



Genes e Câncer

Alguns eventos moleculares envolvidos na formação de um tumor

O câncer como uma doença genética

O câncer é a segunda causa de morte por doença no Brasil. O Instituto Nacional de Câncer, do Ministério da Saúde, estima que, apenas no ano de 2002, serão registrados 337.535 casos novos e 122.600 óbitos por câncer no Brasil e calcula-se que o principal câncer a acometer a população brasileira será o câncer de pele não-melanoma (62.190 casos), seguido pelas neoplasias malignas da mama feminina (36.090 casos), próstata (25.600 casos), pulmão (21.425 casos) e estômago (20.420 casos) (Ministério da Saúde, 1997).

Pode parecer paradoxal, mas uma das causas da grande incidência do câncer é o aumento da expectativa de vida. Ao longo da sua existência, as células humanas são expostas a agentes mutagênicos e sofrem erros de duplicação, resultando em alterações sutis e progressivas na sequência do DNA. Quanto maior o número de divisões da célula, maiores as chances de ocorrência de alterações no seu DNA. Eventualmente, uma dessas mutações no DNA (mutações somáticas) pode alterar a função de um gene crítico, fornecendo uma vantagem no crescimento e na multiplicação da célula na qual ocorreu a mutação, levando a uma expansão do clone derivado dessa célula. Essa multiplicação aumentada pode acelerar a taxa de mutações, que ocorrem em diversas regiões do genoma, levando, em última instância, ao surgimento de clones celulares capazes de invadir, proliferar e colonizar diversas regiões do corpo.

Theodor Boveri (1914) propôs um papel para as mutações somáticas no

desenvolvimento do câncer e, desde então, várias evidências experimentais confirmaram que o câncer ocorre devido a lesões no DNA. A hipótese de Boveri não foi aparentemente bem aceita na época, inicialmente devido à falta de evidências experimentais dos estudos de cariótipos de tumores humanos e animais e, posteriormente, devido à incerteza de as alterações no número de cromossomos nos tumores seriam uma causa ou um efeito do fenótipo neoplásico.

A idéia de que os tumores surgem de alterações genéticas somáticas surgiu no início do século XX (Tyzzer, 1916), mas, somente nos anos 70, com o desenvolvimento de metodologias adequadas, é que foi possível documentar a associação de mutações em genes específicos e a formação de tumores.

O início e a progressão de uma neoplasia humana é um processo de múltiplas etapas e envolve o acúmulo de alterações genéticas nas células somáticas. Essas alterações consistem na ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores tumorais, e parece que ambas as alterações são necessárias para um fenótipo neoplásico “completo”.

A base genética para o desenvolvimento do câncer tem sido confirmada através de estudos familiares, epidemiológicos e citogenéticos. Contudo, apenas nos últimos 25 anos é que surgiram evidências definitivas do câncer como uma doença genética. A visão atual é de que os tumores surgem através de um processo de múltiplas etapas no qual ocorrem as mutações herdadas (derivadas de células germinativas) e mutações somáticas de genes celulares, seguidas de uma

Elida P. Benquique Ojopi, PhD
Pós-doutoranda - LIM27 Instituto de
Psiquiatria - Faculdade de Medicina - USP
São Paulo.
elida@usp.br

Emmanuel Dias Neto, PhD
Pesquisador - LIM27 Instituto de Psiquiatria
Faculdade de Medicina - USP São Paulo.
emmanuel@usp.br

seleção clonal da progênie variante com propriedades de crescimento mais robustas e agressivas. A grande maioria das mutações que contribuem para o desenvolvimento e comportamento das células tumorais são somáticas, isto é, surgem durante o desenvolvimento do tumor e estão presentes apenas nas células neoplásicas do paciente. Uma pequena fração de todas as mutações que ocorrem no câncer pode ser constitucional, estando, dessa forma, presentes em todas as células somáticas dos indivíduos afetados; tais mutações podem não apenas predispor o indivíduo ao câncer, como também ser passadas para as gerações futuras.

Quatro funções tendem a ser reguladas inapropriadamente em uma neoplasia: primeiro, os controles normais da proliferação celular são ineficazes; segundo, o programa de diferenciação pode estar comprometido, ou seja, as células tumorais podem estar bloqueadas em um determinado estágio de diferenciação ou podem estar diferenciadas em um tipo celular inapropriado ou anormal. Terceiro, a organização cromossômica e genética pode estar desestabilizada tal o número de variantes celulares que surgem com frequência elevada. Algumas variantes podem aumentar a mobilidade ou a produção de enzimas que permitem a invasão e a metástase. E ainda, o programa de morte celular (apoptose), pode estar desregulado.

Uma análise no *Medline*, buscando trabalhos científicos que tenham a palavra “câncer” resulta em mais de 1 milhão e 400 mil artigos; assim, qualquer tentativa de revisão completa sobre esse tema seria frustrada.

Os genes mais frequentemente mutados no câncer

A maioria das alterações genéticas mais importantes no câncer ocorrem nos genes que controlam a proliferação celular (proto-oncogenes e genes supressores tumorais), resultando em um crescimento descontrolado característico da célula maligna. Além disso, há ainda o envolvimento de genes associados ao processo de reparo de danos no DNA, os quais, quando inativos, podem elevar a taxa de mutação das células, causando, eventualmente, a alteração de genes importantes na

carcinogênese.

Vários estudos têm demonstrado a importância de outras alterações, chamadas “epigenéticas”, as quais não afetam a sequência primária do DNA, mas desempenham um papel muito importante na tumorigênese (revisão em Plass e Soloway, 2002; Esteller e Herman, 2002), porém, os efeitos epigenéticos não serão abordados aqui.

Oncogenes

Os primeiros oncogenes foram descobertos através dos estudos com retrovírus, os quais, durante o curso da infecção, inserem seu DNA no genoma das células hospedeiras e essas o duplicam juntamente com o seu próprio DNA (Varmus 1982, 1988). A primeira demonstração de proto-oncogenes ativos em tumores humanos ocorreu através de uma técnica chamada de ‘transferência gênica’ ou ‘ensaio de transfecção’, quando foi possível verificar a capacidade do DNA de um tumor em transformar uma linhagem de células de camundongos chamada NIH 3T3 (Murray et al., 1981; Perucho et al., 1981).

Os oncogenes retrovirais são versões alteradas de proto-oncogenes celulares que foram incorporados no genoma retroviral através de recombinação com o DNA do hospedeiro, um processo conhecido como transdução retroviral (Varmus, 1989a). Essa descoberta ocorreu através dos estudos com o vírus do sarcoma de Rous, um retrovírus identificado em um sarcoma de galinha isolado por Payton Rous (1911). Essa observação forneceu um importante suporte para a hipótese de que o câncer pode ser atribuído a determinados elementos genéticos. Sessenta anos após o relato de Rous, foi identificada a região oncogênica do vírus do sarcoma de Rous; a caracterização e a clonagem de sequências transformantes demonstrou que a capacidade oncogênica do vírus era dependente do *v-src*, uma cópia transduzida e mutada do proto-oncogene celular *c-src*. Subseqüentemente, outros oncogenes de vírus de RNA causadores de tumores foram, de fato, caracterizados como genes celulares transduzidos (os proto-oncogenes) (Tabela 1).

Embora ainda não estejam totalmente definidos os mecanismos atra-

vés dos quais a maioria dos oncogenes virais causam a transformação neoplásica, parece que, em termos gerais, os oncogenes virais são versões alteradas dos proto-oncogenes celulares e/ou são expressos de forma anormal. Nos tumores humanos, as mutações somáticas geram alelos alterados dos proto-oncogenes com capacidade tumorigênica (Bishop, 1981).

No final dos anos 70, o DNA fragmentado de células tumorais humanas foi transferido, por transfecção, para fibroblastos de camundongo, não-neoplásicos, em cultura (NIH-3T3). O primeiro “gene transformante” recuperado de células de tumor humano através dessa técnica parecia ser uma forma mutante do proto-oncogene *H-ras*, já conhecido dos estudos com retrovírus (Parada et al., 1982). Experimentos similares identificaram outros oncogenes (Park, 1998), embora estes sejam apenas um grupo de alterações genéticas de ganho de função que ocorrem nas células tumorais. A técnica de transfecção de DNA ajudou a esclarecer a origem celular dos “oncogenes virais”. Esses foram previamente caracterizados como elementos genéticos específicos capazes de conferir propriedades tumorigênicas aos retrovírus [Bishop, 1989 (a); Varmus, 1989 (a)]. Além disso, a técnica de transfecção levou à identificação de genes celulares transformantes que não têm uma contraparte viral. Apesar da sua fonte original de identificação, genoma viral ou celular, esses elementos genéticos foram chamados de proto-oncogenes, em sua versão fisiológica normal, e oncogenes, quando alterados no câncer [Bishop, 1989(b); Varmus, 1989(b)].

Uma outra linha de evidência do papel da ativação de genes específicos no câncer surgiu com o desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico nos anos 70. Em alguns tumores foram observadas translocações envolvendo pontos de quebra consistentes e que envolviam ou estavam próximas a oncogenes já descritos – por exemplo, o *c-myc* no linfoma de Burkitt e o *c-abl*, na leucemia mieloide crônica (Rabbitts, 1994); em outros, foram encontradas regiões cromossômicas com amplificações consistentes (Brodeur e Hogarty, 1998). A maioria dos estudos citogenéticos ocor-

reram em tumores hematológicos, devido às dificuldades técnicas que envolvem a cultura e a análise cromossômica de tumores sólidos.

As translocações cromossômicas serviram como marcos para a descoberta de muitos oncogenes (Croce, 1987; Rowley, 1990). Muitos rearranjos cromossômicos consistentes foram encontrados em tumores hematológicos e sólidos e essas alterações incluem rearranjos cromossômicos, bem como ganhos e perdas de segmentos cromossômicos ou ainda de cromossomos inteiros. A primeira alteração cariotípica consistente identificada em uma neoplasia humana foi a presença de um cromossomo pequeno em células de pacientes com leucemia mielóide crônica (CML) (Nowell e Hungerford, 1960). Mais tarde, esse rearranjo foi identificado como sendo um cromossomo derivativo do cromossomo 22 e ficou conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph), devido à cidade onde ocorreu a descoberta. A aplicação das técnicas de bandeamento cromossômico, no início dos anos 70, possibilitou a caracterização citogenética precisa de muitas translocações em leucemias, linfomas e tumores sólidos (Nowell, 1994). O desenvolvimento subsequente das técnicas de biologia molecular tornou possível a identificação e caracterização dos proto-oncogenes que estavam nos pontos de quebra cromossômicos, ou próximo a estes, em várias neoplasias. Alguns desses proto-oncogenes, tais como *MYC* e *ABL1*, já haviam sido previamente identificados como oncogenes retrovirais.

O cromossomo Ph foi caracterizado como uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)], a qual dá origem a um gene quimérico. O oncogene *ABL1* é translocado do cromossomo 9 para o cromossomo 22, no *locus* do gene *BCR*. A proteína quimérica contém a região amino-terminal derivada do gene *BCR* e a região carboxi-terminal derivada do gene *ABL1* e, como conseqüência, a sua atividade catalítica é aumentada.

As alterações cromossômicas balanceadas são mais comuns em neoplasias hematológicas, particularmente entre as leucemias agudas, quando comparadas aos tumores sólidos, especialmente aqueles de origem epitelial. Por um lado, isso pode ocorrer

porque poucos tumores sólidos foram analisados citogeneticamente ou porque algumas alterações menores podem não ter sido identificadas. Mas por outro lado, é igualmente possível que as alterações balanceadas sejam mais frequentes em neoplasias malignas e tumores sólidos mesenquimais, refletindo, possivelmente, linhagens celulares diferentes em sua origem e/ou vantagem seletiva de tais alterações (Ponder, 2001).

Além das translocações cromossômicas, os estudos citogenéticos revelaram também a presença de amplificação gênica que pode ser visualizada na análise citogenética como pequenos corpúsculos duplos de cromatina extra-cromossômicos (*double minutes-dmins*) ou como regiões cromossômicas coradas homogeneamente [*homogeneously staining regions* (HSR)]. Se o número de cópias é baixo (5 a 10 cópias por célula) ou a unidade amplificada (*amplicon*) é pequena, ou ainda, se o cariótipo é extremamente complexo, a amplificação gênica pode não ser evidente através da análise citogenética convencional. Normalmente, parece que apenas um gene é alvo da amplificação, mas alguns amplicons podem conter dois ou mais genes que, teoricamente, poderiam conferir uma vantagem seletiva para as células tumorais.

O exemplo mais consistente, e um dos mais estudados, de amplificação gênica em tumores humanos é a amplificação do oncogene *MYC* em neuroblastomas; ocorre em 5-10% dos casos (revisão em George et al., 2001) e parece estar associada a um pior prognóstico independentemente do estágio tumoral. Embora ocorra em outros tumores, a amplificação gênica não pode ser considerada como um fator prognóstico independente. Ainda não sabemos se a amplificação de um oncogene é uma conseqüência da proliferação celular desregulada e resultante da instabilidade genética, ou se é um evento celular inicial e é a causa de um fenótipo clínico mais agressivo.

Já foram identificadas milhares de alterações cromossômicas em milhares de tumores e essas têm sido catalogadas por Mitelman em seis edições do *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer* (Mitelman, 1998). Adicionalmente, foi publicado um mapa

dos rearranjos cromossômicos recorrentes (Mitelman et al., 1997), o qual tem sido atualizado e está disponível em um *website* mantido pelo *National Cancer Institute* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CGAP/>) (Mitelman, 2002).

O uso de técnicas que combinam a citogenética clássica com a biologia molecular, como o FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) (Gall e Pardue, 1969), CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) (Kallioniemi et al., 1992), SKY (*Spectral Karyotyping*) (Schrock et al., 1996) e o M-FISH (*multicolor FISH*) (Speicher et al., 1996) tem possibilitado a identificação mais precisa dos rearranjos cromossômicos, o que certamente terá um maior impacto na identificação de genes novos associados ao câncer.

Os proto-oncogenes codificam proteínas envolvidas no controle do crescimento celular e uma alteração na sua estrutura e/ou expressão pode torná-los capazes de induzir o fenótipo neoplásico em células suscetíveis. Eles são altamente conservados durante a evolução e os seus produtos são reguladores importantes do crescimento e da diferenciação celulares em várias espécies, desde os eucariotes mais primitivos até os humanos. Os oncogenes podem ser classificados em pelo menos cinco grupos com base nas propriedades funcionais e bioquímicas das suas contrapartes normais: (1) fatores de crescimento, (2) receptores de fatores de crescimento, (3) transdutores de sinal, (4) fatores de transcrição e (5) outros, incluindo os reguladores de apoptose (revisão em Park, 1998). A tabela 1 lista exemplos de oncogenes de acordo com a sua categoria funcional.

A ativação dos oncogenes envolve a alteração genética dos proto-oncogenes e, como conseqüência, confere uma vantagem no crescimento das células. Atualmente, são conhecidos três mecanismos principais de ativação dos oncogenes nas neoplasias humanas: (1) mutação, (2) amplificação gênica e (3) rearranjos cromossômicos. Esses mecanismos resultam na alteração da estrutura do proto-oncogene ou em um aumento da sua expressão. Como o câncer é um processo de múltiplas

etapas, mais de um mecanismo frequentemente contribui para a gênese dos tumores humanos, alterando vários genes associados ao câncer. A expressão completa de um fenótipo neoplásico, incluindo a capacidade de formação de metástases, normalmente envolve uma combinação de ativação de proto-oncogenes e a inativação ou perda de genes supressores tumorais. Uma análise estatística da idade de incidência de tumores humanos sólidos indicou que cinco ou seis eventos mutacionais independentes podem contribuir para a formação do tumor (Peto, 1977). Em leucemias, parece que apenas três ou quatro eventos seriam necessários, presumivelmente envolvendo genes diferentes (Pierotti et al., 2000).

A descoberta dos oncogenes representou um grande aprimoramento na nossa compreensão da base genética e molecular do câncer. Os estudos sobre oncogenes forneceram um conhecimento importante sobre a regulação da proliferação celular normal, diferenciação e morte celular programada. Além disso, a identificação de alterações nos oncogenes tem fornecido ferramentas importantes para o diagnóstico molecular e monitoramento do câncer e, o mais importante, representam alvos potenciais para novos tipos de terapia. Um dos grandes objetivos atuais é o desenvolvimento de agentes quimio-terápicos desenvolvidos especificamente para ter certos oncogenes como alvo, eliminando as células tumorais sem causar danos às células normais.

Apesar da importância dos oncogenes na gênese de muitos tumores humanos diferentes, muitas das propriedades das células tumorais parecem estar atribuídas à inativação de genes celulares normais, os chamados genes supressores tumorais, os quais parecem regular a proliferação e o crescimento celular de forma negativa.

Genes supressores tumorais

Até a presente data, já foram identificados cerca de 30 genes supressores tumorais relacionados com o desenvolvimento do câncer. Da mesma forma que os oncogenes, os genes supressores tumorais parecem ter funções fisiológicas diversas, geralmente

relacionadas com o controle da proliferação celular, porém, eles são definidos como inativos nas células tumorais, enquanto os oncogenes apresentam mutações ativadoras.

Nas décadas de 50 e 60, as teorias sobre a gênese dos tumores eram dominadas pelas descobertas dos estudos com vírus, mostrando que, sob certas circunstâncias, poderiam produzir transformações morfológicas estáveis nas células em cultura e essas transformações seriam frequentemente seguidas pela aquisição da capacidade de crescer progressivamente em um hospedeiro compatível geneticamente. Já que a introdução de um vírus em uma célula adicionava informação genética nova, essas transformações induzidas por vírus levaram os pesquisadores da época a assumirem que a carcinogênese atuava de forma dominante, já que a aquisição de genes virais produzia alterações fenotípicas mesmo na presença de um grupo normal de genes (Ponder, 2001). Os estudos de transferência gênica causaram a impressão de que a carcinogênese ocorreria através de um mecanismo de ganho de função em um passo único.

Os estudos de Ephrussi et al. (1969) e Harris (1988) forneceram evidências de que a capacidade de uma célula formar um tumor é uma característica recessiva. Essa interpretação – de que a malignidade poderia ser suprimida nas células somáticas híbridas – foi suportada subsequentemente por estudos adicionais com células híbridas intra-específicas com camundongo, rato e hamster, bem como interespecíficas entre células tumorais de roedores e células normais humanas (Amundsen et al., 1998; Versteeg et al., 1998). Contudo, a instabilidade cariotípica entre as células híbridas roedor-humano, dificultou a análise dos cromossomos humanos envolvidos no processo de supressão. Stanbridge e colaboradores, estudando híbridos feitos por meio da fusão de linhagens celulares humanas tumorais a fibroblastos humanos normais (Stanbridge et al., 1982; Stanbridge e Cavenee, 1989), confirmaram que os híbridos que retinham ambos os grupos de cromossomos parentais eram suprimidos, com variantes tumorigênicas, surgindo raramente após perdas cromossômicas. Além

disso, eles demonstraram que a perda de cromossomos específicos, e não simplesmente a perda cromossômica em geral, estava relacionada com a reversão da malignidade. Essa poderia ser suprimida até mesmo na presença dos produtos de oncogenes ativados, tal como os genes da família RAS mutado (Geiser et al., 1986; Stanbridge e Cavenee, 1989).

A observação de que a perda de cromossomos específicos estava associada com a reversão do fenótipo maligno sugeriu que um único cromossomo (e talvez até um único gene) poderia ser suficiente para suprimir a malignidade. Para testar essa hipótese, foram transferidos cromossomos isolados das células normais para as células tumorais, e foi constatado que a transferência de um único cromossomo 11 para uma linhagem celular de carcinoma cervical (HeLa) poderia suprimir o fenótipo tumoral das células (Saxon et al., 1986). Da mesma forma, a transferência de um cromossomo 11 para uma linhagem celular do tumor de Wilms foi capaz de reverter o fenótipo maligno, enquanto a transferência de muitos outros cromossomos não teve efeito (Weissman et al., 1987). Muitos estudos demonstraram que a transferência de até mesmo fragmentos muito pequenos dos cromossomos podem suprimir as propriedades tumorais de certas linhagens celulares.

Concomitantemente aos experimentos iniciais de Harris e colaboradores, Knudson analisava a idade de incidência do retinoblastoma e propôs uma hipótese de que seriam necessários dois “passos” ou eventos mutagênicos para o desenvolvimento desse tumor (Knudson, 1971). O retinoblastoma é, na maioria dos casos, um tumor esporádico, mas algumas famílias o apresentam em uma forma autossômica dominante de herança. Knudson (1971) descreveu a distribuição de idade no diagnóstico dos casos herdados e esporádicos e observou que essa era consistente com o requerimento de um evento adicional na formação do tumor e esse evento ocorria com uma probabilidade constante no tempo. Nos casos esporádicos, a distribuição era mais complexa e consistente com a necessidade de dois eventos. A sua inferência foi que, nos dois casos, havia a necessidade de ocorrerem os

Tabela 1. Oncogenes

Oncogene	Cromossomo	Método de identificação	Tumor
Fatores de crescimento			
<i>v-sis</i>	22q12.3–13.1	Similaridade de seqüência	Glioma/Fibrosarcoma
<i>int2</i>	11q13	Inserção de provírus	Carcinoma mamário
<i>KS3</i>	11q13.3	Transfecção de DNA	Sarcoma de Kaposi
<i>HST</i>	11q13.3	Transfecção de DNA	Carcinoma gástrico
Receptores de fatores de crescimento			
EGFR	7p1.1–1.3	Amplificação de DNA	Carcinoma de células escamosas
<i>v-fms</i>	5q33–34 (<i>FMS</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>v-kit</i>	4q11–21 (<i>KIT</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>v-ros</i>	6q22 (<i>ROS</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>MET</i>	7p31	Transfecção de DNA	Linhagem celular de osteocarcinoma humano
<i>TRK</i>	1q32–41	Transfecção de DNA	Carcinomas de cólon/tireóide
<i>NEU</i>	17q11.2–12	Mutação em ponto/ Amplificação de DNA	Neuroblastoma/ Carcinoma mamário
<i>RET</i>	10q11.2	Transfecção de DNA	Carcinomas de tireóide
<i>Mas</i>	6q24–27	Transfecção de DNA	Carcinoma epidermóide
Transdução de sinal			
SRC	20p12–13	Similaridade viral	Carcinoma de cólon
<i>v-yes</i>	18q21–3 (<i>YES</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>v-fgr</i>	1p36.1–36.2 (<i>FGR</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>v-fes</i>	15q25–26 (<i>FES</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>ABL</i>	9q34.1	Translocação cromossômica	Leucemia mielóide crônica
<i>H-RAS</i>	11p15.5	Similaridade viral/ Transfecção de DNA	Carcinoma de cólon, pulmão, pâncreas
<i>K-RAS</i>	12p11.1–12.1	Similaridade viral/ Transfecção de DNA	Leucemia mielóide aguda, carcinoma de tireóide, melanoma
<i>N-RAS</i>	1p11–13	Transfecção de DNA	Melanoma
<i>gsp</i>	20	Sequenciamento de DNA	Adenomas de tireóide
<i>gip</i>	3	Sequenciamento de DNA	Carcinoma de ovário e de adrenal
<i>Dbl</i>	Xq27	Transfecção de DNA	Linfoma difuso de células B
<i>Vav</i>	19p13.2	Transfecção de DNA	Células hematopoiéticas
<i>v-mos</i>	8q11 (<i>MOS</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>v-raf</i>	3p25 (<i>RAF-1</i>)	Similaridade viral	Sarcoma
<i>pim-1</i>	6p21 (<i>PIM-1</i>)	Mutagênese	Linfoma de células T
<i>v-crk</i>	17p13 (<i>CRK</i>)	Similaridade viral	–
Fatores de transcrição			
<i>v-myc</i>	8q24.1 (<i>MYC</i>)	Similaridade viral	Carcinoma mielocitomatose
<i>N-MYC</i>	2p24	Amplificação de DNA	Neuroblastoma
<i>L-MYC</i>	1p32	Amplificação de DNA	Carcinoma de pulmão
<i>v-myb</i>	6q22–24	Similaridade viral	Mieloblastose
<i>v-fos</i>	14q21–22	Similaridade viral	Osteosarcoma
<i>v-jun</i>	p31–32	Similaridade viral	Sarcoma
<i>v-ski</i>	1q22–24	Similaridade viral	Carcinoma
<i>v-rel</i>	2p12–14	Similaridade viral	Leucemia linfática
<i>v-ets-1</i>	11p23–q24	Similaridade viral	Eritroblastose
<i>v-ets-2</i>	21q24.3	Similaridade viral	Eritroblastose
<i>v-erbA1</i>	17p11–21	Similaridade viral	Eritroblastose
<i>v-erbA2</i>	3p22–24.1	Similaridade viral	Eritroblastose
Outros			
<i>BCL2</i>	18q21.3	Translocação cromossômica	Linfoma de células B
<i>MDM2</i>	12q14	Amplificação de DNA	Sarcomas

Tabela adaptada de Pierotti et al., 2000

Tabela 2. Genes supressores tumorais

Gene	Síndrome de câncer hereditário associada	Tumores com mutações somáticas
RB1	Retinoblastoma familiar	Retinoblastoma, osteossarcoma, carcinoma mamário, próstata, bexiga, pâncreas, esôfago e outros.
TP53	Síndrome de Li-Fraumeni	Aproximadamente 50% de todos os tumores (raro em alguns tipos como carcinoma de próstata e neuroblastoma)
<i>*INK4a</i>		
<i>p16</i>	Melanoma familiar, carcinoma pancreático familiar	Aproximadamente 25-30% de muitos tipos diferentes de tumores (por exemplo, carcinoma de mama, pulmão, pâncreas, bexiga, etc)
<i>p19^{ARF}</i>	?Melanoma familiar?	Aproximadamente 15% de muitos tipos diferentes de tumores
APC	Polipose adenomatosa de cólon familiar, síndrome de Gardner, síndrome de Turcot	Tumores de cólon e reto
BRCA1	Câncer de mama e ovário hereditário	Tumores ovarianos (aproximadamente 10%); rara em carcinoma mamário
BRCA2	Câncer de mama (feminino e masculino), câncer de pâncreas?, outros?	Mutações raras em carcinoma pancreático, ?outros
WT-1	Síndrome **WAGR, síndrome de Denys-Drash	Tumor de Wilms
NF-1	Neurofibromatose tipo 1	Melanoma, neuroblastoma
NF-2	Neurofibromatose tipo 2	Schwannoma, meningioma, ependimoma
VHL	Síndrome de von-Hippel Lindau	Renal, hemangioblastoma
MEN-1	Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1	Adenomas de paratireóide e de glândula pituitária, tumores endócrinos do pâncreas
PTCH	Síndrome de Gorlin, síndrome do carcinoma de células basais hereditário	Carcinoma de célula basal de pele, meduloblastoma
PTEN/MMAC1	Síndrome de Cowden, síndrome de casos esporádicos de polipose juvenil	Glioma, carcinoma mamário, de próstata, carcinoma folicular da tireóide, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
DPC4	Síndrome de polipose juvenil familiar	Aproximadamente 50% dos tumores pancreáticos, 10-15% dos tumores de cólon e reto; raro em outros
E-CAD	Câncer gástrico familiar do tipo difuso, câncer de mama lobular	Tumores gástricos (do tipo difuso), carcinoma lobular mamário; raro em outros tipos
LKB1/STK1	Síndrome de Peutz-Jeghers	Mutação rara em tumores cólon-retais; desconhecida em outros
EXT1	Exostose hereditária múltipla	–
EXT2	Exostose hereditária múltipla	–
TSC1	Esclerose tuberosa	–
TSC2	Esclerose tuberosa	–
<i>hMSH2, bMLH1 hPMS1, hPMS2, bMSH6</i>	Câncer cólon-retal hereditário não-poliposo.	Tumores de cólon, reto, estômago e endométrio

* O gene INK4a codifica dois produtos protéicos distintos como resultado de *splicing* alternativo.

** Síndrome WAGR (Tumor de Wilms, aniridia, displasia genital e urinária, retardo mental).

Tabela adaptada de Fearon e Vogelstein, 2000

dois eventos na formação do tumor, porém, nos casos herdados, um dos eventos já estaria presente na linhagem germinativa. Comings (1973) sugeriu que os dois eventos poderiam afetar os dois alelos de um único gene, concluindo que o seu efeito seria recessivo. Subseqüentemente, em alguns casos herdados foi encontrada uma deleção no cromossomo 13 na linhagem germinativa (Orye et al., 1974), sugerindo que a perda de um gene naquela região poderia ser o primeiro evento, o que levou a estudos bioquímicos e moleculares demonstrando que o desenvolvimento do tumor requeria a perda de ambas as cópias daquela região do cromossomo 13 (Cavenee et al., 1983). Usando as deleções como indício, o gene *Rb* foi posteriormente clonado e mostrou-se mutado em ambas as cópias nos retinoblastomas. O gene *Rb* é, então, o protótipo de um grupo de genes chamados “genes supressores tumorais” (Weinberg, 1991), nos quais, ao contrário dos oncogenes, é necessário que ocorra a perda de função durante a tumorigênese. Posteriormente, diversos estudos de ligação e clonagem posicional em síndromes de câncer hereditários levaram à identificação de muitos genes supressores tumorais (revisão em Fearon, 2002).

Os genes supressores tumorais são caracterizados pelo fato de que as mutações presentes na linhagem germinativa e que inativam esses genes estão associadas com a predisposição ao câncer hereditário. O *link* entre mutação na linhagem germinativa e um risco elevado de desenvolvimento de tumores fornece uma forte evidência do papel desses genes na tumorigênese. Outras descobertas, tais como a demonstração de que tumores esporádicos apresentam perda de um alelo de um gene supressor tumoral acompanhada por mutação somática do alelo remanescente, evidencia que esses genes têm um papel muito mais abrangente do que apenas um gene de tumores hereditários.

A perda somática de um alelo de um gene supressor tumoral envolve freqüentemente a perda de material cromossômico, variando em extensão desde algumas centenas de bases, uma sub-banda ou até todo o cromossomo. Tais eventos são convenientemente chamados de ‘perda de heterozigose’

(*loss of heterozygosity* – LOH), a qual consiste na constatação, pela comparação de *loci* polimórficos do DNA extraído de um tecido normal e DNA de um tecido tumoral do mesmo indivíduo, de perda de material genético nas células tumorais. Essas regiões perdidas podem ser consideradas como possíveis portadoras de genes supressores tumorais. A análise de LOH já identificou um grande número de regiões cromossômicas com perdas em muitos tumores (Osborne e Hamsheer, 2000), mas o número de genes supressores tumorais que já foram identificados pelo critério de mutações somáticas no alelo remanescente é pequeno. Existem algumas explicações possíveis: a maioria das LOH é resultado da instabilidade genética; elas refletem haploinsuficiência (Faro et al., 1998); ou talvez, os critérios usados para a identificação de um gene supressor tumoral sejam muito exigentes.

Muitas regiões cromossômicas freqüentemente afetadas por LOH não apresentam até agora genes de predisposição ao câncer. Para outras regiões com LOH, embora se conheça um gene supressor tumoral envolvido em um dado tipo de tumor hereditário, raramente encontra-se mutações nesse gene nos casos de tumores esporádicos. Existem várias regiões cromossômicas afetadas por LOH em vários tumores e para as quais ainda não foi identificado um gene supressor tumoral (1p, 3p, 8p, 10q, 11p, 17q, 18q e 22q) (Fearon e Vogelstein, 2000). Na verdade, para caracterizar um gene como supressor tumoral, são necessários vários experimentos com linhagens celulares para comprovar que a ausência daquele gene é capaz de induzir a formação de um tumor.

Alguns genes supressores tumorais, tais como *TP53*, *APC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *WT1*, *NF1* e *NF2*, são mais conhecidos pelo fato de que mutações nesses genes na linhagem germinativa estão associadas com um aumento da predisposição ao câncer. Esses e outros genes supressores tumorais estão decritos na tabela 2. A associação entre mutação na linhagem germinativa e risco elevado de desenvolver câncer fornece evidências incontestáveis sobre o papel desses genes na tumorigênese. Outros achados, tais como a

demonstração de LOH em um gene supressor tumoral acompanhada por mutação somática do alelo remanescente nos cânceres esporádicos, conferem um papel mais amplo aos genes associados aos tumores hereditários. Embora os genes supressores tumorais listados na tabela 2 estejam definitivamente associados a síndromes de câncer hereditário, é possível que mutações em certos genes supressores tumorais na linhagem germinativa possam estar associadas a um risco mínimo de predisposição ao câncer. Tais genes poderiam estar freqüentemente inativos por mutações somáticas nas formas esporádicas de câncer, embora teriam um papel mais importante na progressão tumoral do que na iniciação do tumor.

Atualmente, um grande número de genes tem sido chamado de supressores tumorais simplesmente com base na sua expressão reduzida nos tumores. Enquanto outros são também categorizados dessa forma apenas devido à sua capacidade de antagonizar a tumorigênese ou às suas propriedades de crescimento *in vitro* quando a sua expressão é aumentada em linhagens celulares tumorais. Provavelmente, alguns desses genes podem ter um papel crítico na regulação do crescimento e podem até ser alvos de inativação por mutações ou outros mecanismos no câncer humano. Contudo, a expressão alterada de muitos genes nos cânceres pode simplesmente refletir o crescimento alterado e as propriedades de diferenciação das células tumorais comparadas com as células normais do tecido, e não ser um resultado da inativação específica por mutação.

Existem atualmente fortes evidências de que as mutações nos genes supressores tumorais têm um papel crítico e amplo no câncer humano, mas é importante notar que, apenas há 30 anos foi obtida a primeira evidência experimental convincente mostrando que a tumorigênese poderia resultar, pelo menos em parte, da inativação de genes celulares normais com papéis essenciais na regulação do crescimento. Gradualmente, a partir de estudos sobre a genética das células

somáticas e estudos epidemiológicos, bem como estudos de perda cromossômica em células tumorais utilizando citogenética e técnicas de genética molecular, surgiram evidências adicionais da existência de genes supressores tumorais e sua importância na tumorigênese. Nos últimos anos, foram identificados mais de 30 genes supressores tumorais, os quais, em alguns casos, estão inativos na linhagem germinativa e sua inativação predispõe ao câncer; porém, mais frequentemente, os genes supressores tumorais são inativados por mutações somáticas durante o desenvolvimento do tumor (Fearon e Vogelstein, 2000). Embora nós tenhamos aprendido muito sobre os genes supressores tumorais, ainda há muito trabalho por fazer e uma descrição completa da tumorigênese irá, sem dúvida, auxiliar na identificação de genes supressores tumorais adicionais, na caracterização detalhada de suas funções celulares normais e na elucidação da frequência e do espectro de mutações e outros mecanismos que inativam esses genes e seus produtos protéicos nos tumores humanos. Esses achados vão fornecer não apenas novos discernimentos sobre a patogênese do câncer, mas devem também se mostrarem críticos na melhoria da conduta e tratamento dos pacientes com câncer.

Genes de reparo de danos no DNA

O grande número de alterações cromossômicas observadas em certos tumores associado à heterogeneidade morfológica e fisiológica das células tumorais em tumores individuais, foram observações importantes que serviram de base para o conceito de um fenótipo “mutante” no câncer. Loeb et al. (1974) propuseram que as múltiplas mutações encontradas nas células tumorais resultariam de mutações nos genes que garantem a fidelidade da síntese do DNA ou a adequação do reparo do DNA.

As mutações “espontâneas” que ocorrem ao longo da vida de um indivíduo não são suficientes para explicar o risco de desenvolver câncer e, além disso, existem várias correlações entre a tumorigênese e a ausência, adquirida ou herdada, da manutenção da integri-

dade genômica, o que causa um fenótipo “mutante”, ressaltando o papel essencial dos sistemas de manutenção do DNA na prevenção do câncer (Hoeijmakers, 2001).

Apesar da presença de vários pontos preferenciais, o dano no DNA é primariamente um processo ao acaso, que, quando não reparado, pode servir como uma fonte potencial de mutações. Essas, por sua vez, podem ocorrer em genes necessários para a manutenção da instabilidade genética, as quais poderiam produzir mutações adicionais por todo o genoma, levando à cascata de mutações que culmina no câncer.

Os indivíduos com doenças herdas raras, tais como xeroderma pigmentoso (Cleaver e Kraemer, 1989) ou ataxia telangectasia (Meyn, 1997) apresentam uma incidência elevada de certos tumores e as células desses pacientes têm uma diminuição da sobrevivência quando expostas aos mesmos agentes que causam câncer nesses indivíduos. O fato de que as mutações herdadas em genes específicos estarem associadas a um aumento na incidência de certos tumores sugere que esses mesmos genes, quando mutados nas células somáticas, podem causar tumorigênese. Os pacientes com xeroderma pigmentoso apresentam uma forte tendência para desenvolver câncer de pele após a exposição solar e as células desses indivíduos, quando colocadas em cultura, apresentam uma falha no reparo de danos no DNA causado por exposição à luz UV. Esses pacientes apresentam mutações herdadas em um dos genes envolvidos no sistema de excisão de nucleotídeos.

A síndrome câncer de cólon do tipo não-poliposo (*hereditary nonpolyposis coli - HNPCC*) é a forma mais comum de câncer de cólon hereditário, sendo responsável por 2-7% do total dos cânceres cólon-retais. A identificação de genes humanos homólogos aos genes do sistema de reparo de danos no DNA de levedura (*bMSH2*, *bMSH3*, *bMSH6*, *bMLH1*, *bMLH3*, *bPMS1* e *bPMS2*), forneceu uma perspectiva de investigação genética e levou a uma extensiva busca por mutações nesses genes nas famílias com HNPCC. A maioria das alterações foram encontradas nos genes *hMSH2* e *hMLH1* (40%); as mutações nos outros

genes de reparo parecem ser raras ou, então, são associadas a famílias atípicas. O resultado da deficiência no sistema de reparo de danos no DNA leva ao acúmulo de erros de duplicação ou são causados por agentes externos, culminando em um fenótipo “mutante”. As mutações em, pelo menos, um dos genes do sistema de reparo estão associadas a um aumento na incidência de HNPCC e de tumores associados, o que foi demonstrado também em camundongos (revisão em Buermeier et al., 1999). Embora ainda não se conheça exatamente o mecanismo molecular de desenvolvimento de tumor nesses pacientes, a identificação da instabilidade de microssatélites tem revelado implicações clínicas e prognósticas (Muller e Fishel, 2002).

Embora os genes do sistema de reparo de danos no DNA não estejam diretamente envolvidos no processo carcinogênico, esses genes, quando inativos, expõem as células a uma taxa de mutação bastante elevada que, eventualmente, pode envolver a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais (Boland, 1998).

A extensão da instabilidade genética associada ao câncer foi inicialmente relatada por Peinado et al. (1992) observando mutações em seqüências repetitivas usando *primers* aleatórios nas reações de PCR. O DNA obtido de tumores de cólon humanos foi comparado com o DNA de tecidos adjacentes normais e foram observados produtos de PCR adicionais de tamanhos diferentes. Esses pesquisadores investigaram apenas uma pequena fração do genoma e, mesmo dentro dessa visão limitada, eles observaram um grande número de alterações na seqüência de DNA. Extrapolando esses resultados para todo o genoma, eles concluíram que alguns tumores contêm cerca de 100.000 mutações. Outros estudos relataram a presença de seqüências repetitivas alteradas na síndrome HNPCC nos segmentos de DNA entre os genes e até dentro dos exons (Brentnall et al., 1996; Rampino et al., 1997).

Algumas seqüências específicas compostas de repetições de dinucleotídeos são instáveis em alguns tumores humanos (Jiricny, 1998) e esse fenótipo é chamado de “instabilidade

de microssatélites” e é causado por defeitos no sistema de reparo de danos no DNA, os quais funcionam na correção dos erros de duplicação, na síndrome HNPCC e em vários tumores esporádicos. Os defeitos nesse sistema aumentam drasticamente as taxas de mutações. As causas da instabilidade de microssatélites ainda são desconhecidas; em geral, as mutações são geradas quando a taxa de mutação produzida excede a capacidade de correção da célula.

As alterações nos genes de reparo de danos no DNA foram associadas a um amplo espectro de cânceres humanos e, como os genes supressores tumorais, os genes de reparo de danos no DNA devem ter seus dois alelos mutados para que seja observado algum efeito fenotípico nos tumores. Segundo Kinzler e Vogelstein (1997) os genes de suscetibilidade ao câncer podem ser classificados em ‘gatekeepers’ e ‘caretakers’. De acordo com essa classificação, os ‘gatekeepers’ seriam aqueles que agem diretamente no controle da proliferação celular, como, por exemplo, o gene *RBI*; já os ‘caretakers’ não atuam diretamente na proliferação, mas, quando mutados, podem acelerar a conversão de uma célula normal em neoplásica, como os genes de reparo de danos no DNA.

Enquanto os genes supressores tumorais, tais como *RBI*, *p53*, *APC* e *INK4a* parecem ter um papel ativo na regulação do crescimento celular e/ou apoptose, o reconhecimento do dano no DNA e os genes de reparo podem, de certa forma, ser vistos como desenvolvendo papéis mais passivos no controle do crescimento celular. A distinção entre gene supressor tumoral e genes de reparo de danos no DNA pode ser muitas vezes difícil porque alguns genes supressores tumorais, incluindo talvez o *BRCA1* e *BRCA2* podem ter papéis no controle do crescimento e no reparo do DNA.

Câncer hereditário

A história familiar é a característica clínica principal pela qual a predisposição hereditária ao câncer é reconhecida. Porém, como o câncer é uma doença comum, muitas famílias podem apresentar vários casos apenas por acaso. Existe um espectro de pro-

habilidades de que uma dada história familiar reflita predisposição hereditária ao câncer, variando desde um efeito elevado no risco de câncer (50–80%) nos casos de herança dominante nas síndromes de câncer hereditário (1–2% dos casos de câncer), a efeitos moderados a fracos nos casos de câncer familiar (até 10% dos casos, dependendo da definição), nos quais as famílias apresentam vários casos de tumores comuns (por exemplo, mama e ovário; cólon + endométrio + sistema urinário), geralmente com um padrão de herança dominante. Existem ainda os casos de predisposição sem um agrupamento familiar evidente e com um efeito fraco no risco individual, apresentando-se como casos isolados de tumor em um sítio único ou com dois parentes afetados. Nesses últimos, não é possível quantificar a sua contribuição para a incidência do câncer.

Os testes genéticos para o risco de câncer são oferecidos por vários centros como parte da triagem de famílias, embora o seu valor seja controverso quando os benefícios práticos para os pacientes com risco médio a elevado não são ainda claros.

Já foram identificados vários genes associados com um aumento no risco do desenvolvimento do câncer (*BRCA1*, *BRCA2*, *APC* etc) (de Jong et al., 2002; Fodde, 2002), mas eles respondem por apenas uma pequena fração do risco familiar e certamente existem ainda muitos outros a serem identificados. A descoberta desses genes envolvidos no câncer familiar e outros envolvidos nos casos esporádicos será acelerada pelos dados gerados pelo Projeto Genoma Humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001) e pelos dados gerados pelo Projeto Genoma Humano do Câncer (Bonalume-Neto, 1999) e pelo *Cancer Genome Anatomy Project* – CGAP (Strausberg et al., 1997).

A pesquisa do câncer na era Pós-genômica

Até alguns anos atrás, a forma mais eficaz de se identificar oncogenes e genes supressores tumorais era através do delineamento de uma pequena porção do genoma utilizando estraté-

gias de mapeamento e, então, avaliar os genes candidatos na região para mutações em casos de câncer. Contudo, essas estratégias têm suas limitações e são bastante demoradas. Felizmente, vivemos hoje um momento sem precedentes na pesquisa médica. A disponibilidade da sequência completa de nosso DNA permite a correlação precisa entre características genéticas e inúmeros aspectos relacionados à vida dos indivíduos.

Durante muitos anos, a genética do câncer se concentrou nos eventos mutacionais que têm seu efeito primário dentro da célula tumoral. Hoje podemos expandir esses estudos, incluindo outros importantes eventos genéticos até há pouco tempo desconhecidos. Podemos estudar o câncer sob a luz de novos conhecimentos, incluindo eventos epigenéticos (revisão em Jones e Baylin, 2002), tais como a inativação gênica por metilação de DNA, ou ainda RNAs regulatórios curtos e não codificadores de proteínas. O papel da variação genética comum na determinação da suscetibilidade individual dentro da população é amplamente reconhecido e está sendo desenvolvido com base nas informações geradas pelo Projeto Genoma Humano. Os casos de predisposição sem um agrupamento familiar evidente, talvez sejam melhor compreendidos com a análise dos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), alterações de bases únicas do DNA, que podem interferir em diversos aspectos da atividade e estabilidade dos genes e suas proteínas. Os perfis de SNPs de um indivíduo poderão ser usados na determinação de “perfis de risco” ou em estudos de farmacogenética e prognóstico clínico, e, para isso, é necessário o acúmulo de conhecimento em estudos de associação entre dezenas ou centenas de alelos de predisposição. Além disso, essa descoberta implicará novas questões éticas e sociais a serem discutidas (Hatagima, 2002).

Graças ao Projeto Genoma do Câncer Humano, financiado pela FAPESP e pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, o Brasil é atualmente um dos países que mais contribuiu para a descoberta de ge-

nes envolvidos com o câncer humano. Ao lado da análise das informações geradas pelo projeto brasileiro e pelos projetos internacionais, esses dados serão associados aos dados clínicos dos pacientes com câncer. As informações aqui obtidas certamente serão a base de métodos diagnósticos mais precisos, mais baratos e menos invasivos, vindos em um futuro próximo. Podemos ainda esperar o desenvolvimento de novas drogas, mais efetivas e com menores efeitos colaterais. Não há dúvida de que, em breve, teremos menos temor diante de um diagnóstico de câncer.

Agradecimentos

FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e **ABADHS** (Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog Silva).

Referências

- Amundsen SA, Myers TG, Fornace Jr AJ (1998). Roles for *p53* in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17: 3287-3299.
- Bishop JM (1981). Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 23: 5-6.
- Bishop JM (1989a). Retroviruses and oncogenes II. *In: Les Prix Nobel. Almqvist and Wiksell, Stockholm.* pp.220-238.
- Bishop JM (1989b). Oncogenes and clinical cancer. *In: Weinberg RA (ed). Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor, NY.* pp.327-358.
- Boland CR (1998). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds). The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill Companies, Inc.*
- Bonalume-Neto R (1999). Brazilian scientists team up for cancer genome project. *Nature* 398: 450.
- Boveri T (1914). Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren (Gustav Fischer, Jena). English translation: Boveri T (1929) The Origin of Malignant Tumors (Williams & Wilkins, Baltimore).
- Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, Cherian SP, Hueffed M, Rabinovitch PS, Rubin CE, Haggitt RC, Boland CR (1996). Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 56: 1237-1240.
- Brodeur GM, Hogarty MD (1998). Gene amplification in human cancer: biological and clinical significance. *In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds). The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill Companies, New York.* pp. 161-172.
- Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM (1999). Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 33: 533-564.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779-784.
- Cleaver JE, Kraemer KH (1989). Xeroderma pigmentosum. *In: CR Scriver et al. (ed.) Metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill, New York.* pp.2949-2971.
- Comings DE (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 3324-3328.
- Croce CM (1987). Role of chromosome translocations in human neoplasia. *Cell* 49: 155-156.
- Ephrussi B, Davidson RL, Weiss MC, Harris H, Klein G (1969). Malignancy of somatic cell hybrids *Nature* 224: 1314-1316.
- Esteller M, Herman JG (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol* 196: 1-7.
- Fearon ER (2002). Tumor suppressor genes. *In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds). The Genetic Basis of Human Cancer, 2nd Ed. McGraw-Hill, New York.*
- Fearon ER, Vogelstein B (2000). Tumor Suppressor Gene Defects in Human Cancer. *In: Bast RC et al. (eds.) Cancer Medicine. 5th ed. BC Becker Inc, Canada.*
- Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ (1998). The murine gene *p27Kip1* is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396: 177-180.
- Fodde R (2002). The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 38: 867-871.
- Gall JG, Pardue ML (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:378-383.
- Geiser AG, Der CJ, Marshall CJ, Stanbridge EJ (1986). Suppression of tumorigenicity with continued expression of the c-Ha-ras oncogene in EJ bladder carcinoma-human fibroblast hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5209-5213.
- George RE, Variend S, Cullinane C, Cotterill SJ, McGuckin AG, Ellershaw C, Lunec J, Pearson AD; United Kingdom Children Cancer Study Group (2001). Relationship between histopathological features, MYCN amplification, and prognosis: a UKCCSG study. United Kingdom Children Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 36: 169-176.
- Harris H (1988). The analysis of malignancy in cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res* 48: 3302-3306.
- Hatagima A (2002). Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. *Cad Saude Publica* 18: 357-377.
- Hoeijmakers JH (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Jiricny J (1998). Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat Res* 409: 107-121.
- Jones PA, Baylin SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428.
- de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, de Vries EG (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 39: 225-242.
- Kallionieni A, Kallionieni OP, D Sudar, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.
- Knudson AG (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-823.

- Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 761-763.
- Loeb LA, Springgate CF, Battula N (1974). Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res* 34: 2311-2321.
- Meyn MS (1997). Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis. In: MB Kastan (ed.) Genetic instability and tumorigenesis. Springer-Verlag, Berlin. pp.71-148.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Programas de Controle de Câncer - PRO-ONCO (1997). O Problema do Câncer no Brasil. 4.ed. Rio de Janeiro.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 15 Spec No: 417-474.
- Mitelman F (1998). Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. 6th ed. F Mitelman (ed). Wiley-Liss, New York.
- Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.) (2002). Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>)
- Muller A, Fishel R (2002). Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 20: 102-109.
- Murray MJ, Shilo B-Z, Shih C, Cowing D, Hsu HW, Weinberg RA (1981). Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell* 1981. 25: 355-361.
- Nowell PC (1994). Cytogenetic approaches to human cancer genes. *FASEB J* 8: 408-413.
- Nowell PC, Hungerford D (1960). A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497.
- Orye E, Delbeke MJ, Vandenabeele B (1974). Retinoblastoma and long arm deletion of chromosome 13. Attempts to define the deleted segment. *Clin Genet* 5: 457-464.
- Osborne RJ, Hamshere MG (2000). A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Res* 60: 3706-3712.
- Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297: 474-478.
- Park M (1998). In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds.) The genetic Basis of Human Cancer. McGraw-Hill, New York. pp. 205-228.
- Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M (1992). Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10065-10069.
- Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogh J, Wigler M (1981). Human tumor derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* 27: 467-476.
- Peto R (1977). Epidemiology, multistage models, and short-term mutagenicity models. *Cold Spring Harbor Conf Cell Prolif* 4: 1404-1428.
- Pierotti MA, Schichman SA, Sozzi G, Croce CM (2000). Oncogenes. In: Bast RC et al. (eds.) Cancer Medicine. 5th ed. BC Becker Inc, Canada.
- Plass C, Soloway PD (2002). DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet* 10: 6-16.
- Ponder BAJ (2001). Cancer genetics. *Nature* 411: 336-341.
- Rabbitts TH (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143-149.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275: 967-969.
- Rous P (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor. *J Exp Med* 13: 397-411.
- Rowley JD (1990). Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma. *Semin Hematol* 27: 122-136.
- Saxon PJ, Srivatsan ES, Stanbridge EJ (1986). Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBO J* 5: 3461-3466.
- Schrock E, duManoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497.
- Speicer MR, Ballard ST, Ward DC (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH. *Nature Genet* 2: 368-375.
- Stanbridge EJ, Der CJ, Doersen CJ, Nishimi RY, Peehl DM, Weissman BE, Wilkinson JE (1982). Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 215: 252-259.
- Stanbridge EJ, Cavenee WK (1989). Heritable cancer and tumor suppressor genes: a tentative connection. In: Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer. Edited by RA Weinberg. Cold Spring Harbor, NY. pp 281-306.
- Strausberg RL, Dahl CA, Klausner RD (1997). New opportunities for uncovering the molecular basis of cancer. *Nat Genet* 15 Spec No: 415-416.
- Tyzzzer EE (1916). Tumor immunity. *J Cancer Res* 1: 125-156.
- Varmus HE (1982). Form and function of retroviral proviruses. *Science* 216: 812-820.
- Varmus HE (1988). Retroviruses. *Science* 240: 1427-1435.
- Varmus HE (1989a). Retroviruses and oncogenes I. In: Les Prix Nobel. Almqvist and Wiksell, Stockholm. pp.194-212.
- Varmus H (1989b). An historical overview of oncogenes. In: Weinberg RA (ed). Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor, NY. pp.3-44.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rouseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O (1998). Truncating mutations of *bSNF5/INI1* in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394: 203-206.
- Weinberg RA (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254: 1138-1146.
- Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, Jones GR, Geiser AG, Stanbridge EJ (1987). Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 236: 175-180.