTGGTG 3' D 5' AGCCAGGCAAAGAGGAGGAC 3'

Quadro 2. Condições da *PCR*

PTCH1	Hot start	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
Exon 9 e 10	95°C – 2 min	94°C – 2 min	58°C – 1 min	68°C – 1 min e 30 seg	68°C – 5 min
Exon 11	95°C – 2 min	94°C – 1 min	60°C – 45 seg	68°C – 1 min e 30 seg	68°C – 5 min
Exon 16	95°C – 2 min	94°C – 1 min	60°C – 45 seg	68°C – 1 min	68°C – 5 min
Exon 17	95°C – 2 min	94°C – 1min	60°C – 45 seg	68°C – 2 min	68°C – 5 min
Exon 23	95°C – 2 min	94°C – 1min	62°C – 1 min	68°C – 1 min e 30 seg	68°C – 5 min
Ciclos	1 X	35 X			1 X

4.2.4 Eletroforese e eluição

A técnica de eletroforese foi usada tanto para quantificação de DNA quanto para resolver os fragmentos amplificados por *PCR.* O gel de agarose 1,5 % em tampão TEB (Tris 0,9 M; EDTA 0,02 M; ácido bórico 0,9 M) foi utilizado para a migração dos produtos sob tensão 10 V/cm, corado com brometo de etídeo (EtBr) e fotografado utilizando câmara fotográfica Kodak *El Logic 100 Imaging System* sob luz UV. Os fragmentos amplificados foram eluídos do gel conforme instruções do *Kit Biotools Bioclean* (*Biotools* do Brasil) e utilizados para seqüenciamento e uma parte para clonagem.

4.2.5 Clonagem molecular

Para confirmação de parte dos resultados, foi realizada clonagem molecular. Os fragmentos amplificados foram clonados em vetor *pGEM T-easy (Promega)* em *E. coli* XL1-Blue e DH-5α conforme instruções do fabricante. Os insertos foram ligados aos plasmídeos abertos em presença de ligase e usados para transformação das bactérias competentes. Os clones recombinantes selecionados em placas contendo ampicilina. (Figuras 14 e 15).

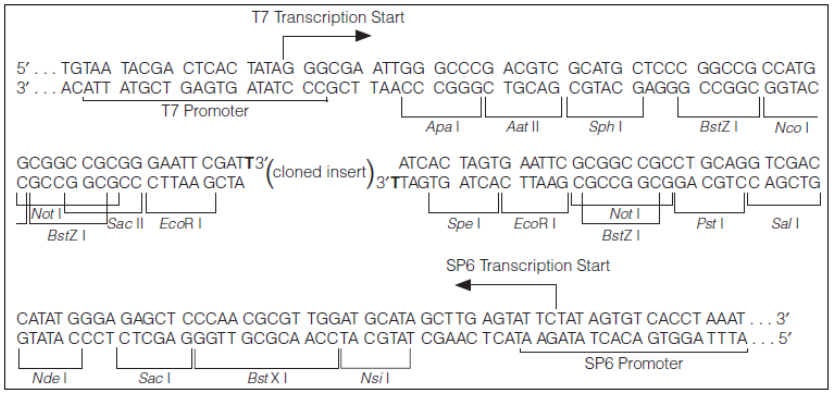

Figura 14. Sequência do Plsmídeo *pGEM T-easy Vector (Promega).*

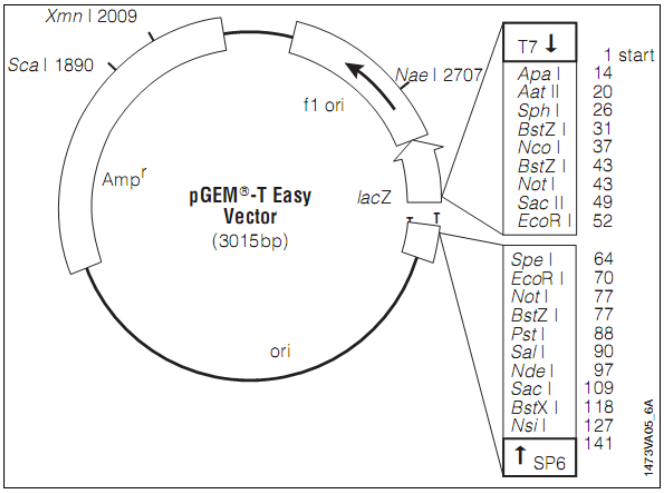

Figura 15. Esquema de *pGem T Easy Vector*.

4.2.5.1 Preparação de bactérias competentes

Um pré-inóculo de *E. coli* (uma colônia) foi feito em 5 ml de meio LB (triptona 1 %, extrato de levedura 0,5% , NaCl 170 mM). A cultura foi mantida em *shaker* a 37° C *overnight*. A seguir 1,0 ml desta cultura foi inoculado em 50 ml de meio LB e mantida sob agitação até atingir D.O.=0,3 a 600 nm. As bactérias foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min (rotor Sorvall AS 600). O *pellet* contendo bactérias foi ressuspendido em 50 ml $CaCl_2$ 50 mM. As bactérias foram incubadas no gelo por 30 min, centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min, ressuspendidas em 1,25 ml de $CaCl_2$ 50 mM, e mantidas na geladeira até o uso, no máximo uma semana.

4.2.5.2 Transformação de bactérias competentes

Os plasmídeos recombinantes (5 ul) mais 95 µl de TE foram adicionados a 100 µl de bactérias competentes. A mistura foi mantida por 20 min a 0° C, e depois submetida a choque térmico por 5 min a 42° C. Em seguida, foram adicionados 800 µl de meio LB (pré-aquecido a 37º C), e a cultura foi mantida no *shaker* a 37° C por 45 min a 22 rpm.

4.2.5.3 Plaqueamento

Foram utilizadas para o plaqueamento placas de petri com meio LB-agar 1,5 % contendo ampicilina (100 µg/ml). Foram aplicadas sobre as placas LB/amp 100 µl de bactérias transformadas pelos plasmídeos recombinantes. Após o plaqueamento, as placas foram mantidas em estufa a 37° C *overnight*. Como controles foram usadas bactérias transformadas com plasmídeos íntegros (controle da transformação), plasmídeos não ligados (controle da ligação), e apenas bactérias (controle da ampicilina).

4.2.5.4 Obtenção de DNA de plasmídeo recombinante (Miniprep)

Uma colônia de bactérias selecionada em placa com ampicilina foi inoculada em 3 ml de meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina e mantida *overnight* sob agitação. Desta cultura, foram coletados 1,5 ml, centrifugados por 1 min, e desprezado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspendido em 300 µl de solução de lise (Triton X-100 2,5 %, sucrose 4 %, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 25 mM, 4 µg lisozima 10 ml/ml). Após fazer um orifício na tampa do tubo *eppendorf* para evitar perda de material, a solução foi fervida a 100° C por 1 min, e centrifugada 10 min a 10.000 rpm. O DNA bacteriano foi retirado com um palito. Ao sobrenadante foram acrescentados 10 µl de DEP (dietil pirocarbonato) para eliminar as nucleases; a solução foi incubada por 15 min a 65° C e centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Os plasmídeos foram precipitados com NaCl, concentração final 100 mM, e um volume de isopropanol. A seguir centrifugados por 15 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado álcool 70 % ao *pellet* para retirar o excesso de NaCl, centrifugado por 10 min a 10.000 rpm e desprezado o sobrenadante. Após secagem o DNA plasmidial foi ressuspendido com TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) e 1 µl RNAase (concentração final 10 µg/ml). Os plasmídeos foram analisados em gel de agarose 1,2 %.

4.2.5.5 PCR dos clones para sequenciamento

Os clones foram amplificados por *PCR* utilizando os *primers* que fazem parte das sequências do plasmídeo que flanqueiam o inserto (SP6 e T7).

SP6 direto: 5’ - ATT TAG GTA ACA CTA TAG - 3’
T7 reverso: 5’ - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3’
Condições: 94° C/ 1 min; 54° C/ 1 min; 72° C/ 1 min; 72° C/5 min (35 ciclos).

4.3 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos fragmentos eluídos de PCR (exon 9) e/ou das minipreps (exons 11,16,17 e 23) de clones selecionados, foi feito utilizando individualmente os *primers* SP6 ou T7 presentes no plasmídeo e flanqueando o inserto, e *kit* para amplificação *Big Dye Terminator,* versão 3.1 (*Applied Biosystems)*. Condições: 96°C, 10 seg; 52°C, 20 seg; 60°C, 4 min (40 ciclos). O sequenciamento foi feito em sequenciador *ABI Prism 3100.*

4.4 Análise das sequências

As seqüências obtidas foram comparadas entre si e com os cDNAs de referência (GenBank numero: NC_000009.11) utilizando programas como *BLAST* (*Basic Local Aligment Search Tool*), *Clustal W* e outros para pesquisa em banco de dados. Posteriormente os resultados foram confirmados diretamente no eletroferograma.

5 Resultados

5.1 Quantificação do dna

O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose conforme figura 16.

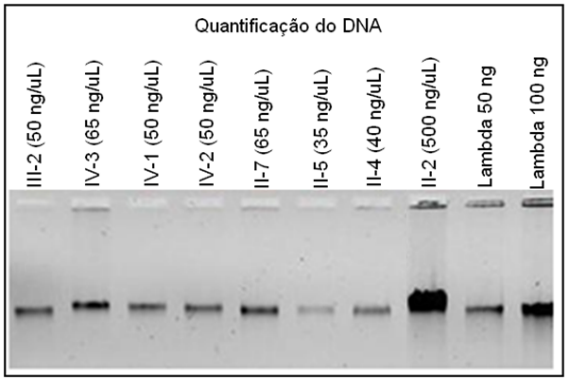

Figura 16. Quantificação do DNA por fago lambda em gel de agarose a 1 %.

5.2 Amplificação dos éxons analisados do gene *PTCH1*

Os éxons analisados foram amplificados por *PCR* e evidenciados pela técnica de eletroforese (Figura 17).

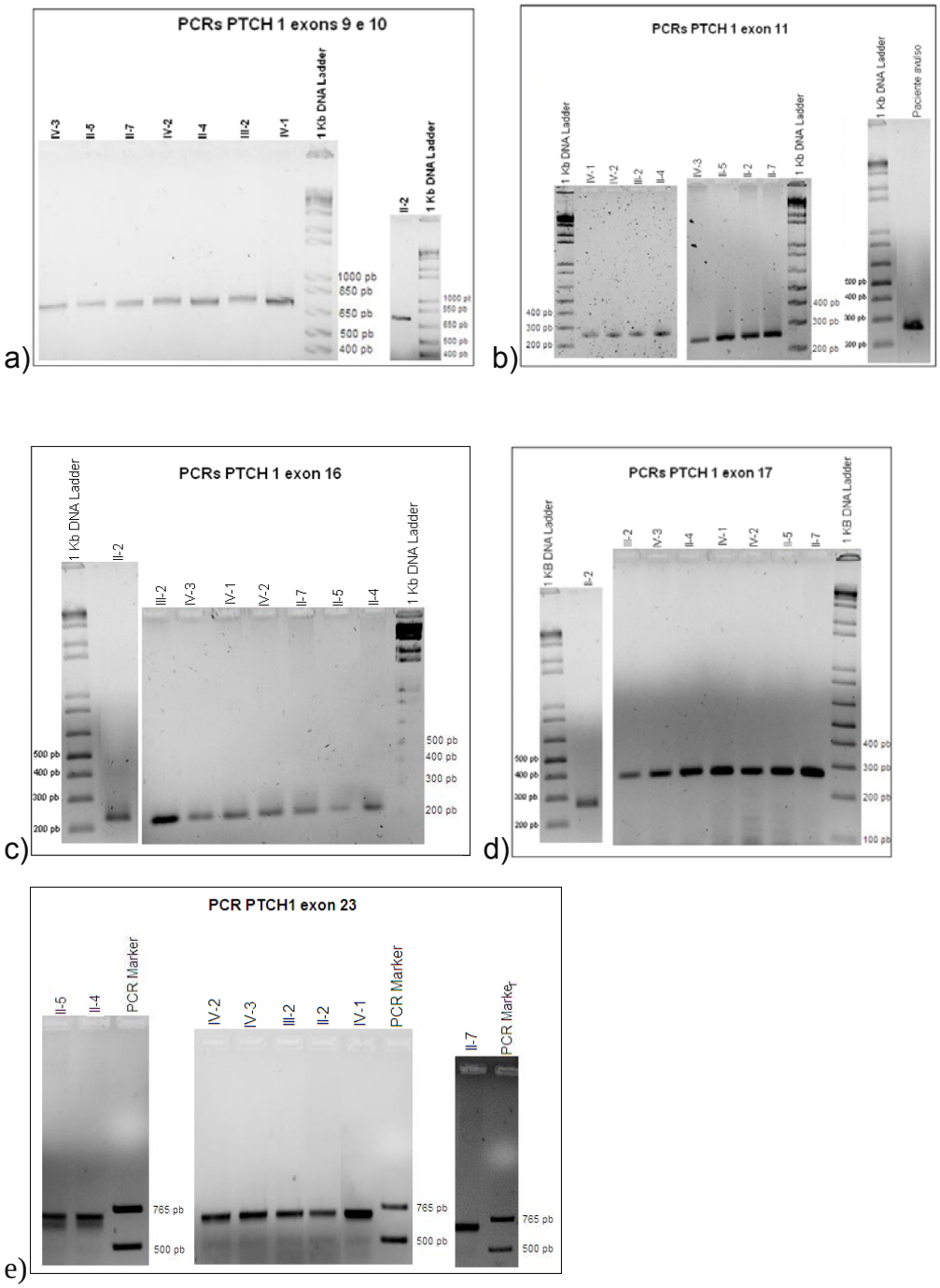

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1,5 %, evidenciando os fragmentos amplificados usando-se a técnica de *PCR.* **a)** Éxon 9 e 10; **b)** Éxon 11; **c)**Éxon 16; **d)** Éxon 17; **e)** Éxon 23.

5.3 Obtenção de DNA de plasmídeo recombinante (Miniprep)

Após a obtenção os plasmídeos recombinantes dos exons 11,16, 17 e 23 foram analisados em gel de agarose a 1%. (Figura 18)

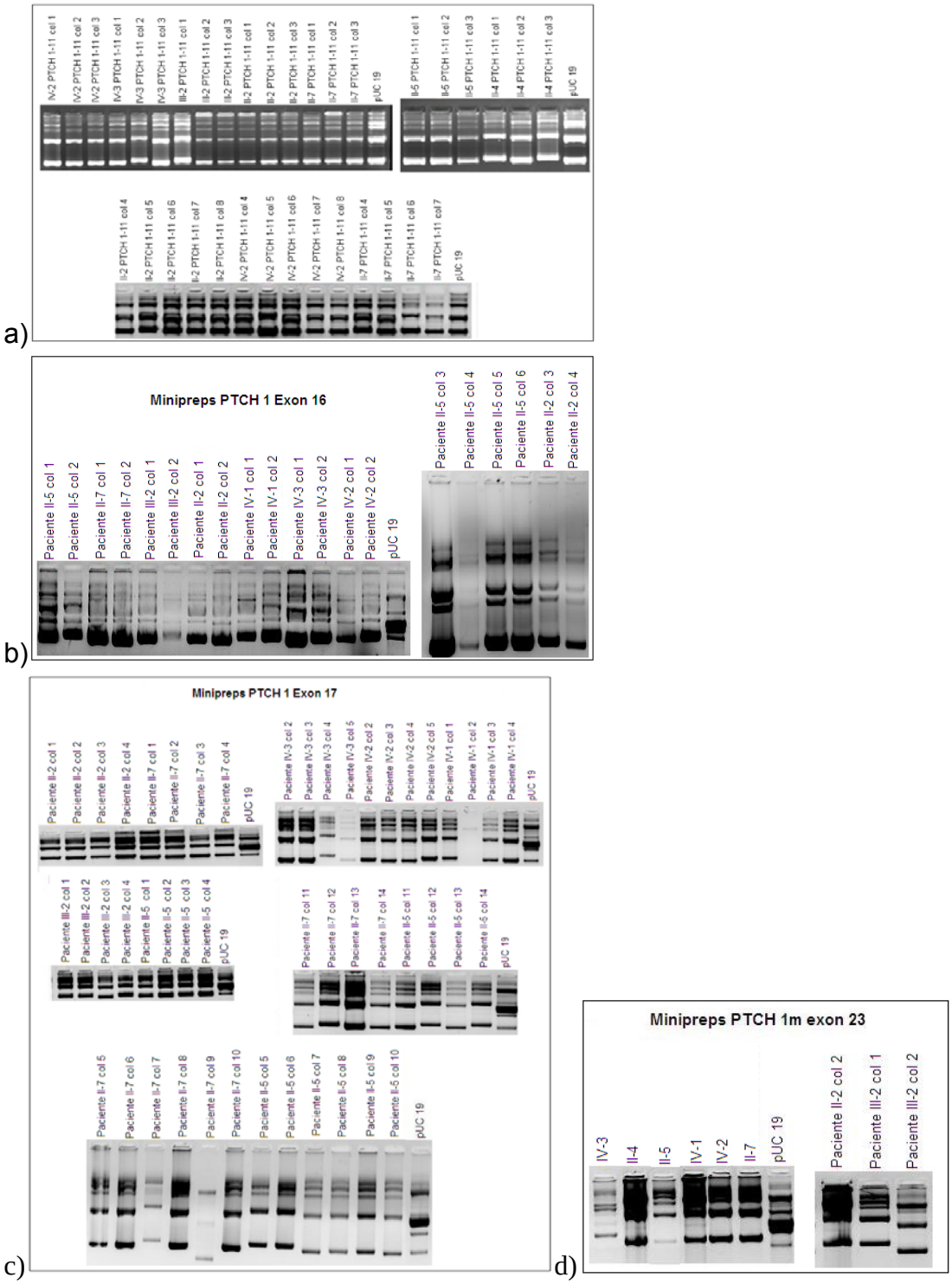

Figura 18. análise do plasmídeo recombinante pela técnica de minipreps em gel de agarose 1% de cada éxon do *PTCH1*. **a)** Éxon 11; **b)** Éxon 16; **c)** Éxon 17 **d)** Éxon 23.

5.4 PCR dos clones para sequenciamento

Os clones foram amplificados por PCR e evidenciados pela técnica de eletroforese (Figura 19).

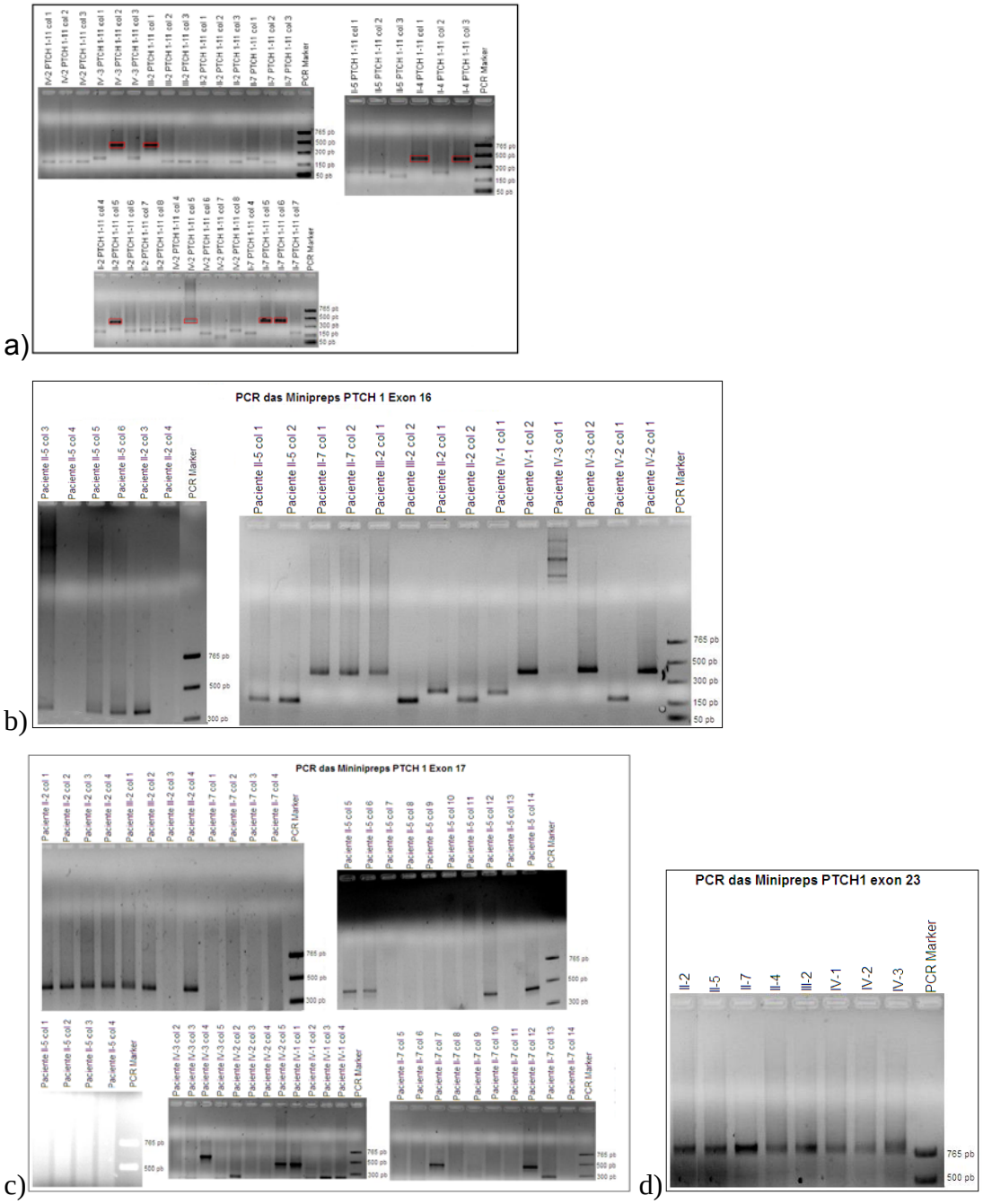

Figura 19. PCR dos clones com confirmação do inserto em gel de agarose 1% de cada éxon do *PTCH1*. **a)** Éxon 11; **b)** Éxon 16; **c)** Éxon 17 **d)** Éxon 23.

5.5 Seqüenciamento automático dos éxons e íntrons

O resultado das análises dos éxons e íntrons do *PTCH1* após o seqüenciamento e pareamento das bases, mostrou :

5.5.1 Éxon 9

No individuo II-7 foram encontradas duas mutações *frameshift* com duas inserções da base timina (T) nas posições 1443 e 1468. Nos indivíduos II-5 e IV-1 foi encontrada uma mutação *missense* no éxon 9 na posição 1420 de G→T (Figuras 20 e 21).

```
PTCH1-9            GGTGGTTCATCAGAGTGTCGCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC
Paciente II-2      GGTGGTTCATCAGAGTGTCGCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC
Paciente II-4      GGTGGTTCATCAGAGTGTCGCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC
Paciente II-5      GGTGGTTCATCAGAGTGTCTCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC
Paciente II-7      GGTGGTTCATCAGAGTGTCGCACAGAACTCCACTCAAAAGGTGTCTTTCC
Paciente III-2     GGTGGTTCATCAGAGTGTCGCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC
Paciente IV-1      GGTGGTTCATCAGAGTGTCTCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC
Paciente IV-2      GGTGGTTCATCAGAGTGTCGCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC
Paciente IV-3      GGTGGTTCATCAGAGTGTCGCACAGAACTCCACTCAAAAGGTG-CTTTCC

PTCH1-9            TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente II-2      TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente II-4      TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente II-5      TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente II-7      TTCACCACCACGACCCTGGTACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente III-2     TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente IV-1      TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente IV-2      TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA
Paciente IV-3      TTCACCACCACGACCCTGG-ACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGACGTCA

PTCH1-9           GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATG
Paciente II-2     GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATG
Paciente II-4     GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATG
Paciente II-5     GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATG
Paciente II-7     GTGTCATCCCCGTGGCCAGCGGCTACGTACTCATG
Paciente III-2    GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATG
Paciente IV-1     GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATG
Paciente IV-2     GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACGTACTCATG
Paciente IV-3     GTGTCATCCGCGTGGCCAGCGGCTACTTACTCATG
```

Figura 20. Sequenciamento dos nucleotídeos com pareamento das bases do éxon 9 do gene *PTCH1* analisado. Em letra maiúscula esta o éxon. Em vermelho estão as bases onde houve mutações. No início das seqüências na primeira linha a sequência normal do éxon e abaixo a encontrada em cada indivíduo.

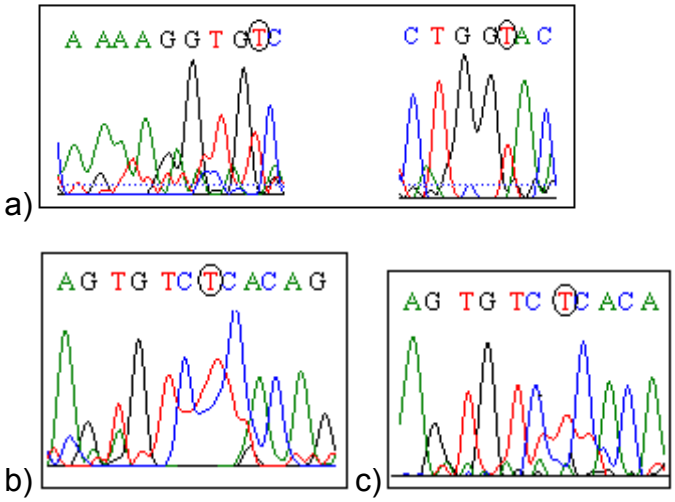

Figura 21. a) Eletroferograma indivíduo(Ind) II-7: duas inserções de T éxon 9; **b)** ind II-5 mutação G→ T éxon 9, **c)** Ind IV-1 mutação G→ T éxon 9.

5.5.2 Íntron 10

A análise do íntron 10 na porção próxima ao éxon 11 (5'), mostrou em todos os indivíduos analisados uma mutação na posição 595 de c→g (Figuras 22 e 23).

```
                    P11d ⟶
PTCH1-11    ctgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatctgaattgcatctcgc
II-2        gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatctgaattgcatctcgc
II-4        gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatctgaattgcatctcgc
II-5        gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatctgaattgcatctcgc
II-7        gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatgtgaattgcatctcgc
III-2       gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatgtgaattgcatctcgc
IV-1        gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatctgaattgcatctcgc
IV-3        gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatctgaattgcatctcgc
IV-2        gtgttaggtgctggtggcagagtcctaactagctttagaatcatctgaattgcatctcgc
             ******************************************* ***************

PTCH1-11    atgtctaatgccaccatcctctgtttttgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
II-2        atgtctaatgccaccatcctctgtttttgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
II-4        atgtctaatgccaccatcctctgtttttgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
II-5        atgtctaatgccaccatcctctgtttttgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
II-7        atgtctaatgccaccatcctctgtttttgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
III-2       atgtctaatgccaccatcctctgtttttgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
IV-1        atgtctaatgccaccatcctctgtttttgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
IV-3        atgtctaatgccaccatcctctgttttcgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
IV-2        atgtctaatgccaccatcctctgttttcgctgtagGTTTTGCCATTTCTCGCTCTTGGTG
            *************************** ********************************

PTCH1-11    TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
II-2        TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
II-4        TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
II-5        TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
II-7        TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
III-2       TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
IV-1        TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
IV-3        TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
IV-2        TTGGTGTGGATGATGTTTTTCTTCTGGCCCACGCCTTCAGTGAAACAGGACAGAATAAAA
            ************************************************************
                                                                ⟵ P11r
PTCH1-11    GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
II-2        GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
II-4        GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
II-5        GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
II-7        GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
III-2       GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
IV-1        GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
IV-3        GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
IV-2        GAATCCCTTTTGAGgtaatgcaaaaacaaaagaagagagctttggggacatcacagcttc
            ************************************************************

PTCH1-11    ctctgttcctaag
II-2        ctctgttcctaag
II-4        ctctgttcctaag
II-5        ctctgttcctaag
II-7        ctctgttcctaag
III-2       ctctgttcctaag
IV-1        ctctgttcctaag
IV-3        ctctgttcctaag
IV-2        ctctgttcctaag
            *************
```

Figura 22. Sequenciamento dos nucleotídeos com pareamento das bases do éxon 11, íntron 10(parcial) e íntron 11(parcial) do gene *PTCH1* analisado. Em letra maiúscula estão os éxons, em minúscula os íntron, em vermelho e sublinhados estão os nucleotídeos nos quais os *primers* direto (5') e reverso (3') se complementam na reação do PCR. Em azul estão as bases onde houve mutações. No início das seqüências, na primeira linha, a sequência normal do éxon e abaixo a encontrada em cada indivíduo.

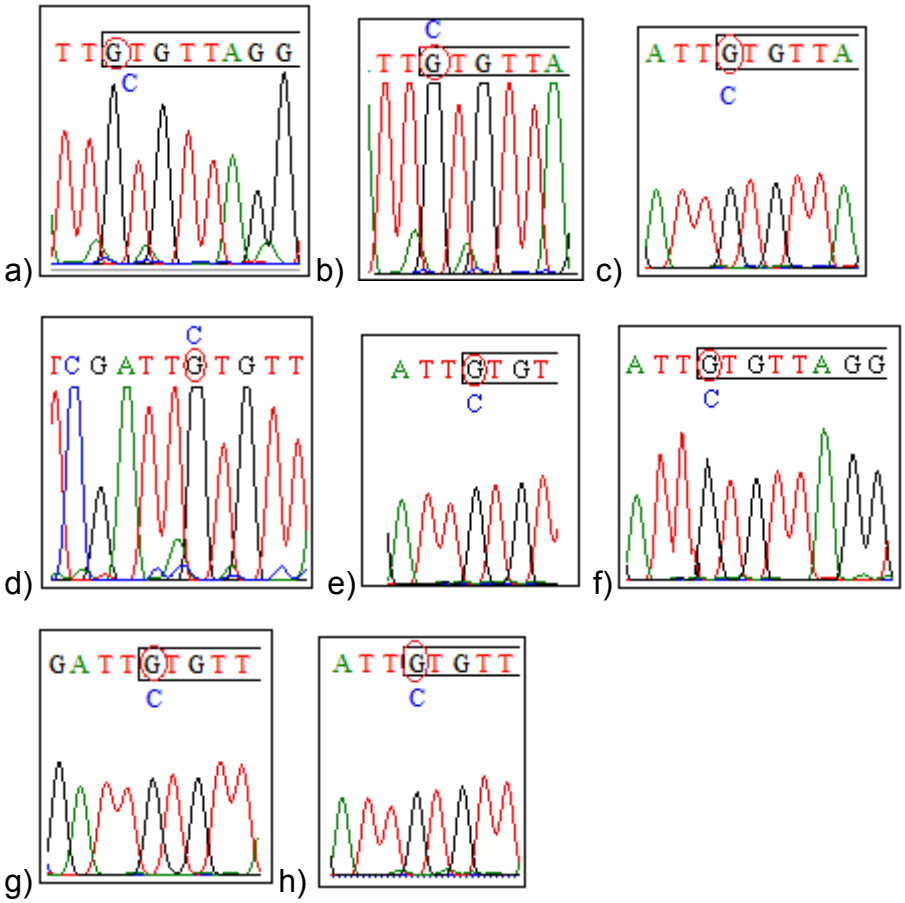

Figura 23. Confirmação das mutações no eletroferograma. **a)** Ind II-2 mutação c→ g, **b)** Ind II-4 mutação c→ g, **c)** Ind II-5 mutação c→ g, **d)** Ind II-7 mutação c→ g, **e)** Ind III-2 mutação c→ g, **f)** Ind IV-1 mutação c→ g, **g)** Ind IV-2 mutação c→ g, **h)** Ind IV-3 mutação c→ g.

Os paciente II-7 e III-2 apresentaram uma segunda mutação no íntron 10 na posição 639 de c→g (Figuras 22 e 24).

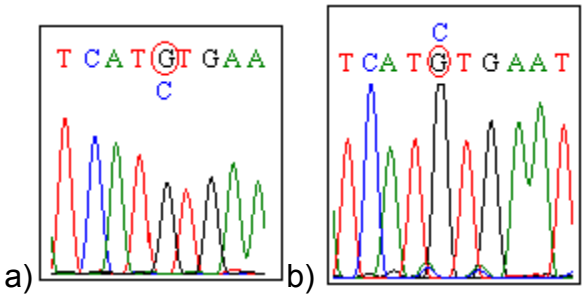

Figura 24. Confirmação das mutações no eletroferograma. **a)** Ind II-7 mutação c→ g e **b)** Ind III-2 mutação c→ g.

Os pacientes IV-2 e IV-3 apresentaram uma segunda mutação no íntron 10 na posição 682 de t→c (Figuras 22 e 25).

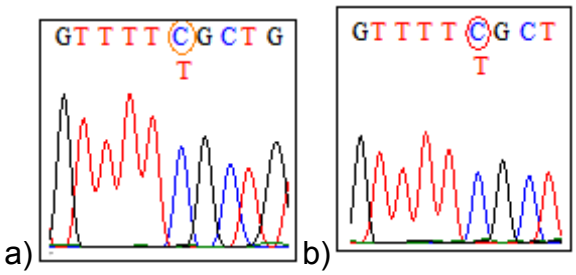

Figura 25. Confirmação das mutações no eletroferograma. **a)** Ind IV-2 mutação c→ g e **b)** Ind IV-3 mutação c→ g.

5.5.3 Éxon 11

Não foram identificadas mutações no éxon 11

5.5.4 Íntron 15

A análise do íntron 15 na porção próxima ao éxon 16 (3'), mostrou no paciente IV-3 uma mutação na posição 312 do íntron 15 de t→a (Figuras 26 e 27).

```
                    Primer 16d →
PTCH_1-16        agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente II-2    agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente II-4    agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente II-5    agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente II-7    agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente III-2   agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente IV-1    agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente IV-2    agggtccttctggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
Paciente IV-3    agggtcctactggctgcgagttataatgtgttacaatcatttgccatttctagGACTTCA
                 ******** ************************************************

PTCH_1-16        GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente II-2    GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente II-4    GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente II-5    GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente II-7    GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente III-2   GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente IV-1    GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente IV-2    GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
Paciente IV-3    GGATGCATTTGACAGTGACTGGGAAACCGGGAAAATCATGCCAAACAATTACAAGAATGG
                 ************************************************************

PTCH_1-16        ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente II-2    ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente II-4    ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente II-5    ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente II-7    ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente III-2   ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente IV-1    ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente IV-2    ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
Paciente IV-3    ATCAGACGATGGAGTCCTTGCCTACAAACTCCTGGTGCAAACCGGCAGCCGCGATAAGC
                 ************************************************************
                                   ← Primer 16r
PTCH_1-16        CCATCGACATCAGCCAGgtactccagctgctgggcactga
Paciente II-2    CCATCGACATCAGCCAGgtactcctgctgctgggctctgt
Paciente II-4    CCATCGACATCAGCCAGgtactcctgctgctgggctctga
Paciente II-5    CCATCGACATCAGCCAGgtactcctgctgctgggctctga
Paciente II-7    CCATCGACATCAGCCAGgtactccagctgctgggcactgt
Paciente III-2   CCATCGACATCAGCCAGgtactccagctgctgggctctgt
Paciente IV-1    TCATCGACATCAGCCAGgtactccagctgctgggctctgt
Paciente IV-2    CCATCGACATCAGCCAGgtactccagctgctgggctctga
Paciente IV-3    CCATCGACATCAGCCAGgtactcctgctgctgggctctga
                 ************************ ********** ***
```

Figura 26. Sequenciamento dos nucleotídeos com pareamento das bases do éxon 16, íntron 15 (parcial) e íntron 16 (parcial) do gene *PTCH1* analisado. Em letra maiúscula estão os éxons, em minúscula os íntron, em vermelho e sublinhados estão os nucleotídeos nos quais os *primers* direto (5') e reverso (3') se complementam na reação do PCR. Em azul estão as bases onde houve mutações No início das seqüências, na primeira linha, a sequência normal do éxon e abaixo a encontrada em cada indivíduo.

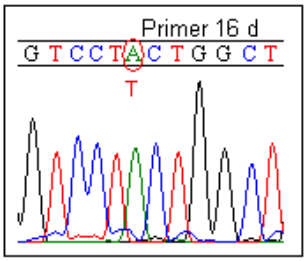

Figura 27. Confirmação da mutação t→a no eletroferograma. Ind IV-3.

5.5.5 Éxon 16

Como resultados no éxon 16, o paciente IV-1 apresentou uma mutação *missense* na posição 2873 de C→T (Figuras 26 e 28).

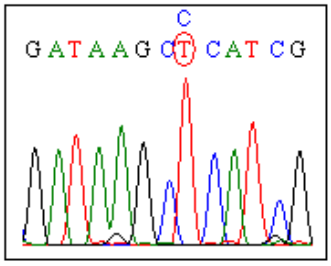

Figura 28. Confirmação da mutação no eletroferograma. Ind IV-1.

5.5.6 Íntron 16

A análise do íntron 16 na porção próxima ao éxon 16 (5'), mostrou:

Mutação de a→t na posição 8, nos indivíduos II-2, II-4, II-5 e IV-3.
Mutação de a→t na posição 19, os indivíduos II-2, II-4, II-5, III-2, IV-1, IV-2 e IV-3.
Mutação de a→t na posição 23, os indivíduos II-2, II-4, II-7, III-2 e IV-1. (Figuras 26 e 29).

.

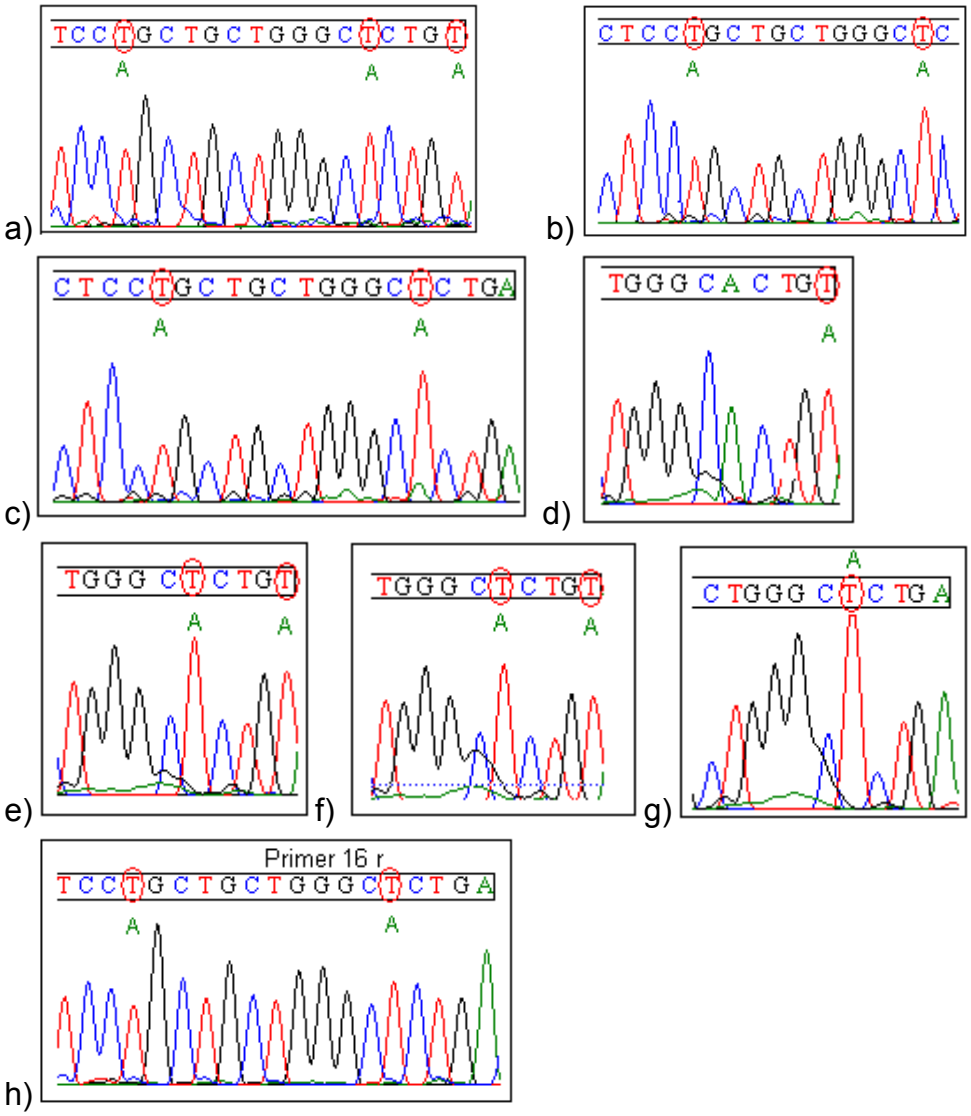

Figura 29. Confirmação dos resultados no eletroferograma. **a)** Ind II-2 mutações de a→t ,**b)** Ind II-4 mutações de a→t, **c)** Ind II-5 mutações de a→t, **d)** Ind II-7 mutação de a→t, **e)** Ind III-2 mutações de a→t, **f)** Ind IV-1 mutações de a→t, **g)** Ind IV-2 mutação de a→t, **h)** Ind IV-3 mutações de a→t.

A análise do íntron 16 na porção próxima ao éxon 17 (3'), mostrou:

Polimorfismo a/t na posição 637, nos indivíduos III-2, IV-1 e IV-2.

Mutação de t→a na posição 638, nos indivíduos II-2, II-7, III-2, IV-2 e IV-3.

Mutação de t→a na posição 639 nos indivíduos II-2, II-4, II-5, III-2, IV-1 e IV-2.

Mutação de t→a na posição 641 nos indivíduos II-2, II-4, III-2, IV-1 e IV-2.

Mutação de t→a na posição 650 nos indivíduos II-2, II-4, II-5, II-7, III-2, IV-1 e IV-3.

Mutação de t→a na posição 652 nos indivíduos II-2, II-4, II-5, III-2 e IV-2.

(Figuras 30 e 31)

```
                          Primer 17d →                          Exon 17
PTCH1-17          aaccccattctcaaaggcctctgttcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente II-2     aaccccaaacacaaaggccacagatcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente II-4     aaccccatactcaaaggccacagatcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente II-5     aaccccatactcaaaggccacagatcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente II-7     aaccccaatctcaaaggccactgatcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente III-2    aaccccpaacacaaaggccacagtacttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente IV-1     aaccccptacacaaaggccactgatcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente IV-2     aaccccpaacacaaaggcctcagatcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
Paciente IV-3     aaccccaatctcaaaggccactgatcttcccgtttttgtagTTGACTAAACAGCGTCTG
                  ******   * ******** * *  ***********************************
PTCH1-17          GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente II-2     GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente II-4     GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente II-5     GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente II-7     GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente III-2    GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente IV-1     GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente IV-2     GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
Paciente IV-3     GTGGATGCAGATGGCATCATTAATCCCAGCGCTTTCTACATCTACCTGACGGCTTGGGT
                  ************************************************************
PTCH1-17          CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente II-2     CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente II-5     CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente II-4     CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente II-7     CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente III-2    CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente IV-1     CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente IV-2     CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
Paciente IV-3     CAGCAACGACCCCGTCGCGTATGCTGCCTCCCAGGCCAACATCCGGCCACACCGACCAG
                  ************************************************************
PTCH1-17          AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente II-2     AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente II-4     AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente II-5     AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente II-7     AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente III-2    AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente IV-1     AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente IV-2     AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
Paciente IV-3     AATGGGTCCACGACAAAGCCGACTACATGCCTGAAACAAGGCTGAGAAgtaagtagcgt
                  ************************************************************
                                   ← Primer 17r
PTCH1-17          tttatcgggaggtctgggaacttacagaggtg
Paciente II-2     tttatcgggaggtctgggatctttcagtggtg
Paciente II-4     tttatcgggaggtctgggatctttctgtggtg
Paciente II-5     tttatcgggaggtctgggatctttctgtggtg
Paciente II-7     tttatcgggaggtctgggtactttctgaggtg
Paciente III-2    tttatcgggaggtctgggttctttctgtggtg
Paciente IV-1     tttatcgggaggtctgggatctttctgtggtg
Paciente IV-2     tttatcgggaggtctgggtactttctgaggtg
Paciente IV-3     tttatcgggaggtctgggtactttctgaggtg
                  *****************  *** * * ****
```

Figura 30 Sequenciamento dos nucleotídeos com pareamento das bases do éxon 17, íntron 16 (parcial) e intron 17 (parcial) do gene *PTCH1* analisado. Em letra maiúscula estão os éxons, em minúscula os íntrons, em vermelho e sublinhados estão os nucleotídeos nos quais os *primers* direto (5') e reverso (3') se complementam na reação do PCR. Em azul estão as bases onde houve mutações. No início das seqüências, na primeira linha, a sequência normal do éxon e abaixo a encontrada em cada indivíduo.

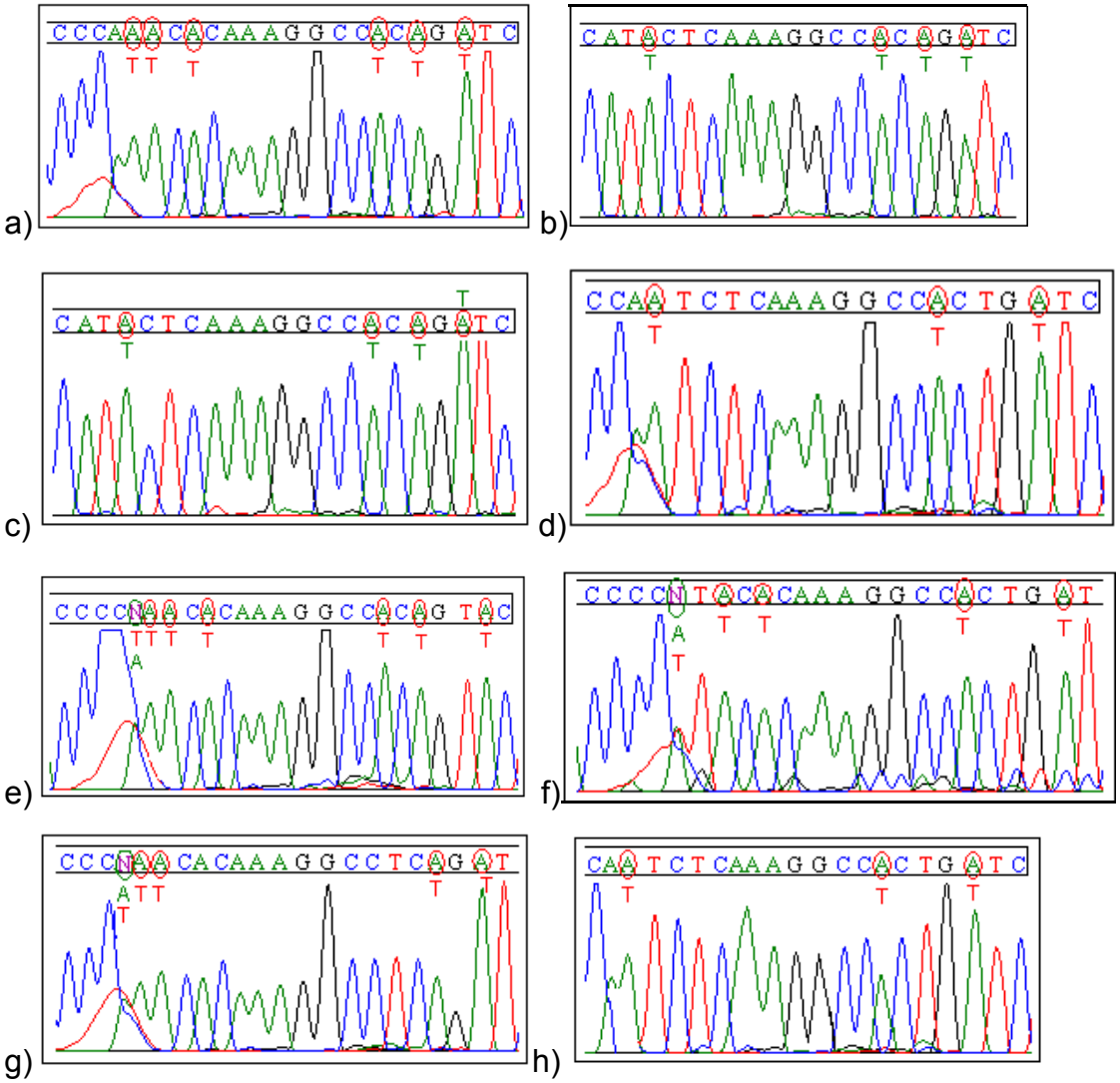

Figura 31. Confirmação dos resultados no eletroferograma. **a)** Ind II-2 mutações de t→a, **b)** Ind II-4 mutações de t→a, **c)** Ind II-5 mutações de t→a, **d)** Ind II-7 mutações de t→a, **e)** Ind III-2 mutações de t→a e polimorfismo a/t, **f)** Ind IV-1 mutações de t→a e polimorfismo a/t, **g)** Ind IV-2 mutações de t→a e polimorfismo a/t, **h)** Ind IV-3 mutações de t→a.

5.5.7 Éxon 17

Não foram encontradas mutações no éxon 17

5.5.8 Íntron 17

A análise da porção do íntron 17 próxima ao éxon 17(5') mostrou:
Mutação de a→t na posição 18 do íntron 17, nos indivíduos II-4, II-7, III-2, IV-2 e IV-3.
Mutação de a→t na posição 19, nos indivíduos II-2, II-5, III-2 e IV-1.
Mutação de a→t na posição 23, os indivíduos II-2, II-4, II-5,II-7, III-2, IV-1, IV-2 e IV-3.
Mutação de a→t na posição 25, os indivíduos II-5, II-7, III-2, IV-1, IV-2 e IV-3.
Mutação de a→t na posição 27, os indivíduos II-2, II-4, II-5, III-2 e IV-1.
(Figuras 30 e 32)

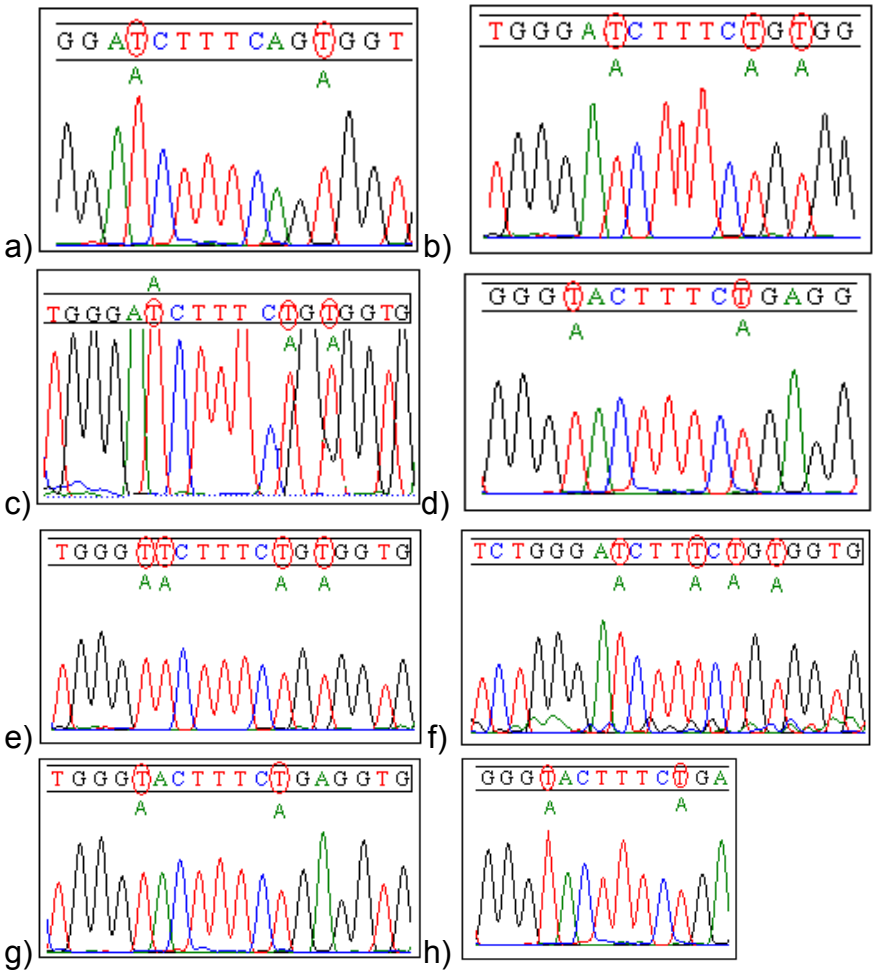

Figura 32. Confirmação dos resultados no eletroferograma. a) Ind II-2 mutações de t→a, b) Ind II-4 mutações de t→a, c) Ind II-5 mutações de t→a, d) Ind II-7 mutações de t→a, e) Ind III-2 mutações de t→a, f) Ind IV-1 mutações de t→a,g) Ind IV-2,h) Ind IV-3 mutações de t→a.

5.5.9 Éxon 23

A paciente II-2 foi apresentou uma mutação *frameshift* com uma deleção da base C na posição 4130.

Na paciente III-2 foi detectada uma mutação *missense* de A→G na posição 4261. Nos irmãos IV-2 e IV-3 foi observada uma mutação *missense* de C→T na posição 4130. (Figuras 33 e 34)

```
            P12d →
PTCH_1-23   ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
II-2        ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
II-4        ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
II-5        ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
II-7        ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
III-2       ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
IV-1        ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
IV-2        ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
IV-3        ggttgactgagtctttggtgaaacccaaggagggaagtgtgggagctgcggggaccatgc
            ************************************************************

PTCH_1-23   ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
II-2        ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
II-4        ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
II-5        ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
II-7        ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
III-2       ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
IV-1        ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
IV-2        ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
IV-3        ccagcctgggataccacccttctaacccaccctcaccctctgcagGTGGTCCATCCCGAA
            ************************************************************

PTCH_1-23   TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
II-2        TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
II-4        TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
II-5        TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
II-7        TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
III-2       TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
IV-1        TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
IV-2        TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
IV-3        TCCAGGCATCACCCACCCTCGAACCCGAGACAGCAGCCCCACCTGGACTCAGGGTCCCTG
            ************************************************************

PTCH_1-23   CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
II-2        CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
II-4        CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
II-5        CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
II-7        CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
III-2       CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
IV-1        CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
IV-2        CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
IV-3        CCTCCCGGACGGCAAGGCCAGCAGCCCCGCAGGGACCCCCCCAGAGAAGGCTTGTGGCCA
            ************************************************************

PTCH_1-23   CCCCCCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
II-2        CCCCC-TACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
II-4        CCCCCCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
II-5        CCCCCCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
II-7        CCCCCCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
III-2       CCCCCCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
IV-1        CCCCCCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
IV-2        CCCCTCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
IV-3        CCCCTCTACAGACCGCGCAGAGACGCTTTTGAAATTTCTACTGAAGGGCATTCTGGCCCT
            **** ***************************************************

PTCH_1-23   AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
II-2        AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
II-4        AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
II-5        AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
II-7        AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
III-2       AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
IV-1        AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
IV-2        AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
IV-3        AGCAATAGGGCCCGCTGGGGCCCTCGCGGGGCCCGTTCTCACAACCCTCGGAACCCAGCG
            ************************************************************
```

```
PTCH_1-23   TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
II-2        TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
II-4        TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
II-5        TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
II-7        TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
III-2       TCCACTGCCATGGGCGGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
IV-1        TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
IV-2        TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
IV-3        TCCACTGCCATGGGCAGCTCCGTGCCCGGCTACTGCCAGCCCATCACCACTGTGACGGCT
            *************** ******************************************

PTCH_1-23   TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
II-2        TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
II-4        TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
II-5        TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
II-7        TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
III-2       TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
IV-1        TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
IV-2        TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
IV-3        TCTGCCTCCGTGACTGTCGCCGTGCACCCGCCGCCTGTCCCTGGGCCTGGGCGGAACCCC
            ************************************************************

PTCH_1-23   CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
II-2        CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
II-4        CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
II-5        CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
II-7        CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
III-2       CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
IV-1        CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
IV-2        CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
IV-3        CGAGGGGGACTCTGCCCAGGCTACCCTGAGACTGACCACGGCCTGTTTGAGGACCCCCAC
            ************************************************************


PTCH_1-23   GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
II-2        GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
II-4        GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
II-5        GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
II-7        GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
III-2       GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
IV-1        GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
IV-3        GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
IV-2        GTGCCTTTCCACGTCCGGTGTGAGAGGAGGGATTCGAAGGTGGAAGTCATTGAGCTGCAG
            ************************************************************

PTCH_1-23   GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
II-2        GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
II-4        GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
II-5        GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
II-7        GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
III-2       GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
IV-1        GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
IV-2        GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
IV-3        GACGTGGAATGCGAGGAGAGGCCCCGGGGAAGCAGCTCCAACTGAggtgagtgccactga
            ************************************************************

                                        ← P12r
PTCH_1-23   caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
II-2        caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
II-4        caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
II-5        caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
II-7        caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
III-2       caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
IV-1        caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
IV-2        caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
IV-3        caagggcagccaagggacctagagccaggcaaagaggaggac
            ******************************************
```

Figura 33. Sequenciamento dos nucleotídeos com pareamento das bases do éxon 23, íntron 22 (parcial) e íntron 23(parcial) do gene *PTCH1* analisado. Em letra maiúscula estão os éxons, em minúscula os íntrons, em vermelho e sublinhados estão os nucleotídeos nos quais os *primers* direto (5') e reverso (3') se complementam na reação do PCR. Em azul estão as bases onde houve mutações e em verde representados pela letra P os polimorfismos. No início das seqüências, na primeira linha, a sequência normal do éxon e abaixo a encontrada em cada indivíduo.

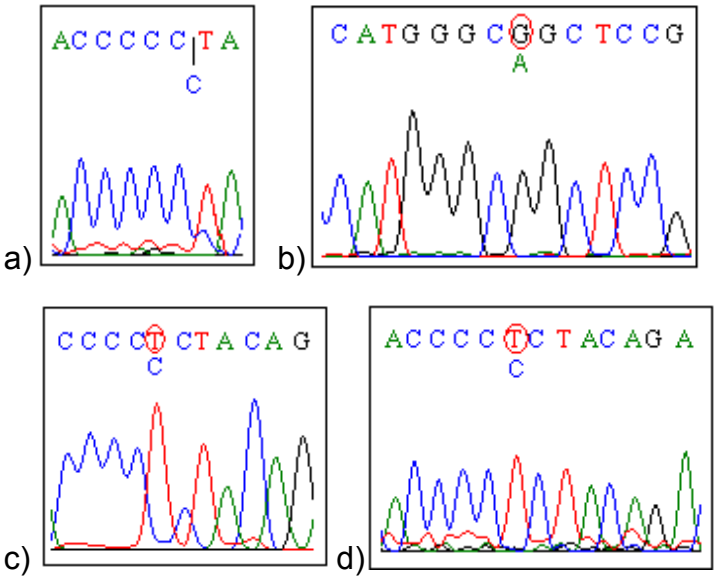

Figura 34. Confirmação dos resultados no eletroferograma. **a)** Ind II-2 deleção de C, **b)** Ind III-2 mutação A→G, **c)** Ind IV-2 mutação C→T e **d)** Ind IV-3 mutação C→T.

Todos os resultados foram sumarizados no quadro 3, figuras 35, 36 e 37.

Quadro 3. Na primeira linha estão os descritos todos os éxons e introns estudados, e na primeira coluna os pacientes identificdos de acordo com o heredograma

Paciente	Exon 9	Intron 10 (3')	Exon 11	Intron 15 (3')	Intron 16 (partial)	Exon 16	Exon 17	Intron 17 (5')	Exon 23
II-2*	normal	595(c→g)	normal	normal	8, 19, 23 (a→t) 638, 639, 641, 650, 652 e 654 (t→a)	normal	normal	19, 23, 27 (a→t)	nt4130(del C)
II-4*	normal	595(c→g)	normal	normal	8, 19 (a→t) 639, 641, 650, 652 e 654 (t→a)	normal	normal	18, 23, 27 (a→t)	normal
II-5	nt1420(G→T)	595(c→g)	normal	normal	8, 19 (a→t) 639, 650, 652 e 654 (t→a)	normal	normal	19, 23, 25, 27 (a→t)	normal
II-7	nt1443(insT) nt1468(insT)	595, 639 (c→g)	normal	normal	23 (a→t) 638, 650, 654 (t→a)	normal	normal	18, 23, 25 (a→t)	normal
III-2*	normal	595, 639 (c→g)	normal	normal	19, 23 (a→t) 637 (a/t) 638, 639, 641, 650, 652, 654 (t→a)	normal	normal	18, 19, 23, 25, 27 (a→t)	nt4261(A→G)
IV-1	nt1420(G→T)	595(c→g)	normal	normal	19, 23 (a→t) 637 (a/t) 639, 641, 650, 654 (t→a)	nt2873 (C→T)	normal	19, 23, 25, 27 (a→t)	normal
IV-2	normal	595(c→g) 682 (t→c)	normal	normal	19 (a→t) 637 (a/t) 638, 639, 641, 652, 654 (t→a)	normal	normal	18, 23, 25 (a→t)	nt4130(C→T)
IV-3	normal	595(c→g) 682 (t→c)	normal	312 (t→a)	8, 19 (a→t) 638, 650, 654 (t→a)	normal	normal	18, 23, 25 (a→t)	nt4130(C→T)

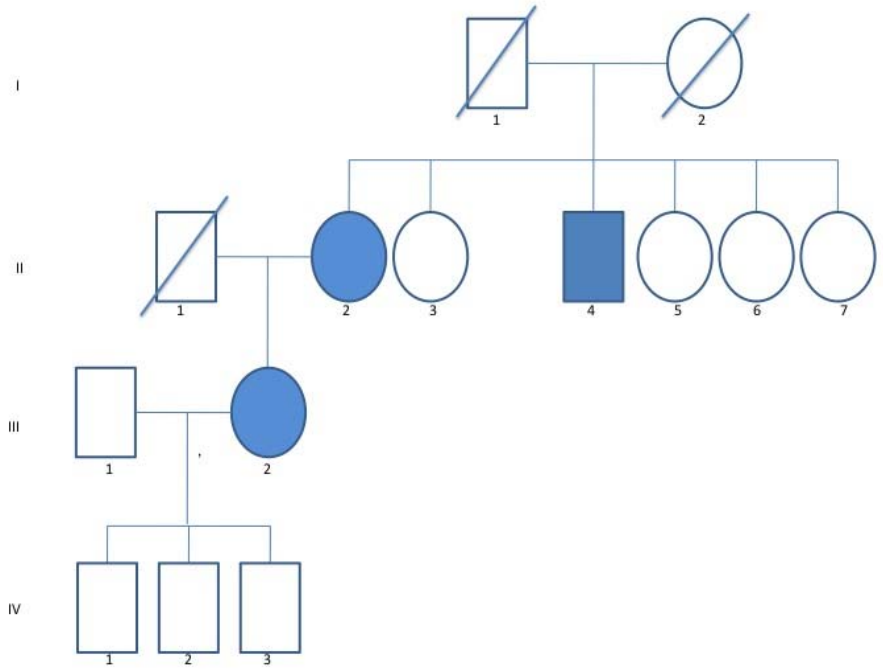

Figura 35. Heredograma da família estudada.

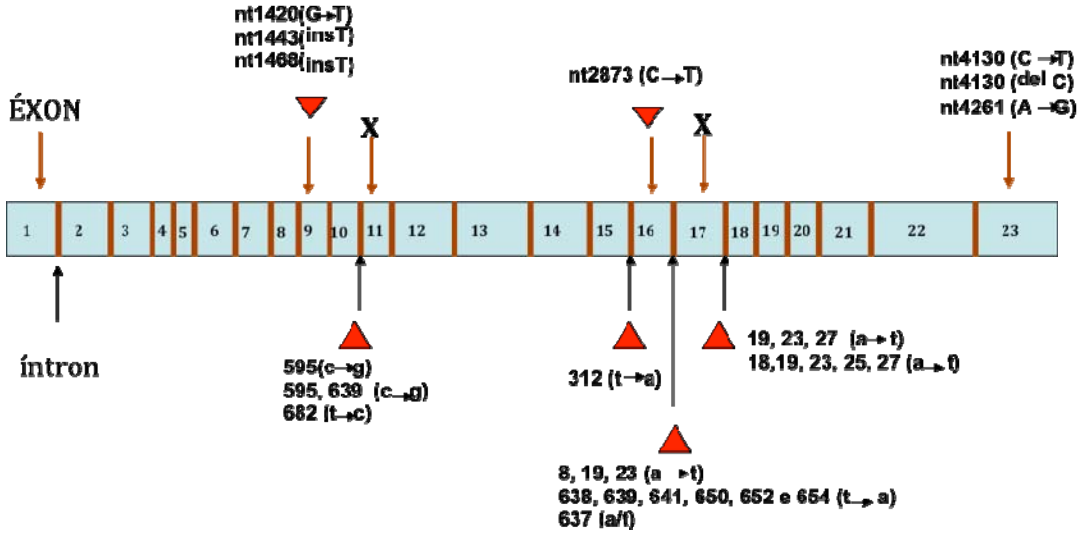

Figura 36. Distribuição dos tipos de mutações encontradas em cada éxon e íntron encontradas. X representa os éxons onde não foram encontradas mutações.

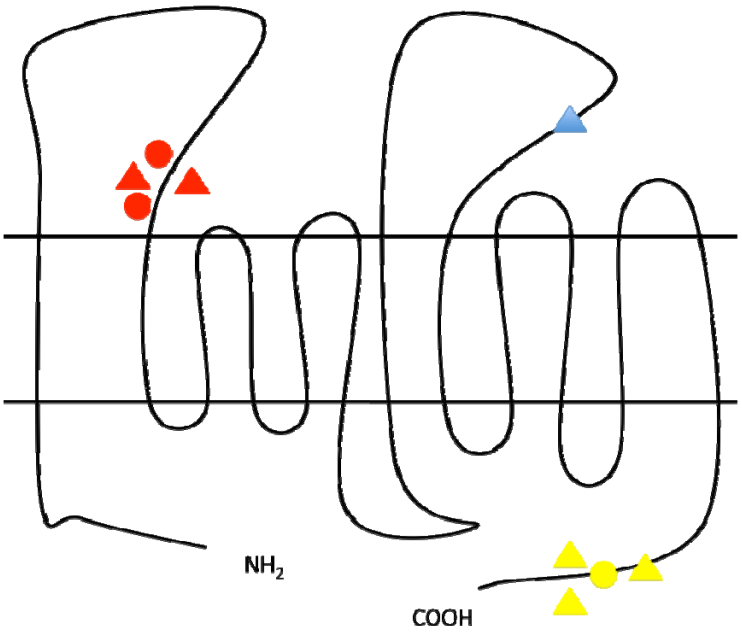

Figura 37. Distribuição das mutações exônicas encontradas, em relação aos domínios estruturais da proteína *patched*. O triângulo vermelho indica mutação *missense* e os círculos vermelhos inserção e deleção no éxon 9, o triângulo azul indica mutação *missense* no éxon 16, Os triângulos amarelos indicam mutações *missense* e o circulo amarelo indica deleção no éxon 23.

6 DISCUSSÃO

Os carcinomas basocelulares familiares múltiplos não sindrômicos são raramente reportados e muito pouco estudados. Caracterizam-se por múltiplos CBCs superficiais, acometendo preferencialmente tronco, de início precoce, sem a ocorrência de outras anormalidades presentes na SNBC, Rombo e Bazex.[2,10,13,31,32,33]

Até o momento são descritos na literatura apenas cinco relatos de famílias com a doença. Em três foi demonstrado pacientes em duas gerações e em dois em três.[14,18,39] Estes trabalhos são simplesmente clínicos e não houve estudos genéticos reportados. É portando importante o estudo destas famílias para se determinar a existência dessa doença como identidade separada das demais síndromes e a realização de estudos genéticos para se tentar determinar as possíveis mutações implicadas neste quadro.

Os casos da família estudada neste trabalho, não apresentavam nenhuma outra alteração fenotípica, somente três deles apresentavam tumores. Dois deles (II-2,III-3) não tinham historia prévia de exposição a carcinógenos e a doença se repetia em 2 gerações, fato similar descrito por Happle em 2000.[18] Os CBCs destes desenvolveram-se em idade bem precoce e as áreas expostas e cobertas eram afetadas igualmente a semelhança das síndromes associadas a múltiplos CBCs, questionando a influência solar nestes casos. A semelhança entre estas doenças (CBCFMNS e SNBC) nos leva a crer que exista um espectro genético que determine as alterações fenotípicas nestes indivíduos, hora cursando com múltiplos tumores sem qualquer outra alteração, hora com alterações importantes como as encontradas na SNBC (cisto mandibulares, calcificação da foice do cérebro costela bífida, entre outras).

Estudos prévios de literatura e do nosso grupo (Laboratório de Genética do Instituto Butantan e Ambulatório de Oncologia Cutânea do

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) mostraram que o gene ligado ao desenvolvimento de CBC esporádico e SNBC é o *PATCH1*.[97-142] Inúmeras mutações já foram descritas alterando principalmente a região dos loops extracelulares da proteína *patched1*, fato que motivou o estudo genético nos indivíduos desta família.

Este estudo do gene *PTCH1* mostrou mutações nos éxons e/ou nos íntrons em todos os familiares analisados. Algumas, na mesma posição e outras em diferentes.

Não existem relatos na literatura demonstrando a associação de CBCs múltiplos não sindrômicos e mutações do gene *PTCH1*.[14,18,39,97-141] O que existe é uma grande quantidade de mutações relatadas na SNBC e nos CBCs esporádicos. Até 2006 no banco de dados de mutações do gene *PTCH1* (www.cybergene.se/*PTCH*/) foram descritas 284 pontos de mutações.[118] Quando comparamos nossos resultados a este banco de dados e aos casos descritos na literatura, supreendentemente nenhuma das mutações encontradas em nossa casuística estão descritas. Este fato talvez se deva a característica do gene *PTCH1* de não apresentar *hot spots* bem definidos, podendo sofrer mutações causadoras de defeitos em sua proteína ao longo de todo o gene. Importante também é o fato de que a localização da mutação no gene, no individuo com SNBC, não interferir necessariamente no fenótipo. Pacientes com as mesmas mutações podem apresentar fenótipos diferentes, e com mutações diferentes podem apresentar fenótipos semelhantes.[140,141]

Nesse estudo, identificamos mutações exônicas em 7 de 8 dos indivíduos analisados (87 %) (Quadro 3), enquanto que doentes portadores de SNBC apresentam taxas de mutações detectadas entre 40 e 80 % .[127,140,141] Em relatos anteriores a maioria dos doentes com SNBC apresentavam mutações *nonsense* e *frameshift* em comparação com *missense* (85 % vs 15 %). A presença de mutações *frameshift* leva ao truncamento da proteína por alterarem o quadro de leitura, através de inserção ou deleção de bases no gene, ou ainda pelo surgimento de um *stop codon*, parando a transcrição protéica precocemente. Isso teoricamente promove o aparecimento de uma

proteína não funcional fazendo com que os indivíduos desenvolvam características fenotípicas da SNBC.[113,121,122,123, 140, 141.]

Em nossa pesquisa, diferente da literatura, a maioria das mutações foi *missense* (6 em 9) representando 66 %. Essas mutações mudam apenas um aminoácido na proteína, alterando parcialmente sua molécula, talvez por isso, apesar de possuírem mutações, alguns dos indivíduos por nós estudados, não apresentavam quadro clínico nem de SNBC nem de CBCMFNS.

O estudo da linhagem germinativa de 48 pacientes portadores de CBC não sindrômicos, únicos, múltiplos, esporádicos e familiares, encontrou apenas um caso de mutação do gene *PTCH1*, localizada no éxon 15. [113] Foi sugerido que nos casos de CBCs múltiplos, familiares e precoces quando outros critérios para SNBC estão ausentes, as mutações no *PTCH1* raramente estão envolvidas, fato não corroborado em nosso estudo. Nos indivíduos da família estudada portadores de CBCMFNS foram encontradas mutações no éxon 23.

A análise genética dos indivíduos desta família , mostrou que muitas das mutações exônicas ocorreram no éxon 9, em diferentes posições. O éxon 9 codifica uma porção final do primeiro *loop* extracelular da proteína *patched1* (Figura 37). Se uma mutação alterar a conformação do *loop* isso pode modificar a ligação com a proteína *Hh*, alterando a transdução do sinal levando ao desenvolvimento ou predisposição de tumores.

No indivíduo II-7, embora não apresentasse nenhuma característica da SNBC e nenhum CBC, foram encontradas duas mutações do tipo *frameshift no* éxon 9 no final do primeiro *loop* (Figura 37), que altera o quadro de leitura podendo promover o truncamento da proteína. Isso se assemelha aos resultados encontrados por Lindström et al em 2006,[118] onde em portadores de SNBC o éxon 9 é um sítio freqüente de mutações e a grande maioria do tipo *frameshift* e *nonsense*.

Os indivíduos II-5 e IV-1 apresentaram mutação na posição 1420 de G→T. Esta alteração leva a troca do aminoácido Alanina (GCA) para Serina (TCA) [A475S], o que pode vir a alterar a estrutura da proteína. Apesar disso

o indivíduo II-5 , mesmo com idade avançada 63 anos, não apresentava tumores até o momento. Trata-se de uma mutação conservada na família e ainda não descrita na literatura.[97-144]

O indivíduo IV-1 apresentou uma segunda mutação *missense* no exon 16 na posição 2873 de C→T, o que leva a troca do aminoácido de Prolina (CCC) por Leucina(CTC) [P958L], podendo facilitar assim no futuro o desenvolvimento de CBCs.

O éxon 16 codifica a porção final do segundo *loop* extra-celular da proteína *patched*. Segundo Lindström et al[118] esse é um sitio de mutação importante com a ocorrência de muitas mutações *nonsense* e *frameshift* nessa região. Nós encontramos uma mutação do tipo *missense* nessa posição ainda não reportada na literatura. (Figura 37)

As pacientes II-2 e III-2 com múltiplos CBCs, apresentaram mutações no éxon 23. Na primeira (II-2) foi encontrada uma deleção nt 4130 (del C), ainda não descrita, podendo levar ao truncamento da proteína. A filha (III-2) apresentou uma mutação *missense* com a troca do aminoácido Serina (AGC) por Glicina(GGC) [S1421G].

A localização das mutações pode ser importante nos casos de CBCFMNS, já que em duas das nossas pacientes com tumores, foram encontradas mutações que se relacionavam ao domínio terminal *COOH* da proteína *patched* (Figura 37), codificada pelo éxon 23, e mutações nesse éxon são raramente descritas em pacientes com SNBC.[118]

Os indivíduos IV-2 e IV-3, irmãos, apresentaram uma mutação *missense* no mesmo nucleotídeo da posição 4130 de C→T do éxon 23. Esta alteração leva a troca do aminoácido Prolina(CCC) por Leucina(CTC) [P1377L]. Nesse mesmo nucleotídeo a avó paciente II-2, apresentou uma deleção de base, o que leva a possibilidade dessa posição ser um sitio de mutações nessa família. Nenhum dos dois indivíduos apresentou até o momento qualquer tipo de tumor. Teremos de acompanhá-los, verificando se existe a susceptibilidade para o aparecimento das lesões, e assim confirmar ou não a importância dessa mutação no surgimento de CBCs ao longo do tempo.

Mutações observadas nos íntrons são pouco discutidas na literatura, permanecendo ainda controverso seu papel no desenvolvimento tumoral. Estudos anteriores[16,19] demonstram uma taxa de detecção de mutações exônicas no gene *PTCH1* de 33% nos portadores da SNBC, porém em artigos mais recentes onde foi feita a análise também dos íntrons, essa taxa aumenta[113,123] sugerindo que estes devam ter importância no aparecimento da síndrome. Se esta análise for verdadeira, talvez as alterações intrônicas dos casos estudados possam influenciar o surgimento de CBCMFNS.

Todos os indivíduos estudados apresentaram mutações e/ou polimorfismos nos íntrons do gene *PTCH1*. Nos íntrons 10, 16 e 17 foram encontradas diversas mutações e polimorfismos muitas delas se repetindo em mais de um membro da família. (Figura 36) (Tabela 3)

No íntron 10 e íntron 17 uma mesma mutação na mesma posição se repetiu em todos indivíduos da família sugerindo se tratar de uma característica hereditária. No íntron 16 foi onde se encontrou o maior número de mutações (nove no total).

Mutações nos íntrons podem causar alteração de *splice* do RNAm levando a possibilidade do íntron não ser eliminado durante a transcrição, comprometendo a estrutura da proteína.[145] Alteração da proteína *patched* causado por erro de *splice* já foi descrito nos portadores da SNBC.[145] Isso talvez possa predispor ao desenvolvimento de CBC. Esta afirmação entretanto só será possível em estudos futuros.

Os indivíduos II-2, III-2 e II-4 que apresentavam CBCs, mostraram 8 mutações idênticas distribuídas pelos íntrons 10,16 e 17. Mesmo apresentando as mesmas mutações, o indivíduo II-4 diferia clinicamente, mostrando quadro de CBCs múltiplos esporádicos, associados QAs e a CECs, provavelmente desencadeados por RUV e eventuais alterações em outros genes.

Em estudos recentes[143,144] foi demonstrado que a presença de polimorfismos no gene *PTCH1*, localizados nos éxons e íntrons está associada a um o risco aumentado de desenvolvimento de CBCs esporádico e múltiplos. O polimorfismo intrônico encontrado nos indivíduos III-2 (mãe) e

V-1, IV-2 (filhos) não havia sido reportado na literatura. Não sabemos como esse polimorfismo pode interferir no surgimento de CBCs.

De forma resumida demonstramos mutações em todos os membros da família avaliada. Em determinados íntrons como o 10 e 17 foram encontradas mutações em todos indivíduos na mesma posição. No íntron 16 todos indivíduos apresentavam mutação e muitas delas na mesma posição. Nas pacientes com suspeita de CBCMFNS encontramos mutações iguais nos íntrons 10, 16 e 17 e diferentes no éxon 23, podendo ser as responsáveis pelo surgimento dos tumores.

Pela primeira vez estão sendo descritas mutações em éxons e íntrons do gene *PTCH1* em indivíduos portadores de CBCMFNS e em seus familiares. A análise destes dados genéticos podem comprovar a possível origem espectral do CBC que vai desde lesão esporádica em um pólo e a SNBC em outro, passando pelo CBCMFNS.

Este trabalho abre caminho para outros estudos com um numero maior de casos de CBC múltiplos não-sindrômicos familiares e não familiares, necessários para corroborar os dados encontrados neste estudo e se entender melhor esse mecanismo.

7 CONCLUSÃO

1. Pela primeira vez estão sendo descritas mutações em éxons e íntrons do gene *PTCH1* em indivíduos portadores de CBCMFNS e nos familiares estudados.

2. Todos os indivíduos estudados com ou sem a presença de CBCs apresentaram algum tipo de mutação.

3. Mãe e filha ambas com CBCMFNS apresentaram mutações no éxon 23.

4. Mutação na mesma posição ocorreu em todos os indivíduos analisados no íntron 10 [595 (c→g)] e no íntron 17 [23 (a→t)] mostrando serem caracteres hereditários.

5. Os três indivíduos com tumores apresentaram mutações no íntron 16 nas mesmas posições 19 (a→t) e em 639, 641, 650, 652 e 654 (t→a), e no íntron 17 posições 23, 27 (a→t).

6. Os indivíduos irmãos, IV-1 e IV-2, apresentaram o mesmo polimorfismo no íntron 17.

8 ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA ..... ESTUDO CLÍNICO E MUTAÇÕES NOS GENES *PATCHED* EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS BASOCELULARES MÚLTIPLOS FAMILIARES NÃO SINDRÔMICOS

PESQUISADOR...CYRO...FESTA...NETO.....

CARGO/FUNÇÃO: PÓS GRADUAÇÃO PROF ASSOCIADO..... INSCRIÇÃO...CONSELHO REGIONAL Nº27716 .....

UNIDADE.....DO.....HCFMUSP:.....DERMATOLOGIA.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : .6 MESES.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Essas informações estão sendo fornecido para sua participação voluntária neste estudo, que visa estudar pessoas portador(a) de múltiplos cânceres de pele chamados de carcinomas basocelulares, ou familiar de algum portador. Este tipo de câncer de pele é o mais freqüente e seu aparecimento vem crescendo muito nos últimos anos devido principalmente à exposição intensa da pele ao sol durante a vida. O principal objetivo desta pesquisa é verificar se existe alguma MUTAÇÃO GENÉTICA NAS PESSOAS QUE TEM ESTE TIPO TUMOR, com isto, esta pesquisa poderá ajudar médicos e pesquisadores compreender melhor esta doença. É preciso que você entenda a natureza da sua participação na pesquisa e dar o seu consentimento livre e esclarecido por escrito

2 – Caso concorde e participar desta pesquisa, você será submetido(a) a alguns procedimentos médicos que serão explicados agora. Caso apresente tumores, o tratamento proposto a você é a cirurgia de remoção do câncer da pele isto independente de estar ou não fazendo parte da pesquisa. Esta cirurgia será realizada no Hospital das Clínicas por médicos habilitados. Será preciso que você consinta que parte do material retirado na cirurgia, seja fornecido para a pesquisa, o restante vai ser enviado para realização do exame anatomo-patológico. Seu papel na pesquisa será o de consentir o fornecimento do material para a sua realização, o que não prejudicará seu tratamento.

3 – Será realizada coleta de sangue rotineira por punção periférica da veia do antebraço e o material enviado para estudo.

4 – Caso concordar em participar desta pesquisa científica, poucos riscos estão envolvidos. Os fragmentos do tumor que irão ser estudados serão retirados na cirurgia e o sangue no laboratório, sendo a manipulação deste feita pelo pesquisador o que não acarretará nenhum desconforto ou risco para você.

5 – Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que se encontre alguma mutação relacionada ao tumor, e se compreenda melhor seu comportamento. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício que viriam a partir de outros estudos.

6 – Os procedimentos ao os quais você será submetido são os já utilizados rotineiramente para o seu tratamento, não havendo outros que lhe trariam mais vantagens para se optar.

7 –Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Cyro Festa Neto . que pode ser encontrado no Departamento/Divisão de Clínica de Dermatologia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 255 3º andar salas 3069/3070 Cerqueira César – São Paulo- SP Telefone(s) 30884894/30882515....Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua

Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

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

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

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

11 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Os materiais e dados obtidos durante esta pesquisa serão utilizados apenas na mesma, outros pesquisadores não poderão utilizá-los para outros fins.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo" ESTUDO CLÍNICO E MUTAÇÕES NOS GENES *PATCHED* EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMAS BASOCELULARES MÚLTIPLOS FAMILIARES NÃO SINDRÔMICOS"

Eu discuti com o Dr.CYRO FESTA NETO sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

_____

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

9 REFERÊNCIAS

1. Einspahr J G, Stratton S P, Bowden G T, Alberts D S. Chemoprevetion of human skin cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2002: 41: 269-285.

2. Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma (Part I). J Am Acad Dermatol 1991; 24: 1-13.

3. Silverstone H, Gordon D. Regional studies in skin cancer. 2. Wet tropical and subtropical coasts of Queensland. Med J Aust 1996; 2:733–40.

4. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD et al. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. Arch Dermatol 1995; 131:157–63.

5. Mithoefer AB, Supran S, Freeman RB. Risk factors associated with the development of skin cancer after liver transplantation. Liver Transpl 2002; 8:939–44.

6. Corona R, Dogliotti E, D'Errico M et al. Risk factors for basal cell carcinoma in a Mediterranean population: role of recreational sun exposure early in life. Arch Dermatol 2001; 137:1162–8.

7. Lear JT, Smith AG, Strange RD, Fryer AA. Patients with truncal basal cell carcinoma represent a high-risk group. Arch Dermatol 1998; 134:373.

8. Grossman D, Leffell DJ. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. Arch Dermatol 1997; 133:1263–70.

9. Gallagher RP, Bajdik CD, Fincham S et al. Chemical exposures, medical history, and risk of squamous and basal cell carcinoma of the skin. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5:419–24.

10, Miller, SJ. Biology of basall cell carcinoma (Part II). J Am Acad Dermatol 1991; 24: 161-75.

11. Armstrong BK, Kricker A. The epidemiology of UV induced skin cancer. J Photochem Photobiol B. 2001;63: 8-18.

12. Goldberg LH. Basal cell carcinoma. Lancet. 1996;347(9002):663-7.

13. Descamps V, Aractingi S, Venencie PY. Carcinomes cutanés. Ann. Dermatol. Venereol. 1997;124:12-29.

14. Guarneri B, Borgia F, Cannavo SP, Vaccaro M, Happle R. Multiple familial basal cell carcinomas including a case of segmental manifestation. Dermatology 2000;200:299-302.

15. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. Mod Pathol. 2006;19 Suppl 2:S127-47

16. Chidambaram A, Goldstein AM, Gailani MR, Gerrard B, Bale SJ, DiGiovanna JJ, Bale AE, Dean M. Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in Caucasian and African-American nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. Cancer Res. 1996;56(20):4599-601.

17. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). Orphanet J Rare Dis. 2008;3:32.

18. Happle R. Nonsyndromic type of hereditary multiple basal cell carcinoma. Am J Med Genet 2000; 95:161-3.

19. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Unden AB, Gillies S, *et al.*: Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996, 85:841-851.

20. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP: Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996, 272:1668-1671

21. McCormack CJ, Kelly JW, Dorevitch AP. Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma. A possible indicator of differing causes. Arch Dermatol. 1997;133:593-6.

22. Bastiaens MT, Hoefnagel JJ, Bruijn JA, Westerndorp RGJ, Bermeer BJ,

Bavinck JNB. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinomas indicates different types of tumors. J Invest Dermatol. 1998;110:880-4.

23. Leffell DJ, Headington JT, Wong DS, Swanson NA. Aggressive-growth basal cell carcinoma in young adults. Arch. Dermatol. 1991;127:1663-7.

24. Steigleder GK. Metastasizing basalioma in AIDS. Z Hautkr 1987; 62:661.

25. Sitz KV, Keppen M, Johnson DF. Metastatic basal cell carcinoma in acquired immunodeficiency syndrome-related complex. Jama 1987; 257:340–3.

26. Castori M, Castiglia D, Passarelli F, Paradisi M. Bazex-Dupré-Christol syndrome: an ectodermal dysplasia with skin appendage neoplasms. Eur J Med Genet.2009;52(4):250-5.

27. Barcelos AC, Nico MM. Bazex-Dupré-Christol syndrome in a 1-year-old boy and his mother. Pediatr Dermatol. 2008;25(1):112-3.

28. Torrelo A, Sprecher E, Mediero IG, Bergman R, Zambrano A. What syndrome is this? Bazex-Dupre-Christol syndrome. Pediatr Dermatol. 2006; 23(3):286-90.

29. Shanley S, Ratcliffe J, Hockey A, et al. Nevoide basal cell carcinoma syndrome: Review of 118 affected individual. Am J Med Genet 1994;50:282-290.

30. Clendenning W, Block JB, Radde IC. Basal cell nevus syndrome. Arch Dermatol 1964; 90: 38-53.

31. Lo Muzio L, Nocini PF,Saviola A, Consolo U, Procaccici M, Zelante L, Pannone G, Bucci P, Dolci M, Bambini F, Solda P , Flavia G. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. Clinical finding in 37 italian affected individuals. Clin Genet 1999; 55: 34-40.

32. Hall J, Johnston KA, McPhillips JP, Barnes SD, Elston DM. Nevoid basal cell carcinoma syndrome in a black child. J Am Acad Dermatol 1998; 38:363-5.

33. Gorlin R. Nevoide basal cell carcinoma syndrome. Dermatol Clin 1995; 13:113-125.

34. Unden AB, Zaphiropoulos PG, Bruce K et al. Human patched (*PTCH*) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma. Cancer Res 1997; 57: 2336–40.

35. Walsh N, Ackerman A. Infundibulocystic basal cell carcinoma: a newly described variant. Mod Pathol 1990;3:599-608.

36. Mascaró JM Jr, Ferrando J, Bombi JA, Lambruschini N, Mascaró JM. Congenital generalized follicular hamartoma associated with alopecia and cystic fibrosis of three siblings. Arch Dermatol. 1995;131:454-458.

37. Delacretaz J, Balsiger F. Hamartoma folliculaire multiple familial. Dermatologica. 1979;159:316-324.

38. Requena L, Farina M, Robledo M, Sangueza O, Yus E, Villanueva A, et al. Multiple hereditary infundibulocystic basal cell carcinomas: A genodermatosis different from nevoid basal cell carcinoma syndrome. Arch Dermatol 1999;135:1227-35.

39. P Coquart N, Meyer N, Lemasson G, Conan V, Hu W, Misery L. A new non-syndromictype of familial carcinomas? J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009;23(2):223-4.

40. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell. 1996;87:159-70.

41. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100:57-70.

42. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science. 1983;222:771-8.

43. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med. 2008; 358 (5):502–11.

44. Yokota J. Tumor progression and metastasis. Carcinogenesis. 2000; 21 (3): 497–503.

45. Todd R, Wong DT (1999). Oncogenes. Anticancer Res. 1999; 19 (6A): 4729–46.

46. Athar M, Tang X, Lee JL, Kopelovich L, Kim AL. Hedgehog signalling in skindevelopment and cancer. Exp Dermatol. 2006;15(9):667-77.

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

55. Callahan CA et al. MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. Genes Dev. 2004; 18 (22): 2724–9.

48. Ruppert JM et al. The GLI-Kruppel family of human genes. Mol Cell Biol. 1998; 8 (8): 3104–13.

49. Park HL et al. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. Development. 2000; 127 (8): 1593–605.

50. Teh MT; Wong ST; Neill GW; Ghali LR; Philpott MP; Quinn AG . FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas.. Cancer Res. 2002; 62 (16): 4773–80. PMID 12183437.

51. Xie J et al. A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 9 (16): 9255–9.

52. Knudson AGJ. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. Cancer Res 1985; 45:1437–43.

53. Stacey SN, Sulem P, Masson G, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Sigurdsson A, Gudbjartsson DF, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Scherer D, Hemminki K, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Botella-Estrada R, Soriano V, Juberias P, Saez B, Gilaberte Y, Fuentelsaz V, Corredera C, Grasa M, Höiom V, Lindblom A, Bonenkamp JJ, van Rossum MM, Aben KK, de Vries E, Santinami M, Di Mauro MG, Maurichi A, Wendt J, Hochleitner P,Pehamberger H, Gudmundsson J, Magnusdottir DN, Gretarsdottir S, Holm H, Steinthorsdottir V, Frigge ML, Blondal T, Saemundsdottir J, Bjarnason H, Kristjansson K, Bjornsdottir G, Okamoto I, Rivoltini L, Rodolfo M, Kiemeney LA, Hansson J, Nagore E, Mayordomo JI, Kumar R, Karagas MR, Nelson HH, Gulcher JR, Rafnar T, Thorsteinsdottir U, Olafsson JH, Kong A, Stefansson K. New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. Nat Genet. 2009;41(8):909-14.

54. Eshkoor SA, Ismail P, Rahman SA, Oshkour SA. p16 gene expression in basal cell carcinoma. Arch Med Res. 2008;39(7):668-73.

55. Conscience I, Jovenin N, Coissard C, Lorenzato M, Durlach A, Grange F, Birembaut P, Clavel C, Bernard P. P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. Eur J Dermatol. 2006;16(5):518-22.

56. Soufir N, Molès JP, Vilmer C, Moch C, Verola O, Rivet J, Tesniere A, Dubertret L, Basset-Seguin N. P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. Oncogene. 1999;18(39):5477-81.

57. Malkin D, Li FP, Strong LC et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 1990; 250:1233–8.

58. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323–31.

59. Kastan MB, Onkyekwere O, Sidransky D et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991; 51:6304–11.

60. Katayama H, Sasai K, Kawai H et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. Nat Genet 2004; 36:55–62.

61. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B et al. p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253:49–53.

62. Vogt Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. Oncogene 1999; 18:6145–57.

63. Ronen D, Schwartz D, Teitz Y et al. Induction of HL-60 cells to undergo apoptosis is determined by high levels of wild-type p53 protein whereas differentiation of the cells is mediated by lower p53 levels. Cell Growth Different 1996; 7:21–30.

64. Hall PA, McKee PH, Dover R et al. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. Oncogene 1993; 8:203–7.

65. Auepemkiate S, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. P53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. Histopathology 2002; 40:568–73.

66. Demirkan NC, Colakoglu N, Duzcan E. Value of p53 protein in biological behavior of basal cell carcinoma and in normal epithelia adjacent to carcinomas. Pathol Oncol Res 2000; 6:272–4.

67. G Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2005;152(6):1108-24.

68. Pritchard BN, Youngberg GA. Atypical mitotic figures in basal cell carcinoma. A review of 208 cases. Am J Dermatopathol 1993; 15:549–52.

69. Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:4216–20.

70. Wikonkal NM, Brash DE. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. J Invest Dermatol Symp Proc 1999; 4:6–10.

71. Dicker T, Siller G, Saunders N. Molecular and cellular biology of basal cell carcinoma. Australas J Dermatol. 2002;43(4):241-6.

72. Sánchez-Camacho C, Rodríguez J, Ruiz JM, Trousse F, Bovolenta P. Morphogens as growth cone signalling molecules. Brain Res Brain Res Rev. 2005;49(2):242-52.

73. Bale AE, Yu KP. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. Hum Mol Genet. 2001;10(7):757-62.

74. Shimokawa T, Svärd J, Heby-Henricson K, Teglund S, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of first exon variants of the tumor-suppressor Patched1 in Hedgehog signaling. Oncogene. 2007; 26(34):4889-96.

75. Botchkarev VA, Fessing MY. Edar signaling in the control of hair follicle development. J Investig Dermatol Symp Proc. 2005;10(3):247-51

76. Lai LP, Mitchell J. Indian hedgehog: its roles and regulation in endochondral bone development. J Cell Biochem. 2005;96(6):1163-73.

77. Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. Biol Reprod. 2000; 33: 1825-1838.

78. Van den Heuvel, M. Ingham, P.W. Smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature.*1996; 382, 547–551.

79. Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M. and Hooper, J.E. The Drosophila smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*. 1996; 86, 221–232.

80. Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L. et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for sonic hedgehog. *Nature* . 1996; 384, 129–134

81. Ohlmeyer, J.T. and Kalderon, D. Hedgehog stimulates maturation of cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Natur.*1998;396, 749–753.

82. Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C. and Plessis, A. Suppressor of fused links fused and cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway. *Curr. Biol.*. 1998; 8, 583–586.

83. Stone, D.M., Murone, M., Luoh, S.-M., Ye, W., Armanini, M.P., Gurney, A., Phillips, H., Brush, J., Goddard, A. and de Sauvage, F.J., Rosenthal, A. (1999) Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J. Cell Sci.* 1999; 112, 4437–4448.

84. Wang, G., Wang, B. and Jiang, J. Protein kinase A antagonizes hedgehog signaling by regulating both the activator and represssor forms of cubitus interruptus. *Genes Dev.* 1999; 13, 2828–2837.

85. Chen, Y. and Struhl, G. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cel.* 1996; 87, 553–563.

86. Zaphiropoulos, P. G., Unden, A. B., Rahnama, F., Hollingsworth, R. E. and Toftgard, R. *PTCH*2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. Cancer Res. 1999; 59, 787–792

87. Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Milenkovic, L., McMahon, J. A. and Scott, M. P. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. Genes Dev. 1996;10, 301–312

88. Marigo, V., Scott, M. P., Johnson, R. L., Goodrich, L. V. and Tabin, C. J. Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. Development.1996; 122, 1225–1233

89. Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K. and Hui, C. *PTCH*2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. Nat. Genet.1998;18,104–106

90. Carpenter, D., Stone, D. M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A. and de Sauvage, F. J. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95, 13630–13634

91. Rahnama F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of *PTCH*2 splice variants in Hedgehog signalling. Biochem J. 2004;378(Pt 2):325-34

92. Smyth, I., Narang, M. A., Evans, T., Heimann, C., Nakamura, Y., Chenevix-Trench, G.Pietsch, T., Wicking, C. and Wainwright, B. J. Isolation and characterization of human patched 2 (*PTCH*2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. Hum. Mol. Genet. 1999; 8, 291–297

93. Hurst GD, Werren JH. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. Nat. Rev. Genet. 2001; 2 (8): 597–606.

94. Häsler J, Strub K. Alu elements as regulators of gene expression. Nucleic Acids Res. 2006; 34 (19): 5491–7.

95. Eyre-Walker, A.; Keightley, P. The distribution of fitness effects of new mutations. Nature reviews. Genetics 2007; 8 (8): 610–618.

96. Wicking C, McGlinn E. The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. Cancer Lett. 2001;173(1):1-7

97. Sasaki R, Saito K, Watanabe Y, Takayama Y, Fujii K, Agawa K, Miyashita T, Ando T, Akizuki T. Nevoid basal cell carcinoma syndrome with cleft lip and palate associated with the novel *PTCH* gene mutations. J Hum Genet. 2009;54(7):398-402.

98. Hellani A, Baghdadi H, Dabbour N, Almassri N, Abu-Amero KK. A novel *PTCH1* germline mutation distinguishes basal cell carcinoma from basaloid follicular hamartoma: a case report. J Med Case Reports. 2009;3:52.

99. Wang W, Wang J, Li J, Mao L, Guo F, Zhang B. New mutation of the patched homologue 1 gene in a Chinese family with naevoid basal cell carcinoma syndrome. Br J Oral Maxillofac Surg. 2009;47(5):366-9.

100. Harwood CA, Attard NR, O'Donovan P, Chambers P, Perrett CM, Proby CM, McGregor JM, Karran P. *PTCH* mutations in basal cell carcinomas from azathioprine-treated organ transplant recipients. Br J Cancer. 2008;99(8):1276-84.

101. Fu X, Wang Q, Chen X, Huang X, Cao L, Tan H, Li W, Zhang L, Bi J, Su Q, Chen L. Expression patterns and polymorphisms of *PTCH* in Chinese hepatocellular carcinoma patients. Exp Mol Pathol. 2008;84(3):195-9.

102. Laimer M, Onder K, Schlager P, Lanschuetzer CM, Emberger M, Selhofer S, Hintner H, Bauer JW. Nonsense-associated altered splicing of the Patched gene fails to suppress carcinogenesis in Gorlin syndrome. Br J Dermatol. 2008;159(1):222-7.

103. Li TJ, Yuan JW, Gu XM, Sun LS, Zhao HS. *PTCH* germline mutations in Chinese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. Oral Dis. 2008;14(2):174-9.

104. Lü Y, Zhu HG, Ye WM, Zhang MB, He D, Chen WT. A new mutation of *PTCH* gene in a Chinese family with nevoid basal cell carcinoma syndrome. Chin Med J. 2008;121(2):118-21.

105. Suárez-Martínez EB, Ruiz A, Matías J, Morales L, Cruz A, Vázquez D, Villa J, Matta JL. Early-onset of sporadic basal-cell carcinoma: germline mutations in the TP53, *PTCH*, and XPD genes. P R Health Sci J. 2007;26(4):349-54.

106. Kagawa N, Maruno M, Suzuki T, Hashiba T, Hashimoto N, Izumoto S, Yoshimine T. Detection of genetic and chromosomal aberrations in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors with DNA microarrays. Brain Tumor Pathol. 2006;23(1):41-7.

107. Heitzer E, Wolf P. Nonmonoclonal *PTCH* gene mutations in psoralen plus UVA-associated basal cell carcinomas. J Invest Dermatol. 2008;128(3):746-9.

108. Scott A, Strouthidis NG, Robson AG, Forsyth J, Maher ER, Schlottmann PG, Michaelides M. Bilateral epiretinal membranes in Gorlin syndrome associated with a novel *PTCH* mutation. Am J Ophthalmol. 2007;143(2):346-8.

109. Brailey LL, Davis T, Kolker SE, Murry TC, Thomas D, Bale AE, Ruhoy SM. Congenital linear unilateral basal cell nevus: a case report with patched gene molecular studies. J Cutan Pathol. 2007;34(1):65-70

110. Xie WH, Ren GX, Li SJ, Zhang J, Huang W, Guo W. Genetic linkage analysis and mutation detection in Chinese families with basal cell nevus syndrome. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2006;41(10):596-8.

111. Gu XM, Li TJ. Detection of *PTCH* gene mutations in odontogenic keratocysts by SSCP and DNA sequencing. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2006;24(4):293-6.

112. Gu XM, Zhao HS, Sun LS, Li TJ. *PTCH* mutations in sporadic and Gorlin-syndrome-related odontogenic keratocysts. J Dent Res. 2006;85(9):859-63.

113. Soufir N, Gerard B, Portela M, Brice A, Liboutet M, Saiag P, Descamps V, Kerob D, Wolkenstein P, Gorin I, Lebbe C, Dupin N, Crickx B, Basset-Seguin N, Grandchamp B. *PTCH* mutations and deletions in patients with typical nevoid basal cell carcinoma syndrome and in patients with a suspected genetic predisposition to basal cell carcinoma: a French study. Br J Cancer. 2006;95(4):548-53.

114. Wilson LC, Ajayi-Obe E, Bernhard B, Maas SM. Patched mutations and hairy skin patches: a new sign in Gorlin syndrome. Am J Med Genet A. 2006;140(23):2625-30.

115. Lee YW, Roh BH, Ki CS, Park YL, Shin HB, Lee YK, Choi TY, Whang KU. Identification of a novel mutation in the *PTCH* gene in a Korean family with naevoid basal cell carcinoma syndrome. Clin Exp Dermatol. 2007;32(2):202-3.

116. Song YL, Zhang WF, Peng B, Wang CN, Wang Q, Bian Z. Germline mutations of the *PTCH* gene in families with odontogenic keratocysts and nevoid basal cell carcinoma syndrome. Tumour Biol. 2006;27(4):175-80.

117. Pruvost-Balland C, Gorry P, Boutet N, Magnaldo T, Mamelle G, Margulis A, Kolb F, Duvillard P, Spatz A, Brugières L, Chompret A, Avril MF. Clinical and genetic study in 22 patients with basal cell nevus syndrome. Ann Dermatol Venereol. 2006;133(2):117-23.

118. Lindström E, Shimokawa T, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. *PTCH* mutations: distribution and analyses. Hum Mutat. 2006;27(3):215-9.

119. Nagao K, Togawa N, Fujii K, Uchikawa H, Kohno Y, Yamada M, Miyashita T. Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the *PTCH* gene with exon junction microarrays. Hum Mol Genet. 2005;14(22):3379-88.

120. Marsh A, Wicking C, Wainwright B, Chenevix-Trench G. DHPLC analysis of patients with Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome reveals novel *PTCH* missense mutations in the sterol-sensing domain. Hum Mutat. 2005;26(3):283.

121. Pastorino L, Cusano R, Nasti S, Faravelli F, Forzano F, Baldo C, Barile M, Gliori S, Muggianu M, Ghigliotti G, Lacaita MG, Lo Muzio L, Bianchi-Scarra G.Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. Hum Mutat. 2005;25(3):322-3.

122. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T, Reifenberger G. Somatic mutations in the *PTCH*, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. Br J Dermatol. 2005;152(1):43-51.

123. Tanioka M, Takahashi K, Kawabata T, Kosugi S, Murakami K, Miyachi Y, Nishigori C, Iizuka T. Germline mutations of the *PTCH* gene in Japanese patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. Arch Dermatol Res. 2005;296(7):303-8.

124. Savino M, d'Apolito M, Formica V, Baorda F, Mari F, Renieri A, Carabba E, Tarantino E, Andreucci E, Belli S, Lo Muzio L, Dallapiccola B, Zelante L, Savoia A. Spectrum of *PTCH* mutations in Italian nevoid basal cell-carcinoma syndrome patients: identification of thirteen novel alleles. Hum Mutat. 2004;24(5):441.

125. Chung CH, Wong TY, Shieh TY, Shieh DB, Chao SC. Nevoid basal cell carcinoma syndrome - clinical manifestations and mutation analysis of a Taiwanese family. J Formos Med Assoc. 2003;102(11):793-7.

126. Midro AT, Panasiuk B, Tümer Z, Stankiewicz P, Silahtaroglu A, Lupski JR, Zemanova Z, Stasiewicz-Jarocka B, Hubert E, Tarasów E, Famulski W, Zadrozna-Tołwińska B, Wasilewska E, Kirchhoff M, Kalscheuer V, Michalova K, Tommerup N. Interstitial deletion 9q22.32-q33.2 associated with additional familial translocation t(9;17)(q34.11;p11.2) in a patient with Gorlin-Goltz syndrome and features of Nail-Patella syndrome. Am J Med Genet A. 2004;124A(2):179-91.

127. Boutet N, Bignon YJ, Drouin-Garraud V, Sarda P, Longy M, Lacombe D, Gorry P. Spectrum of *PTCH1* mutations in French patients with Gorlin syndrome. J Invest Dermatol. 2003;121(3):478-81.

128. Tate G, Li M, Suzuki T, Mitsuya T. A new germline mutation of the *PTCH* gene in a Japanese patient with nevoid basal cell carcinoma syndrome associated with meningioma. Jpn J Clin Oncol. 2003;33(1):47-50.

129. Lam CW, Leung CY, Lee KC, Xie J, Lo FM, Au TS, Tong SF, Poon MK, Chan LY, Luk NM. Novel mutations in the PATCHED gene in basal cell nevus syndrome. Mol Genet Metab. 2002;76(1):57-61.

130. Minami M, Urano Y, Ishigami T, Tsuda H, Kusaka J, Arase S. Germline mutations of the *PTCH* gene in Japanese patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. J Dermatol Sci. 2001;27(1):21-6.

131. Evans T, Boonchai W, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Georgas K, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wicking C. The spectrum of patched mutations in a collection of Australian basal cell carcinomas. Hum Mutat. 2000;16(1):43-8.

132. Situm M, Levanat S, Crnic I, Pavelic B, Macan D, Grgurević J, Mubrin-Koncar M, Lipozencić J. Involvement of patched (*PTCH*) gene in Gorlin syndrome and related disorders: three family cases. Croat Med J. 1999;40(4):533-8.

133. Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, de Sauvage F, Raffel C. Analysis of *PTCH*/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma. Genes Chromosomes Cancer. 2000;27(1):44-51

134. Vortmeyer AO, Stavrou T, Selby D, Li G, Weil RJ, Park WS, Moon YW, Chandra R, Goldstein AM, Zhuang Z. Deletion analysis of the adenomatous polyposis coli and *PTCH* gene loci in patients with sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated medulloblastoma. Cancer. 1999 Jun;85(12):2662-7.

135. Hasenpusch-Theil K, Bataille V, Laehdetie J, Obermayr F, Sampson JR, Frischauf AM. Gorlin syndrome: identification of 4 novel germ-line mutations of the human patched (*PTCH*) gene. Mutations in brief no. 137.

136. Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T, Reifenberger G. Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (*PTCH*) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. Cancer Res. 1997;57(13):2581-5.

137. Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sörensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched. Cancer Res. 1997;57(11):2085-8.

138. Wiestler OD, Wicking C. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched. Cancer Res. 1997;57(11):2085-8.

139. Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD. Sporadic medulloblastomas contain *PTCH* mutations. Cancer Res. 1997; 57(5):842-5.

140. Wicking C, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Negus K, Graham S, Suthers G, Haites N, Edwards M, Wainwright B, Chenevix-Trench G. Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident. Am J Hum Genet. 1997;60(1):21-6.

141. Wicking C, Gillies S, Smyth I, Shanley S, Fowles L, Ratcliffe J, Wainwright B, Chenevix-Trench G. De novo mutations of the Patched gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome help to define the clinical phenotype. Am J Med Genet. 1997; 73(3):304-7

142. Santos DCC. *Estudo de mutações nos genes PTCH e de microssatélites em pacientes portadores de carcinoma basocelular esporádico e síndrome de Gorlin.* [Dissertação]. Rio Claro: Instituto de Biociências da UNESP; 2003.

143 Strange RC, El-Genidy N, Ramachandran S, Lovatt TJ, Fryer AA, Smith AG, LearJT , Wong C, Jones PW, Ichii-Jones F, Hoban PR. Susceptibility to basal cell carcinoma: associations with *PTCH* polymorphisms. Ann Hum Genet. 2004;68(Pt6):536-45.

144. Strange RC, El-Genidy N, Ramachandran S, Lovatt TJ, Fryer AA, Smith AG, Lear JT, Ichii-Jones F, Jones PW, Hoban PR. *PTCH* polymorphism is associated with the rate of increase in basal cell carcinoma numbers during follow-up: preliminary data on the influence of an exon 12-exon 23 haplotype. Environ Mol Mutagen. 2004;44(5):469-76.

145. Smyth I, Wicking C, Wainwright B, Chenevix-Trench G. The effects of splice site mutations in patients with naevoid basal cell carcinoma syndrome. Hum Genet. 1998;102(5):598-601.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo