

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* DOS GENES *KRAS* E *BRAF*
NAS LESÕES SEBÁCEAS E CERATOACANTOMAS
ESPORÁDICOS OU RELACIONADOS A SÍNDROMES
HEREDITÁRIAS**

MÉRIN BARBARA STAMBONI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra Renata de Almeida Coudry

Co-Orientador: Dr. Gilles Landman

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Stamboni, Mérin Barbara

Avaliação do *status* dos genes *KRAS* e *BRAF* nas lesões sebáceas e ceratoacantomas esporádicos ou relacionados a síndromes hereditárias /
Mérin Barbara Stamboni – São Paulo, 2010.

72p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Renata de Almeida Coudry

Descritores: 1. NEOPLASIAS DAS GLÂNDULAS SEBÁCEAS. 2. ONCOGENE. 3. CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE. 4. KRAS. 5. BRAF. 6. CERATOACANTOMAS. 7. SÍNDROME MUIR TORRE.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que estão sempre presentes em todas as situações de minha vida, por todo investimento que fizeram em mim, por me apoiarem e sempre acreditarem no meu crescimento, fazendo dos momentos mais difíceis sempre um motivo para continuar.

A minha irmã Helen que se dedica ao máximo para me ajudar e nunca me deixa sozinha.

Ao meu noivo por sua compreensão e carinho.

Eles são um exemplo de amor incondicional e sempre estão na torcida para que eu conquiste os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o centro da minha vida. Sem Deus nada disso teria acontecido. Agradeço a Deus por ter colocado muitos anjos para me ajudarem nessa fase da minha vida.

A Dra. Renata de Almeida Coudry, minha orientadora, por ter acreditado em mim e ter me dado essa oportunidade, por toda orientação e apoio.

Ao Dr. Gilles Landman, meu co-orientador, pelo apoio e carinho.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular, Rodrigo Crespo e Marina Gomes que me ensinaram e me ajudaram nos procedimentos com muito carinho e paciência.

A todas as meninas do laboratório de Anatomia Patológica pelo apoio e compreensão.

Ao Sr Severino da Silva Ferreira e Carlos Ferreira Nascimento pela prontidão e rapidez com que me auxiliaram.

A Sra. Sueli Nonogaki, que trabalhou na elaboração das lâminas de imunoistoquímica e sempre foi muito atenciosa comigo.

Ao Sr. José Ivanildo Neves, o Sr IVAN, pela importância de sua ajuda na reta final deste trabalho.

A Ana Maria R. Alves Kuninari, coordenadora da Pós Graduação pela compreensão e pelas palavras de incentivo. A Luciana Pitombeira Castelano e Vanuza Barros Rodrigues pela atenção e orientações.

A Dra. Sibeles Meireles que sem me conhecer, me ajudou muito. Sua ajuda foi essencial para o término dessa pesquisa. Foi responsável pela realização dos experimentos de seqüenciamento.

A Suely Francisco, supervisora da biblioteca, que nos momentos finais foram tudo o que eu estava precisando.

A Dra. Erika Maria Monteiro Santos, pela atenção e cuidado com sua ajuda nas análises estatísticas que foram essenciais para o estudo.

A FAPESP pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

A Capes por me auxiliar financeiramente.

Nenhum de nós é tão bom quanto todos nós juntos.

RESUMO

Stamboni MB. **Avaliação do *status* dos genes *KRAS* e *BRAF* nas lesões sebáceas e ceratoacantomas esporádicos ou relacionados a síndromes hereditárias.** São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: As lesões sebáceas se dividem em: hiperplasias sebáceas, adenomas sebáceos, epiteliomas sebáceos e carcinomas sebáceos, podendo acontecer de forma esporádica ou associada a síndromes hereditárias. Os ceratoacantomas, como as lesões sebáceas, também podem estar associados com o câncer hereditário, designado de Síndrome de Muir-Torre, definida pela presença dessas lesões e malignidades viscerais, principalmente o câncer colorretal. A mutação do gene *BRAF* já foi descrita em hiperplasias sebáceas. O oncogene *BRAF*, um dos elementos da via MAP-quinase, assim como o gene *KRAS*, ambos têm um papel chave na proliferação, diferenciação e apoptose celular. **OBJETIVOS:** Avaliação dos genes *KRAS* e *BRAF* nas lesões sebáceas e ceratoacantomas esporádicos ou relacionados a síndromes hereditárias. **MÉTODOS:** O *status* dos genes *KRAS* (códon 12 e 13) e *BRAF* (V600E) foi avaliado em 62 lesões sebáceas e 42 ceratoacantomas pelo método de seqüenciamento Sanger, seguido da avaliação da expressão de proteínas de reparo do DNA. **RESULTADOS:** No presente estudo foram observadas 9 de 62 amostras (14%) com mutação do gene *KRAS* em lesões sebáceas e 10 de 42 amostras (23,8%) nos ceratoacantomas. O gene *BRAF* esteve mutado em 5 de 62 amostras (8%) de lesões sebáceas e 2 de 42 amostras (4,7%) de ceratoacantomas. A presença de mutação em ambos os genes foi observada apenas em uma amostra avaliada. Não houve diferença estatística significativa entre as mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* com as variáveis clínicas associadas às lesões sebáceas. **CONCLUSÃO:** Estes resultados demonstram que esses dois genes de sinalização da via MAPquinase podem apresentar um discreto papel na carcinogênese das lesões sebáceas, no entanto, mutação no gene *KRAS* sugere ter um papel mais freqüente em ceratoacantomas.

SUMMARY

Stamboni MB. [Mutation analysis of *KRAS* and *BRAF* genes in sebaceous lesions and ceratoacanthomas sporadics or related to hereditary syndrome]. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

BACKGROUND: Sebaceous lesions comprises: hyperplasias, adenomas, sebaceomas and carcinomas, which can be sporadic or related to hereditary syndrome. Keratoacanthomas, as sebaceous lesions, can be associated with hereditary cancer, known as Muir-Torre syndrome, accepted as the presence of those lesions with visceral malignancies, mainly colorectal cancer. *BRAF* mutation has been described in sebaceous hyperplasia. *BRAF* oncogene is part of the MAPKinase pathway, as *KRAS* gene, and both have an important role in cellular proliferation, differentiation and apoptosis. It was the objective of this study to clarify the role of *KRAS* and *BRAF* genes in sebaceous lesions and keratoacanthomas. **METHODS:** After sequencing for *KRAS* (codons 12 and 13) and *BRAF* (V600E) in 62 sebaceous lesions and 42 keratoacanthomas samples, mismatch repair protein expression was analyzed by immunohistochemistry. **RESULTS:** Mutations in *KRAS* was identified in 9 of 62 cases (14%) of sebaceous lesions and 10 of 42 cases (23, 8%) of keratoacanthomas. *BRAF* mutation was observed in 5 of 62 cases (8%) of sebaceous lesions and 2 of 42 cases (4,7%) of Keratoacanthomas. Mutation in both genes occurred in just one sample. There was no statistical significance observed with clinical variables. **CONCLUSION:** The results indicate that MAPKinase pathway plays a discreet role in carcinogenesis of sebaceous lesions; however *KRAS* mutation appears to play a more important role in keratoacanthomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de sinalização MAPquinase.....	23
Figura 2	Histologia das lesões sebáceas e ceratoacantoma.....	28
Figura 3	Imagens representativas da técnica de LCM.....	30
Figura 4	Gel de eletroforese utilizando iniciadores para β -actina.....	31
Figura 5	Imagens representativas da Imunoistoquímica.....	34
Figura 6	Eletroferograma demonstrando mutações nos genes <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Critérios de Amsterdam I.....	11
Quadro 2	Critérios de Amsterdam II.....	11
Tabela 1	Descrição dos iniciadores senso (FW) e antisenso (RW) para amplificação específica dos genes <i>BRAF</i> e <i>KRAS</i>	32
Tabela 2	Anticorpos utilizados para análise imunoistoquímica.....	33
Tabela 3	Lesões sebáceas selecionadas (N=72).....	36
Tabela 4	Caracterização das amostras de hiperplasia sebácea.....	38
Tabela 4.1	Câncer visceral associado à hiperplasia sebácea.....	38
Tabela 5	Caracterização das amostras de adenoma sebáceo.....	40
Tabela 5.1	Câncer visceral associado ao adenoma sebáceo.....	40
Tabela 6	Caracterização das amostras de epiteloma sebáceo.....	41
Tabela 6.1	Câncer visceral associado ao epiteloma sebáceo.....	42
Tabela 7	Caracterização das amostras de carcinoma sebáceo.....	43
Tabela 7.1	Câncer visceral associado ao carcinoma sebáceo.....	43
Tabela 8	Caracterização das amostras de ceratoacantomas.....	45
Tabela 8.1	Câncer visceral associado ao ceratoacantoma.....	44

Tabela 9	Casos com mais de uma lesão sebácea e/ou ceratoacantoma.....	46
Tabela 10	Pacientes apresentando diagnóstico clínico ou molecular de S. Lynch....	47
Tabela 11	Pacientes portadores de lesões sebáceas e ceratoacantomas associados com câncer visceral.....	49
Tabela 12	Associação entre as lesões sebáceas e ceratoacantomas com câncer visceral.....	50
Tabela 13	Avaliação do status do gene <i>KRAS</i> com as lesões sebáceas.....	52
Tabela 14	Avaliação do status do gene <i>BRAF</i> com as lesões sebáceas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AFAP -	Polipose adenomatosa familiar atenuada
AMARC	alfa-metilacil-coa racemase
APC	Adenomatous polyposis coli
AS	Adenoma sebáceo
Blimp-1	<i>B-lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CA	Câncer
CBC	Carcinoma basocelular
CCR	Câncer colorretal
CE	Ceratoacantoma
CEC	Carcinoma epidermóide
CS	Carcinoma Sebáceo
Dsg2	Desmogleina 2
DMBA	7,12dimetilbezantraceno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ES	Epitelioma sebáceo
FAP	Polipose adenomatosa familiar
GAP	Proteínas ativadoras da GTPase
GDP	Guanina difosfato
GTP	Guanina trifosfato
GTPase	Enzima hidrolase
HS	Hiperplasia Sebácea
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
HRAS	<i>V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LOH	Perda de heterosigoze
LCM	Microdissecção por captura a laser
MAPquinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MAP	Polipose associada – <i>MYH/MUTYH</i>
MLH1	<i>human mutL homolog 1</i>
MLH3	<i>MutL homolog 3 (E. coli)</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2,</i>
MSH3	<i>mutS homolog 3 (E. coli)</i>
MSH6	<i>mutS homolog 6 (E. coli)</i>
MTS	Síndrome de Muir-Torre
MSI	Instabilidade microssatélite
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog¹</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMS1	<i>Postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)</i>
PMS2	<i>Postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)</i>
RAD51	<i>homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RECa	<i>Homologous recombination A</i>
S. Lynch	Síndrome de Lynch
TGFα	<i>Transforming growth factor alpha</i>
VDR	Receptor da vitamina D3
WAF1/CIP1	Proteína p21

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Lesões sebáceas e ceratoacantomas associados a síndromes hereditárias	9
1.2	Lesões sebáceas e alterações moleculares	14
1.3	Oncogenes <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>	20
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVO	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos Específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Seleção da amostra.....	27
4.2	Procedimento molecular	29
4.2.1	Microdissecção	29
4.2.2	Extração de DNA	30
4.2.3	Avaliação de mutação dos genes <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> por Sequenciamento Sanger ..	31
4.2.4	Avaliação das proteínas de reparo do DNA MLH1 E MSH2 por imunohistoquímica.....	33
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6	RESULTADOS	36
6.1	Caracterização da amostra	36
6.1.1	Hiperplasia sebácea.....	37
6.1.2	Adenoma sebáceo	39
6.1.3	Epitelioma sebáceo	41
6.1.4	Carcinoma sebáceo	42
6.1.5	Ceratoacantoma.....	44

6.1.6	Lesões associadas.....	46
6.1.7	Associação de lesões sebáceas com diagnóstico de Síndrome de Lynch	46
6.1.8	Pacientes portadores de lesões sebáceas ou ceratoacantomas associados com cânceres viscerais	48
6.2	Avaliação do status de mutação dos genes <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>	50
7	DISCUSSÃO.....	55
8	CONCLUSÃO	62
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

ANEXOS

- Anexo 1** Protocolo de coloração de HE para material parafinado e microdissecção
- Anexo 2** Extração DNA (KIT Qiagen)
- Anexo 3** Protocolo Imunoistoquímica
- Anexo 4** Resultado da avaliação de mutação de *BRAF* e *KRAS* pelo Seqüenciamento

1 INTRODUÇÃO

As glândulas sebáceas estão associadas com folículos pilosos e são compostas por um ácino lobular revestido na periferia por uma camada fina de epitélio plano ou cuboidal basalóide, demonstrando células com escasso citoplasma. A porção interna das glândulas sebáceas é composta por sebócitos maduros, geralmente, com núcleos endentados e citoplasma multi-vacuolado. Estas glândulas são encontradas em alta concentração na região da cabeça e pescoço e são responsáveis pela produção de sebo, uma secreção rica em lipídios com várias funções (DANBY 2008; ZOUBOULIS et al. 2008). Estas estruturas são hormônio dependente e, geralmente, se tornam mais proeminentes na puberdade (BAYER-GARNER et al. 1999). As células-tronco da pele são responsáveis pela manutenção da homeostase e reparo do tecido após a ocorrência de injúria. Estas células são responsáveis pela regeneração e auto-renovação da pele. Os aglomerados de células-tronco podem estar localizados: na porção inter-folicular (responsáveis pela renovação da epiderme), no folículo piloso e nas glândulas sebáceas. Na renovação celular fisiológica estas três populações celulares são responsáveis pela manutenção de suas estruturas específicas. No entanto, quando esta homeostase é rompida, qualquer uma destas populações é capaz de produzir qualquer uma das três estruturas. Apesar do papel destas células no reparo e regeneração celular é de conhecimento que a aquisição de mutações nestas células pode ter importante papel na carcinogênese da pele (PINCELLI 2010).

As lesões sebáceas são tumores raros de anexo cutâneo que demonstram um grande desafio aos clínicos e patologistas devido a seus aspectos complexos do ponto de vista de nomenclatura, associação a síndromes hereditárias como também em relação ao seu tratamento.

As lesões sebáceas são caracterizadas por pápulas ou nódulos que podem ser únicas ou mesmo centenas, estão geralmente localizadas na pele da face ou perto dela, mas podem também estar presentes no couro cabeludo e outras partes do corpo. Lesões localizadas em sítios não freqüentes são provavelmente originadas em glândulas sebáceas ectópicas que já foram descritas em: esôfago, vagina, cérvix, timo, pênis e vulva (WANG et al. 2009; BATISTATOU et al. 2006). Acometem principalmente indivíduos de meia-idade e idosos, especialmente entre as 4^o e 5^o décadas de vida, no entanto, podem surgir na puberdade se estiverem associadas à herança genética.

As lesões sebáceas diferem em alguns aspectos histológicos e clínicos, subdividindo-as em: hiperplasia sebácea, adenomas sebáceos, epiteliomas sebáceos (sebaceomas), e neoplasias malignas que têm sido classificadas como carcinoma sebáceo ocular ou extra-ocular (EISEN e MICHAEL I 2009).

Hiperplasia sebácea (HS): A hiperplasia sebácea, também chamada de hiperplasia sebácea senil ou de nevo sebáceo senil se localiza particularmente na face, especialmente na fronte, apresentando pápulas geralmente menores de 5mm de diâmetro, mas já foi documentado lesões de até 5cm de diâmetro. Estas lesões apresentam cor amarelada e são centralmente umbilicadas. A maioria das lesões consiste em uma glândula sebácea aumentada composta de numerosos lóbulos

agrupados em torno de um canal sebáceo amplo, centralmente localizado, sendo que os lóbulos sebáceos se apresentam completos ou quase completamente maduros. Sua abertura na superfície corresponde à umbilicação central da lesão. Cortes seriados mostram que todos os lóbulos sebáceos agrupados em torno do canal central estão conectados com esse ducto (PRIOLEAU et al. 1984).

A etiologia da hiperplasia sebácea ainda permanece obscura, no entanto, o desenvolvimento destas lesões tem sido associado com imunossupressão, especificamente em pacientes que sofreram transplantes renais e em uso de ciclosporina (BERKER et al. 1996, ZOUBOULIS and BOSCHNAKOW 2001;).

O tratamento das hiperplasias sebáceas pode ser realizado por curetagem e eletrocoagulação (radiofrequência, nitrogênio líquido, ácido tricloroacético a 50%), a biópsia pode ser necessária se houver a dúvida com diagnóstico de carcinoma basocelular (MACHADO FILHO 2001).

Adenoma sebáceo (AS): Os adenomas sebáceos são classificados como neoplasias epiteliais benignas, compostos de glândulas sebáceas incompletamente diferenciadas. Ocorrem em ambos os sexos, apresentam clinicamente um aspecto de nódulos ou pápulas vermelho-amarelados, e usualmente, medem ao redor de 5mm de diâmetro, mas podem apresentar dimensões maiores (FERGUSON et al. 1987).

Trata-se de uma lesão bem delimitada composta por lóbulos com dois tipos celulares: células germinativas que são idênticas às células presentes na periferia das glândulas sebáceas normais, e células sebáceas maduras em proporções variáveis. Alguns lóbulos contêm predominantemente células basalóides e outros, principalmente células sebáceas, assemelhando-se a lóbulos sebáceos maduros. Na

maioria dos lóbulos, no entanto, os dois tipos de células ocorrem em proporções aproximadamente iguais, muitas vezes dispostas de tal modo que os grupos de células sebáceas estão rodeados por células basalóides. O aumento no número de células germinativas é a chave para discriminar entre hiperplasias sebáceas, adenomas sebáceos e epiteliomas sebáceos. Os adenomas sebáceos mostram uma expansão variável de células basalóides, com mais de duas camadas celulares normais similares as observadas em glândulas sebáceas normais e hiperplasias sebáceas, mas por convenção ocorrem em menos que 50% do tumor (> 50% de células basalóides é observada em epiteliomas sebáceos (RULON e HELWIG 1974).

Clinicamente, os adenomas sebáceos podem ser confundidos com carcinoma basocelular. No entanto, histologicamente, o diagnóstico diferencial pode incluir outras lesões demonstrando citoplasma amplo e claro, como por exemplo, tumores écrinos, melanocíticos com variantes de células claras, lesões xantomatosas e metástase de carcinoma renal de células claras (SHALIN et al. 2010). Além disso, pode ter dificuldade diagnóstica com outras neoplasias sebáceas.

Epitelioma sebáceo (ES): Os epiteliomas sebáceos também chamados de sebaceomas se apresentam, clinicamente, como os adenomas sebáceos, no entanto, podem ser um pouco maiores variando de 5 a 10 mm de diâmetro, com coloração laranja-amarelado. Similar aos demais tumores sebáceos são observados na região da cabeça e pescoço (LAZAR et al. 2007).

Como já relatado anteriormente, a distinção entre adenoma sebáceo e epitelioma sebáceo pode ser difícil. Alguns autores acreditam tratar-se de um *continuum* destas lesões benignas. Histologicamente, os epiteliomas sebáceos se

apresentam como massas irregulares de células basalóides com diferenciação sebácea, que se assemelham às células germinativas e maduras das glândulas sebáceas. Os epiteliomas sebáceos perdem o padrão organóide observado nos adenomas sebáceos, resultando numa disposição desordenada dos sebócitos maduros sem o senso central de maturação observado nos adenomas, mas o aspecto circunscrito e simétrico é mantido. Os sebaceomas podem estar localizados inteiramente na derme ou estarem conectados à epiderme. Estes tumores podem apresentar estruturas ductais ou diferenciação escamosa (MISAGO et al. 2002). A presença de figuras de mitose pode ocorrer, mas a atipias celulares não são observadas. Estas lesões também não demonstram aspecto em paliçada na periferia e artefatos de retração como observado nos carcinomas basocelulares. (TROY e ACKERMAN 1984; MISAGO et al. 2004). Têm sido descritos aspectos histológicos diferentes para os epiteliomas sebáceos, como por exemplo, padrão carcinóide-*like* e aspecto reticulado (KAZAKOV et al. 2005; NIELSEN et al. 1998).

O tratamento empregado nos epiteliomas sebáceos é sempre a excisão cirúrgica.

Carcinoma sebáceo (CS): O carcinoma sebáceo tem sido tradicionalmente subdividido em carcinoma periocular e extra-ocular. Esta distinção tem sido considerada importante, pois tumores malignos tendem a ocorrer mais freqüentemente em região periocular diferentemente dos adenomas sebáceos e epiteliomas sebáceos (DOWD et al. 2008; DASGUPTA et al. 2009).

Os carcinomas sebáceos perioculares se originam nas glândulas de meibomian ou glândulas de Zeis ou em outras glândulas sebáceas da pálpebra. Estes

tumores compreendem aproximadamente três quartos de todos os carcinomas sebáceos que acometem indivíduos entre a sexta e oitava décadas de vida e ocorrem de forma similar em ambos os sexos (DOWD et al. 2008; DASGUPTA et al. 2009). O carcinoma periocular é considerado o segundo carcinoma mais comum na região da pálpebra, vindo após apenas dos carcinomas basocelulares. Um estudo retrospectivo recente, em fatores epidemiológicos dos carcinomas sebáceos, relatou uma diminuição da incidência em indivíduos de pele branca (DORES et al. 2008). Clinicamente, pode ser facilmente confundido com blefarconjuntivite ou um calázio, o que pode resultar num atraso para realização do diagnóstico. Este atraso pode ser responsável pelo desenvolvimento de metástases regionais e pode resultar em um tratamento sub-ótimo. A presença de metástases em linfonodos não é totalmente incomum e mortalidade tem sido descrita em 20% dos casos (RAO et al. 1982). No entanto, estudos retrospectivos mais recentes têm demonstrado uma mortalidade baixa, provavelmente devido a diagnósticos mais precoces (DOWD et al. 2008; SONG et al. 2008).

Histologicamente, os carcinomas sebáceos peri-oculares demonstram um aspecto arquitetural infiltrativo na derme ou no tecido subcutâneo da pálpebra, mas também pode infiltrar músculo esquelético superficial. As células do tumor são volumosas com núcleos hipercromáticos e freqüentes figuras de mitose, e em quase metade dos casos observa-se uma disseminação pagetóide de células malignas no epitélio conjuntival ou na epiderme da pálpebra ou em ambos (PEREIRA et al. 2005).

O carcinoma sebáceo extra-ocular é uma neoplasia maligna rara. O couro cabeludo e a face são os sítios mais comumente acometidos. Estas lesões são

usualmente observadas como nódulos lisos com ou sem ulceração, e geralmente apresentam aspecto eritematoso. O carcinoma sebáceo extra-ocular pode ser uma malignidade agressiva, sendo que alguns autores demonstraram a incidência de metástase e mortalidade associada a estas lesões (RULON e HELWIG 1974; WICK et al. 1985; DOWD et al. 2008).

Os achados histopatológicos do carcinoma sebáceo extra-ocular consistem nas mesmas características observadas para o carcinoma sebáceo peri-ocular. Em geral, são lesões grandes, pouco circunscritas e assimétricas, com bordas irregulares orientadas horizontalmente. Apresentam blocos de células neoplásicas que variam na forma e tamanho, tendem a apresentar áreas de necrose, e sebócitos maduros podem estar presentes, mas geralmente de maneira focal (FARMER 2004).

Ceratoacantoma (CE): Os ceratoacantomas apesar de não serem classificados como lesões sebáceas foram também incluídos neste estudo por estarem associados à síndrome hereditária de Muir-Torre na qual as lesões sebáceas também estão fortemente relacionadas.

Clinicamente, aparecem como nódulos cupuliformes, cor da pele, com configuração vulcânica, medindo em torno de 1 a 2cm de diâmetro, podendo se apresentar sob duas formas: solitário ou múltiplo. Estas lesões têm uma predileção por áreas expostas ao sol e são preferencialmente encontradas na pele da face, incluindo bochechas, nariz, orelhas e dorso das mãos. Não foram descritas nas palmas, plantas ou superfícies mucosas, embora, em casos raros, possam ocorrer no bordo avermelhado do lábio e região sublingual. Os ceratoacantomas geralmente alcançam seu pleno desenvolvimento em quatro a 12 semanas, e têm uma tendência a

se resolverem espontaneamente, e quando isso ocorre, geralmente, deixam uma cicatriz hipopigmentada e deprimida na pele (SCHWARTZ 1994).

A etiopatogenia dos ceratoacantomas não é conhecida. Os investigadores acreditam, de modo geral, que a lesão é decorrente de uma hiperplasia de infundíbulo de um ou vários folículos pilosos e uma metaplasia escamosa das glândulas sebáceas conectadas (AHMED, 1980). Estas lesões são observadas em indivíduos imunodeprimidos e exibem um comportamento mais agressivo, tendem a persistir por um tempo mais prolongado e demonstram uma alta probabilidade de evoluírem para um carcinoma epidermóide (WALDER et al. 1971).

Histologicamente, os ceratoacantomas são caracterizados por uma cratera central preenchida por queratina e rodeados por células epiteliais proliferantes que se estendem para cima de forma semelhante a um lábio, através dos lados da cratera e, para baixo, em direção à derme como línguas irregulares (KUMAR et al. 2005). Estas proliferações podem ainda parecer um pouco atípicas, porém menos do que na fase inicial: a ceratinização é extensa e regularmente avançada, com apenas uma delgada estrutura de uma ou duas camadas de células basófilas, não ceratinizadas, na periferia das proliferações, enquanto que as células dentro desta aparecem eosinófilas e vítreas como resultado da ceratinização. Há muitas pérolas córneas, a maioria das quais mostram ceratinização completa no seu centro. A base de um ceratoacantoma completamente desenvolvido mostra-se regular e bem demarcada e usualmente não se estende abaixo do nível das glândulas sudoríparas. Um infiltrado inflamatório bastante denso geralmente se encontra presente na base da lesão (LEVER 1991).

Os ceratoacantomas podem ser confundidos com carcinoma epidermóide, pois compartilham várias características histológicas (SCHWARTZ 1994). Os

investigadores Rank e Dixon demonstraram que carcinomas epidermóides apresentam um risco de 8,5% de serem diagnosticados como ceratoacantomas (RANK e DIXON 1979). Por esta razão muitos profissionais têm tratado estas lesões cirurgicamente, semelhantes ao tratamento de tumores malignos.

1.1 LESÕES SEBÁCEAS E CERATOACANTOMAS ASSOCIADOS À SÍNDROMES HEREDITÁRIAS

A maioria dos casos de lesões sebáceas e ceratoacantomas ocorrem de forma esporádica, mas podem estar associados a síndromes hereditárias. A primeira, denominada de síndrome do nevus sebáceo epidérmico apresenta uma lesão chamada de nevus sebáceo de Jadasshon que é considerado uma lesão hamartomatosa e está raramente associada com neoplasias malignas. A segunda trata-se da síndrome de Muir-Torre (MTS), sendo definida como uma síndrome hereditária autossômica dominante associada com as características fenotípicas cutâneas especialmente com tumores de glândulas sebáceas e/ou ceratoacantomas e malignidades viscerais, principalmente o câncer colorretal (CCR) (CESINARO et al. 2007; EISEN e MICHAEL II 2009).

Esta síndrome pode estar relacionada com mutações germinativas nos genes de reparo do pareamento incorreto do DNA que definem a síndrome de Lynch ou com alterações nos genes *APC* e *MYH/MUTYH* que definem a polipose adenomatosa familiar (FAP) e a polipose associada – *MYH/MUTYH* (MAP), respectivamente. (PONTI et al. 2007)

Síndrome de Lynch: A forma hereditária mais comum de CCR é a síndrome de Lynch, também conhecida como câncer colorretal hereditário sem polipose – HNPCC, caracterizada pela ausência de pólipos no cólon e reto (LYNCH et al. 2004).

Lynch observou, nesses casos, um padrão de herança autossômica dominante de câncer de intestino. Indivíduos com a síndrome de Lynch têm um risco de 80% de desenvolvimento de adenocarcinoma colorretal durante a vida. Embora no início esta síndrome estivesse apenas relacionada com este tipo de câncer, atualmente, outras neoplasias têm sido consideradas como parte da síndrome, como neoplasias de: endométrio, ovário, trato genitourinário e intestino delgado (LYNCH et al. 2004).

A síndrome de Lynch está associada com mutação em genes de reparo de pareamento incorreto do DNA. Os genes identificados até o momento incluem *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MSH3*, *PMS1*, *PMS2* e *MLH3*. O gene *MLH1* juntamente com o gene *MSH2* é responsável por 90% dos casos de síndrome de Lynch. Na tentativa de identificar pacientes portadores da síndrome, criaram-se os critérios de Amsterdam I (relacionando apenas o CCR) e Amsterdam modificado ou Amsterdam II (incluindo neoplasias em outros sítios) para caracterização clínica da síndrome de Lynch (Quadros 1 e 2) (LYNCH et al. 2004).

Quadro 1 - Critérios de Amsterdam I.

- Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR;
- Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
- Pelo menos duas gerações acometidas;
- Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- Exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP).

Quadro 2 - Critérios de Amsterdam II.

- Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR ou tumor extra-colônico: câncer de endométrio, intestino delgado, pelve renal ou ureter.
- Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
- Pelo menos duas gerações acometidas;
- Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- Exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP);

Polipose adenomatosa familiar: A FAP é uma síndrome de CCR herdada de forma dominante, causada por mutação no gene *APC* (função importante no controle de crescimento celular e na adesão célula-célula), que leva à formação de múltiplos adenomas de aparecimento em idade precoce. Estas lesões aparecem geralmente na puberdade, e um ou mais destes pólipos se torna um adenocarcinoma de intestino. A FAP clássica é definida pela presença de mais de 100 adenomas sincrônicos colorretais, principalmente no retossigmóide. Pacientes com polipose, mas com menos de 100 pólipos são considerados portadores de adenomatose familiar atenuada – AFAP (PONTI et al. 2005; CHURCH et al. 2004).

Polipose associada – *MYH/MUTYH*: Recentemente, o gene *MYH/MUTYH* foi descoberto como responsável por uma síndrome de polipose herdada de forma

recessiva, semelhante ao quadro clínico da AFAP, com menos de 100 adenomas sincrônicos, predominando no lado direito do cólon, mas em raros casos observou-se mais de 500 pólipos (MISAGO et al. 2004). A penetrância do CCR em pacientes portadores da polipose associada gene *MYH/MUTYH* (MAP) é de 19% aos 50 anos de idade e 43% aos 60 anos de idade (LUBBE et al. 2009). A MAP é causada por inativação bialélica do gene *MYH/MUTYH* um componente da maquinaria de reparo de excisão de bases, cuja disfunção leva a um aumento de alteração de G>T (ALTASSAN et al. 2002).

Síndrome de Muir Torre (MTS): A MTS foi identificada de forma independente pelos médicos Muir em 1967 e Torre em 1968. Muir descreveu um indivíduo com múltiplos adenomas sebáceos e ceratoacantomas na face com posterior desenvolvimento de um carcinoma epidermóide de laringe, quatro adenocarcinomas colorretais sincrônicos, três pólipos colorretais e dois carcinomas duodenais em um período de seis anos. Torre descreveu um indivíduo com múltiplos tumores sebáceos associados com câncer de cólon e âmpola de Vater. Sendo que, em nenhuma das descrições foi documentado a presença de história familiar. Em 1973, Rulon e Helwig publicaram a descrição de dois pacientes portadores de lesão sebácea e malignidades viscerais e história familiar de vários tipos de neoplasia maligna que foi corroborado por outras publicações na mesma época (JAKOBIES et al. 1974; REIFFERS et al. 1976). O significado da presença de história familiar associada à MTS não foi totalmente compreendida até as publicações de Anderson e Lynch na década de 80 (HALL et al. 1994). Estes autores demonstraram a presença de CCR em vários familiares associados á lesões sebáceas. Assim sendo, Lynch propôs que a

MTS pode ser um fenótipo da Síndrome de Lynch II, correspondendo de 1 a 3% das famílias portadoras da síndrome de Lynch (SCHWARTZ et al. 1995).

Atualmente o critério usado para definir a MTS tem sido proposto como a presença de lesões sebáceas (adenoma, epitelioma sebáceo ou carcinoma sebáceo) e ceratoacantomas socrônicos ou metacrônicos com malignidade visceral. A hiperplasia sebácea não é considerada uma lesão associada à MTS por alguns autores (FINAN e CONNOLLY 1984). Isto se deve ao fato de ser uma lesão muito comum na população em geral, assim sendo, não seria um marcador específico para a MTS. No entanto, a hiperplasia sebácea tem sido associada à MTS relacionada com mutação germinativa no gene *MYH/MUTYH*. PONTI et al. (2007) descreveram quatro pacientes portadores de MAP associados com hiperplasia sebácea. Sendo que, três pacientes apresentavam polipose atenuada no intestino e um deles um adenocarcinoma colorretal (PONTI et al. 2007).

As lesões sebáceas associadas à síndrome podem ser únicas ou centenas e são quase sempre encontradas na pele da face, mas podem aparecer em qualquer parte do corpo (PONTI 2005; MANGOLD et al. 2004; ORTA et al. 2009). Os adenomas sebáceos têm sido considerados a lesão sebácea mais comumente encontrada na MTS (COHEN et al. 1991; KIM et al. 2007). Estas lesões ocorrem geralmente no tronco quando associadas à MTS, diferentemente da sua localização na face quando ocorrem de forma esporádica (SINGH et al. 2008). A incidência dos epiteliomas sebáceos associados à MTS varia segundo os autores de 31 a 86% e estes tumores não apresentam uma diferença quanto a sua localização quando relacionados à síndrome ou quando esporádicos. A incidência dos carcinomas sebáceos é

considerada de 66 a 100%. Sendo que os carcinomas sebáceos extra-oculares estão mais associados a esta síndrome (ABBAS et al. 2009).

A análise de mutações dos genes de reparo em famílias diagnosticadas com a síndrome de Muir-Torre demonstrou uma prevalência maior para mutações nos genes *MSH2* e *MLH1*, e com vasta supremacia para mutações identificadas no gene *MSH2*. (MANGOLD et al. 2004; PONTI 2005; ORTA et al. 2009).

1.2 LESÕES SEBÁCEAS E ALTERAÇÕES MOLECULARES

Até o momento, poucos estudos têm sido realizados no intuito de melhor compreender as alterações moleculares responsáveis pela carcinogênese dos tumores sebáceos. Quanto aos ceratoacantomas os raros estudos com foco em alterações moleculares foram realizados na tentativa de definir marcadores para serem utilizados na diferenciação dos ceratoacantomas com carcinomas epidermóides. Nestes estudos foi evidenciado que a mutação do gene TP53 e a translocação nuclear da proteína β -catenina, importante molécula na via de sinalização Wnt, são pouco freqüentes nos ceratoacantomas, mas apresentam importante papel nos carcinomas (TATAROGLU et al. 2009; SUK et al. 2009). Assim sendo esta sessão abordará as alterações moleculares já relatadas nas lesões sebáceas.

Primeiramente, serão expostos estudos avaliando alterações moleculares em lesões sebáceas esporádicas, depois os achados observados em animais transgênicos que desenvolvem lesões sebáceas e por fim as alterações avaliadas nos tumores sebáceos relacionados á MTS.

BRENNAN e MAHONEY (2009) demonstraram que o aumento de expressão da proteína desmogleína 2 (Dsg2), uma caderina transmembrana, em ceratinócitos da epiderme de humanos, desregula múltiplas vias de sinalização nestas células e permite o desenvolvimento de tumores de pele. O aumento de expressão de Dsg2 está associado com o aumento da proliferação celular e sobrevivência celular independente do mecanismo de ancoragem. Os autores, utilizando anticorpos com alta sensibilidade para a proteína, mostraram um dramático aumento da expressão de Dsg2 em certas malignidades epiteliais, incluindo carcinomas basocelulares, carcinomas epidermóides, carcinomas de glândulas sebáceas e carcinomas écrinos.

O fator de transcrição de indução de maturação de linfócitos B (Blimp-1) foi proposto como marcador de população de células progenitoras que residem nas glândulas sebáceas e que regulam seu tamanho e atividade. Em um estudo recente, SELLHEYER e KRAHL (2010), usando métodos de imunoistoquímica para examinar a expressão de Blimp-1 em amostras de pele de embriões, de fetos e adultos e também de 119 tumores sebáceos, demonstraram o papel desta na evolução do epitélio normal e sua localização nos tumores sebáceos (SELLHEYER e KRAHL 2010). Os autores observaram que Blimp-1 é expresso tardiamente no desenvolvimento embrionário e se mostra restrito ao desenvolvimento de glândulas sebáceas e que mantém seu padrão de expressão na vida adulta. Em todos os tumores sebáceos, este marcador está presente apenas no constituinte maduro dos mesmos.

HALSEY et al. (1974) demonstraram que a proteína alfa-metilacil-CoA racemase (AMARC), também conhecida como P504S, tem um aumento da expressão em neoplasias sebáceas benignas e hiperplasia sebácea com decréscimo desta expressão em tumores com menos diferenciação sebácea, como adenomas e

carcinomas sebáceos. Esta proteína tem papel importante na oxidação mitocondrial e peroxisomal de ácidos gordurosos e ácidos biliares intermediários. Além disso, AMARC tem sido considerado um marcador de valor no diagnóstico do câncer de próstata e colorretal.

O gene *TP53*, considerado o guardião do genoma, tem sido relatado como alterado em vários tumores humanos. Um estudo recente demonstrou a presença de mutação deste gene em 15 carcinomas sebáceos perioculares, sendo que as demais neoplasias sebáceas não foram avaliadas neste estudo (KIYOSAKI et al. 2010). Além disso, os autores observaram que a baixa expressão da proteína p21(WAF1/CIP1) estava relacionada com a presença de metástases em linfonodos. No entanto, não observaram correlação clinicopatológica com a mutação do gene *TP53* ou correlação com a proteína p21(WAF1/CIP1).

KAZAKOV et al. (2010) avaliaram a presença de mutação do gene *CTNNB1* em diversos tumores de pele, incluindo nove adenomas sebáceos, seis epiteliomas sebáceos e 14 carcinomas sebáceos (ambos, periocular e extra-ocular). Foi observado que os tumores sebáceos não demonstraram mutação para o gene avaliado. No entanto, TAKEDA et al.(2006) demonstrou que 1/3 dos tumores sebáceos humanos apresentaram mutação em *LEF1*, e essa mutação não permite a ligação de *LEF1* com B-catenina, não fazendo a ativação transcricional que inativam a via WNT. Estes achados mostram que a via de sinalização Wnt tem um importante papel no desenvolvimento das neoplasias sebáceas. Esta via está relacionada com a FAP, que por sua vez, também está associada à síndrome de MTS.

Um estudo publicado em 2008 demonstrou que a pesquisa de proteína Survivina poderia ser utilizada para auxiliar na diferenciação de lesões sebáceas

benignas e malignas. Esta proteína é um membro da família de inibidores da apoptose e também demonstram um papel no controle do ciclo celular, ambos considerados fundamentais na progressão para malignidades. Os autores avaliaram a expressão da proteína em hiperplasias sebáceas, adenomas sebáceos e carcinomas sebáceos e observaram que a positividade nuclear era presente em 1,4% das hiperplasias sebáceas, 8,2% dos adenomas sebáceos e 12% dos carcinomas sebáceos. No entanto, consideram que estudos avaliando a relação da expressão de survivina com a presença de recorrência, metástase em linfonodos e evolução da doença ainda sejam necessários para uma maior compreensão desta proteína relacionada a progressão da doença (CALDER et al. 2008).

Estudos em animais demonstraram que vias como: vitamina D, reparo de recombinação homóloga e MAPquinase estão associadas com lesões sebáceas. ZINSER et al. demonstraram o desenvolvimento de lesões sebáceas em camundongos homozigotos para a perda do gene receptor da vitamina D3 (VDR) quando tratados por via oral com o carcinógeno 7,12dimetilbezantraceno (DMBA) (ZINSER et al. 2002).

Camundongos deficientes de forma heterozigota para os genes *Tp53* e *Rad51c*, sendo este último membro da família RecA/Rad51 responsável pelo reparo de quebra de fita dupla, promovem o desenvolvimento de tumores de glândulas sebáceas. Estes tumores foram evidenciados apenas em camundongos com mutação heterozigótica de ambos os genes (DH), mas quando estas ocorriam no mesmo cromossomo (DH-*cis*), mas não nos camundongos com mutações dos genes em cromossomos diferentes (DH-*trans*) (KUZNETNOV et al. 2009). Além disso, os animais DH-*cis* desenvolviam tumores nas fêmeas numa velocidade maior e

suprimiam o fenótipo causado por camundongos heterozigotos apenas para *Tp53*, onde os tumores mais freqüentes são: osteossarcomas, carcinomas e linfomas. Os autores, realizando a pesquisa de perda de heterozigose (LOH), verificaram que os animais DH-*cis* perdiam os alelos selvagens de *Rad51c* e *Tp53*, enquanto que os animais DH-*trans* perdiam o alelo selvagem de *Tp53* juntamente com o alelo mutado de *Rad51c*, mas mantinham o alelo selvagem deste último gene. Esta observação demonstra a importância do gene *Rad51c* na formação dos tumores sebáceos, mas denota a dependência do gene *Tp53*.

Camundongos transgênicos super-expressando o fator de crescimento TGF α desenvolvem hiperplasias, papilomas, adenomas sebáceos e menos freqüentemente, carcinomas epidermóides e sebáceos quando induzidos por DMBA (JHAPPAN et al. 1994).

As alterações moleculares associadas à MTS foram mais intensamente estudadas nos tumores associados à síndrome de Lynch, mas trabalhos recentes também foram realizados em lesões sebáceas associadas à MAP.

Os estudos demonstram que carcinomas sebáceos associados à Síndrome de Lynch apresentam a presença de Instabilidade de Microsatélites (MSI) similar ao observado nos adenocarcinomas de cólon em pacientes portadores de mutação germinativa nos genes de reparo do DNA (CESINARO et al. 2007; YANABA et al. 2008). Um método atualmente aceito para avaliar o *status* funcional do sistema de pareamento incorreto do DNA é a avaliação das proteínas de reparo MSH2, MLH1 e algumas vezes MSH6, por meio do estudo imunoistoquímico (SINGH et al. 2008; ABBAS et al. 2009). A perda da imunorreatividade nuclear destas proteínas em células dos tumores sebáceos sugere o diagnóstico de MTS e tem mostrado uma alta

correlação com altos níveis de MSI, quando acessada por meio de reação em cadeia da polimerase e eletroforese capilar, considerada o padrão ouro para esta pesquisa (BOLAND et al. 1998; MARCUS et al. 1999). Em contraste com adenocarcinomas de cólon, as neoplasias sebáceas demonstram uma maior incidência da perda de MSH2 mais comumente que de MLH1 (MANGOLD 2004; SINGH 2008; CHHIBER et al. 2008; ORTA, 2009). A presença de mutação do gene *MSH6* é observada apenas excepcionalmente, mas alterações nos genes *MSH3*, *PMS1* e *PMS2* ainda não foram definitivamente ligadas a MTS (CHHIBER et al. 2008).

PONTI et al. (2007) avaliaram a história familiar de quatro indivíduos portadores de mutação no gene *MYH* que apresentavam hiperplasia sebácea. Neste estudo os autores também avaliaram o *status* dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS*, a expressão das proteínas de reparo MLH1, MSH2 e MSH6 e a proteína APC. Além disso, avaliaram os mesmos genes e expressão das proteínas em cinco casos de hiperplasia sebácea ocorrendo de forma esporádica. A hiperplasia sebácea nos portadores da MAP estava presente nos indivíduos probandos, mas também era relatada em seus familiares. Nos casos com mutação no gene *MYH/MUTYH*, as lesões não demonstravam alterações nas proteínas de reparo, mas apresentaram mutação no gene *BRAF* (exon 15 v600E) estando esta envolvida em eventos de proliferação precoce de glândulas sebáceas anormais. Já as lesões sebáceas esporádicas não apresentaram mutação deste gene. Os demais genes avaliados também não demonstraram nenhuma alteração em lesões associadas à síndrome ou esporádicas. Assim os autores concluem que a avaliação do *status* de mutação do gene *BRAF* nas hiperplasias sebáceas pode ser um caminho para mapear e diagnosticar a MAP, sugerindo que estas lesões podem ser usadas como marcador

clínico e biomolecular (PONTI et al. 2007). A presença de mutações no gene *BRAF* não foi observada previamente nos tumores colorretais em pacientes portadores da MAP. No entanto, a mutação do gene *KRAS* foi um evento comum nos tumores colônicos relacionados à MAP (THIRLWEL et al. 2007).

Na síndrome de Lynch, o gene *BRAF* foi avaliado nos adenocarcinomas colorretais, mas não foi evidenciado em nenhum caso. No entanto, nos tumores esporádicos que apresentam a perda da proteína de reparo MLH1 causada por metilação do gene e não mutação germinativa do mesmo, ao redor de 19% dos adenocarcinomas colorretais apresenta a presença de mutação no gene *BRAF*. Este achado determina que a exclusão do diagnóstico de síndrome de Lynch quando ocorre à perda da proteína MLH1 pode ser realizado apenas pela realização da pesquisa de status da mutação do gene *BRAF*. Os genes *BRAF* e *KRAS* participam da mesma via de sinalização e é de conhecimento que mutações em *KRAS* ou *BRAF*, mas virtualmente nunca em ambos, são comuns no CCR. Como já descrito anteriormente, as mutações no gene *BRAF* não são encontradas em adenocarcinomas associados à síndrome de Lynch, no entanto, mutações no gene *KRAS* são consideradas freqüentes (NAGASAKA et al. 2008).

1.3 ONCOGENES *KRAS* E *BRAF*

A presença de mutações da família de genes *RAS* é a anormalidade isolada mais comum dos oncogenes dominantes nos tumores humanos. Foram identificadas diversas mutações distintas do gene *RAS* nas células tumorais, todas reduzindo drasticamente a atividade GTPase das proteínas *RAS*. Em geral, os carcinomas

(especialmente de cólon e pâncreas) apresentam mutação do gene *KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), tumores de bexiga no gene *HRAS* e tumores hematopoiéticos no gene *NRAS*.

Diversos estudos são indicativos de que o RAS desempenha papel importante na mitogênese induzida pelos fatores de crescimento. As proteínas RAS normais estão ligadas no lado citoplasmático da membrana plasmática e vão de um lado para o outro entre um estado ativado, com transmissão de sinal e um estado inativado, quiescente. Estas proteínas também podem ser encontradas no retículo citoplasmático e nas membranas de Golgi, onde podem ser ativadas pelo fator de crescimento celular que se liga na membrana plasmática, através de um mecanismo ainda não elucidado (SCHUBBERT et al. 2007)

No estágio inativo, as proteínas RAS ligam à guanosina difosfato (GDP); quando as células são estimuladas pelo fator de crescimento ou por outras interações entre receptor e ligante, o RAS é ativado pela troca de GDP por GTP (guanina trifosfato). Por sua vez, o RAS se torna ativo na via MAPquinase, trazendo para si a proteína citosólica *RAF-1* e estimula a via MAPquinase para transmitir os sinais promotores ao núcleo. As MAP quinases ativadas desta maneira visam os fatores de transcrição nuclear e assim promovem a mitogênese. Nas células normais, o estágio ativado com transmissão de sinal da proteína RAS é transitório porque sua atividade GTPase intrínseca hidrolisa GTP em GDP, retornando, portanto, o RAS em sua forma básica quiescente (KERKHOFF e RAPP 2001, AVRUCH et al. 2001).

O ciclo ordenado da proteína RAS depende de duas reações:

- 1) Troca de nucleotídeo (GDP por GTP), que ativa a proteína RAS

2) Hidrólise do GTP, que transforma o RAS ativo, ligado ao GTP, na sua forma inativa, ligada ao GDP. Ambos os processos são regulados pela via enzimática.

A atividade GTPase intrínseca é dramaticamente acelerada pelas proteínas ativadoras da GTPase (GAPs). Estas proteínas amplamente distribuídas se ligam ao RAS ativo e aumentam sua atividade GTPase em mais de 100 vezes, levando a uma hidrólise rápida de GTP em GDP e ao término da transdução do sinal. Deste modo, GAPs funcionam como “freios” que impedem a atividade descontrolada do RAS. A resposta a esta ação de freio parece titubear quando as mutações afetam o gene *RAS* (GARRINGTON et al. 1999).

As proteínas mutantes RAS se ligam ao GAP, mas sua atividade GTPase não chega a aumentar. A partir daí, as proteínas mutantes são retidas na forma ligada ao GTP excitado, ou seja, a proteína mutante RAS é permanentemente ativada devido à incapacidade em hidrolisar o GTP, levando a um estímulo contínuo das células sem qualquer gatilho externo, causando por sua vez uma ativação patológica da via de sinalização mitogênica. A importância da ativação da GTPase no controle do crescimento normal é subestimada pelo fato de que uma mutação incapacitante da neurofibromina (NF-1), uma proteína ativadora da GTPase, está também associada com a neoplasia (SCHUBBERT et al. 2007).

Além do *RAS*, outros membros da cascata de sinalização da via MAPquinase também podem ser alterados nas células tumorais. Assim, foram detectadas mutações no gene *BRAF* em mais de 60% dos melanomas e em mais de 80% dos nevus benignos (WOJCIECHOWSKA e LEWINSKI 2006).

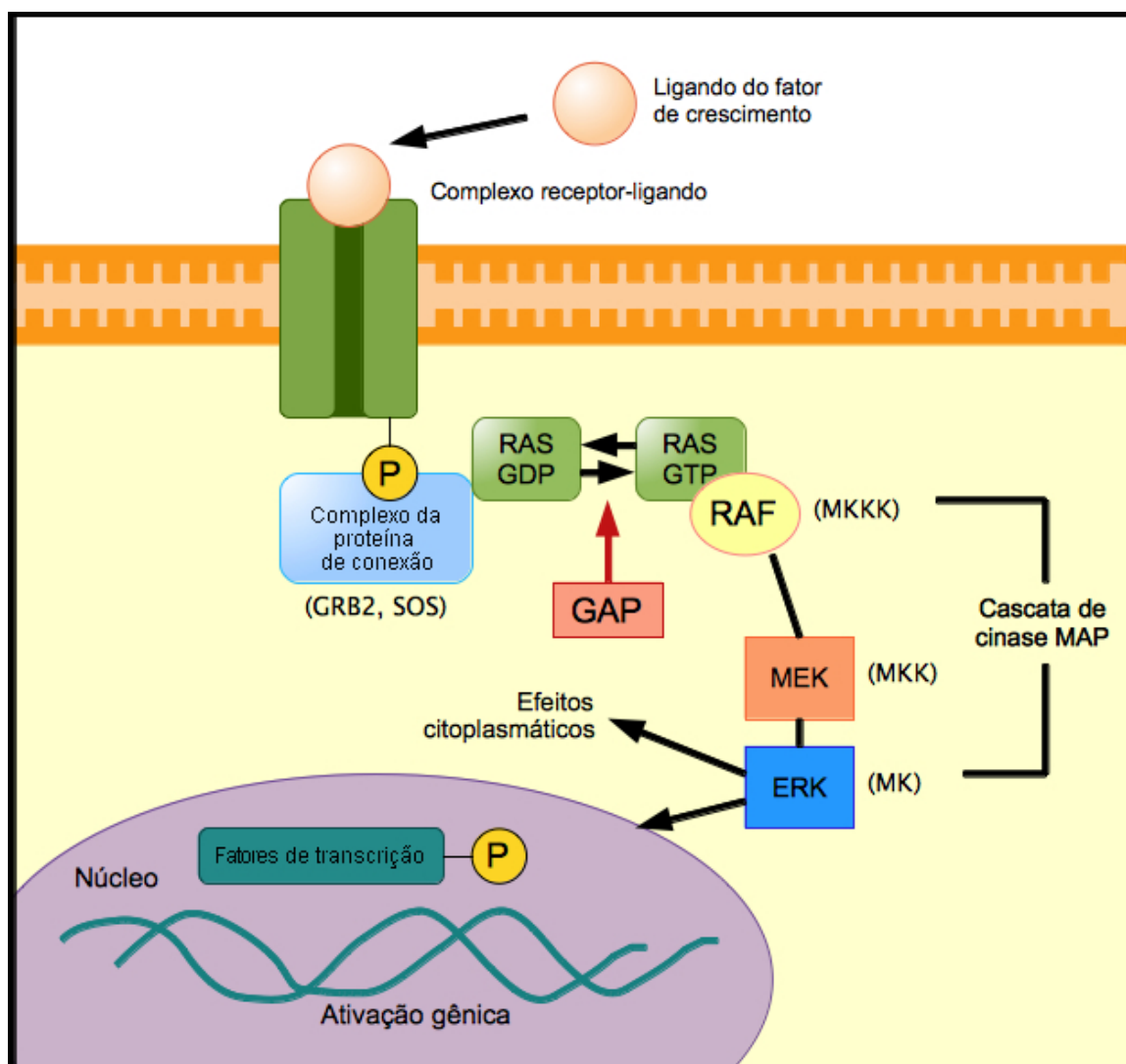


Figura 1 - Via de Sinalização da MAPquinase. Após a ligação de fatores de crescimento ocorre dimerização e autofosforilação de tirosinas. As proteínas de conexão (GRB2 e SOS) levam o receptor para a proximidade de RAS seguido pela catalisação e troca de guanina. A proteína RAS ativada associa-se a RAF1 e esta então ativa e fosforila MEK. Esta cascata de moléculas interage com proteínas que são translocadas para o núcleo onde os fatores de transcrição são ativados (Reprodução modificada do desenho de Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 7º ed. Filadélfia, W.B. Saunders, 2004, p.99).

O oncogene *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) codifica a proteína RAF tipo B, um dos elementos da via MAP quinase, tendo um papel chave na proliferação, diferenciação e apoptose celular. São conhecidas três isoformas de serina-treonina quinase: *ARAF*, *BRAF*, *CRAF*. Embora todas elas

tenham a habilidade de ativar a MAPquinase, a proteína *BRAF* é o mais efetivo ativador, sendo caracterizado por sua diferente distribuição e expressão em vários tecidos. A mutação do gene *BRAF* causa contínua ativação da via quinase, o que induz excessiva proliferação e diferenciação das células cancerígenas (LODISH et al. 2005; WOJCIECHOWSKA e LEWINSKI 2006).

2 JUSTIFICATIVA

As lesões sebáceas compreendem um espectro que pode variar desde lesões hiperplásicas até lesões malignas. Uma identificação acurada destas lesões é fundamental para um tratamento apropriado, para avaliação do prognóstico e determinação do potencial de associação com síndromes hereditárias. Assim sendo, um melhor entendimento das bases moleculares destas lesões pode permitir uma melhor avaliação de risco e regimes terapêuticos mais eficazes para pacientes com lesões sebáceas em sua apresentação inicial.

A presença de mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* tem sido evidenciada em adenomas e adenocarcinomas colorretais esporádicos, sendo que a primeira é freqüentemente associada á tumores colônicos em pacientes portadores de síndrome de Lynch, e a segunda inexistente nestes tumores.

Até o momento, em lesões sebáceas, foi estudado apenas o *status* de mutação do gene *BRAF* e unicamente nas hiperplasias sebáceas relacionadas à MAP. Nenhum outro estudo avaliou os genes *KRAS* e *BRAF* nas lesões sebáceas esporádicas ou associadas a síndromes hereditárias. Sendo que o mesmo é observado para os ceratoacantomas.

Desta forma, se torna pertinente avaliar alterações em ambos os genes nas lesões sebáceas e ceratoacantomas relacionados ou não à MTS.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de mutações nos genes *KRAS* (códon 12 e 13) e *BRAF* (códon v600E) nas lesões sebáceas e ceratoacantomas tanto nas lesões esporádicas quanto naquelas associadas à síndrome de Muir Torre.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de lesões sebáceas no período de 1976 a 2009 operadas no Hospital A C Camargo;
- Avaliar a associação de lesões sebáceas e ceratoacantomas com malignidades viscerais (considerada MTS);
- Avaliar a associação de lesões sebáceas e ceratoacantomas com a síndrome de Lynch por meio de critérios clínicos, molecular e estudo imunoistoquímico das proteínas de reparo do DNA;
- Avaliar a associação das lesões sebáceas e ceratoacantomas com variáveis clínicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C.Camargo (ref nº1111/08).

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Trata-se de um estudo retrospectivo, onde o ponto de partida foi à busca pelas lesões cutâneas (lesões sebáceas e ceratoacantomas), sendo selecionados 216 casos de lesões sebáceas e ceratoacantomas arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, entre os anos de 1976 a 2009.

Os casos selecionados foram revistos por dois patologistas: Dr. Gilles Landman e Dra Renata de Almeida Coudry, para definição diagnóstica. Após esta revisão foram separados 129 casos, sendo que 46 casos o diagnóstico de lesão sebácea ou ceratoacantoma não foi confirmado. Além disso, 41 casos de ceratoacantomas em regressão não foram selecionados, pois a diminuta faixa de epitélio impossibilitaria uma extração adequada do DNA para a realização dos experimentos.

Quanto à distribuição das lesões após a revisão, obteve-se:

- 35 Hiperplasias Sebáceas
- 16 Adenomas Sebáceos
- 8 Epiteliomas Sebáceos
- 13 Carcinomas Sebáceos

- 57 Ceratoacantomas

Nos casos selecionados, foram avaliados os prontuários médicos para a coleta de dados clínicos e para estabelecer se a lesão possuía característica esporádica ou hereditária.

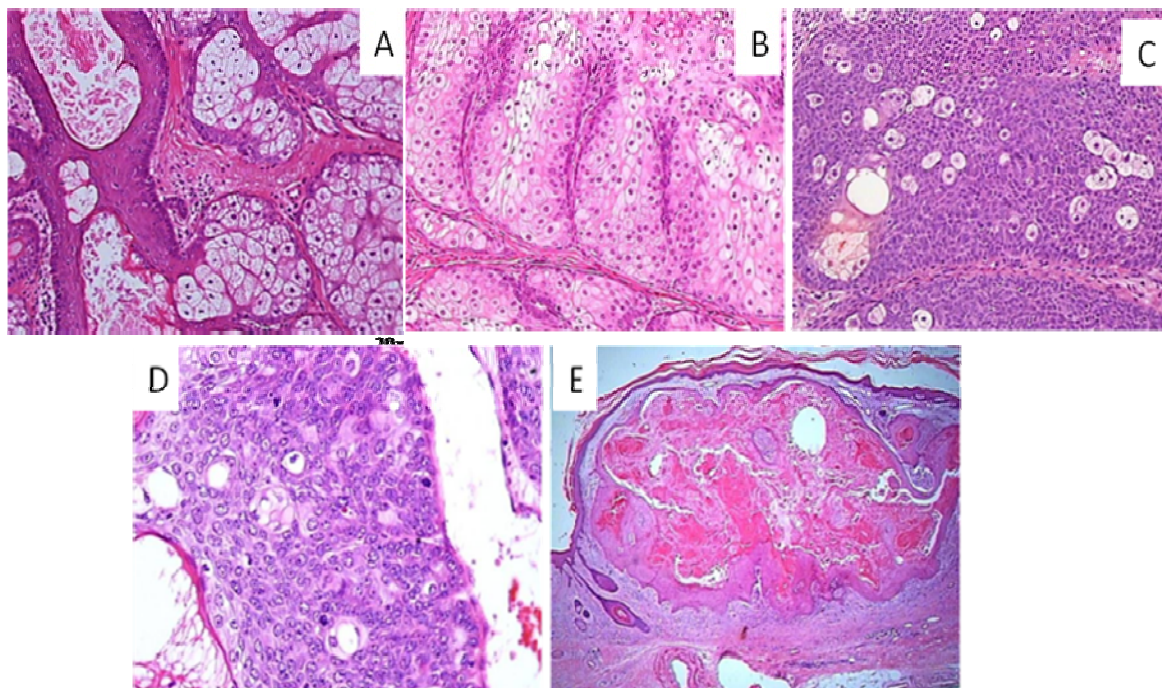


Figura 2 - Histologia das lesões sebáceas e do ceratoacantoma. **A:** Hiperplasia sebácea. **B:** Adenoma sebáceo. **C:** Epitelioma sebáceo. **D:** Carcinoma sebáceo. **E:** Ceratoacantoma.

Dentre os dados clínicos foram avaliados: idade, cor, sexo, naturalidade, diagnóstico primário, idade do aparecimento da lesão na pele, local da lesão, câncer visceral associado, presença de pólipos intestinais, história familiar de câncer e tipo de câncer familiar.

4.2 PROCEDIMENTO MOLECULAR

4.2.1 Microdissecção

Para todas as amostras foram realizados cortes histológicos de 5µm, as lâminas com os cortes de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação e realização da microdissecção manual (*scrape*) ou microdissecção por captura a laser (LCM). (Anexo1)

Para lesões de volume maior ou igual a 60% de células tumorais foi realizada a técnica de *scrape*. Nas lesões onde a região analisada não continha uma porcentagem superior a 60% de células tumorais, a amostra foi submetida ao método de LCM.

Técnica de Scrape – microdissecção manual

Foram selecionadas 70 amostras:

- 20 Hiperplasias Sebáceas
- 6 Adenomas sebáceos
- 8 Carcinomas Sebáceos
- 35 ceratoacantomas

A área tumoral foi marcada na lâmina corada com HE e serviu como molde para a raspagem do tecido na lâmina.

Microdissecção por captura a laser (LCM)

Foram selecionadas 59 lesões:

- 15 Hiperplasias Sebáceas

- 10 Adenomas Sebáceos
- 5 Carcinomas Sebáceos
- 8 Sebaceomas
- 22 Ceratoacantomas

Utilizou-se uma média de quatro lâminas coradas por HE de cada amostra para a realização de LCM (Figura 3), sendo capturadas cerca de 2000 a 3000 células por amostra.

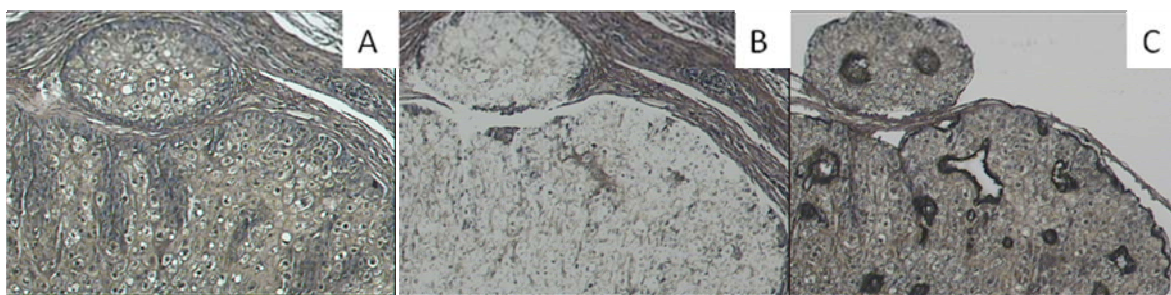


Figura 3 - Imagens representativas da técnica de LCM. **A.** Lesão antes da dissecação. **B.** Espaço vazio após a microdissecação. **C.** Tecido microdissecado aderido à cápsula.

4.2.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit de extração QIAamp DNA Micro (Qiagen-Uniscience do Brasil), segundo as orientações do fabricante e a quantificação do material extraído foi realizada utilizando-se 1µl de DNA no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) (Anexo 2).

Protocolo de Avaliação de Integridade da Amostra

O DNA extraído foi avaliado quanto a sua integridade por meio de uma PCR utilizando *primers* constitutivos para o gene de β -actina sendo, o iniciador senso na

seqüência 5' - GTGTTGTGGGTGTAGGTAG- 3' e o iniciador antisenso - 5' – CATGTCACACTGGGGAAG - 3'. O produto amplificado apresenta 211 pares de bases e foi visualizado em gel de agarose 2%. Posteriormente estocado a - 20° C.

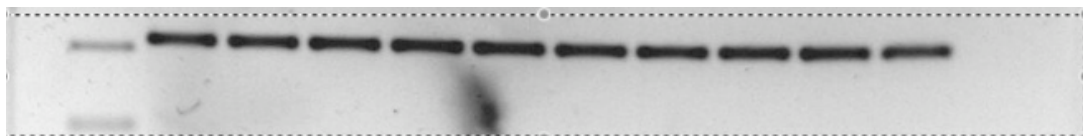


Figura 4 - Gel de eletroforese utilizando iniciadores para β -actina

4.2.3 Avaliação de mutação dos genes *BRAF* e *KRAS* – Sequenciamento Sanger

Para a realização dessa técnica houve a colaboração do laboratório **Fleury**. A análise de mutação dos genes *KRAS* e *BRAF* foi realizada por amplificação de DNA seguida por sequenciamento Sanger. As regiões de interesse foram amplificadas utilizando pares de *primers* específicos (Tabela 1). Em seguida o fragmento amplificado foi sequenciado pela técnica de incorporação direta de nucleotídeos por eletroforese capilar.

Nos experimentos foram amplificados e sequenciados controles positivos e negativos. O controle positivo para mutação do gene *BRAF* foi realizado utilizando o DNA de células HT29 que apresenta a mutação V600E (T1799A) em heterozigose e foi misturado em uma proporção de 50% com células HCT116 que não apresenta mutação no gene *BRAF*.

Para o controle de mutação do gene *KRAS* foi utilizada a mesma mistura de células HT29 e HCT116. A célula HCT116 apresenta a mutação no códon 13 (GGC>GAC), enquanto a célula HT29 é selvagem para mutação no gene *KRAS*.

Para o controle negativo foi realizado amplificação com água estéril.

A amplificação foi realizada por meio de PCR convencional. Cada reação de PCR continha 25µl de reação composta por: um µl de DNA, 12,5 µl de Máster Mix Promega 2x, 0,5 µl de iniciadores senso, 0,5 µl de iniciadores antisenso e 10,5 µl de água estéril. As condições de ciclagem foram às seguintes: dez minutos para denaturação inicial á 94°C, seguido de 45 ciclos de denaturação por 15 segundos á 94°C, 35 segundos de anelamento á 55°C, e extensão á 72 °C. Para completar a amplificação realizou-se uma fase final de extensão por um período de 10 minutos á 72 °C.

Após a amplificação o produto foi purificado utilizando os Kits Ilustra GFX PCR DNA e gel Band Purification (GE Healthcare) segundo protocolo do fabricante. A eluição foi realizada com 30µl de tampão. O produto purificado seguiu para seqüenciamento direto no equipamento ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos). A análise das seqüências geradas foi realizada de forma manual.

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores senso (FW) e antisenso (Rv) para amplificação específica dos genes *KRAS* e *BRAF*.

Gene	Primers	Bases
KRAS FW	5'– GAA TGG TCC TGC ACC AGT AA – 3'	20
KRAS Rv	5'– GTG TGA CAT GTT CTA ATA TAG TCA – 3'	24
BRAF FW	5'– TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG – 3'	22
BRAF Rv	5'– GCC TAC ATT CTT ACC ATC CAC – 3'	21

4.2.4 Avaliação das proteínas de reparo do DNA MLH1 E MSH2 – por imunoistoquímica

A imunoistoquímica é a técnica que envolve o uso de anticorpos de espécies pré-definidas, com sistema de alta sensibilidade de detecção, o que resulta em uma reação com um produto colorido quando observado ao microscópio. O poder desta técnica é a observação simultânea da morfologia do tecido, permitindo a integração da morfologia e das informações imunoistoquímicas da área de interesse.

A análise imunoistoquímica das proteínas de reparo MLH1 e MSH2 foi realizada em cortes parafinados, pela técnica de polímero sem biotina, utilizando-se os anticorpos conforme a Tabela 2. O protocolo de realização das reações se encontram no Anexo 3.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para análise imunoistoquímica.

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes
MLH1	G168-728	1:500	BD Biosciences Pharmigen cat#51-1327GR, San Jose, CA, EUA
MSH2	G219-1129	1:1000	BD Pharmingen cat # 556349

Os cortes histológicos das lesões foram examinados, e foi considerado perda de expressão do gene de reparo quando ocorreu negatividade nuclear na reação imunoistoquímica para MLH1 e MSH2, porém com presença de expressão protéica em células do epitélio normal adjacente e/ou células do estroma.

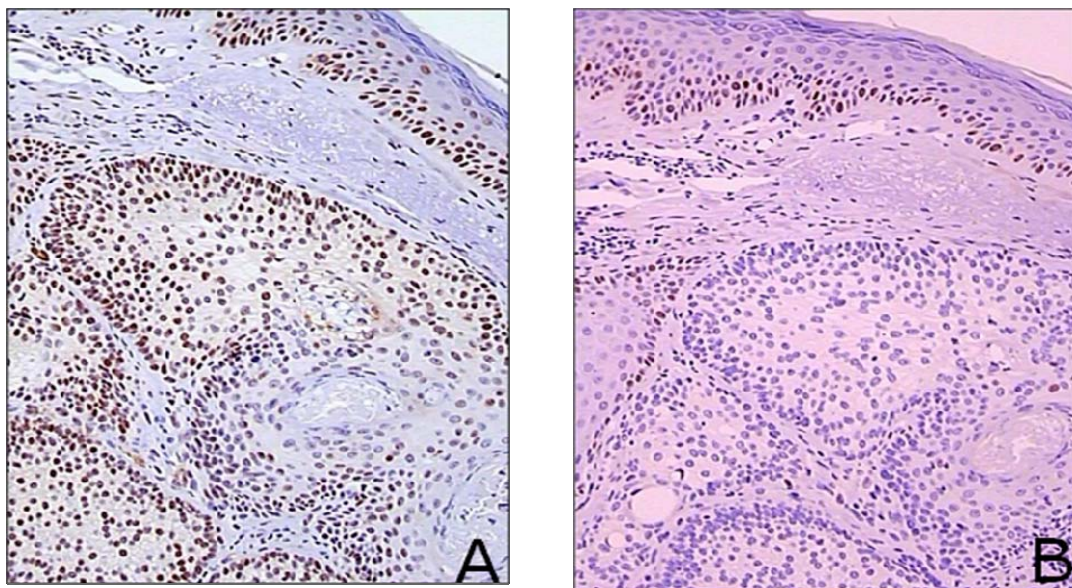


Figura 5 – Imagens representativas da Imunoistoquímica. A: presença das proteínas de reparo MLH1 na região nuclear da lesão e no epitélio normal. B: perda de expressão nuclear da proteína de reparo MSH2 nas células de interesse, porém o epitélio normal manteve-se inalterado, sendo o controle positivo da reação.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre as variáveis clínicas e patológicas e a presença de mutação nos genes *KRAS* e *BRAF* foi realizada utilizando-se o teste de qui-quadrado, fixando-se em 5% o erro alfa ($p \leq 0,005$).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram avaliadas 72 amostras de lesões sebáceas e 57 ceratoacantomas operadas entre o período de 1976 a 2009. Foram selecionadas todas as amostras de lesões sebáceas que após a avaliação pelos patologistas o diagnóstico de lesão sebácea foi confirmado (Tabela 3). No entanto, para os ceratoacantomas, como o estudo não visava avaliar a prevalência desta lesão que foram operadas no Hospital AC Camargo, foram selecionadas apenas lesões que não se encontravam em estágio final de regressão e que permitiria extração do DNA com quantidades suficientes para a realização do sequenciamento direto.

Tabela 3 – Frequência de lesões sebáceas operadas (N=72) no hospital AC Camargo (2010).

Variáveis	Categoria	HS	AS	ES	CS	Total
Sexo	Homens	18 (51%)	11 (68%)	6 (75%)	8 (61%)	43 (59,7%)
	Mulheres	17 (48%)	5 (31%)	2 (25%)	5 (38%)	29 (40,3%)
Localização	Facial	34 (97%)	15 (94%)	7 (87,5%)	6 (46%)	62 (86%)
	Extra-facial	1 (3%)	1 (6%)	1 (12,5%)	3 (23%)	6 (8,3%)
	Ocular	-	-	-	4 (30,8%)	4 (5,7%)
Total %		35 (48%)	16(22%)	8 (11%)	13 (18%)	72 (100%)

Legenda: HS: hiperplasia sebácea/ AS: adenoma sebáceo/ ES: epitelioma sebáceo/ CS: carcinoma sebáceo/ CE: ceratoacantoma.

Foram avaliados 110 prontuários, sendo que 19 prontuários não foram encontrados, pois corresponde a pacientes que abriram apenas envelope e não tiveram abertura de fichas no Hospital.

6.1.1 Hiperplasia sebácea

Para a caracterização dos indivíduos portadores de lesões de hiperplasias sebáceas foi possível reunir dados de 30 prontuários de um total de 35 lesões.

A média de idade dos indivíduos com hiperplasia sebácea do sexo masculino foi de 60 anos, e a média de idade no sexo feminino foi de 65 anos. A maioria das lesões apresentava uma localização facial (96,6%) e eram $\leq 1\text{mm}$ (86%).

Foram observados nove indivíduos com hiperplasia sebácea associados a câncer visceral (30%). O câncer visceral mais frequente foi o de tiróide, correspondendo a 33,3% dos casos. Foi observado que 43,3% dos pacientes apresentavam história familiar de câncer, sendo que 76,9% eram de câncer visceral. Nos pacientes com hiperplasias sebáceas, 6,6% estavam associados com a S. Lynch (Tabelas 4 e 4.1).

Tabela 4 - Caracterização dos indivíduos portadores de hiperplasia sebácea no hospital AC Camargo (2010).

Variável	Categoria	N(%)
Gênero	Masculino	16 (53,3)
	Feminino	14 (46,6)
Localização do Tumor	Facial	29 (96,6)
	Extra-facial	1 (3,3)
Tamanho do Tumor	≤ 1cm	26 (86,6)
	> 1cm	4 (13,3)
Ca visceral associado	Presente	9 (30)
	Ausente	21 (70)
História Familiar	Presente	13 (43,3)
	Ausente	4 (13,3)
	Não Informada	13 (43,3)
Tipo de Ca Familiar	Pele não melanoma	2 (15,4)
	Visceral	10 (76,9)
	Não informado	1 (7,6)
S. Lynch	Presente	2 (6,6)
	Ausente	21 (70%)
	Não informado	7 (23,3%)

Tabela 4.1 – Indivíduos portadores de Hiperplasia sebácea associados a câncer visceral no hospital AC Camargo (2010).

ID	Sexo	Local da HS	Local CA Visceral	HF	Lynch
13	F	Retroauricular	Parótida	NI	Não
21	M	Asa Nasal	Retossigmoide	Sim	Sim
50	M	Malar	Bexiga	NI	Não
66	M	Malar	Tiróide	Não	Não
67	M	Asa nasal	Estômago	NI	Não
74	M	Asa nasal	Próstata/Testículo	NI	Não
101	F	Nariz	Cólon/Endométrio	Sim	Sim
137	F	Fronte	Tiróide	Sim	Não
146	F	Paranasal	Tiróide	Sim	Não

F: feminino/ M: masculino/ HS: hiperplasia sebácea/HF: história familiar/ NI: não informada.

6.1.2 Adenoma sebáceo

Para a caracterização dos indivíduos portadores de lesões de adenomas sebáceos foi possível reunir dados de 13 prontuários de um total de 16 lesões.

A média de idade dos indivíduos com adenomas sebáceos do sexo masculino foi de 55 anos, e a média de idade no sexo feminino foi de 66 anos. Na maioria dos indivíduos as lesões se apresentavam na região facial (84,6%) e eram $\leq 1\text{mm}$ (69,2%).

Foram observados nove indivíduos com adenomas sebáceos associados a câncer visceral (69,2%). O câncer visceral mais freqüente foi o de cólon, correspondendo a 66,6% dos casos. Foi observado que 38,7% dos pacientes apresentavam história familiar de câncer, sendo que 80% eram de câncer visceral. Nos pacientes com adenomas sebáceos, 38,7% estavam associados à S. Lynch (Tabelas 5 e 5.1).

Tabela 5 - Caracterização dos indivíduos portadores de adenoma sebáceo no hospital AC Camargo (2010).

Variável	Categoria	N(%)
Gênero	Masculino	9 (69,2)
	Feminino	4 (30,7)
Localização do Tumor	Facial	11 (84,6)
	Extra-facial	2 (15,3)
Tamanho do Tumor	≤ 1cm	9 (69,2)
	> 1cm	4 (30,7)
Ca visceral associado	Presente	9 (69,2)
	Ausente	4 (30,8)
História Familiar	Presente	5 (38,5)
	Ausente	2 (15,3)
	Não informada	6 (46,15)
Tipo de Ca Familiar	Visceral	4 (80)
	Não informado	1 (20)
S. Lynch	Presente	5 (38,7)
	Ausente	4 (30,7)
	Não informado	4 (30,7)

Tabela 5.1 – Indivíduos portadores de Adenoma sebáceo associados a câncer visceral no hospital AC Camargo (2010).

ID	Sexo	Local do AS	Local Tu Visceral	HF	Lynch
1	M	Infra-escapular	Parótida	Não	Não
24	M	Asa nasal	Retossigmóide	Sim	Sim
32	M	Couro cabeludo	Cólon	Sim	Sim
51	F	Dorso nasal	Gástrico	Sim	Sim
76	F	Temporal	Mama	NI	Provável
131	F	Mandíbula	Cólon	NI	Provável
156	F	Fronte	Cólon/endométrio	Sim	Sim
159	F	Couro cabeludo	Retossigmóide	Sim	Sim
160	F	Temporal	Reto	Sim	Não

F: feminino/ M: masculino/ AS: adenoma sebáceo/HF: história familiar/ NI: não informada.

6.1.3 Sebaceoma - Epitelioma Sebáceo

Para a caracterização dos indivíduos portadores de epitelomas sebáceos foi possível reunir dados de seis prontuários de um total de oito lesões.

A média de idade dos indivíduos com epitelomas sebáceos no sexo masculino foi de 64 anos, e a média de idade no sexo feminino foi de 82 anos. A maioria das lesões apresentava uma localização facial (83,3%) e eram $\leq 1\text{mm}$ (83,3%).

Foram observados dois indivíduos com epitelomas sebáceos associados ao câncer visceral (33,3%), sendo um deles de cólon e o outro de estômago. Foi observado que 16,6% dos pacientes apresentavam história familiar de câncer, no entanto, apenas um deles tinha informação de câncer visceral. Nos pacientes com epitelomas sebáceos, 33,3% deles estavam associados à S. Lynch (Tabelas 6 e 6.1).

Tabela 6 – Caracterização dos indivíduos portadores de epitelioma sebáceo no hospital AC Camargo (2010).

Variável	Categoria	N(%)
Gênero	Masculino	5 (83,3)
	Feminino	1 (16,6)
Localização do Tumor	Facial	5 (83,3)
	Extra-facial	1 (16,6)
Tamanho do Tumor	$\leq 1\text{cm}$	5 (83,3)
	$> 1\text{cm}$	1 (16,6)
Ca visceral associado	Presente	2 (33,3)
	Ausente	4 (66,6)
História Familiar	Presente	1 (16,6)
	Ausente	1 (16,6)
	Não Informada	4 (66,6)
Tipo de Ca Familiar	Visceral	1 (50)
	Não informado	1 (50)
S. Lynch	Presente	2 (33,3)
	Ausente	4 (66,6)

Tabela 6.1 – Indivíduos portadores de epiteloma sebáceo associados a câncer visceral no hospital AC Camargo (2010).

ID	Sexo	Local do ES	Local Tu Visceral	HF	Lynch
94	M	Asa nasal	Retosigmóide	Sim	Sim
102	M	Asa nasal	Gástrico	Sim	Sim

M: masculino/ ES: epiteloma sebáceo/ HF: história familiar.

6.1.4 Carcinoma sebáceo

Para a caracterização dos indivíduos portadores de carcinomas sebáceos foi possível reunir dados de dez prontuários de um total de 13 lesões.

A média de idade dos indivíduos com carcinomas sebáceos do sexo masculino foi de 65 anos, e a média de idade no sexo feminino foi de 52 anos. A maioria das lesões apresentava uma localização extra-ocular (70%) e eram $\leq 1\text{mm}$ (70%).

Foram observados seis indivíduos com carcinomas sebáceos associados ao câncer visceral (60%). O câncer visceral mais freqüente foi o de cólon, correspondendo a 50% dos casos. Foi observado que 40% dos pacientes apresentavam história familiar de câncer, sendo que 30% eram de câncer visceral. Nos pacientes com carcinomas sebáceos, 20% estavam associados à S. Lynch (Tabelas 7 e 7.1).

Tabela 7 - Caracterização dos indivíduos portadores de carcinoma sebáceo no hospital AC Camargo (2010).

Variável	Categoria	N(%)
Gênero	Masculino	7 (70)
	Feminino	3 (30)
Local do Tumor	Ocular	3 (30)
	Extra Ocular	7 (70)
Tamanho do Tumor	≤ 1cm	7 (70)
	> 1cm	3 (30)
Ca visceral associado	Presente	6 (60)
	Ausente	4 (40)
História Familiar	Presente	4 (40)
	Ausente	6 (60)
Tipo de Ca Familiar	Visceral	3(75)
	Não informado	1 (25)
S. Lynch	Presente	2 (20)
	Ausente	4 (40)
	Não informado	4 (40)

Tabela 7.1 – Indivíduos portadores de carcinoma sebáceo associados a câncer visceral no hospital AC Camargo (2010).

ID	Sexo	Local do CS	Local Tu Visceral	HF	Lynch
19	M	Nasal E		NI	Provável
20	F	Dorso nasal	Cólon ascendente	Sim	Sim
30	F	Infra-mamária	Cólon transverso	NI	Provável
31	F	Braço	Cólon	Sim	Sim
78	M	Pálpebra	Parótida	NI	Não
161	M	Fronte	Orofaringe	Sim	Não

F: feminino/ M; masculino/ CS: carcinoma sebáceo/HF; história familiar/ NI: não informada

6.1.5 Ceratoacantoma

Para a caracterização dos indivíduos portadores de ceratoacantomas foi possível reunir dados de 51 prontuários de um total de 57 lesões.

A média de idade dos indivíduos com ceratoacantomas do sexo masculino foi de 63 anos, e a média de idade no sexo feminino foi de 66 anos. A maioria das lesões apresentava uma localização extra-facial (72,5%) e eram $\leq 1\text{mm}$ (70,5%).

Foram observados nove indivíduos com ceratoacantomas associados ao câncer visceral (17,6%). Os cânceres viscerais mais frequentes foram o de intestino e parótida, correspondendo a 22,2% cada um deles. Foi observado que 27,4% dos pacientes apresentavam história familiar de câncer, sendo que 78,5% eram de câncer visceral. As amostras de ceratoacantomas não estavam associadas à S. Lynch (Tabelas 8 e 8.1).

Tabela 8 - Caracterização dos indivíduos portadores de ceratoacantomas no hospital AC Camargo (2010).

Variável	Categoria	N(%)
Gênero	Masculino	20 (39,2)
	Feminino	31 (60,7)
Localização do Tumor	Facial	14 (27,4)
	Extra Facial	37 (72,5)
Tamanho do Tumor	≤ 1cm	36 (70,5)
	> 1cm	15 (29,4)
Ca visceral associado	Presente	9 (17,6)
	Ausente	42 (82,3)
História Familiar	Presente	14 (27,4)
	Ausente	13 (25,4)
	Não Informada	24 (47)
Tipo de Ca Familiar	Visceral	11 (78,6)
	Pele não melanoma	2 (14,2)
	Não informado	1 (7,1)
S. Lynch	Presente	-
	Ausente	42 (82)
	Não informado	9(17,6)

Tabela 8.1 – Indivíduos portadores de ceratoacantomas associados a câncer visceral no hospital AC Camargo (2010).

ID	Sexo	Local do CE	Local Tu Visceral	HF	Lynch
26	F	Antebraço	Mama	Sim	Não
37	F	Mão	Linfoma Não Hodgkin	NI	Não
42	F	Ombro	Parótida	Não	Não
53	F	Braço	Endométrio	Sim	Não
70	F	Antebraço	Tiróide	Sim	Não
88	F	Perna	Reto	NI	Não
99	F	Antebraço	Mama	Não	Não
111	F	Cervical	Retosigmóide	Não	Não
153	M	Orelha	Parótida	Não	Não

HF: história familiar/ CE; Ceratoacantoma / NI: não informada/

6.1.6 Lesões associadas

Foram encontrados sete casos com mais de uma lesão sebácea e/ou ceratoacantoma associados (Tabela 9). Foram observados dois casos de hiperplasia sebácea associados com outras lesões sebáceas, sendo que ambos apresentavam o diagnóstico molecular de S. de Lynch (100%).

Tabela 9 - Indivíduos com mais de uma lesão sebácea e/ou ceratoacantoma no hospital AC Camargo (2010).

ID	1º lesão	2º lesão	3º lesão
21	HS	ES	AS
31	CS	HS	-
40	CE	CE	-
51	AS	ES	-
62	CE	CE	-
78	CS	CS	-
81	CE	CE	-

HS: hiperplasia sebácea/ AS: adenoma sebáceo/ ES: epitelioma sebáceo/ CS: carcinoma sebáceo/ CE: ceratoacantoma.

6.1.7 Associação de lesões sebáceas com diagnóstico de Síndrome de Lynch

Na avaliação dos dados clínicos das amostras, foram encontrados sete indivíduos portadores de lesões sebáceas com diagnóstico clínico ou molecular de Síndrome de Lynch. Os pacientes, 51 e 156 são irmãos. Foi observado que em três casos de indivíduos portadores de síndrome de Lynch havia mais de uma lesão sebácea associada. Esses achados se encontram na Tabela 10. Após o estudo imunohistoquímico de todas as lesões (N=72), independente da avaliação dos prontuários, 14 indivíduos (19,44%), portadores de lesões sebáceas, apresentaram perda de expressão das proteínas de reparo do DNA, sendo que sete casos já apresentavam o diagnóstico clínico e molecular da síndrome de Lynch e os outros

sete casos sugerem ser um provável portador dessa síndrome, pois apresentaram perda de expressão dessas proteínas.

A perda da expressão da proteína MSH2 foi predominante (85,71%) em relação à MLH1 (14,29%). Nos dois casos com perda de expressão da proteína MLH1, os dados clínicos não foram avaliados, pois não houve a abertura de prontuário no hospital.

As lesões mais afetadas foram o adenoma sebáceo (57,14%), o carcinoma sebáceo extra-ocular (28,57%) e o epitelioma sebáceo (14,29%).

Nenhum dos ceratoacantomas apresentou perda de expressão das proteínas de reparo do DNA e nenhum dos pacientes com ceratoacantomas tinham diagnóstico de síndrome de Lynch.

Tabela 10 – Indivíduos apresentando diagnóstico clínico ou molecular de S. Lynch no hospital AC Camargo (2010).

ID	1ª lesão	2ª lesão	3ª lesão	Diagnóstico	IQ
20	CS			Molecular	Perda de MSH2
21	HS	ES	AS	Clínico	Perda de MSH2
31	CS	HS		Clínico	Perda de MSH2
32	AS			Clínico	Perda de MSH2
51*	AS	ES		Clínico	Perda de MSH2
156*	AS			Clínico	Perda de MSH2
159	AS			Molecular	Perda de MSH2
19	CS			Provável	Perda de MSH2
30	CS			Provável	Perda de MSH2
76	AS			Provável	Perda de MSH2
131	AS			Provável	Perda de MSH2
132	AS			Provável	Perda de MSH2
134	AS			Provável	Perda de MLH1
141	CS			Provável	Perda de MLH1

HS: hiperplasia sebácea/ AS: adenoma sebáceo/ ES: epitelioma sebáceo/ CS: Carcinoma Sebáceo/ CE: ceratoacantoma.*Os paciente 51 e 156 são irmãos.

6.1.8 Indivíduos portadores de lesões sebáceas ou ceratoacantomas associados com cânceres viscerais

Foram observados 31 indivíduos portadores de lesões sebáceas e ceratoacantomas com câncer visceral associado, sendo que três casos apresentavam mais de uma lesão sebácea associada. Dos 59 indivíduos avaliados com lesões sebáceas, 37,29% deles apresentaram associação com câncer visceral, sendo o adenoma sebáceo a lesão de pele mais acometida nestes casos, seguido do carcinoma sebáceo e epitelioma sebáceo. Nos pacientes portadores de ceratoacantomas (N=51 avaliados) esta associação foi de 17,6%. (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Indivíduos portadores de lesões sebáceas e ceratoacantomas associados com câncer visceral.

Paciente	Sexo	Idade ao diagnóstico	Lesão	Local	Câncer visceral	HF	S. Lynch
1	M	65	AS	Infra-escapular	Parótida	Não	NR
13	F	45	HS	Retroauricular	Parótida	Sim	NR
20	F	52	CS	Dorso nasal	Intestino	Sim	SIM
21	M	51	HS	Asa nasal	Intestino	Sim	SIM
		51	AS	Asa nasal			
		52	ES	Asa nasal			
26	F	72	CE	Antebraço	Mama	Sim	NR
30	F	54	CS	Infra- mamário	Intestino	Sim	Provável
31	F	52	CS	Braço	Intestino/Endométrio	Sim	SIM
		60	HS	Nariz			
32	M	53	AS	Couro cabeludo	Intestino	Sim	SIM
37	F	80	CE	Mão	Linfoma não Hodgkin	Sim	NR
42	M	87	CE	Ombro	Parótida	Sim	NR
50	M	70	HS	Malar	Bexiga	Sim	NR
51	M	43	AS	Dorso nasal	Estômago	Sim	SIM
		46	ES	Retroauricular			
53	F	80	CE	Braço	Endométrio	Sim	NR
66	M	75	HS	Malar	Tiróide	Não	NR
67	M	88	HS	Asa nasal	Estômago	Sim	NR
70	F	48	CE	Antebraço	Tiróide	Sim	NR
74	M	39	HS	Asa nasal	Próstata	Sim	NR
76	F	79	AS	Temporal	Mama	Sim	Provável
78	M	76	CS	Pálpebra	Parótida	Sim	NR
88	F	58	CE	Perna	Intestino	Sim	NR
99	F	62	CE	Antebraço	Mama	Não	NR
111	F	67	CE	Cervical	Intestino	Não	NR
131	F	63	AS	Mandíbula	Intestino	Sim	Provável
137	F	58	HS	Fronte	Tiróide	Sim	NR
146	F	56	HS	Paranasal	Tiróide/Mama	Sim	NR
153	M	55	CE	Orelha	Parótida	Não	NR
156	F	60	AS	Fronte	Intestino	Sim	SIM
159	F	51	AS	Couro cabeludo	Reto	Sim	SIM
160	M	78	AS	Temporal	Intestino	Sim	NR
161	M	77	CS	Fronte	Orofaringe	Sim	NR
162	M	75	CS	Pálpebra	Parótida	Sim	NR

M: masculino/ F: feminino/ HS: hiperplasia sebácea/ AS: adenoma sebáceo/ ES epiteloma sebáceo/ CS: carcinoma sebáceo/ CE; ceratoacantoma/NR: não relatado.

Tabela 12 – Associação entre as lesões sebáceas e ceratoacantomas com câncer visceral.

Lesão		HS	AS	ES	CS	CE
Ca	Visceral	9 (30%)	9 (69,2 %)	2 (33,3%)	6 (60%)	9 (17,6%)
(N%)						

HS: hiperplasia sebácea/ AS: adenoma sebáceo/ ES epitelioma sebáceo/ CS: carcinoma sebáceo/ CE; ceratoacantoma.

6.2 AVALIAÇÃO DO *STATUS* DE MUTAÇÃO DOS GENES *KRAS* E *BRAF*

Foi realizada a avaliação da mutação dos genes *KRAS* (códon 12 e 13) e *BRAF* (V600E) por seqüenciamento de Sanger em 104 amostras, assim distribuídas: 26 hiperplasias sebáceas, 16 adenomas sebáceos, sete epitelomas sebáceos, 13 carcinomas sebáceos e 42 ceratoacantomas. Houve sucesso da reação em 99 amostras para o gene *KRAS* (26HS, 13AS, 7ES, 13CS e 40 CE) e 97 amostras para o gene *BRAF* (26HS, 15AS, 7ES, 13CS e 36CE). Foram observadas oito amostras de lesões sebáceas com mutação do gene *KRAS* (N= 59) e cinco amostras de lesões sebáceas com mutação do gene *BRAF* (N=61).

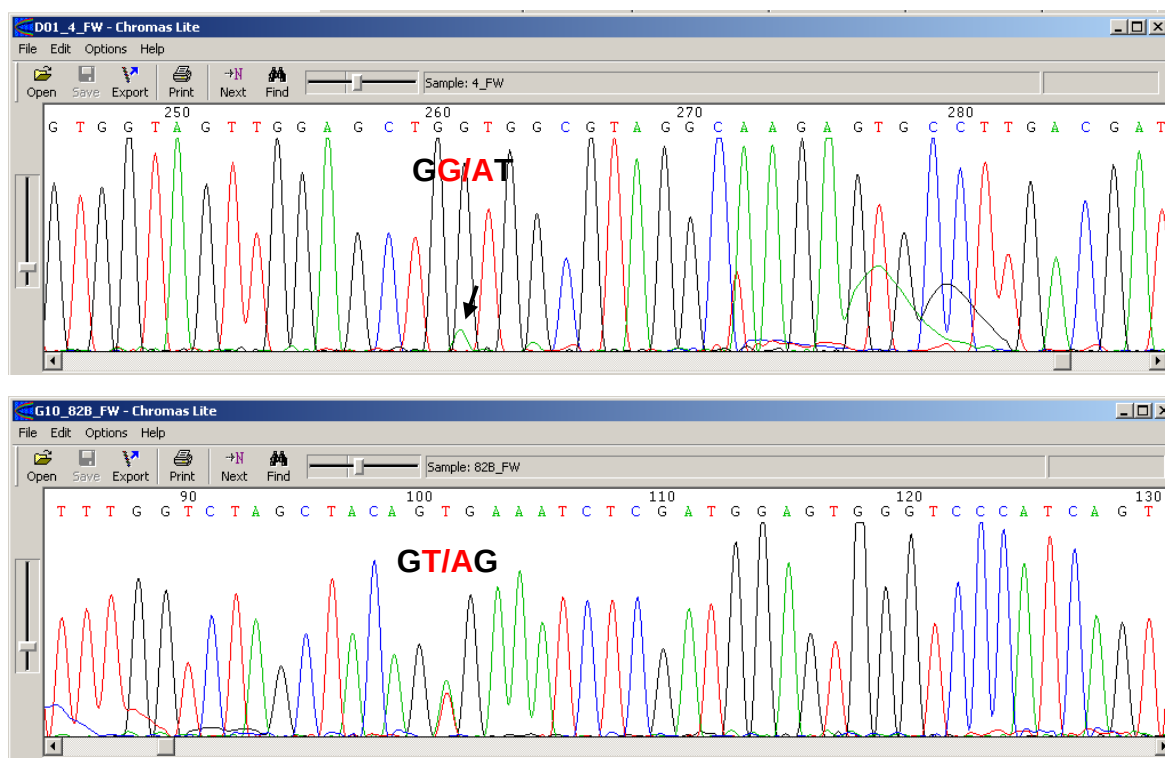


Figura 6 - Eletroferograma demonstrando mutações nos genes *KRAS* e *BRAF*. **A.** Presença de mudança de GGT>GAT no códon 12 do gene *KRAS*; **B.** Presença de mudança de GTG>GAT no códon 600 do gene *BRAF*.

Não houve significância estatística entre mutações do gene *KRAS* com as variáveis clínicas nas lesões sebáceas (Tabela 13). Das nove lesões apresentando mutação no gene *KRAS*, 12,1% apresentavam outra lesão sebácea associada ($p=0,037$). Não houve significância estatística entre a mutação do gene *KRAS* e as diferentes lesões sebáceas ($p=0,800$).

Tabela 13 - Avaliação do *status* do gene *KRAS* com as lesões sebáceas.

Variáveis clínicas		<i>KRAS</i>		Valor de p
		Mutação N(%)	Sem mutação N(%)	
Gênero	Feminino	1 (5,0%)	19 (95%)	p=0,142
	Masculino	7 (19%)	34 (81%)	
Localização	Facial	7 (14%)	43 (86%)	p=0,066
	Extra-facial	0	8 (100%)	
	Ocular	1 (50%)	2 (50%)	
CA visceral associado	Presente	5 (20,8%)	19 (79,2%)	p= 0,149
	Ausente	2 (7,1%)	26 (92,9%)	
S. Lynch	Presente	1 (14,3%)	6 (85,7%)	p= 0,945
	Ausente	6 (13,3%)	39 (86,7%)	
História familiar	Presente	1 (5,6%)	17 (94,4%)	p= 0,471
	Ausente	0	9 (100%)	
Outra lesão associada	Presente	2 (12,1%)	51 (87,9%)	p=0, 037
	Ausente	5 (50%)	2 (50%)	
Hiperplasia sebácea		3 (11,5%)	23 (88,5)	p= 0,800
Adenoma sebáceo		2 (12,5%)	14 (87,5%)	
Epitelioma sebáceo		1 (14,3%)	6 (85,7%)	
Carcinoma sebáceo		2 (23,1%)	10 (776,9%)	

Não houve significância estatística entre mutações no gene *BRAF* com as variáveis clínicas nas lesões sebáceas (Tabela 14). Todas as lesões sebáceas que tinham associação com outra lesão sebácea apresentaram mutação no gene *BRAF*, mas o valor não foi significativo (p=0, 540). Não foi encontrada nenhuma hiperplasia sebácea com mutação no gene *BRAF*. Não houve significância estatística entre a mutação do gene *BRAF* e as diferentes lesões sebáceas (p= 0,083).

Tabela 14 - Avaliação do *status* do gene *BRAF* com as lesões sebáceas.

Variáveis clínicas		<i>BRAF</i>		Valor de p
		Mutação N(%)	Sem mutação N(%)	
Gênero	Masculino	3 (15%)	17 (85%)	p=0,166
	Feminino	2 (4,8%)	40 (95,2)	
Localização	Facial	5 (10%)	45 (90%)	p=0,521
	Extra-facial	0	8 (100%)	
	Ocular	0	4 (100%)	
CA visceral associado	Presente	2 (8,3%)	22 (91,7%)	p= 0,872
	Ausente	2 (7,1%)	26 (92,9%)	
S. Lynch	Presente	2 (28,6%)	5 (71,4%)	p= 0,026
	Ausente	2 (4,4%)	43 (95,6%)	
História familiar	Presente	2 (11,1%)	16 (88,9%)	p=0,299
	Ausente	0	9 (100%)	
Outra lesão associada	Presente	5 (8,6%)	53 (91,4%)	p= 0,540
	Ausente	0	4 (100%)	
Hiperplasia sebácea		0 (0%)	26 (100%)	p= 0,083
Adenoma sebáceo		2 (12,5%)	14 (87,5%)	
Epitelioma sebáceo		2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Carcinoma sebáceo		1 (7,7%)	12 (92,3%)	

Os ceratoacantomas, por se tratar de uma lesão diferente das lesões sebáceas não foram avaliados estatisticamente em conjunto. Das 36 amostras analisadas do seqüenciamento do gene *BRAF*, foram encontrados dois casos com mutações (5,5%) nesse gene em ceratoacantomas. No seqüenciamento do gene *KRAS* (N=40), foram observados dez casos com mutações (25%) em ceratoacantomas, sendo que oito

delas ocorreram em lesões de indivíduos do sexo masculino. Apenas uma amostra de ceratoacantoma com mutação no gene *KRAS* apresentou câncer visceral associado (parótida).

Todos os casos com suas variáveis clínicas, achados moleculares e *status* das proteínas do reparo do DNA se encontram no Anexo 4.

7 DISCUSSÃO

Este estudo teve por finalidade iniciar uma avaliação molecular da via MAPquinase em lesões sebáceas e ceratoacantomas. Esta via regula a expressão de genes fundamentais na proliferação e sobrevivência celular, e é considerada importante no desenvolvimento de terapias alvo, como por exemplo, drogas anti-EGFR e drogas multi-alvos (como o Sorafenib). Além desta pesquisa molecular foram também avaliados a prevalência das lesões sebáceas operadas no Hospital A C Camargo no período de 1976 a 2009 e os aspectos clínicos e familiares destas lesões e ceratoacantomas.

As lesões sebáceas constituem um espectro desde uma apresentação benigna até carcinomas bem agressivos. A incidência de lesões sebáceas na população é considerada baixa. BERKER et al. (1996) relataram uma incidência de hiperplasias sebáceas de 1% na população saudável e 16% em pacientes imunodeprimidos. Em nosso estudo selecionamos as lesões sebáceas por meio da análise do banco de dados do Departamento de Anatomia Patológica onde foram evidenciados 35 hiperplasias sebáceas, 16 adenomas sebáceos, oito epiteliomas sebáceos e 13 carcinomas sebáceos. Foi evidenciada uma maior frequência de hiperplasias sebáceas (48,6%).

As lesões sebáceas estão geralmente localizadas na pele da face ou perto dela, mas podem estar presentes no couro cabeludo ou em qualquer outra parte do corpo. Acometem principalmente indivíduos de meia-idade e idosos, especialmente entre as 4ª e 5ª décadas de vida (BERKER et al. 1996, PONTI et al. 2007). No presente estudo, a maioria dos casos avaliados apresentou lesões localizadas na região facial

(68%) e uma média de idade mínima de 55 anos e máxima de 66 para pacientes do sexo masculino e mínima de 52 anos de idade e máxima de 82 anos para pacientes do sexo feminino.

Os carcinomas sebáceos são divididos em periocular e extra-ocular sendo que os carcinomas perioculares são considerados os mais comumente observados (NELSON et al. 1995 e IVAN et al. 2010). Dores et al. (2008), avaliando um grande número de casos de carcinomas sebáceos, não demonstraram diferenças entre a distribuição destes tumores (DORES 2008). No presente estudo foi observada uma predominância de tumores extra-oculares (69%). Dores et al. (2008) quando discutem esta discrepância de resultados observam que os estudos anteriores demonstrando uma maior incidência de tumores perioculares foram realizados em população asiática e que não existem estudos atuais demonstrando a incidência destes tumores. Além disso, os autores acreditam que há uma tendência de aumento nos tumores extra-oculares (DORES 2008). Em estudos com uma casuística menor estas diferenças podem ser explicadas pela forma que são recrutados os casos. Em alguns deles o recrutamento não foi realizado por informações gerais do banco de dados, mas sim, seguindo recrutamentos específicos para avaliação de lesões sebáceas com síndromes hereditárias.

Alguns estudos mostram associações entre lesões sebáceas e ceratoacantomas com síndromes de câncer hereditário, designado de síndrome de Muir-Torre (MTS), a qual é definida pela presença de lesões sebáceas ou ceratoacantomas e malignidades viscerais (MUIR 1967; TORRE 1968). Até o momento a grande maioria dos autores continua relacionando a MTS apenas como um fenótipo florido da Síndrome de Lynch e não relacionado com outras síndromes. Esta proposta torna

este assunto restrito e com a chance de se tornar pouco elucidativo. Pacientes portadores de mutação bialélica no gene *MYH* podem não ser contemplados em vários estudos. No presente estudo, foram observados 30,5% dos casos de lesões sebáceas e 17,6% de ceratocantomas demonstrando associação com câncer visceral, no entanto, apenas sete casos estavam associados à síndrome de Lynch.

Quanto à incidência das lesões sebáceas na MTS, as hiperplasias sebáceas representam 0 a 10% dos casos. Além das lesões sebáceas, os ceratoacantomas ocorrem em cerca de 20% dos casos de MTS (ABBAS et al. 2009). No presente estudo, 30% das hiperplasias sebáceas apresentaram câncer visceral associado e 6,6% dos pacientes apresentavam o diagnóstico clínico ou molecular de síndrome de Lynch. Segundo a literatura a hiperplasia sebácea não parece estar associada à MTS (FINAN e CONNOLLY 1984; CESINARO et al. 2007, SINGH et al. 2008; ORTA et al. 2009). ORTA et al. (2009) demonstraram que as hiperplasias sebáceas esporádicas ou associadas a outras lesões sebáceas que apresentaram perda da expressão das proteínas de reparo MSH2 e MSH6, não demonstraram alteração do reparo de DNA (ORTA et al. 2009). No presente estudo, dois casos de hiperplasia sebácea em pacientes com diagnóstico de síndrome de Lynch, não apresentaram perda da expressão de proteínas de reparo do DNA. No entanto, os dois pacientes apresentavam lesões sebáceas associadas, uma delas um adenoma sebáceo e outra um carcinoma sebáceo, sendo que ambas apresentaram perda da expressão de MSH2. Estes achados corroboram com a prerrogativa que as hiperplasias sebáceas não fazem parte da MTS considerada um fenótipo da MTS, mas sim uma lesão freqüente na população. No entanto, autores têm demonstrado a presença de hiperplasias sebáceas associadas á MTS causada por mutação no gene *MYH/MUTYH* (PONTI et al. 2007).

Os adenomas sebáceos são considerados marcadores específicos da MTS correspondendo de 25 a 66% dos casos (CESINARO et al. 2007; ABBAS et al. 2009). SHALIN et al. (2010) acreditam que nos relatórios anátomo-patológicos deveria vir descrita esta associação. Desta forma, os pacientes teriam uma avaliação mais apropriada. No nosso estudo, 69% dos adenomas sebáceos estavam associados a câncer visceral e 38% dos pacientes demonstravam o diagnóstico clínico ou molecular de síndrome de Lynch.

A incidência de epitelomas sebáceos associados á MTS é considerada de 31 a 86% (ABBAS et al. 2009). No presente estudo, 33,3% dos epitelomas sebáceos estavam associados a câncer visceral e 33,3% apresentavam o diagnóstico de síndrome de Lynch.

A incidência de carcinomas sebáceos associados á MTS é considerada de 66 a 100% (ABBAS et al. 2009). Em nosso estudo, 60% dos carcinomas sebáceos estavam associados a câncer visceral e 20% apresentavam o diagnóstico de síndrome de Lynch.

No presente estudo, foram observados seis pacientes com carcinoma sebáceo apresentando câncer visceral associado, sendo dois perioculares e quatro extra-oculares. Os dois carcinomas sebáceos perioculares apresentavam tumores viscerais sem o diagnóstico de síndrome de Lynch e dos quatro tumores extra-oculares, dois apresentavam o diagnóstico de síndrome de Lynch e um paciente não foi diagnosticado como S. Lynch, mas apresentou perda da expressão de proteína MSH2. Esse achado também foi observado por Ivan et al., que demonstraram que dos 17 casos de carcinomas extra-oculares, oito deles eram de pacientes com diagnóstico de MTS, com perda simultânea de expressão das proteínas de reparo do

DNA MSH2 e MSH6, provavelmente indicando que estes pacientes apresentam síndrome de Lynch. Os autores não evidenciaram a perda de expressão destas proteínas nos tumores perioculares. Assim sendo, os tumores extra-oculares parecem estar associados à síndrome de Lynch, enquanto que os tumores perioculares parecem estar associados à MTS que não apresentam alterações nos genes de reparo do DNA.

As lesões sebáceas podem preceder o câncer visceral em 22%, e em 6% podem ser diagnosticadas de forma simultânea à malignidade visceral e, mais freqüentemente, ocorrem após o diagnóstico do câncer visceral (56%) (ABBAS et al. 2009). No presente estudo, todos os pacientes apresentaram lesões sebáceas após o aparecimento do câncer visceral. No entanto, este estudo não foi desenhado para avaliar este evento, pois iniciamos apenas das lesões sebáceas e verificamos os pacientes com câncer visceral. Para responder esta pergunta teríamos também que avaliar pacientes portadores de câncer visceral se estes já apresentaram lesões sebáceas anteriores. Apenas um caso de adenoma sebáceo apresentou perda de expressão da proteína de reparo MSH2, mas não apresentava associação com câncer visceral. Este paciente deve ser avaliado mais profundamente, pois pode ser um portador de síndrome de Lynch e no futuro vir a apresentar uma malignidade visceral. Foi observado que 19,44% das lesões sebáceas demonstraram perda de expressão das proteínas de reparo do DNA, sendo que 85,71% correspondiam à perda de MSH2 e 14,29% à perda de MLH1. Esses dados são equivalentes aos apresentados na revisão de ABBAS (2009), mostrando que a perda da expressão da proteína MSH2 em lesões sebáceas varia de 60 a 90% dos casos e a perda de MLH1

pode ocorrer em 10%. Nenhum ceratoacantoma demonstrou perda de expressão dessas proteínas.

Pouco ainda é conhecido sobre alterações moleculares nas lesões sebáceas. Um melhor entendimento da carcinogênese destas lesões pode propiciar melhor identificação histológica, planejamento terapêutico e avaliação prognóstica. Até o momento, apenas um estudo avaliou o *status* de mutação do gene *BRAF* em lesões sebáceas hiperplásicas. Neste estudo, PONTI et al. (2007) avaliaram o status de mutação do gene *BRAF* nas lesões esporádicas e em lesões associadas à MAP. Eles demonstraram que as lesões esporádicas não apresentaram mutação nesse gene, entretanto, quando associada à MAP, foi observado mutação no gene *BRAF* em 100% dos casos (PONTI et al. 2007).

O oncogene *BRAF* codifica a proteína RAF tipo B, um dos elementos da via MAP- quinase, assim como o gene *KRAS* também pertencente à mesma via, ambos tem um papel chave na proliferação, diferenciação e apoptose celular (LODISH et al. 2005; WOJCIECHOWSKA e LEWINSKI 2006). Estudos demonstram a presença de mutações no gene *BRAF* em mais de 60% dos melanomas e em mais de 80% dos nevos benignos. Neoplasias colorretais benignas, carcinoma papilífero de tireóide e adenocarcinomas esporádicos colorretais também estão associados com a mutação no gene *BRAF*, enquanto vários adenocarcinomas colorretais associados à síndrome de Lynch apresentam mutação no gene *KRAS*. As mutações de *BRAF* e *KRAS* são consideradas excludentes nos adenocarcinomas colorretais (NAGASAKA et al. 2008).

No presente estudo, foram observadas 13,56% de mutação do gene *KRAS* em lesões sebáceas e 25% nos ceratoacantomas. O gene *BRAF* esteve mutado em 8% das

lesões sebáceas e 5,5% dos ceratoacantomas. Foram observados dois casos com diagnóstico de síndrome de Lynch e mutação do gene *BRAF*. Foi observado apenas um caso com mutação do gene *KRAS* em um paciente portador de síndrome de Lynch. Os resultados são contrários aos encontrados na literatura relacionados ao CCR em pacientes portadores de síndrome de Lynch. Nos tumores de cólon de pacientes portadores de síndrome de Lynch a presença de mutação do gene *BRAF* não é observada, no entanto, mutações no gene *KRAS* são freqüentes (NAGASAKA et al. 2008).

No presente estudo foram observadas dez de 42 amostras (23,8%) com mutação do gene *KRAS* em ceratoacantomas, no entanto, o gene *BRAF* esteve mutado em apenas duas amostras (4,7%).

Os resultados demonstram que a via MAPquinase parece estar relacionada a um pequeno número de lesões sebáceas e não parece apresentar um papel na progressão destas lesões. No entanto, mutações no gene *KRAS* parecem ter um papel mais freqüente em ceratoacantomas. Além disso, outra conclusão pode ser hipotetizada neste estudo. A MTS não deve ser considerada apenas um fenótipo florido da síndrome de Lynch, mas mutações germinativas em outros genes devem estar relacionadas com a associação entre lesões sebáceas e tumores viscerais. Assim sendo, as lesões sebáceas devem ser consideradas marcadores de síndromes de câncer hereditário e estudos mais aprofundados devem ser realizados para melhor compreensão destes mecanismos, pois uma aceitação sem críticas do papel inevitável dos genes de reparo relacionados á MTS pode impedir novos entendimentos e uma melhor avaliação de risco de novas neoplasias nestes pacientes.

8 CONCLUSÃO

- Mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* foram pouco freqüentes nas lesões sebáceas, no entanto, mutações no gene *KRAS* demonstraram um papel mais presente nos ceratoacantomas.
- Não houve concordância com a literatura, pois os adenomas e carcinomas de pacientes portadores de síndrome de Lynch não demonstram mutação do gene *BRAF*.
- As hiperplasias sebáceas foram as lesões mais freqüentemente operadas no Hospital A C Camargo entre 1976 e 2009.
- Houve uma alta incidência de tumores viscerais associados a lesões sebáceas (37,29%) e ceratoacantomas (17,6%).
- 19,44% das lesões sebáceas associadas à MTS apresentaram um fenótipo da síndrome de Lynch.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas O, Mahalingam M. Cutaneous sebaceous neoplasms as markers of Muir-Torre syndrome: a diagnostic algorithm. **J Cutan Pathol** 2009; 36:613-19.

Ahmed AR. Multiple keratoacanthoma. **Int J Dermatol** 1980; 19: 496-9.

Altassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T: A mutations in colorectal tumors. **Nat Genet** 2002; 30:227–32.

Avruch J, et al. Ras activation of the raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the mapkinase cascade. *Recent Progrm Horm, Res* 2001; 56: 127-155.

Bayer-Garner IB, Givens V, Smoller B. Immunohistochemical staining for androgen receptors; a sensitive marker of sebaceous differentiation. **Am J Dermatopathol** 1999; 21:426-31.

Batistatou A, Panelos J, Zioga A, Charalabopoulos KA. Ectopic modified sebaceous glands in human penis. **Int surg Pathol** 2006; 14:355-6.

Brennan D, Mahoney MG. Increased expression of Dsg2 in malignant skin carcinomas: a tissue-microarray based study. **Cell Adh Migr** 2009; 3:148-54.

Berker DA, Taylor AE, Quinn AG, Simpson NB. Sebaceous hyperplasia in organ transplant recipients: shared aspects of hyperplastic and dysplastic processes? **J Am Acad Dermatol** 1996; 35:696-9.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A national Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:5248-57.

Calder KB, Khalil FK, Schlauder S, Cualing HD, Morgan MB. Immunohistochemical expression of survivin in cutaneous sebaceous lesions. **Am J Dermatopathol** 2008; 30:545-8.

Cesinaro AM, Ubiali A, Sighinolfi P, Trentini GP, Gentili F, Facchetti F. Mismatch repair proteins expressions and microsatellite instability in skin lesions with sebaceous differentiation: a study in different clinical subgroups with and without extracutaneous cancer. **Am J Dermatopathol** 2007; 29:351-58.

Chhiber V, Dresser K, Mahalingam M. MSH-6: extending the reliability of immunohistochemistry as a screening tool in Muir-Torre syndrome. **Mod Pathol** 2008; 21:159-64.

Church J, Fazio VW. Polipose adenomatosa familiar, síndrome de Gardner e síndrome de Turcot. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon reto e ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed Editora; 2004. p.609-19.

Cohen PR, Kohn SR, Davis DA, Kurzrock R. Muir-Torre syndrome. **Dermatol Clin** 1995; 13:79-89.

Cohen PR, Kohn SR, Kurzrock R. Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. **Am J Med** 1991; 90:606-13.

Danby FW. Why we have sebaceous glands. **J Am Acad Dermatol** 2005; 52:1071-2.

Dasgupta T, Wilson LD, Yu JB. A retrospective review of 1349 cases of sebaceous carcinoma. **Cancer** 2009; 115:158-65.

Dores GM, Curtis RE, Toro JR, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. Incidence of cutaneous sebaceous carcinoma and risk of associated neoplasm: insight into Muir-Torre syndrome. **Cancer** 2008; 113:3372-81.

Dowd MB, Kumar RJ, Sharma R, Murali R. Diagnosis and management of sebaceous carcinoma: an Australian experience. **ANZ J Surg** 2008; 78:158-63.

Eisen DB, Michael DJ. Sebaceous lesions and their associated syndromes: Part I. **J Am Acad Dermatol** 2009; 61:549-60.

Eisen DB, Michael DJ. Sebaceous lesions and their associated syndromes: Part II. **J Am Acad Dermatol** 2009; 61:563-78.

Farmer E, Hood A. **Pathology of the skin.** 2nd ed. New York; McGraw-Hill; 2004; Neoplasms with sebaceous differentiation; p.1035-57.

Ferguson JW, Glary CP, Mac Alister AD. Sebaceous cell adenoma rare intraoral occurrence of a tumor which is a frequent marker of Torre' syndrome. **Pathology** 1987; 19:204-208.

Finan MC, Connolly SM. Sebaceous gland tumors and systemic disease: a clinicopathologic analysis. **Medicine (Baltimore)** 1984; 63:232-42.

Garrington T, Johnson G. Organization and regulation of mitogen-activated protein-kinase signaling pathways. **Curr Opin Cell Biol** 1999; 11:211-218.

Hall NR, Williams AT, Murday VA, Newton JA, Bishop TD. Muir-Torre syndrome: a variant of the cancer family syndrome. **J Med Genet** 1994; 31: 627-631.

Halsey MA, Calder KB, Mathew R, Schlauders, Morgan MB. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) in sebaceous neoplasms. **J Cutan Pathol** 2010;37:446-51.

Ivan D, Prieto VG, Esmali B, Wistuba II, Tang X, Lazar A. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in periocular and extraocular sebaceous carcinomas. **J Cutan Pathol** 2010; 37:231-236.

Jakobies FA. Sebaceous adenoma of the eyelid and visceral malignancy. **Am J Ophthalmol** 1974; 78:952-60.

Jhappan C, Takayama H, Dickson RB, Merlino G. Transgenic mice provide genetic evidence that transforming growth factor alpha promotes skin tumorigenesis via H-ras-dependent and H-ras-independent pathways. **Cell Growth Differ** 1994; 5:385-94.

Kazakov DV, Kutzner H, Rutten A, Mukensnabl P, Michal M. Carcinoid-like pattern in sebaceous neoplasms: another distinctive, previously unrecognized pattern in extraocular sebaceous carcinoma and sebaceoma. **Am J Dermatopathol** 2005; 27:195-203.

Kazakov DV, Sima R, Vanecek T, Kutzner H, Palmedo G, Kacerovska D, Grossmann P, Michal M. Mutations in exon 3 of the CTNNB1 gene (beta-catenin gene) in cutaneous adnexal tumors. **Am J Dermatopathol** 2009; 31:248-55.

Kerkhoff E and Rapp U. The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. **Adv Enz Regul** 2001; 41: 261-267.

Kim SK, DO JE, Kang HY, Lee ES, Kim YC. Combination of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy with carbon dioxide laser for sebaceous hyperplasia. **J Am Acad Dermatol** 2007; 56:523-4.

Kiyosaki K, Nakada C, Hijiya N, et al. Analysis of p53 mutations and the expression of p53 and p21WAF1/CIP1 protein in 15 cases of sebaceous carcinoma of the eyelid. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2010; 51:7-11.

Kuznetsov SG, Haines DC, Martin BK, Sharan SK. Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. **Cancer Res** 2009; 69:863-72.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. Trad. de Maria da Conceição Zacarias et al. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. Neoplasia; 309-11.

Lazar AJ, Lyle S, Calonje E. Sebaceous neoplasia and Muir-Torre syndrome. **Curr Diagn Pathol** 2007; 13:301-19.

Lever W, Lever GS. **Histologia da pele**. São Paulo: Manole; 1991. Tumores com diferenciação sebácea; p.540-5.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, et al. **Biologia celular e molecular**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed. 2005. Neoplasias: oncogenes; p.938-54.

Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Chandler IP, Houlston RS. Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation. **J Clin Oncol** 2009; 27:3975-80.

Lynch HT, Shaw TG, Lynch JF, Grady WM. Histórico do câncer colorretal hereditário sem polipose: síndrome de Lynch. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon reto e ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmedd Editora; 2004. p.575-93.

Machado Filho CDA. Tumores cutâneos benignos. In: Cucé LC, Neto CF, editores. **Manual de dermatologia**. 2 ed. Barueri: Atheneu; 2001. p.401-40.

Mangold E, Pagenstecher C, Leister M, et al. A genotype correlation in HNPCC: strong predominance of MSH2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. **J Med Genet** 2004; 41:567-72.

Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. **Am J Surg Pathol** 1999; 23:1248-55.

Misago N, Mihara I, Ansai S, Narisawa Y. Sebaceoma and related neoplasms with sebaceous differentiation: a clinicopathologic study of 30 cases. **Am J Dermatopathol** 2002; 24:294-304.

Misago N, Suse T, Uemura T, Narisawa Y. Basal cell carcinoma with sebaceous differentiation. **Am J Dermatopathol** 2004; 26:298-303.

Muir EG, Yates Bell AJ, Barlow KA. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum and larynx associated with keratoacanthomas of the face. **Br J Surg** 1967; 54:191-5

Nagasaka T, Minoru K, Kloor M., et al. Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the Methilator phenotype in color cancer. **Gastroenterology** 2008; 134: 1950-1960.

Nelson BR, Hamlet KR, Gillard M, Railan D, Johnson TM. Sebaceous carcinoma. **J Am Acad Dermatol** 1995; 33:1-15.

Nielsen TA, Maia-Cohen S, Hessel AB, Xie DL, Pellegrini AE. Sebaceous neoplasms with reticulated and cribiform features: a rare variant of sebaceoma. **J Cutan Pathol** 1998; 25:233-35.

Orta L, Klimstra DS, Qin J, et al. Towards identification of hereditary of DNA mismatch repair deficiency: Sebaceous neoplasm warrants routine immunohistochemical screening regardless of patient's age or other clinical characteristics. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:934-44.

Pereira PR, Odashiro AN, Rodrigues-Reyers AA, Correa ZM, Souza Filho JP, Burnier MN. Histopathological review of sebaceous carcinoma of the eyelid. **J Cutan Pathol** 2005; 32: 496-501.

Pincelli C, Marconi A. Keratinocyte stem cells: friends and foes. **J Cell Physiol** 2010 Jun 21.

Ponti G, Leon MP, Maffei S et al. Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre Syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutation. **Clin Genet** 2005; 68:442-7.

Ponti G, Leon MP. Muir – Torre Syndrome. **Lancet Oncol** 2005; 6:980-87.

Ponti G, Venesio T, Losi L et al. BRAF Mutations in multiple sebaceous hyperplasias of patients belonging to MYH: associated polyposis pedigrees. **J Invest Dermatol** 2007; 127:1387-91.

Prioleau PG, Santa Cruz DJ. Sebaceous gland neoplasia. **J Cutan Pathol** 1984; 11: 396-414.

Rank BK, Dixon PL. Another look at keratoacanthoma. **Aust N Z J Surg** 1979; 49:654-8.

Rao NA, Hidayat AA, McLean IW, Zimmerman LE. Sebaceous carcinomas of the ocular adnexa: a clinicopathologic study of 104 cases, with five-years follow up data. **Hum Pathol** 1982; 13:113-22.

Reiffers J, Laugier P, Hunziker N. Hyperplasies sebaceées, kerato-acanthomes, epitheliomas du visage et cancer du colon. **Dermatologica** 1976; 153:23-33.

Rulon DB, Helwig EB. Cutaneous sebaceousneoplasms. **Cancer** 1974; 33:82-102.

Rulon DB, Helwig EB. Multiple sebaceous neoplasms of the skin: an association with multiple visceral carcinomas, especially of the colon. **Am J Clin Pathol** 1973; 60:745-53.

Schubberts S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7(4) 295-308.

Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. **J Am Acad Dermatol** 1995; 33:90-104.

Schwartz RA. Keratoacanthoma. **J Am Acad Dermatol** 1994; 30:1-19.

Sellheyer K, Krahl D. Blimp-1: a marker of terminal differentiation but not of sebocytic progenitor cells. **J Cutan Pathol** 2010; 37:362-70.

Shalin SC, Lyle S, Calonje E, Lazar AJF. Sebaceous neoplasia and Muir-Torre syndrome: important connections with clinical implications. **Histopathology** 2010; 56:133-47.

Singh RS, Grayson W, Redston M, et al. Site and tumor type predicts DNA mismatch repair status in cutaneous sebaceous neoplasia. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:936-42.

Song A, Carter KD, Syed NA, Song J, Nerad JA. Sebaceous cell carcinoma of the ocular adnexa: clinical presentations, histopathology, and outcomes. **Ophthalm Plast. Reconstr Surg** 2008; 24:194-200.

Suk JD, Park WS, Kim DK. Low rates of somatic p53 mutations in keratoacanthomas. **J Dermatol Sci** 2009; 53:72-3.

Tataroglu C, Karabacak T, Apa DD. Beta-catenin and CD44 expression in eratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. **J Dermatol Sci** 2009; 53:72-3.

Takeda H, Lyle S, Lazar AJ et al. Human sebaceous tumors harbor inactivating mutation in LEF 1. **Nat Med** 2006; 12: 395-397.

Thirlwel C, Howarth KM, Segditsas S, et al. Investigation of pathogenic mechanisms in multiple colorectal adenoma patients without germline APC or MYH/MUTYH mutations. **Br J Cancer** 2007; 96:1729-34

Torre D. Multiple sebaceous neoplasms tumors. **Arch Dermatol** 1968; 98:549-531.

Troy JL, Ackerman AB. Sebaceoma. A distinctive benign neoplasm of adnexal epithelium differentiating toward sebaceous cells. **Am J Dermatopathol** 1984; 6:7-13.

Wang WP, Wang Ws, Tsai YC. Multiple tiny ectopic sebaceous glands discovered throughout entire esophageal tract. **Dig Dis Sci** 2009; 54:2754-7

Walder BK, Robertson MR, Jeremy D. Skin cancer and immunosuppression. **Lancet** 1971; 2:1281-83.

Wick MR, Goellner JR, Wolfe JT 3rd, Su WP. Adnexal carcinomas of the skin. II. Extraocular sebaceous carcinomas. **Cancer** 1985; 56:1163-72.

Wojciechowska K., Lewinski A. BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma. **Endocr Regul** 2006; 40:129-38.

Yanaba K, Nakagawa H, Takeda Y, Koyama N, Sugano K.. Muir-Torre Syndrome caused by partial duplication of MSH2 gene by Alu-mediated nonhomologous recombination. **Br J Dermatol** 2008; 158:150-6.

Zinser GM, Sundberg J, Welsh JE. Vitamin D3 receptor ablation sensitizes skin to chemically induced Tumorigenesis. **Carcinogenesis** 2002; 23:2103-9.

Zouboulis CC, Baron JM, Bohm M et al. Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. **Exp Dermatol** 2008; 17:542-51.

Zouboulis CC, Boschnakow A. Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland. **Clin Exp Dermatol** 2001; 26:600-7.

Anexo 1 - Protocolo de coloração de HE e microdissecção

A) Coloração:

- 1) Xilol 2'
- 2) Xilol 2'
- 3) Etanol 100% 2'
- 4) Etanol 95% 1'
- 5) Etanol 75% 30''
- 6) H₂O DEPEC 30''
- 7) Hematoxilina 1'
- 8) Reagente Blue 30''
- 9) Eosina Y 30''
- 10) Etanol 75% 30''
- 11) Etanol 95% 30''
- 12) Etanol 100% 30''
- 13) Xilol 5'
- 14) Secar por 5'

B) Microdissecção:

Técnica de Scrape – microdissecção manual

A realização da microdissecção manual iniciou-se com o processo de desparafinização das lâminas para facilitar a lise das células, pois a parafina dificulta esse processo.

- A) Protocolo de Desparafinização
 1. Banho de Xilol por 5 minutos
 2. Banho de Xilol por 5 minutos
 3. Banho de Xilol por 5 minutos
 4. Banho de álcool absoluto por 5 minutos
 5. Banho de álcool absoluto por 5 minutos

Após a secagem, foi realizada a macrodissecção manual usando um bisturi para cada caso tendo a lâmina marcada como molde. O conteúdo de cada lesão foi

colocado em um tubo de 1,5 ml e a partir dessa etapa seguimos o protocolo da Qiagen para a extração de DNA.

Técnica de captura a laser (LCM)

- ✓ Realizada por um patologista (RAC)
- ✓ Microdissecar à laser (spot sizer 7,5)
- ✓ Fires de 2.000 á 3.000.
- ✓ Acoplar bem o cap contendo as células capturadas em um tubo **Safe Lock** de 0,5
- ✓ Adicionar 65µl de tampão de extração (Anexo I).
- ✓ Deixar em over night em estufa à 42°C.
- ✓ Seguir para o processo de extração de DNA.



Anexo 2 - Extração de DNA (KIT QIAGEN)

Protocolo de Extração

1. Transferir a amostra da lesão em um tubo de 1,5ml
2. Imediatamente adicionar 90µl do buffer ATL em temperatura ambiente
3. Adicionar 20 µl. da proteinase K e dar um vórtex por 15 segundos
4. Deixar o tubo no termomix a 56° - 450 rpm overnight.
5. Adicionar 110 µl de buffer AL – e vórtex por 15 segundos.
6. Adicionar 110 µl etanol 100%, vórtex por 5 segundos e incubar em temperatura ambiente por mais 5 minutos.
7. Remover o conteúdo do tubo de 1,5 ml
8. Colocar cuidadosamente na coluna MinElute Qiagem. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar o collection tubo.
9. Cuidadosamente, abrir a coluna MinElute Qiagem e adicionae 500 µl Buffer AW1. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar o collection tubo.
10. Cuidadosamente, abrir a coluna MinElute Qiagem e adicionae 500 µl Buffer AW2. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar o collection tubo.
11. Cuidadosamente, abrir a coluna MinElute Qiagem e adicionae 500 µl de etanol 70%. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Descartar o collection tubo.
12. Centrifugar a 20,000 x g (14000 rpm) para secar a membrana completamente. Descartar o collection tubo.
13. Colocar a coluna MinElute Qiagem num tubo de 1,5ml. Adicionar 40 µl de água sigma ou miliq.
14. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 20,000 x g (14000 rpm) por 2 minutos.
15. O DNA extraído foi quantificado utilizando-se 1µl de DNA no espectofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE).

Anexo 3 - Protocolo de Imunoistoquímica

Os cortes histológicos presentes nas lâminas foram submetidos ao seguinte protocolo para ambos anticorpos:

1) Desparafinização das lâminas:

Desparafinização dos cortes de 3 µm de espessura, do material incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas e deixadas por 24 horas em estufa 60°C:

- a. Xilol a 60°C por 20 minutos
- b. Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos
- c. Etanol 100% 30 segundos
- d. Etanol 95% 30 segundos
- e. Etanol 70% 30 segundos
- f. Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

2) Recuperação antigênica

Panela de Pressão e Tampão citrato pH 6,0

- a. Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) destampada.
- b. Mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.
- c. Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal.
- d. Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total.
- e. Destampar a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada

3) Bloqueio da peroxidase endógena

- a. Incubar as amostras em H₂O₂ 3% (água oxigenada 10 vol) por 4 trocas de 5 minutos cada.
- b. Lavar em água corrente e destilada.
- c. Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

- d. Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme Tabela 10, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

- f. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

4) Sistemas de amplificação

- a. Incubar por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).
- b. Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
- c. Incubar com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C.
- d. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

5) Revelação com cromógeno

- a. Incubar as lâminas em solução substrato: 100 mg% 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H_2O_2 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.
- b. Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.
- c. Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.

6) Contra coloração

- a. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
- b. Lavar bem em água corrente e destilada
- c. Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

7) Desidratação e montagem das lâminas

- a. Etanol 80%, 30 segundos
- b. Etanol 95%, 30 segundos
- c. Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada

- d. Xilol 4 vezes, 30 segundos cada
- e. Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha)

Soluções para imunoistoquímica

1) Tampão citrato 10 mM pH 6,0

- a. 12,6 g de ácido cítrico
- b. água destilada q.s.p. 6,0 L
- c. corrigir o pH com NaOH 2N

2) Tampão Tris-EDTA pH 9,0

- a. 0,372 g de EDTA
- b. 1,21 g de Tris
- c. água destilada q.s.p. 1,0 L
- d. corrigir o pH com NaOH 2N

3) Tampão PBS 0,01 M pH 7,4 20X (concentrado)

- a. 160 g de NaCl
- b. 27,31 g de fosfato de sódio dibásico
- c. 4,86 g de fosfato de sódio monobásico
- d. água destilada q.s.p. 1,0 L

Anexo 4 - Resultado da avaliação de mutação de *BRAF* e *KRAS* pelo sequenciamento Sanger.

	Sexo	ID	Lesão	LOCAL	Ca visceral	MSH2	MLH1	BRAF	<i>KRAS</i>		Lynch
									12	13	
1	M	58	CE	Extra-facial	IG	0	0	GT/AG	WT	WT	NÃO
2	M	65	AS	Extra-facial	Parótida	0	0	WT	WT	WT	NÃO
3	M	45	CS	Ocular	IG	0	0	WT	WT	WT	NÃO
4	M	62	CE	Facial	IG	0	0	NA	GG/AT	GG/AC	NÃO
5	M	44	CE	Facial	Não	0	0	WT	GG/AT	WT	NÃO
6	F	62	CE	Extrafacial	Não	0	0	GT/AG	WT	WT	NÃO
8	F	63	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
9	F	84	CE	Facial	IG	0	0	NA	NA	NA	NÃO
10	F	75	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
11	F	78	AS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
12	M	68	CE	Facial	Não	0	0	NA	WT	WT	NÃO
13	F	65	HS	Facial	Parótida	0	0	WT	WT	WT	NÃO
14	F	53	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
15	F	64	CE	Facial	Não	0	0	WT	WT	GG/AC	NÃO
16	F	63	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
17	M	69	CE		IG	0	0	WT	WT	WT	NI
18	F	66	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
19	M	65	CS	Extra-ocular	Não	1	0	WT	WT	WT	Provável
20	F	52	CS	Extra-ocular	Intestino	1	0	GT/AG	WT	WT	SIM
21*	M	51	HS	Facial	Intestino	0	0	WT	WT	WT	SIM
24*	M	51	AS	Facial	Intestino	1	0	WT	WT	WT	SIM
25	F	58	CE	Extra-Facial	Não	0	0	NA	WT	WT	NÃO
26	F	72	CE	Extra-Facial	Mama	0	0	NA	WT	WT	NÃO
27	F	55	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	GA/GT	WT	NÃO
28	M	67	CS	Extra-ocular	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
29	M	46	CS	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
30	F	54	CS	Extra-facial	INTESTINO	1	0	WT	WT	WT	Provável
31**	F	52	CS	Extra-facial	Intestino/Endométrio	1	0	WT	WT	WT	SIM
32	M	53	AS	Facial	Intestino	1	0	WT	NA	NA	SIM
33	F	64	CE	Extra-Facial	IG	0	0	WT	WT	WT	NI
34	M	73	CE	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
35	M	74	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
36	F	82	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	NA	NA	NÃO
37	F	80	CE	Extra-facial	Linfoma não hodgkin	0	0	WT	WT	WT	NÃO
38	M	63	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
39	F	68	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
40	M	73	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	GG/AT	WT	NÃO
42	M	87	CE	Extra-Facial	Parótida	0	0	WT	GG/AT	GG/AC	NÃO
44	M	59	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
45	M	60	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	GG/AT	GG/AC	NÃO
46	M	54	CE	Extra-facial	Não	0	0	NA	GG/AT	WT	NÃO
47	M	70	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
48	M	65	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	GG/AT	GG/AC	NÃO
50	M	70	HS	Facial	Bexiga	0	0	WT	GG/AT	WT	NÃO
51***	M	43	AS	Extra-Facial	Estômago	1	0	WT	GG/AT	WT	SIM
52	F	62	HS	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO

53	F	80	CE	Extra-facial	Endométrio	0	0	WT	WT	WT	NÃO
54;55;56	M	73	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	GG/AC	NÃO
57	M	73	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
58	M	54	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
59	F	45	CE	Extra-facial	Não	0	0	WT	WT	GG/AC	NÃO
60	M	62	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
61	F	72	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
62	F	86	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
63	M	28	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
64;65	M	72	HS	Facial	Tiróide	0	NA	WT	WT	WT	NÃO
66	M	75	HS	Facial	Tiróide	0	0	WT	WT	WT	NÃO
67	M	88	HS	Facial	Estômago	0	0	WT	WT	WT	NÃO
68	M	29	HS	Facial	IG	0	0	WT	WT	WT	NÃO
69	M	68	HS	Facial	Não	0	0	WT	NA	NA	NÃO
70	F	48	CE	Extra-Facial	Tireóide	0	0	WT	WT	WT	NÃO
71	F	51	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
72	M	66	CE	Facial	Não	0	0	NA	WT	WT	NÃO
73	F	55	CE	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
74;75	M	39	HS	Facial	Próstata/Testículo	0	0	WT	WT	GG/AC	NÃO
76	F	79	AS	Facial	Mama	1	0	WT	WT	WT	Provável
77	F	43	HS	Facial	IG	0	0	WT	WT	WT	NÃO
78	M	76	CS	Ocular	Parótida	0	0	WT	WT	GG/TT	NÃO
79	M	77	CS	Ocular	Parótida	0	0	WT	WT	WT	NÃO
80	F	24	CE	Extra-facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
81	F	62	CE	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
82	M	73	AS	Extra-Facial	Não	0	0	GT/AG	NA	NA	NÃO
82B	M	73	ES	Extra-Facial	Não	0	0	GT/AG	GG/AT	GG/AC	NÃO
83	F	80	CE	Extra-facial	IG	0	0	NR	NR	NR	NI
84	M	47	CE	Extra-facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
86	F	77	CE	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
87	F	90	CE	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
88	F	58	CE	Extra-facial	Intestino	0	0	NR	NR	NR	NÃO
89	F	57	CE	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
91	M	49	CS	Ocular	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
92****	M	65	AS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
92****	M	65	ES	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
93	M	66	CE	Facial	IG	0	0	NR	NR	NR	NI
94*	M	51	ES	Facial	Intestino	1	0	WT	NA	NA	SIM
95	M	61	AS	Facial	Não	0	0	NA	NA	NA	NÃO
96	M	73	CE	Extra-facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
97	M	95	CE	Extra-Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
98	F	73	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
99	F	62	CE	Extra-Facial	Mama	0	0	NR	NR	NR	NÃO
100	F	54	CE	Extra-Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
101**	F	52	HS	Facial	Intestino/Endométrio	0	0	NR	NR	NR	SIM
102***	M	46	ES	Facial	Estômago	1	0	WT	WT	WT	SIM
103	F	77	CE	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
104	F	68	CE	Extra-Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
105	F	79	CE	Extra-facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
106	M	43	HS	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
107	M	55	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
108	F	69	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
109	M	41	CE	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO

110	F	34	HS	Facial	IG	0	0	NR	NR	NR	NI
111	F	67	CE	Extra-Facial	Cólon	0	0	WT	WT	WT	NÃO
112	F	86	CE	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
113	F	?	CS	Facial	IG	0	0	WT	WT	WT	NÃO
114	M	58	CE	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
131	F	63	AS	Facial	Intestino	1	0	WT	WT	WT	Provável
132	M	41	AS	Facial	Não	1	0	WT	WT	WT	Provável
133	M	76	ES	Facial	IG	0	0	WT	WT	WT	NI
134	M		AS		IG	0	1	WT	NA	WT	Provável
135	M	73	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
136	M	43	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
137	F	58	HS	Facial	Tiróide	0	0	WT	WT	WT	NÃO
141	F	40	CS	Extra-ocular	IG	0	1	WT	WT	GAC	Provável
142	M	35	HS	Facial	IG	0	0	WT	WT	WT	NI
143	M	7	AS	Facial	IG	0	0	WT	WT	GG/AC	NI
145	M	77	ES	Extra-Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
146	F	56	HS	Facial	Tiróide	0	0	NR	NR	NR	NÃO
147	F	63	HS	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
148	F	77	HS	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
149	F	87	HS	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
150	F	61	HS	Facial	Não	0	0	NR	NR	NR	NÃO
151	M	46	HS	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO
152	F	60	HS	Facial	IG	0	0	WT	WT	WT	NI
153	M	55	CE	Facial	Parótida	0	0	WT	WT	WT	NÃO
156	F	60	AS	Facial	Intestino/endométrio/ Gástrico	1	0	GT/AG	WT	WT	SIM
157	F	?	ES	Facial	IG	0	0	GT/AG	WT	WT	NI
159	F	51	AS	Facial	Intestino	1	0	WT	WT	WT	SIM
160	M	78	AS	Facial	Intestino	0	0	WT	WT	WT	NÃO
161	M	77	CS	Facial	Orofaringe	0	0	WT	WT	WT	NÃO
162	F	82	ES	Facial	Não	0	0	WT	WT	WT	NÃO

*mesmo paciente; ** mesmo paciente, *** mesmo paciente, **** mesmo paciente/ 0 : positivo, 1: negativo/ HS: hiperplasia sebácea/ AS: adenoma sebáceo/ ES: epiteloma sebáceo/ CS: carcinoma sebáceo/ CE: ceratoacantoma/ WT: selvagem (ausência de mutação)/ NR: não realizado seqüenciamento/NI: Não informado/ IG: Sem informação do prontuário.