

Complexos de reparo mismatch: mecanismos e funções

Mismatch repair complexes: mechanisms and functions

Marcos Vinícius Macedo de Oliveira¹

Carlos Alberto de Carvalho Fraga²

André Luiz Sena Guimarães³

Resumo: As proteínas do Reparo de DNA Mismatch (MMR) são encontradas em diversos mecanismos importantes de funções celulares. A principal função dessas proteínas está relacionada ao reparo pós replicacional do DNA, corrigindo as bases incorporadas incorretamente ao genoma devido ao erro de replicação. A perda das funções das proteínas MMR é geralmente aumentada devido a mutações espontâneas em organismos, que vão desde bactérias a humanos. As mutações nos genes MMR causam câncer colorretal hereditário não-poliposo, e a perda das funções dos genes MMR está associada com uma significativa fração de cânceres esporádicos. Esta revisão busca resumir os principais mecanismos moleculares das funções protéicas dos MMR. O conhecimento acerca do mecanismo de reparo MMR está em processo de crescimento ao longo dos anos, embora a complexidade de suas vias de sinalização, ainda, permanece pouco conhecida. O entendimento desses mecanismos, portanto, faz-se crucial para maior suporte no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para doenças relacionadas a essa via de reparo.

Palavras-chave: Reparo de DNA Mismatch. MutL. MutS. MSH2.

Abstract: DNA mismatch repair (MMR) proteins are ubiquitous players in a diverse array of important cellular functions. In its role in post-replication repair, MMR safeguards the genome correcting base mispairs arising as a result of replication errors. Loss of MMR results in greatly increased rates of spontaneous mutation in organisms ranging from bacteria to humans. Mutations in MMR genes cause hereditary nonpolyposis colorectal cancer, and loss of MMR is associated with a significant fraction of sporadic cancers. Given its prominence in mutation avoidance and its ability to target a range of DNA lesions, MMR has been under investigation in studies of ageing mechanisms. This review aims to summarize what is known about the molecular details of the MMR pathway. The knowledge about the MMR mechanism is increasing over years, although the complexity of their signaling pathways still remains poorly understood. The understanding of these mechanisms, therefore, is crucial to further support the development of new therapeutic targets for diseases that are related to this repair pathway.

Key words: DNA mismatch repair. MutL. MutS. MSH2

1 Doutorando em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Montes Claros, Brasil.

2 Doutorando em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Montes Claros, Brasil.

3 Pós-doutorado em Biologia Celular na University of Western Ontario. Professor da Universidade Estadual de Montes Claros.

REVISÃO DE LITERATURA

O MMR em *Escherichia coli* é direcionado pela ausência da metilação na posição N6 da adenina nos sítios dGATC da nova fita de DNA sintetizada. Essa sinalização está associada à presença de gaps na cadeia não metilada que, na verdade, servem como sinal para direcionar a reação. Os gaps, ainda, são suficientes para direcionar o reparo de mismatch em extratos de células de mamíferos e *Drosophila*, e ovos de *Xenopus* (IYER *et al.*, 2006a; JIRICNY, 2006).

O mecanismo de MMR associado à replicação do DNA é melhor entendido em organismos procarióticos, envolvendo os complexos protéicos MutL, MutS, MutH, DNA Helicase II, Exonuclease (I, VII, X e Rec J), SSB, DNA polimerase III e DNA ligase (LAHUE *et al.*, 1989; LI, 2008). O MMR inicia-se quando MutS liga-se aos nucleotídeos inseridos erroneamente na cadeia recém-sintetizada, formando um complexo MutS-DNA. Em uma reação dependente de energia, o complexo MutS-DNA interage com as proteínas MutL. A interação entre os complexos MutL e MutS ativa a endonuclease MutH, responsável pela clivagem da cadeia danificada e início dos mecanismos de reparo do DNA, com a consequente substituição dos nucleotídeos incorretos (IYER *et al.*, 2006b; LIN *et al.*, 2007; MODRICH; LAHUE, 1996; UMAR; KUNKEL, 1996). O gap, por sua vez, atua como ponto de inserção da helicase, que separa as fitas, sendo as exonucleases responsáveis pela deleção dos nucleotídeos na região contendo o mismatch. Dependendo da posição da quebra da cadeia em relação à região de mismatch, as exonucleases podem agir na direção 5' → 3' (Exo I, VII ou Rec J) ou na direção 3' → 5' (Exo I ou X). Recentemente, estudos demonstraram que a Exo VII, também, realiza excisão de nucleotídeos na direção 3' → 5' (NOWOSIELSKA; MARINUS, 2008). As exonucleases removem nucleotídeos do gap prolongando a regiões posteriores do mismatch (LI, 2008; MODRICH; LAHUE, 1996).

Em eucariotos, as proteínas MutS são compostas pelas proteínas MSH (MutS Homolog). O complexo MSH2-MSH6 forma a estrutura do MutSa que reconhece pequenos mismatches e pequenos loops de inserção/deleção (denominado indel). A estrutura MutSβ é formada pelas proteínas MSH2 e MSH3, responsáveis pelo reconhecimento de loops indel de tamanhos mais expressivos (HARRINGTON; KOLODNER, 2007; BUERMAYER *et al.*, 1999). MutSa e MutSβ interagem com MutLa para a

correção de mismatches, processo este dependente da presença do ATP, mas não da hidrólise desse nucleotídeo (SELMANE *et al.*, 2003). O MutLa, ainda, é capaz de criar gaps adicionais no DNA *in vitro* (IYER *et al.*, 2006a; KADYROV *et al.*, 2006).

O mecanismo de excisão mais simples de eucariotos depende dos complexos MutSa, MutLa, Exo1, RPA e ATP. O complexo MutSa ativa a Exo1 que hidrolisa na região 5' no mismatch do DNA. O complexo MutSa-Exo1 hidrolisa os nucleotídeos, resultando na remoção de aproximadamente 2.000 nucleotídeos. A redução da capacidade hidrolítica do complexo MutSa-Exo1 (redução para aproximadamente 250 nucleotídeos) é controlada, em grande parte, pelo RPA, cuja ligação ao gap o permite controlar o acesso da Exo1 à cauda 5' no processo da excisão (GENSCHEL; MODRICH, 2003). Em relação à MutLa, tem sido sugerido a sua participação na finalização da excisão dos nucleotídeos via dois mecanismos distintos: supressão da atividade da Exo1 e associação com RPA para a finalização do MMR, sendo que este mecanismo, ainda, não se apresenta bem esclarecido (ZHANG *et al.*, 2005). Estudos recentes indicam que a fosforilação reduz a afinidade do RPA pela molécula de DNA e o RPA não fosforilado potencializa a excisão de nucleotídeos danificados via MMR. O RPA fosforilado, ainda, estimula a síntese da cadeia do DNA. No mecanismo da supressão da atividade da Exo1, simplesmente ocorre a estabilização dos produtos de excisão contra hidrólises não-específicas realizadas pela Exo1 (GENSCHEL; MODRICH, 2003).

Além das proteínas MMR, o PCNA (proliferating cell nuclear antigen) exerce uma função importante nos reparos de erros de replicação. Embora, a função precisa do PCNA associada às proteínas MMR, ainda, não está bem esclarecida, foram propostos três mecanismos gerais (UMAR *et al.*, 1996). Primeiro, o PCNA relaciona-se diretamente com o MSH-3, MSH-6 e MLH-1 (MutL Homolog-1) através de um domínio denominado PIP-Box existente nessas proteínas do MMR. Tais regiões, quando mutadas, quebram a interação com o PCNA *in vitro* e confere um fenótipo mutante *in vivo* (LEE; ALANI, 2006). Segundo, o anel do PCNA exerce a função de orientação para a distinção da fita molde e da fita nascente pelas proteínas MMR. Isso permite uma maior concentração das proteínas MMR na fita nascente, potencializando a eficiência do sistema de reparo (UMAR *et al.*, 1996). Outro mecanismo

proposto sugere que o PCNA livre aumenta a capacidade dos complexos MMR em reconhecer a presença dos mismatches nas fitas do DNA (FLORES-ROZAS *et al.*, 2000).

Algumas propostas tentam explicar as vias pelas quais o dano do DNA reconhecido pelas proteínas MMR podem ativar o checkpoint do ciclo celular e a apoptose. Proteínas MMR sinalizariam diretamente a existência de um dano no DNA e, posteriormente, recrutariam algumas outras proteínas que ativariam o sinal de ativação que permite um ou mais checkpoints no ciclo celular (STOJIC *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2003; O'BRIEN; BROWN, 2006). Por outro lado, em relação aos mecanismos apoptóticos, estudos recentes tem sugerido que a ação mutagênica do Bcl-2 provavelmente esteja relacionada à habilidade dessa proteína em suprimir a expressão do gene MSH-2. O mecanismo utilizado pelo Bcl-2 para a inativação do pRb e a subsequente não liberação do fator de transcrição E2F estaria relacionado a não transcrição do MSH2 (YOUN *et al.*, 2005).

Deficiência do sistema MMR

A maioria das mutações genéticas é deletéria para as células, causando uma perda funcional parcial ou total dos genes. Agentes físico-químicos de natureza exógena, tais como, luz UV e cigarro, bem como metabólitos reativos de origem endógena (espécies oxigênio e nitrogênio reativos) contribuem para o acúmulo de danificações no DNA por um período prolongado. O DNA danificado, não havendo o reparo, possui um alto potencial de acarretar o desenvolvimento de neoplasias em células germinativas e/ou somáticas.

Estudos bioquímicos e genéticos caracterizam os efeitos das alterações em MMR responsáveis por promover defeitos no sistema de reparo do DNA em cânceres. As mutações dos genes MMR promovem instabilidade microssatélite em alguns tipos de câncer. No entanto, estudos demonstraram que tumores positivos para a instabilidade microssatélite possuíam defeitos no sistema de reparo mismatch, não apresentando mutações nestes genes. O silenciamento epigenético do hMLH1 (MLH1 humano), via hipermetilação da sequência promotora, tem uma forte relação com a diminuição da atividade de reparo. Muito embora, a hipermetilação do gene hMSH2 é raramente observado em tumores que apresentam instabilidade microssatélite (GRADY; MARKOW-

ITZ, 2002; KANE *et al.*, 1997).

A perda da expressão *in vitro* dos complexos MLH1 e MSH2 foi frequentemente encontrada em células tumorais, apresentando resistência a agentes químicos. A caracterização da tolerância a agentes alquilantes por células deficientes em MMR tem direcionado implicações importantes nos processos quimioterápicos em pacientes com câncer colorretal hereditário não-poliposo e instabilidade microssatélite (PELTOMAKI, 2003). Estudos indicam que diferentes níveis de expressão de MLH1 e MSH2 podem estar associados a resposta de resistência a drogas de caráter citotóxicos.

DISCUSSÃO

A perda de reparo MMR resulta em instabilidade microssatélite e no acúmulo de mutações em proto-oncogenes ou genes supressores de tumor que pode culminar com o desenvolvimento do câncer (NUNN *et al.*, 2003). Tem sido observado que tumores com perda de expressão da proteína MSH2 apresentam alta frequência de instabilidade microssatélite (MARCUS *et al.*, 1999; THIBODEAU *et al.*, 1996). Em um estudo com câncer de mama, houve diminuição da expressão de MSH2 relacionada significativamente com metástases linfonodais, alto grau de malignidade e invasividade (LEUNG *et al.*, 1999). Foi identificado que a perda de expressão de MSH2 associa-se a presença de nódulos metastáticos e estágios menos diferenciados no carcinoma de células escamosas de esôfago (UEHARA *et al.*, 2005). Além disso, pacientes com menor expressão de MSH2 exibem estágios clínicos mais avançados, associados com o aumento de instabilidade microssatélite. Entretanto, maior imunomarcagem dessa proteína esteve significativamente relacionada a estadiamentos tumorais mais severos de adenocarcinoma colorretal (LANZA *et al.*, 2002). Em um estudo experimental, camundongos foram expostos a benzopireno, e, posteriormente, identificadas as respostas de acordo com os grupos de estudo. Foi verificado que os camundongos knockout para o gene MSH2 desenvolveram linfoma quando expostos a esse agente alquilante (ZIENOLDDINY *et al.*, 2006).

O melhor modelo proposto para explicar a atuação do sistema MMR na ativação de apoptose, após a radiação, decorre da oxidação de resíduos de guanina induzidos pela radiação, o que resulta na produção de adutos mutagênicos (CHEN *et al.*, 2001) que irão ser reconhecidos pelo sistema MMR (NI *et*

al., 1999). O reconhecimento no sítio do dano por esse sistema leva a fosforilação, e, conseqüentemente, ativação de CHK2 (Checkpoint homolog). A ativação de CHK2 facilita a função checkpoints de um complexo de proteínas (MLH1, MSH2, BRCA1, NBS1 e ATM) no sítio do dano do DNA, podendo acarretar na sinalização de vias apoptóticas (BROWN *et al.*, 2003).

O MMR tem sido associado como um fator de prognóstico para resposta à quimioterapia em diferentes tipos de tumores esporádicos e no câncer colorretal, no entanto, o seu papel preditivo no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, ainda, não foi definido. Alguns estudos demonstraram que células deficientes no sistema de reparo por mismatch apresentaram-se mais resistentes à radiação ionizante, uma vez que, essas células não entraram em processo de apoptose em resposta a radiação (ZENG *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1999). Vários estudos têm apontado que além de apresentar função de reparo de erros pós-transcricionais, a proteína MSH2 também é requerida para a ativação de checkpoint da fase S do ciclo celular em resposta a radiação ionizante (BROWN *et al.*, 2003).

CONCLUSÃO

O conhecimento acerca do mecanismo de reparo MMR está em processo de crescimento ao longo dos anos, embora a complexidade de suas vias de sinalização, ainda, permanece pouco conhecida. A descoberta da resistência de células tumorigênicas esporadicamente defeituosas em MMR a certas drogas quimioterápicas tem impactos significativos na pesquisa do tratamento do câncer. Necessita-se de um maior entendimento sobre a maquinaria MMR no processo de reparo de dano, sendo importante o conhecimento da função quanto à hidrólise de ATP, ligações de nucleotídeos e DNA via subunidades MutS e MutL. Há ainda a necessidade de se expandir as investigações em relação aos mecanismos transcricionais e pós-transcricionais pelos quais a expressão das proteínas MMRs é regulada em células eucarióticas. Pesquisas adicionais devem ser realizadas a fim de se identificar seletivamente células deficientes em proteínas MMRs. O entendimento desses mecanismos, portanto, faz-se crucial para maior suporte no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para doenças relacionadas a essa via de reparo.

REFERÊNCIAS

- BENACHENHOU, N. et al. Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch-repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 79, n.7-8, p.1012-1017, Mar. 1999.
- BROWN, K. D. et al. The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nat. Genet.*, v. 33, n.1, p.80-84, Jan. 2003.
- BUERMEYER, A. B. et al. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, v. 33, n.533-564, 1999.
- CHEN, S. K. et al. Determination of 8-oxoguanine in individual cell nucleus of gamma-irradiated mammalian cells. *Radiat. Res.*, v. 155, n.6, p.832-836, Jun. 2001.
- FINK, D. et al. The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells. *Br. J. Cancer*, v. 77, n.5, p.703-708, Mar. 1998.
- FLORES-ROZAS, H.; CLARK, D.; KOLODNER, R. D. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. *Nat. Genet.*, v. 26, n.3, p.375-378, Nov. 2000.
- GENSCHEL, J.; MODRICH, P. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol. Cell*, v. 12, n. 5, p.1077-1086, Nov. 2003.
- GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v. 3, p. 101-128, 2002.
- GRIFFIN, S. et al. DNA mismatch binding and incision at modified guanine bases by extracts of mammalian cells: implications for tolerance to DNA methylation damage. *Biochemistry*, v. 33, n. 16, p. 4787-4793, Apr. 1994.
- HARRINGTON, J. M.; KOLODNER, R. D. Saccharomyces cerevisiae Msh2-Msh3 acts in repair of base-base mismatches. *Mol. Cell Biol.*, v. 27, n. 18, p. 6546-6554, Sep. 2007.

- IYER, R. R. et al. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem.Rev.*, v. 106, n. 2, p. 302-323, Feb. 2006a.
- IYER, R. R. et al. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem.Rev.*, v. 106, n. 2, p. 302-323, Feb. 2006b.
- JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 7, n. 5, p. 335-346, May. 2006.
- KADYROV, F. A. et al. Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. *Cell*, v. 126, n. 2, p. 297-308, Jul. 2006.
- KANE, M. F. et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.*, v. 57, n. 5, p. 808-811, Mar. 1997.
- KAT, A. et al. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 90, n. 14, p. 6424-6428, Jul. 1993.
- LAHUE, R. S.; AU, K. G.; MODRICH, P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, v. 245, n. 4914, p.160-164, Jul. 1989.
- LANZA, G. et al. Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod.Pathol.*, v. 15, n. 7, p.741-749, Jul. 2002.
- LEACH, F. S. et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer*, v. 88, n.10, p.2333-2341, May. 2000.
- LEE, S. D.; ALANI, E. Analysis of interactions between mismatch repair initiation factors and the replication processivity factor PCNA. *J.Mol.Biol.*, v. 355, n. 2, p.175-184, Jan. 2006.
- LEUNG, S. Y. et al. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res.*, v. 59, n. 1, p.159-164, Jan. 1999.
- LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.*, v. 18, n.1, p.85-98, Jan. 2008.
- LIN, Z.; NEI, M.; MA, H. The origins and early evolution of DNA mismatch repair genes--multiple horizontal gene transfers and co-evolution. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, n.22, p.7591-7603, 2007.
- MARCUS, V. A. et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am.J.Surg.Pathol.*, v. 23, n.10, p.1248-1255, Oct. 1999.
- MODRICH, P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J.Biol.Chem.*, v. 281, n. 41, p.30305-30309, Oct. 2006.
- MODRICH, P.; LAHUE, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu.Rev.Biochem.*, v. 65, n.101-133, 1996.
- NI, T. T.; MARSISCHKY, G. T.; KOLODNER, R. D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol.Cell*, v. 4, n. 3, p.439-444, Sep. 1999.
- NOWOSIELSKA, A.; MARINUS, M. G. DNA mismatch repair-induced double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, v. 7, n.1, p.48-56, Jan. 2008.
- NUNN, J. et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.*, v. 39, n. 2, p.115-129, Feb. 2003.
- O'BRIEN, V.; BROWN, R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 4, p. 682-692, Apr. 2006.
- OHRLING, K. et al. Mismatch repair protein expression is an independent prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *Acta Oncol.*, v. 49, n. 6, p.797-804, Mar. 2010.
- PELTOMAKI, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.*, v. 21, n. 6, p.1174-1179, Mar. 2003.

- SARGENT, D. J. et al. Defective Mismatch Repair As a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon Cancer. *J. Clin. Oncol.*, v. 28, n. 20, p. 3219-26, May. 2010.
- SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 57, n. 579-608, 2003.
- SELMANE, T. et al. Formation of a DNA mismatch repair complex mediated by ATP. *J. Mol. Biol.*, v. 334, n. 5, p. 949-965, Dec. 2003.
- STOJIC, L. et al. Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes Dev.*, v. 18, n.11, p.1331-1344, Jun. 2004.
- THIBODEAU, S. N. et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res.*, v. 56, n. 21, p. 4836-4840, Nov. 1996.
- UEHARA, H. et al. Deficiency of hMLH1 and hMSH2 expression is a poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, v. 92, n.2, p.109-115, Nov. 2005.
- UMAR, A. et al. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*, v. 87, n.1, p.65-73, Oct. 1996.
- UMAR, A.; KUNKEL, T. A. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur.J.Biochem.*, v. 238, n. 2, p. 297-307, Jun. 1996.
- YAN, T. et al. DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells. *Clin.Cancer Res.*, v. 9, n. 6, p. 2327-2334, Jun. 2003.
- YOUN, C. K. et al. Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat.Cell Biol.*, v. 7, n. 2, p. 137-147, Feb. 2005.
- ZEKRI, A. R. et al. Mismatch repair genes (hMLH1, hPMS1, hPMS2, GTBP/hMSH6, hMSH2) in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *World J.Gastroenterol.*, v. 11, n. 20, p. 3020-3026, May. 2005.
- ZENG, M. et al. Ionizing radiation-induced apoptosis via separate Pms2- and p53-dependent pathways. *Cancer Res.*, v. 60, n. 17, p. 4889-4893, Sep. 2000.
- ZHANG, H. et al. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res.*, v. 59, n. 13, p. 3021-3027, Jul. 1999.
- ZHANG, Y. et al. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell*, v. 122, n. 5, p. 693-705, Sep. 2005.
- ZIENOLDDINY, S. et al. Msh2 deficiency increases susceptibility to benzo[a]pyrene-induced lymphomagenesis. *Int.J.Cancer*, v. 118, n. 11, p. 2899-2902, Jun. 2006.