Érica Cristina Pavarino Bertelli

Estudo Molecular de Células Normais e Neoplásicas do Tecido Cutâneo

1910000859

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética

Érika Cristina Pavarino Bertelli

ESTUDO MOLECULAR DE CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS DO TECIDO CUTÂNEO

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

859/99

Tese apresentada para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP

1998

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com auxílio financeiro da CAPES, CNPq, FAPESP e FUNDUNESP.

Dedico este trabalho

Ao meu esposo *Paulo Henrique*, pelo apoio e carinho em todos os momentos de minha vida

e pela paciência e colaboração no decorrer deste trabalho

À minha mãe *Oneida*, por todo amor dedicado à minha filha,

tornando possível a concretização deste trabalho

À minha filha, *Beatriz*, inspiração do meu viver

"A mais bela coragem é a confiança que devemos ter na capacidade do nosso esforço."

(Machado de Assis)

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Eloiza Helena Tajara da Silva*, orientadora deste trabalho, por acreditar na minha capacidade de elaboração e execução de um projeto de pesquisa, pela confiança, incentivo e amizade.

Minha eterna graditão.

Às Instituições financiadoras deste projeto: CAPES, CNPq, FAPESP e FUNDUNESP;

À Direção e ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, pela disposição das condições materiais;

À Profa. Dra. *Ana Elizabete Silva*, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelo apoio e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Àqueles que em qualquer momento se colocaram disponíveis, transmitindo seus conhecimentos e experências profissionais e de vida com dedicação e carinho, pelo valor inestimável do apoio oferido e pelas sugestões que complementaram este trabalho:

- Profa. Dra. *Maria Elizabete Jorge Amaral*, Departamento de Biologia da UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo.

- Profa. Dra. *Eny Maria Goloni Bertollo*, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo.

- Profa. Dra. *Dorotéia Rossi Silva Souza*, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo.

- Prof. Dr. *Marco Antônio Zago*, Fundação Hemocentro - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo.

- *Wilson Araújo da Silva Júnior*, *Fabiana Matioli*, *Angelina Xavier Acosta* e *Adriana. Aparecida Marques*, Setor de Biologia Molecular - Laboratório de Clonagem, Fundação Hemocentro - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo.

- Prof. Dr. *Luís Gonzaga Tone* e pós- graduando *José Alexandre Rodrigues de Lemos*, Serviço de Oncopediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo.

- Profa. Dra. *Luiza Lina Villa* e pós-graduanda *Nídea Alice Pinheiro*, Instituto de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo.

- Profa. Dra. *Marileila Varella Garcia* e Prof. Dr. *Christopher Korch*, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA.

- Biólogos *Josué Rodrigues dos Santos* e *Rosana Silistino*, Departamento de Biologia da UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo.

- Prof. Dr. *James Robert Coleman*, Departamento de Botânica da UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo.

- Prof. Dr. *Carlos Daglian* , Departamento de Letras Modernas da UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo.

- Professores do Departamento de Biologia da UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo, em especial Profa. Dra. *Cláudia Márcia Aparecida Carareto*.

- Professores do Departamento de Física da UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo, em especial Prof. Dr. *João Ruggiero Neto*.

A todos os colegas que compartilharam comigo o desenvolvimento deste trabalho, sabendo cultivar uma amizade que o tempo amadureceu. Agradeço em especial, *Andréa Borduchi Carvalho Franco de Salles*, *Sheila Adami Vayego*, *Rosane Gomes de Paula Queiroz*, *Flávia Cristina Carvalho Rodrigues*, *Nilce Barril*, *Rosa Sayoko Kawasaki Oyama* e *Andréa Regina Baptista Rossit*.

Ao meu esposo, *Paulo Henrique*, aos meus pais, *Reginaldo* e *Oneida*, e a todos os meus familiares, por terem acreditado no meu ideal, escutado minhas constantes angústias alegrias e decepções sempre como se fosse a primeira vez. Obrigada pelo apoio e por terem acreditado que eu chegaria ao final.

À minha filha, *Beatriz*, pela sua existência.

A *Deus* que, incomparável e inconfundível na sua infinita bondade, compreendeu meus anseios e me deu a necessária coragem para atingir o meu objetivo, ofereço o meu porvir e peço forças para sempre agir com eficiência em meu trabalho e acerto em minhas decisões.

Obrigada por tudo.

Durante a realização deste trabalho foram redigidos para publicação os seguintes artigos:

1. Pavarino, E.C., Rossit, A.R.B., Tajara, E.H. Chromosome breakpoint distribution in nonmelanoma skin cancers. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 99, p. 81-84, 1997.

2. Pavarino-Bertelli, E.C., Rodrigues, F.C.C., Tajara, E.H. Assessment of methods for extracting DNA from paraffin-embedded tissue and conditions for PCR-SSCP analysis of the *TP53* suppressor gene. *Genet. Mol. Biol.*

3. Pavarino-Bertelli, E.C., Rodrigues, F.C.C., Tajara, E.H. Skin carcinogenesis in Southeast Brazil I: Analysis of *TP53* gene in normal epidermis from sun-exposed and non-sun-exposed sites. *Int. J. Cancer.*

4. Pavarino-Bertelli, E.C., Queiroz, R.G., Rodrigues, F.C.C., Zago, M.A., Tajara, E.H. Skin Carcinogenesis in Southeast Brazil II: Analysis of *TP53* gene in nonmelanoma skin tumors. *Int. J. Cancer.*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO....1

I.1. O controle do ciclo celular....1

A transição G1-S e as quinases cdk4,6/ciclina D, cdk2/ciclina E e cdk2/ciclina A....2

A fase M e a quinase cdc2/ciclina B....7

O bloqueio do ciclo celular, as proteínas inibidoras de cdks e a p53....9

A apoptose e a proteína p53....11

I.2. Exposição solar, p53 e câncer de pele....13

II. OBJETIVOS....23

III. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO....24

Artigo 1....25

Artigo 2....29

Artigo 3....50

Artigo 4....65

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES....92

V. RESUMO....101

VI. SUMMARY....103

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....105

I. INTRODUÇÃO

I.1. O controle do ciclo celular

As células de mamíferos estão sujeitas a um grande número de diferentes estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, antagonistas de mitose e indutores de diferenciação, aos quais respondem com progressão ou bloqueio do seu ciclo (Graña e Reddy, 1995). Os principais reguladores dessas respostas incluem uma classe especial de enzimas. Essas enzimas são quinases que apresentam uma subunidade catalítica ativa somente após sua fosforilação e uma subunidade regulatória instável denominada ciclina, cujo nível, como seu nome indica, oscila nas várias fases do ciclo celular (Evans *et al.*, 1983; Murray e Kirschner, 1991; Nasmyth, 1996).

A subunidade catalítica é uma fosfoproteína e seu estado de fosforilação é um determinante de sua atividade. Assim, para tornar-se ativa, grupos fosfatos precisam estar ausentes em algumas posições e presentes em outras. Como a quinase é autocatalítica, a fosforilação de uma pequena quantidade da enzima é suficiente para a ativação das demais moléculas (Lewin, 1997). Em leveduras, uma única subunidade catalítica (cdc2 em *Schizosaccharomyces pombe* e cdc28 em *Saccharomyces cerevisiae*) interage sucessivamente com várias ciclinas enquanto, em mamíferos, diferentes subunidades (cdc2 ou cdk1, cdk2, cdk4, cdk6, cdk7, cdk8) são expressas com ciclinas específicas (A, B, C, D, E, G, H) conforme a célula progride de G1 para M. A homologia funcional dessas substâncias em eucariotos é surpreendente e a maioria daquelas sintetizadas por mamíferos pode ser substituída pelas suas correspondentes produzidas por leveduras (Hartwell e Kastan, 1994). As unidades catalíticas, por exemplo, mostram uma homologia de sequência superior a 40% embora essa homologia em ciclinas esteja frequentemente

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

limitada a um domínio de aproximadamente 100 aminoácidos, responsável pela ligação e ativação das quinases (Morgan, 1995).

A passagem das células de um estágio a outro do ciclo celular é regulada, então, por fatores que atuam sobre a transcrição dos genes das ciclinas e a degradação dessas proteínas e sobre a modificação por fosforilação da subunidade catalítica da enzima (Nurse, 1990). Esse controle mantém a ordem dos eventos e possui pontos de checagem, ou *checkpoints*, responsáveis por assegurar que etapas críticas como duplicação e segregação cromossômicas sejam finalizadas com grande fidelidade. Além disso, tal controle responde por bloqueio de proliferação quando a integridade do genoma está comprometida (Hartwell e Weinert, 1989). Em *Escherichia coli,* por exemplo, lesões no material genético geram um sinal que ativa uma série de genes responsáveis pela resposta SOS, alguns deles participando do reparo do DNA e outros do bloqueio da divisão celular (Huisman e D'Ari, 1981). Um padrão semelhante também é observado em células de mamíferos e leveduras, com participação de genes como o *TP53* ou o *ATM* (Painter e Young, 1990; Kuerbitz *et al.*, 1992) e o *wee1* (Nurse, 1975), respectivamente.

Um dos *checkpoints* mais importantes é o START, que ocorre em G1 e é também conhecido, em células de mamíferos, como ponto de restrição. Nesse ponto, a célula deve decidir se progride para outro ciclo de duplicação de DNA em função dos estímulos externos. Outros *checkpoints* também agem na mitose, impedindo que a célula se divida antes que todo o DNA tenha sido duplicado e reparado, e outros atuam na fase S prevenindo a duplicação de DNA lesado (Hunter e Pines, 1994).

A transição G1-S e as quinases cdk4,6/ciclina D, cdk2/ciclina E e cdk2/ciclina A

A primeira quinase em mamíferos a ser ativada após as células serem liberadas do estado quiescente G0 é composta pelas várias ciclinas D e por cdk4 ou cdk6, dependendo do tipo celular. Suas atividades catalíticas são primeiramente observadas no meio da fase

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

G1, com um pico máximo próximo à transição G1-S, e podem persistir através dos ciclos subsequentes se os estímulos mitogênicos continuarem presentes, uma vez que a expressão de ciclina D é ativada por fatores de crescimento. Entretanto, se esses fatores forem removidos, o nível de ciclina D cai imediatamente, independente do estágio do ciclo celular (Graña e Reddy, 1995; Sherr, 1996).

Existem três tipos de ciclinas D (D1, D2 e D3), que são em parte específicas para cada tipo celular, com a maioria das células expressando D3 juntamente com D1 ou D2 (Sherr, 1993). A ciclina D1 é codificada pelo gene *CCND1* (*cyclin-D1 gene*) localizado na banda cromossômica 11q13, que tem sido identificado como o protoncogene *PRAD1* (*parathyroid adenomatosis 1*) (Motokura *et al.*, 1991; Inaba *et al.*, 1992). A expressão aumentada da ciclina D1 é observada em diferentes tumores, incluindo carcinoma espinocelular da pele (Mitsunnaga *et al.*, 1995; Michalides *et al.*, 1996; Sutter *et al.*, 1997; Kornmann *et al.*, 1998), e está associada com translocações, inversões, inserções virais e amplificações da região 11q13 (Sherr, 1993; Bringuier *et al.*, 1996; Shimazaki *et al.*, 1997; Arkervall *et al.*, 1998).

A ciclina D2 é codificada pelo gene *CCND2* (*cyclin-D2 gene*) localizado na região cromossômica 12p13 (Inaba *et al.*, 1992; Xiong *et al.*, 1992), que tem sido identificada como o sítio de integração do provírus de leucemia de murinos (*vin-1*), responsável pela expressão aumentada dessa ciclina em neoplasias humanas e de roedores (Hanna *et al.*, 1993; Iolascon *et al.*, 1998). A amplificação e os rearranjos dessa região e da região 6p21 onde está mapeado o gene que codifica a ciclina D3 (Inaba *et al.*, 1992; Motokura *et al.*, 1992), também já foram observados em tumores humanos e em doenças linfoproliferativas (Leach *et al.*, 1993; Akasaka *et al.*, 1997; Dal Cin *et al.*, 1997; LaStarza *et al.*, 1998).

Um melhor entendimento do controle do ciclo celular em G1 tem sido obtido do estudo de genes supressores de tumor, cujos produtos interagem com complexos

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

cdk/ciclinas. O produto do gene *RB1*(*retinoblastoma gene*), por exemplo, que está ausente ou inativo em retinoblastomas e em outros tipos de câncer, é um substrato para os complexos cdk/ciclina D (Lewin, 1997).

Em células quiescentes ou durante o início de G1, a proteína pRb, na sua forma hipofosforilada, liga-se aos fatores de transcrição E2Fs (E2F-1, -2, -3 e, -4 e DP-1, -2 e, -3), que parecem ativar positivamente a transcrição de genes responsáveis pela transição para a fase S, incluindo aqueles das ciclinas A e E. Esse "sequestro" de E2F pela pRb garante que as células não iniciem a duplicação do DNA. Várias outras proteínas semelhantes à pRb, incluindo a p107 e a p130 em mamíferos e a RBF em *Drosophila*, também regulam os fatores E2F e são capazes de inibir a entrada na fase S (Levine, 1997; Wang, 1997). No ponto de restrição, ou próximo a ele, a pRb é fosforilada pelas quinases cdk4,6/ciclina D (Figura 1). Essa fosforilação causa, então, a liberação de E2F e, consequentemente, a transcrição dos genes requeridos para a duplicação do DNA (Nevins, 1992). Algumas oncoproteínas virais, tais como o antígeno T do vírus SV40, a proteína E1A do adenovírus e a E7 do vírus do papiloma humano, facilitam a progressão do ciclo celular, em parte pela sua ligação à pRb e pela liberação de E2F (Jansen-Dürr, 1996). É interessante que essas proteínas virais contêm sequências semelhantes à sequência do terminal amino das ciclinas D, sugerindo que esses resíduos devem ser responsáveis pelas ligações com a pRb. Realmente, mutações em ponto no terminal amino das ciclinas impedem que essa ligação ocorra (Dowdy *et al.*, 1993).

Na regulação da transição G1-S, a próxima quinase a ser ativada consiste na cdk2/ciclina E ou A (Figura 1). Ao contrário das ciclinas D, a expressão da ciclina E oscila periodicamente e atinge um nível máximo no estágio G1-S e é degradada em S (Dulic *et al.*, 1992; Koff, *et al.*, 1992). O complexo também fosforila a pRb, o que resulta num controle retroativo positivo, uma vez que o gene da ciclina E é regulado pelo E2F. A

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

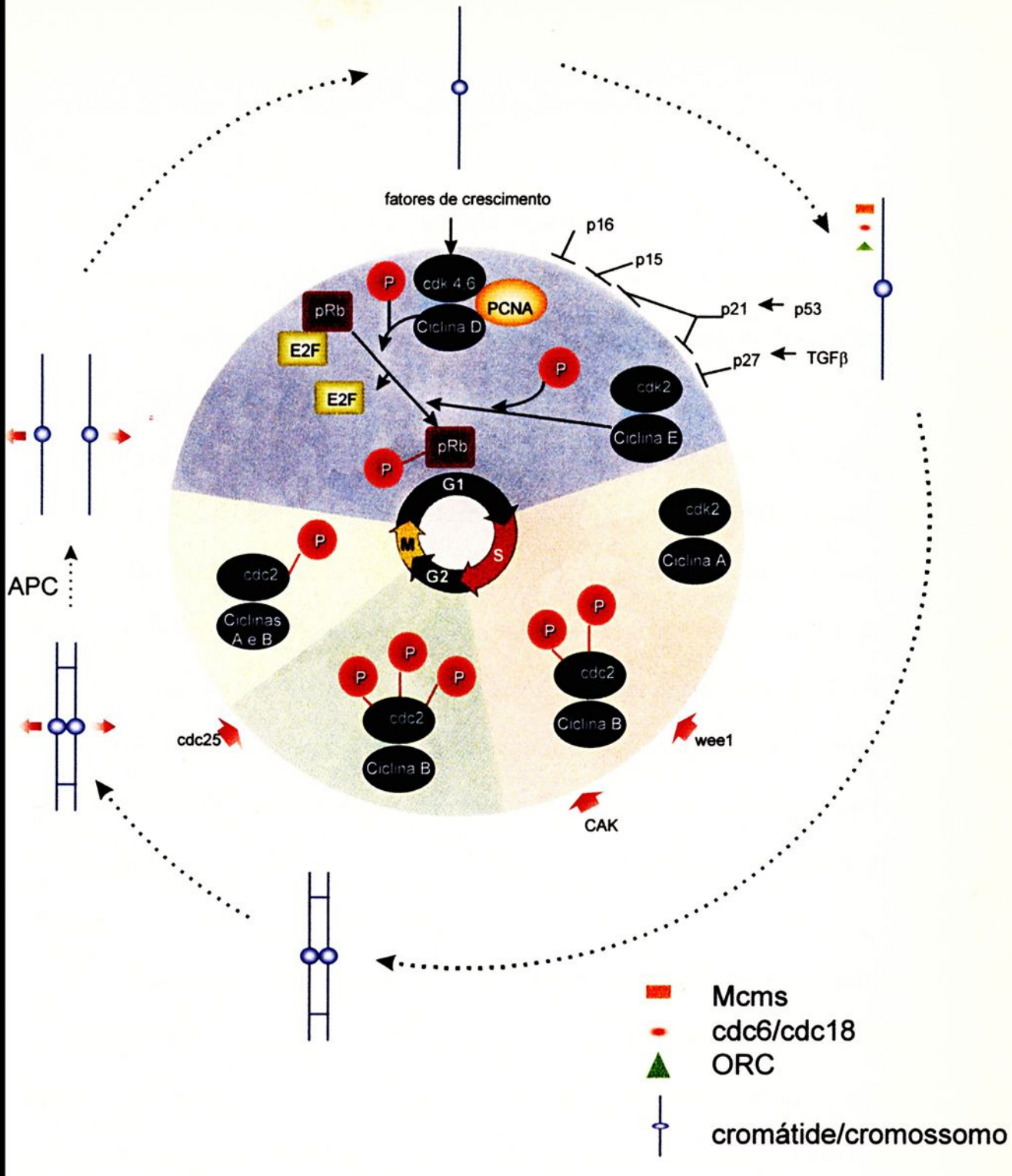


Figura 1. Reguladores que atuam no ciclo celular das células de mamíferos. (G1 = *gap* entre mitose e duplicação do DNA; S = período de síntese do DNA; G2 = *gap* entre a fase S e a mitose seguinte, M = mitose; cdk4,6, cdk2 e cdc2 = quinases dependentes de ciclinas; PCNA = *proliferating-cell nuclear antigen;* pRb = *retinoblastoma gene product*; E2F = fator de transcrição que se liga à pRb; P = fósforo; p16, p15, p21, p27 e p53 = proteínas inibidoras de cdks; TGFβ = *transforming growth factor* β; wee1, CAK e cdc25= proteínas que fosforilam ou desfosforilam cdc2; proteínas Mcms, cdc6/cdc18 e ORC = complexo de pré-duplicação; APC = complexo que promove a anáfase. (Voet e Voet, 1995, com modificações).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

progressão do ciclo, que estava sob a dependência de mitógenos atuando sobre a expressão da ciclina D, passa a ser independente de estímulos externos e dirigida pela ciclina E (Sherr, 1996).

É possível que os fatores E2F também regulem o gene da ciclina A, que forma complexos com a cdk2. Sua síntese é iniciada no final de G1 e é importante para a transição G1-S, pois sua inibição em cultura pode impedir a duplicação do DNA (Girard *et al.*, 1991; Sherr, 1996).

Alterações nos genes das ciclinas E e A também já foram observadas em alguns tumores humanos (Courjal *et al.*, 1996; Sherr *et al.*, 1996; Chao *et al.*, 1998). A ciclina E é expressa de forma aberrante em neoplasias benignas e pré-malignas da pele, em carcinomas de mama, cólon , endométrio, fígado e em leucemias linfocíticas (Gray-Bablin *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Yasui *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Bito *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*,1997; Erlanson *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998). Tal expresssão parece ser simplesmente resultante da falha da degradação da ciclina E por proteólise, pois não existem evidências de que seu gene e o da ciclina A atuem como protoncogenes (Sherr, 1996).

Os complexos cdk/ciclina E e cdk/ciclina A têm como substrato proteínas relacionadas com a duplicação do DNA e alguns já foram observados em áreas nucleares ligadas a esse processo (Cardoso *et al.*, 1993). Além disso, estudos recentes em leveduras e anfíbios sugerem que as quinases da fase S realmente disparam o início da duplicação do DNA, que é dependente da ativação de complexos protéicos ligados ao ácido nucléico, nos pontos de origem de duplicação. Esses complexos são chamados de pre-Rec (complexo de pré-duplicação) e são compostos por três blocos protéicos: o complexo ORC ou de reconhecimento da origem, a cdc6/cdc18 e as proteínas Mcms (Figura 1). As quinases da fase S provavelmente participam dessa ativação, dada sua associação física com o

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

complexo pre-Rec e a presença de múltiplos sítios de fosforilação em ORC (Heichman e Roberts, 1994; Wuarin e Nurse, 1996). Uma outra proteína quinase, a Cdc7-Dbf4 (ou DDK, quinase dependente de Dbf4) também deve atuar nessa etapa pois interage com o complexo ORC e com a origem de duplicação (Stillman, 1996).

Após a síntese de DNA, as quinases da fase S e certas enzimas proteolíticas que degradam cdc6 impedem a montagem de um novo complexo pre-Rec (Stillman, 1996; Wuarin e Nurse, 1996). As quinases da fase M participam igualmente desse bloqueio, o que significa que o DNA não será novamente duplicado até a degradação das ciclinas envolvidas, que ocorrerá somente no final da mitose (Nasmyth, 1996).

A fase M e a quinase cdc2/ciclina B

A ativação da quinase da fase M é o evento que dispara o início da mitose e requer a fosforilação da subunidade catalítica cdc2 e sua ligação com a ciclina B. Sua inativação, ao contrário, é necessária para a saída da fase M e depende da destruição da subunidade regulatória por proteólise. Em células que estão em atividade proliferativa, o nível de cdc2 mantém-se constante durante todo o ciclo mas sua ciclina está presente apenas durante a mitose ou imediatamente antes dela, o que indica ser regulada por um mecanismo postranscricional após sua síntese na fase S (Sherr,1993; King *et al.*, 1994). Existem evidências de que uma segunda ciclina (ciclina A) acompanha a periodicidade da ciclina B e que interage com cdc2, mas os dados em mamíferos são escassos (Sherr, 1993; Graña e Reddy, 1995; Baldin *et al.*, 1997).

O início da mitose é, então, sinalizado pela ativação do complexo cdc2/ciclina B (Figura 1). Esse complexo acumula-se no estado inativo durante as fase S e G2, o que é conseguido através da fosforilação de cdc2 nos aminoácidos tirosina Tyr-15 e treonina Thr-14 pela proteína wee1. No final de G2, a fosfatase cdc25, ela própria regulada por padrões complexos, desfosforila esses resíduos e ativa cdc2 através de um *feedback*

positivo (King *et al.*,1994; Morgan, 1995; Lewin, 1997). Além da perda de fosfatos nos dois resíduos, a cdc2 é fosforilada na treonina Thr-161 por uma enzima denominada CAK (quinase ativadora de cdc2). Essa enzima também é uma quinase com homologia às cdks, cuja subunidade catalítica é a Cdk7 ou MO15 e a subunidade regulatória é a ciclina H (Fisher e Morgan, 1994).

Uma vez ativada a quinase, vários eventos da fase M, incluindo condensação dos cromossomos, reorganização do citoesqueleto, desagregação do envelope nuclear e modificações no formato da célula, são desencadeados. É provável que a quinase aja diretamente em proteínas envolvidas na alteração da estrutura celular. Muitas dessas proteínas são fosforiladas *in vitro* pela enzima e, entre elas, podem ser citadas as histonas H1, necessárias para a condensação dos cromossomos, e as laminas do envelope nuclear (Nurse, 1990; Lewin, 1997).

A inativação da quinase após a mitose depende da atuação de um sistema proteolítico mediado por ubiquitina, que induz a destruição de proteínas, incluindo as ciclinas. A ubiquitina é uma proteína altamente conservada, que pode reagir covalentemente com resíduos de lisina de proteínas instáveis através de ligações isopeptídicas, e fornece, assim, alvos para degradação por proteases (Glotzer *et al.*, 1991; King *et al.*, 1996).

Alguns estudos recentes têm identificado um complexo de subunidade múltipla, conhecido como APC (complexo que promove a anáfase) ou ciclossomo, que é essencial para a separação cromossômica durante a anáfase e também para a destruição das ciclinas da fase M (Figura 1). O APC cataliza a ubiquitinação de proteínas que contêm, em seu terminal amino, uma região conservada de nove aminoácidos denominada *destruction box*. Essas proteínas incluem os inibidores de anáfase Pds1 e Cut2, em leveduras, e a ciclina B, que é universalmente requerida para a saída da telófase. O mecanismo de ativação do APC

não é bem conhecido, mas sabe-se que esse processo ocorre somente após a fosforilação da cdk da fase M e é mantido durante o período G1 subsequente, sendo depois desligado pelo acúmulo de quinase da fase G1 (King *et al.*, 1996; Nasmyth, 1996).

A proteólise de ciclinas da fase M e dos inibidores de anáfase pelo complexo APC libera a montagem do pre-Rec, já citado anteriormente, necessário para a posterior entrada em S. Essa proteólise pode ser a essência do mecanismo pelo qual as células dos eucariotos garantem que uma nova duplicação dos cromossomos não aconteça antes da separação das cromátides irmãs sintetizadas na fase S anterior (Nasmyth, 1996).

O bloqueio do ciclo celular, as proteínas inibidoras de cdks e a p53

Os complexos cdk/ciclinas são regulados negativamente por proteínas conhecidas como inibidores de cdk (CDKIs) (Hirama e Koeffer, 1995), que impedem a progressão do ciclo celular em parte por prevenir a fosforilação da pRb (Lewin, 1997).

Em mamíferos, têm sido identificadas duas classes de CDKIs: as proteínas Ink4 (p16, p15, p18 e p19), e a família de proteínas p27 (*KIP1*), p57 (*KIP2*) e p21 (*CIP1/WAF1/CAP20/SDI1*) (Morgan, 1995) (Figura 1).

As proteínas Ink4 são inibidores específicos de cdk4 e cdk6, que controlam diretamente a atividade quinase dependente de ciclina D e indiretamente a fosforilação da pRb (Serrano *et* al., 1993; Sherr, 1994). O gene *p16* (também conhecido como *MTS1* ou *CDKN2*) e o *p15* (conhecido como *MTS2*) são adjacentes e localizados na banda cromossômica 9p21 (Hannon e Beach, 1994). O locus *p16* está rearranjado, deletado ou mutado na maioria das linhagens celulares tumorais e associado à tumorigênese de uma variedade de neoplasias, incluindo o melanoma familial (Hunter e Pines, 1994; Larsen, 1996; Piccinin *et al.*, 1997). A deleção do locus *p15* já foi observada juntamente com a deleção *p16* em melanomas malignos, sugerindo também a sua participação no desenvolvimento dessa neoplasia (Wagner *et al.*, 1998). Dados recentes têm mostrado que

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

os outros membros da família Ink4 estão igualmente mutados em câncer humano (Easton *et al.*, 1998; Roesler *et al.*, 1998).

Um outro regulador da progressão de G1 é a proteína p27, que foi primeiramente identificada como um inibidor do complexo cdk2/ciclina E na linhagem de células epiteliais de pulmão Mv1Lu, sendo induzida por inibição de contato celular ou pelo fator TGFβ (*transforming growth factor* β) (Graña e Reddy, 1995; Hirama e Koeffler, 1995). O TGFβ é um fator de crescimento negativo, pois inibe a proliferação em muitos tipos celulares, atuando direta ou indiretamente sobre os reguladores da transição G1-S, incluindo cdk2, cdk4 e ciclinas A e E, e sobre a fosforilação da proteína pRb (Geng e Weinberg, 1993).

A proteína p27, na fase inicial do ciclo celular, interage com os complexos cdk4/cdk6/ciclina D. Quando as células são expostas ao TGFβ, a síntese de cdk4 é bloqueada por esse fator, resultando num aumento do nível de p27 "livre". Em consequência, o número de moléculas disponíveis para a ligação com a cdk2/ciclina E é maior e suficiente para a inibição do complexo (Ewen *et al.*, 1993, Sherr, 1994).

Um outro membro da família dos CDKIs é a proteína p57. Tal proteína pode interagir com vários complexos cdk/ciclinas e sua expressão elevada também bloqueia o ciclo celular em G1 (Graña e Reddy, 1995). Nessa fase, a proteína supressora de tumor p53 é, sem dúvida, um componente importante no controle da progressão do ciclo celular. A expressão dessa proteína é induzida em células com danos no DNA, o que resulta na ativação de genes dependentes de p53. Entre eles, está o gene *WAF1/CIP1/SID1* (Mr 21.000 *protein/potent inhibitor of ciclin dependent kinases*) que codifica a proteína $p21^{WAF1}$, um potente CDKI (Xiong *et al.*, 1993).

Em células normais, a proteína $p21^{WAF1}$ liga-se a diferentes quinases, como cdk4/D1, cdk2/E, cdk2/A e cdc2/A. Os complexos contendo uma única molécula de

$p21^{WAF1}$ são ativos cataliticamente, enquanto aqueles contendo moléculas múltiplas inibem a sua função. A $p21^{WAF1}$ também associa-se ao PCNA (*proliferating-cell nuclear antigen*), que é um componente da DNA polimerase δ e participa da duplicação e reparo do DNA (Laskey, *et* al., 1989; Sherr, 1994). Nesse caso, a $p21^{WAF1}$ bloqueia a síntese do DNA pela inativação de PCNA (Flores-Rozas *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994) mas não o papel desse antígeno em reações de reparo (Li *et al.*, 1994). Provavelmente, tais reações são estimuladas pelo produto de outro gene que também é sintetizado mediante estímulo da p53 normal em células expostas ao stresse, conhecido como *GADD45* (*growth arrest and DNA damage gene*), e que interage com o PCNA (Marx, 1994).

O nível de $p21^{WAF1}$ é controlado diretamente pela proteína p53, o que indica um mecanismo pelo qual essa última modula, e possivelmente coordena, a progressão do ciclo celular e a duplicação do DNA (El-Deiry *et al.*, 1993). Quando a expressão da p53 é estimulada após um dano no DNA por luz ultravioleta, raios γ ou agentes químicos, a transcrição do gene *WAF1* é ativada e consequentemente o nível de $p21^{WAF1}$ é elevado. Esse aumento resulta na inibição dos complexos cdk4/ciclina D e cdk2/ciclina E, bloqueando as células em G1 para reparo do DNA pré-duplicado e impedindo desse modo que aquelas com danos no material genético iniciem a fase S (Lu e Lane, 1993; Xiong *et al.*, 1993; Hunter e Pines, 1994).

A apoptose e a proteína p53

Em situações em que o dano no DNA não é reparado, a p53 estimula as células a sofrerem apoptose para impedir a propagação desses danos (Bellamy, 1997).

Embora os mecanismos pela qual a proteína p53 induz a apoptose não estejam bem esclarecidos, alguns estudos sugerem expressão de vários efetores secundários envolvidos nesse processo (Hetts, 1998). A transativação do gene *BAX* causa a elevação no nível do seu produto bax, cuja ação é indutora da apoptose. A apoptose mediada por *BAX* tem a

participação do gene *BCL2* (*B-cell leukemia/lymphoma-2*), que codifica uma proteína citoplasmática de 26 kD associada à membrana. Tal proteína difere dos produtos de outros protoncogenes por funcionar aumentando a sobrevivência de células, ao invés de promover seu crescimento. Esse aumento é atríbuído à capacidade da bcl2 bloquear a apoptose. A inibição da apoptose pela bcl2 pode ocorrer em qualquer estágio do ciclo celular, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão definidos. Entretanto, sabe-se que a p53 pode funcionar como repressora transcricional do *BCL2* e como ativadora do *BAX* e que provavelmente a sobrevida ou a morte celular é determinada pelo equilíbrio bcl2/bax (Hoffman e Liebermann, 1994; Delfino *et al.*, 1997).

A proteína p53 também pode ligar-se à região promotora do gene *FASR* (*cell surface receptor Fas)* e resultar na indução da expressão de seu produto FasR/Apo-1 (Sheard, 1997). O antígeno FasR/APO-1 é uma proteína transmembrânica pertencente à família dos receptores para o fator de necrose tumoral (TNFα = *tumor necrosis factor - alpha*), que possui a capacidade de, quando ligada ao anticorpo específico, induzir a apoptose, possivelmente utilizando uma das vias de quinases dependentes de ciclinas (Delfino *et al.*, 1997; Wiman, 1997).

A transativação do gene *IGF-BP3* (*insulin-like growth factor binding protein 3*) pela p53 e consequentemente a expressão elevada do seu produto pode bloquear o sinal de sobrevivência mediado por IGF e, então, levar à apoptose (Wiman, 97). Outros genes, além dos já citados, são induzidos por p53 e podem atuar no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio também levando à apoptose (Polyak *et al.*, 1997).

unesp

I.2. Exposição solar, p53 e câncer de pele

A luz solar é sabidamente um dos mais importantes fatores etiológicos da tumorigênese cutânea, sendo a radiação ultravioleta (UV) o seu componente mais estreitamente relacionado com esse processo (Grossman e Leffel, 1997, Kraemer, 1997).

Estudos epidemiológicos realizados em diferentes países têm revelado uma correlação positiva entre incidência de carcinomas baso e espinocelulares e exposição solar, bem como relação inversa com grau de pigmentação da pele. De fato, a frequência de carcinomas cutâneos é maior em regiões do corpo expostas ao sol de pessoas de pele clara e aumenta com o decréscimo da latitude (Corona, 1996; Franceschi *et al.*, 1996; Strom e Yamamura, 1997). Além disso, pessoas que manifestam eritema e dificilmente se bronzeiam apresentam risco aumentado de desenvolver esse tipo de neoplasia (Kricker *et al.*, 1995; Naylor, 1997), do mesmo modo que aquelas com idades avançadas, sugerindo efeito cumulativo do agente indutor (Franceschi *et* al., 1996).

No nível molecular, os danos da luz UV no DNA já estão bem estabelecidos, sendo as pirimidinas, mais do que as purinas, os principais alvos das fotorreações, que levam à formação de dímeros de ciclobutano e fotoprodutos 6-4 numa proporção aproximada de 9:1, respectivamente (D'Errico *et al.*, 1996; Whittaker, 1996).

Os dímeros de ciclobutano são formados pelas ligações 5,6 de duas pirimidinas adjacentes, enquanto os fotoprodutos 6-4 possuem uma ligação covalente entre as posições 6 e 4 de duas pirimidinas (Figura 2) e ambos são capazes de bloquear a duplicação do DNA. Acredita-se que a polimerase, quando encontra fotoprodutos durante o processo de síntese do ácido nucléico, é bloqueada e os dímeros eventualmente são eliminados pelo reparo por excisão (D'Errico *et* al., 1996; Hall *et al.*, 1996). A remoção dos danos genéticos por esse mecanismo representa uma estratégia molecular vital utilizada pelas

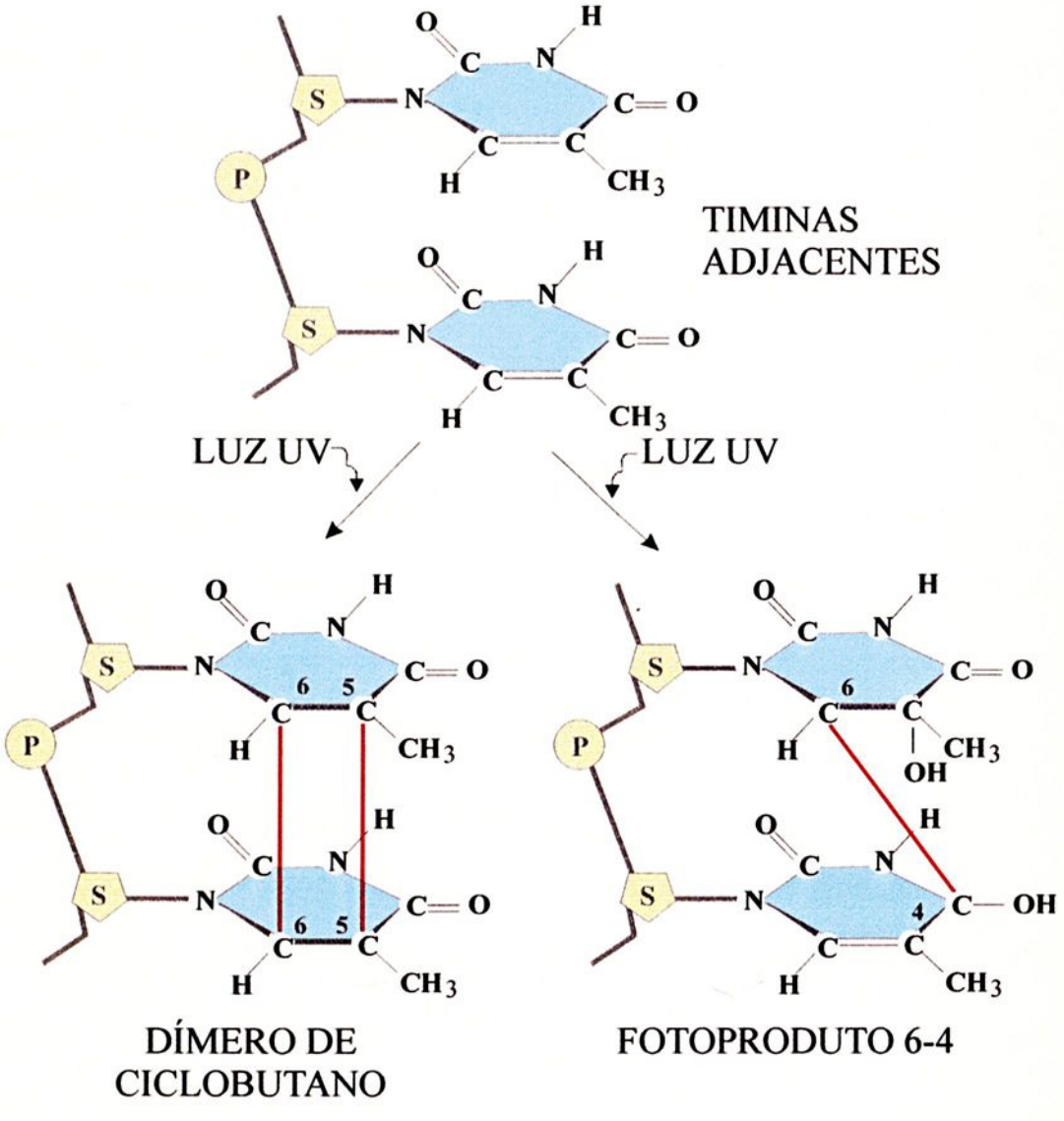


Figura 2. Formação de dímero de ciclobutano e de fotoproduto 6-4 induzida pela radiação ultravioleta (UV). (Lehninger *et al.*, 1993, com modificações).

células de mamíferos para neutralizar os efeitos genotóxicos e carcinogênicos provocados pelos agentes ambientais, incluindo a luz solar (Sage *et al.*, 1996). De fato, a importância fisiológica desse reparo é exemplificada pela doença autossômica recessiva denominada Xeroderma Pigmentoso (XP), na qual os indivíduos afetados manifestam sensibilidade à luz solar, envelhecimento prematuro e alta frequência de ceratoses actínicas e câncer de pele em áreas expostas, provavelmente em virtude da incapacidade enzimática para corrigir lesões do DNA causadas pela exposição à UV (Gherardini *et al.*, 1997). Tem sido sugerido que indivíduos jovens fenotipicamente normais com predisposição a carcinomas basocelulares, que é comum em idades avançadas, também apresentam sistemas de reparo alterados (Wei *et al.*, 1993).

Estudos moleculares, utilizando enzimas dímero-específicas, já determinaram que a razão de reparo dos dímeros de ciclobutano induzidos por UV em fibroblastos irradiados é mais lenta em sequências gênicas que são frequentemente mutadas em câncer de pele. Esses resultados sugerem que a deficiência dessas enzimas pode contribuir para mutações associadas ao câncer (Tornaletti e Pfeifer, 1994).

A origem das mutações induzidas por UV nos sítios de dipirimidinas pode ser decorrente da alta frequência de desaminação da citosina do dímero com formação de uma uracila que, exceto pelo grupo metil, é idêntica à timina. Essa é a razão pela qual a presença de citosina no dímero faz com que a polimerase incorpore geralmente uma adenina na fita oposta ao sítio de pirimidina. Isso resulta na transição C>T (citosina para timina) quando a pirimidina é uma citosina (Figura 3), mas, quando é uma timina, o mesmo não ocorre porque a adenina é pareada corretamente (Taylor, 1994; D'Errico *et al.*, 1996). Portanto, as principais lesões pré-mutagênicas são representadas pelos dímeros T<>C, C<>T e C<>C; enquanto o dímero T<>T não resulta em mutação desse tipo (D'Errico *et al.*, 1996).

unesp

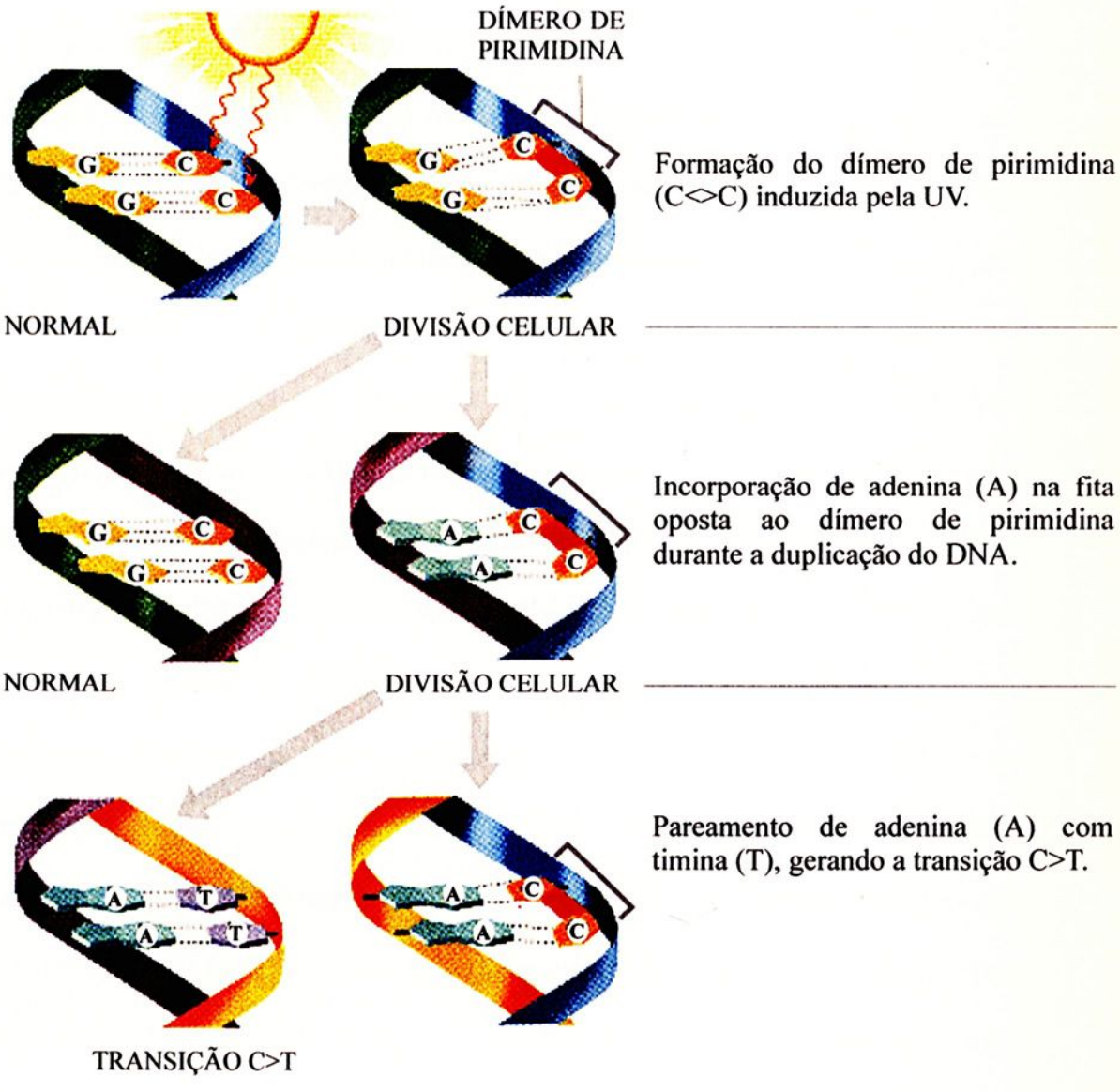


Figura 3. Transição C>T (citosina para timina) causada pela luz ultravioleta (UV). (Leffel e Brash, 1996, com modificações).

Substituições C>T , além do tipo CC>TT em sítios de dipirimidinas são frequentemente observadas no gene supressor de tumor *TP53* em vários tumores cutâneos humanos induzidos por UV (De Gruijl, 1994; Basset-Séguin *et al.*, 1994; Matsumura *et al.*, 1996; D' Errico *et al.*, 1997; Dumaz *et al.*, 1997; Pontén *et al.*, 1997).

O gene *TP53* está localizado na banda p13 do cromossomo 17 humano e corresponde a uma sequência de 20 kb com 11 exons (Isobe *et al.*, 1986; Levine *et al.*, 1994; Sidransky e Hollstein, 1996). A fosfoproteína nuclear de 53 kD codificada por ele contém 393 aminoácidos e tem sido dividida em três domínios principais de acordo com sua função e estrutura: região amino-terminal, carboxi-terminal e central. A região amino-terminal, em geral a menos conservada durante a evolução, constitui o domínio de ativação transcricional e contém sítios de ligação para a proteína de 55K do adenovírus E1B e para o produto do gene *MDM2* (*murine double minute 2 gene*), que regulam negativamente a ativação transcricional da p53 (Lane, 1994; Levine, 1997, Xiao *et al.*, 1998). A região carboxi-terminal contém um domínio necessário para oligomerização da proteína, sequências que sinalizam o transporte da p53 para o núcleo da célula e sítios de ligação ao DNA em sequências não específicas (Hartmann *et al.*, 1995; Arrowsmith e Morin, 96). Finalmente, a região central, altamente conservada durante a evolução, liga-se ao DNA em sequências específicas permitindo, desse modo, a transcrição de genes que contêm sítios de ligação a ela (Wang e Harris, 1997). Essa região também contém um sítio de ligação para o antígeno T do vírus SV40 (Lane, 1994).

Ao contrário da p53 normal, que é normalmente instável devido ao seu curto tempo de vida, a p53 mutante pode ser detectada por técnicas imuno-histoquímicas porque é degradada mais lentamente, o que resulta em seu acúmulo nas células (McNutt *et al.*, 1994). Embora os mecanismos de estabilização da proteína não estejam claros, podem envolver mutações em regiões codificadoras até alterações em outras proteínas que afetam

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

seu tempo de vida, ou ainda numa possível fosforilação anormal e alterações na sua conformação e oligomerização. Também podem decorrer de sua ligação com alguns produtos virais e celulares, tais como o antígeno T do vírus SV40, as proteínas do adenovírus Eb1 e do vírus do papiloma humano, além das proteínas do choque térmico de 70 kD, bem como do produto gênico mdm2 (Lee *et al.*, 1994; Sidransky e Hollstein, 1996; Blagosklonny, 1997).

A relação entre estabilização e mutação, entretanto, é discutível, porque a expressão elevada e a imunodetecção também podem ser observada no caso da proteína normal (McNutt *et al.*, 1994; Blagosklonny, 1997). Por exemplo, um estudo realizado por Hall *et al.* (1993) mostrou que a exposição *in vivo* da pele à luz UV induz o aparecimento imediato da proteína p53 normal principalmente na epiderme, mas também nos fibroblastos dérmicos e células epiteliais de estruturas anexas. A coloração imuno-histoquímica foi observada no prazo de duas horas após a exposição e retornou a níveis não detectáveis depois de 360 horas. Os autores sugeriram que o aumento no nível da proteína normal seria responsável por um bloqueio temporário do ciclo celular em G1, o que permitiria uma resposta ao estresse por um mecanismo de reparo do DNA semelhante à resposta SOS observada em procariotos. Esse atraso no ciclo, como citado anteriormente, preveniria mutações permanentes durante a replicação do material genético. A ausência dessa proteção, portanto, poderia desestabilizar o genoma e contribuir para a malignização (Hartwell, 1992; McNutt *et al.*, 1994).

A perda da função normal da p53 está associada à transformação celular *in vitro* e ao desenvolvimento de neoplasias *in vivo* (Chang *et al.*, 1993). De fato, as anormalidades no gene *TP53* estão entre as mais frequentes em condições malignas humanas esporádicas, incluindo aquelas de origem epitelial, mesenquimal, hematopoética, linfóide e do sistema nervoso central. Mutações na linhagem germinativa também têm sido descritas em

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

famílias com a síndrome Li-Fraumeni e parecem predispor os portadores ao desenvolvimento de um ou mais tumores (Hollstein *et al.*, 1991; 1994).

Diferentes estudos indicam que as mutações do gene *TP53* ocorrem frequentemente nos exons 5 a 8, sequências essas altamente conservadas durante a evolução, e que a natureza ou o tipo da mutação depende da origem do tecido (Levine, 1993; Pfeifer e Holmquist, 1997). Em carcinomas, por exemplo, a maioria delas resulta de alteração em uma ou algumas bases de um dos alelos, com perda do outro alelo. Em sarcomas, todavia, deleções, inserções e rearranjos gênicos são mais comuns e mutações em ponto são raras (Levine, 1993).

Dados recentes mostram que o padrão de mutação do *TP53* pode refletir o tipo de carcinógeno envolvido. Por exemplo, transversões de guanina (G) para timina (T) ocorrem frequentemente em cânceres de pulmão e esôfago, bem como de cabeça e pescoço, que são particularmente relacionados com o consumo de fumo. Transições nos dinucleotídeos CpG são observadas em muitas neoplasias, mas a mutação no códon 249 predomina em carcinomas hepatocelulares de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite B (HBV) e expostos à aflatoxina. Substituições em sequências dipirimidínicas, em especial de base única (citosina para timina), têm sido significativamente associadas à radiação UV e são frequentes em carcinomas de pele (Hollstein *et* al., 1997; Pfeifer e Holmquist, 1997). Tais alterações já foram observadas em carcinomas basocelulares e espinocelulares provenientes de indivíduos normais ou com XP (Brash *et al.*, 1991; Rady *et al.*, 1992; Dumaz *et al.*, 1993; Molès *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1993; van der Riet *et al.*, 1994; D'Errico *et al.*, 1997; Pontén *et al.*, 1997), bem como em linhagens celulares de carcinomas espinocelulares (Gusterson *et al.*, 1991; Burns *et al.*, 1993) e em lesões pré-malignas, como carcinomas espinocelulares *in situ* (Campbell *et al.*, 1993b). Esses resultados são concordantes com os dados imuno-histoquímicos obtidos na investigação da

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

presença de formas alteradas da proteína p53 nesses tumores (McNutt *et al.*, 1994), que mostram imunorreatividade entre 21-74% para as ceratoses solares, 8% a 61% para os carcinomas espinocelulares e 10% a 92% para os basocelulares (Gusterson *et al.*, 1991; Barbareschi *et al.*, 1992; McGregor *et al.*, 1992; Shea *et al.*, 1992; Sim *et al.*, 1992b; Slater *et al.*, 1992; Stephenson *et* al., 1992; Urano *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 1993a; Helander *et al.*, 1993; Molès *et al.*, 1993; Nagamo *et* al., 1993; Ro *et al.*, 1993; Taguchi *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993; Kershman *et al.*, 1994; Kubo *et al.*, 1994; Oran *et al.*, 1994; Kay *et al.*, 1996).

Uma imunopositividade nuclear tem sido claramente observada em zonas proliferativas menos diferenciadas do tumor, sugerindo uma possível correlação entre expressão da proteína p53 e comportamento da neoplasia (Gusterson *et al.*, 1991; Slater *et al.*, 1992; Nagamo *et* al., 1993; Oran *et al.*, 1994). Entretanto, alguns estudos mostram que a expresssão elevada não reflete o grau de malignidade do tumor, uma vez que frequências altas de imunopositividade foram observadas em lesões benignas e pré-malignas (Sim *et al.*, 1992a;b; McGregor *et al.*, 1992; Szekeres e Giacomoni, 1994; Taguchi *et al.*, 1994; Onodera *et al.*, 1996). Esses autores sugeriram que a mutação pode ocorrer durante os estágios iniciais da tumorigênese, embora existam resultados contrários a essa hipótese (Kubo *et al.*, 1994), além do fato dos dados imuno-histoquímicos nem sempre corresponderem à presença de mutação (Campbell *et al.*, 1993a).

As investigações em melanoma cutâneo, ao contrário dos carcinomas epiteliais, são confusas e contraditórias (Castresana *et al.*, 1993; McNutt *et al.*, 1994; Asklen *et al.*, 1998). Alguns estudos imuno-histoquímicos sugerem que o produto do gene *TP53* possui papel importante no desenvolvimento metastático dessa neoplasia (Strech *et al.*, 1991; McGregor *et al.*, 1993; Yamamoto e Takahashi, 1993). Outros, ao contrário, detectaram positividade em lesões benignas (Cristofolini *et al.*, 1993) ou não encontraram qualquer

correlação entre sua expressão, que parece ser baixa (Ro *et al.*, 1993), e o aparecimento de metástases (Askslen e MØrkve, 1992; Castresana *et al.*, 1993; Montano *et al.*, 1994). Além disso, imunorreatividade elevada também foi correlacionada com melhor sobrevida dos pacientes (Essner *et* al., 1997).

A expressão aumentada da proteína p53 também tem sido frequentemente observada em regiões do organismo expostas ao sol, sugerindo um papel da luz UV nesse tipo de neoplasia (Straume e Akslen, 1997; Whiteman *et al.,* 1998). Por outro lado, alguns estudos moleculares em melanomas malignos provenientes de portadores normais e com XP não detectaram qualquer mutação (Castresana *et al.*, 1993; Dumaz *et al.*, 1993), mas outros relataram substituições de citosina por timina (C>T), bem como outros tipos de alterações (Weiss *et al.*, 1993; Asklen *et al.*, 1998). Tais achados dificultam o estabelecimento do papel do gene *TP53* em melanomas.

Apesar de escassos, alguns estudos imuno-histoquímicos já detectaram a presença da proteína p53 mutante em células cultivadas provenientes de amostras aparentemente normais de áreas expostas à luz solar e sua ausência naquelas de áreas protegidas (Shea *et al.*, 1992; McNutt *et al.*, 1994). A análise do gene por sequenciamento em culturas de ceratinócitos irradiados por UV também mostrou substituições do tipo CC>TT similares àquelas encontradas em tumores cutâneos e com frequências dose-dependentes (Tornaletti *et al.*, 1993; Nakazawa *et al.*, 1994). Transições CC>TT foram igualmente detectadas em biópsias de pele normal exposta ao sol e menos frequentemente naquelas de pele não exposta de indivíduos australianos, mas não foram observadas naquelas provenientes de sítios não expostos de indivíduos franceses (Nakazawa *et al.*, 1994). Esse mesmo tipo de mutação (CC>TT) também foi observado em pele normal exposta ao sol, mas foi ausente naquelas provenientes de áreas não expostas de indivíduo com XP (Williams *et* al., 1998). Clones de ceratinócitos, que têm origem na junção dermo-epidérmica e em folículos

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

pilosos, também apresentam mutação do tipo C>T. É interessante que, em pele exposta ao sol, esses clones mutantes são maiores e mais frequentes do que em áreas não expostas, sugerindo que a luz solar pode agir como um promotor favorecendo a expansão de células já alteradas (Jonason *et al.*, 1996). De acordo com essa hipótese estão os achados de imunorreatividade com um padrão compacto, que reflete a multiplicação clonal de ceratinócitos mutantes e reforça a idéia de que tal evento é precoce durante a transformação maligna (Ren *et al.*, 1996a). É interressante que a análise de ceratinócitos adjacentes a tumores de pele, embora com mutações em *TP53*, nunca mostraram o mesmo tipo de alteração do tumor, o que parece excluir esses eventos como precursores do câncer (Ren *et al.*, 1996b).

De qualquer modo, não existem dúvidas de que as formas mutantes de p53 observadas em tumores e também vistas em pele normal são induzidas pela radiação solar. Além disso, não devem ser detrimentais por si só, mas contribuem indiretamente para a instabilidade genética no tecido lesado (Ren *et al.*, 1996b). Um exemplo dessa instabilidade é a presença de inúmeras aberrações cromosômicas em carcinomas e em alguns tumores benignos e pré-malignos cutâneos, bem como em pele normal de pessoas idosas (Mertens *et al.*, 1992; Kawasaki *et al.*, 1991; Kawasaki-Oyama *et al.*, 1994; Pavarino *et al.*, 1995; 1997).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

II. OBJETIVOS

Em vista do exposto e da escassez de dados sobre alterações do gene *TP53* em pele normal e neoplásica na população brasileira, foi proposto o presente trabalho, que teve como objetivos:

1. Identificar regiões cromossômicas que podem conter genes ativados por quebras cromossômicas resultante de instabilidade genômica.

2. Avaliar as técnicas utilizadas para extração de DNA de tecidos parafinados e os fatores que afetam a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) usadas para rastreamento de mutações no gene *TP53*.

3. Investigar mutações no gene supressor de tumor *TP53* em pele normal exposta e não exposta à luz solar.

4. Investigar mutações no gene supressor de tumor *TP53* em tumores cutâneos que já haviam sido analisados para expressão elevada da proteína p53 por método imuno-histoquímico.

unesp

III. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

Chromosome Breakpoint Distribution in Nonmelanoma Skin Cancers

Érika C. Pavarino, Andréa R. B. Rossit, and Eloiza H. Tajara

ABSTRACT: *We have identified chromosome regions that may be sites of genes activated as a result of chromosomal rearrangements observed in 61 of the 86 skin tumors referenced in the literature. The data showed that most of the breakpoints were distributed throughout the genome and some tended to cluster. Highest frequencies of breakpoints were observed in chromosomes with high relative length, except chromosomes 14 and 15 that were more often affected in malignant tumors, despite their size. Our work provides a starting point for more detailed studies that may allow identification of these genes as important keys in the development and progression of skin cancers.* © *Elsevier Science Inc., 1997*

Nonmelanoma skin cancers are common tumors whose incidence is currently increasing in caucasian populations [1–3]. These include two types: basal cell carcinomas (BCCs) and squamous cell carcinomas (SCCs), both keratinocyte-derived tumors that show marked differences in biological behavior. BCCs are typically slow growing, locally invasive tumors that rarely metastasize. By contrast, SCCs tend to be faster growing, locally invasive tumors with distinct metastatic potential [4]. SCCs frequently develop on sun-exposed, traumatized, or chronically inflamed body sites. Furthermore, SCCs may develop from either pretumoral precursor lesions, such as actinic keratosis, or from in situ carcinomas commonly termed Bowen diseases (BWDs). On the other hand, although BCCs occur predominantly on the face, they can also be found on nonsun-exposed body sites and apparently develop spontaneously [1].

Epidemiologic and experimental data strongly implicate ultraviolet (UV) light as an important factor in the development of skin cancers. It is known that UV radiation induces the formation of pyrimidine dimers and other photoproducts that lead to mutations, mainly C→T or CC→TT transitions [5–7]. Several reports have revealed such mutations at dipyrimidine sequences in the RAS oncogenes and in the p53 tumor suppressor gene in SCCs and BCCs [4]. In fact, some data have shown that p53 mutations seem particularly more prevalent in nonmelanoma skin cancer than RAS mutations [8].

The precise function of p53 still needs to be clarified, but it appears to be associated with cell cycle arrest (G1 arrest) after a genotoxic insult, which gives DNA repair processes more time before the cell proceeds to replicate DNA in the S-phase. A high level of p53 protein is also associated with apoptosis, which would prevent an excessively damaged genome from entering into or proceeding with S-phase. A disfunctioning p53 could therefore result in genetic instability of the cell, which could facilitate subsequent mutations and progression toward malignancy [9].

It is interesting that skin tumors exhibit a high frequency of clonal and nonclonal chromosomal aberrations, which may reflect a genetic instability. There is a marked diversity of these chromosomal abnormalities. Most are structural, balanced rearrangements occurring in multiple, unrelated clones. Also, there is an intriguing abundance of nonclonal structural aberrations, probably from small neoplastic clones, occurring in a minor part of the total cells of the tumor. A similar karyologic pattern has also been detected in benign lesions and nonneoplastic skin samples derived from exposed and protected areas, most of them taken from elderly people [10–12]. Therefore, it seems that such abnormalities consist in one of the first steps to malignancy or reflect the genetic instability caused by a basic molecular defect, e.g., in p53 gene, related to carcinogenic agents. However, genetic instability and p53 mutations are the most common findings in other human cancers, but their karyotypic patterns are, in general, completely different from the skin pattern. Thus, what is the significance or the role of multiple rearrangements in cutaneous carcinogenesis?

To identify chromosome regions that may be sites of genes activated as a result of chromosome breakage, breakpoints observed in 61 skin tumors (52 malignant and 9 benign) from primary culture were plotted on an ideogram [11, 13–27, Heim and Mertens, personal communication].

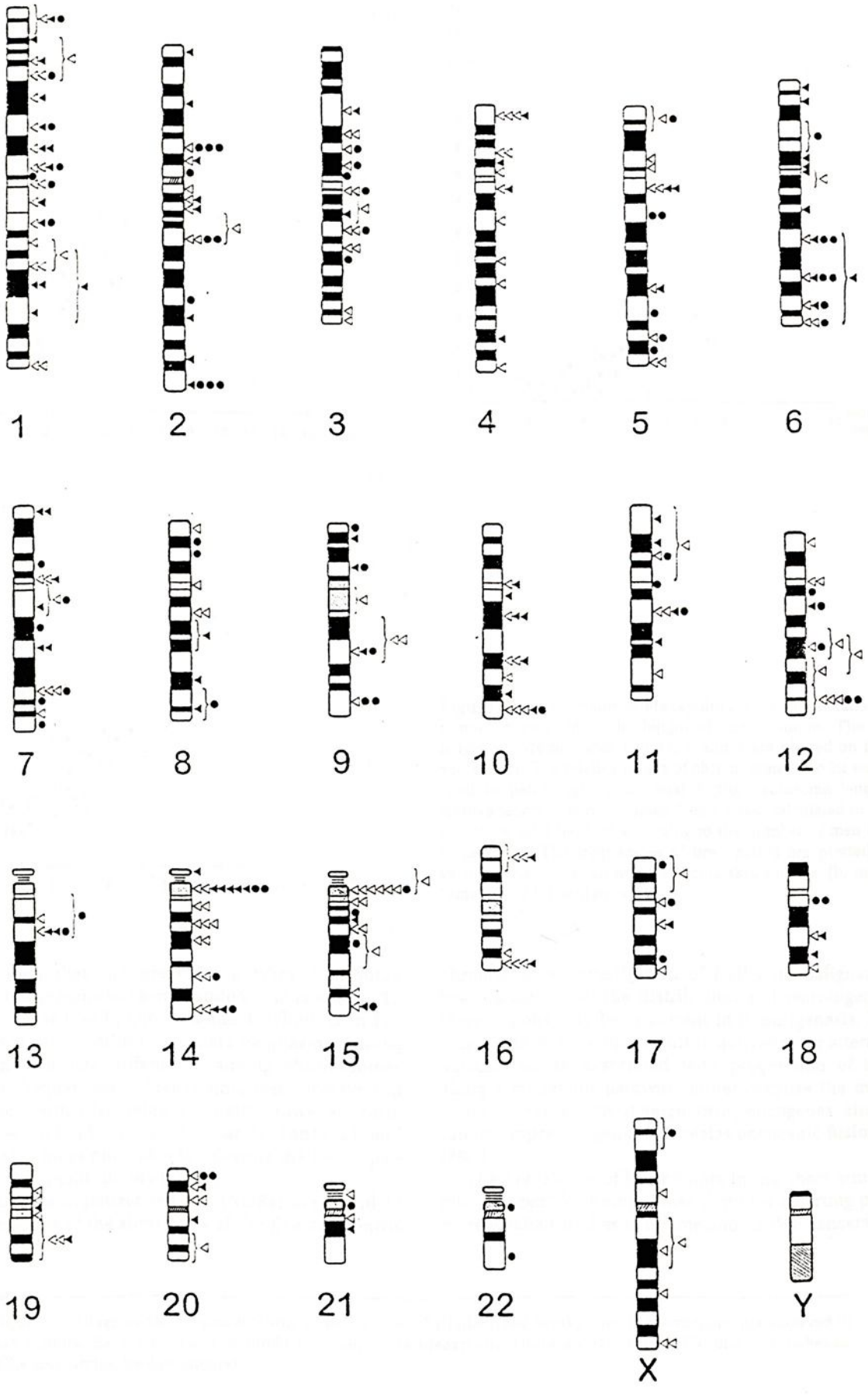
From the Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Address reprint requests to: Dr. E. H. Tajara, Departamento de Biologia, IBILCE, Caixa Postal 136, 15054–000 — São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Received June 12, 1996; accepted November 30, 1996.

Cancer Genet Cytogenet 99:81–84 (1997)
© Elsevier Science Inc., 1997
655 Avenue of the Americas, New York, NY 10010

0165-4608/97/$17.00
PII S0165-4608(96)00433-5


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
X
Y

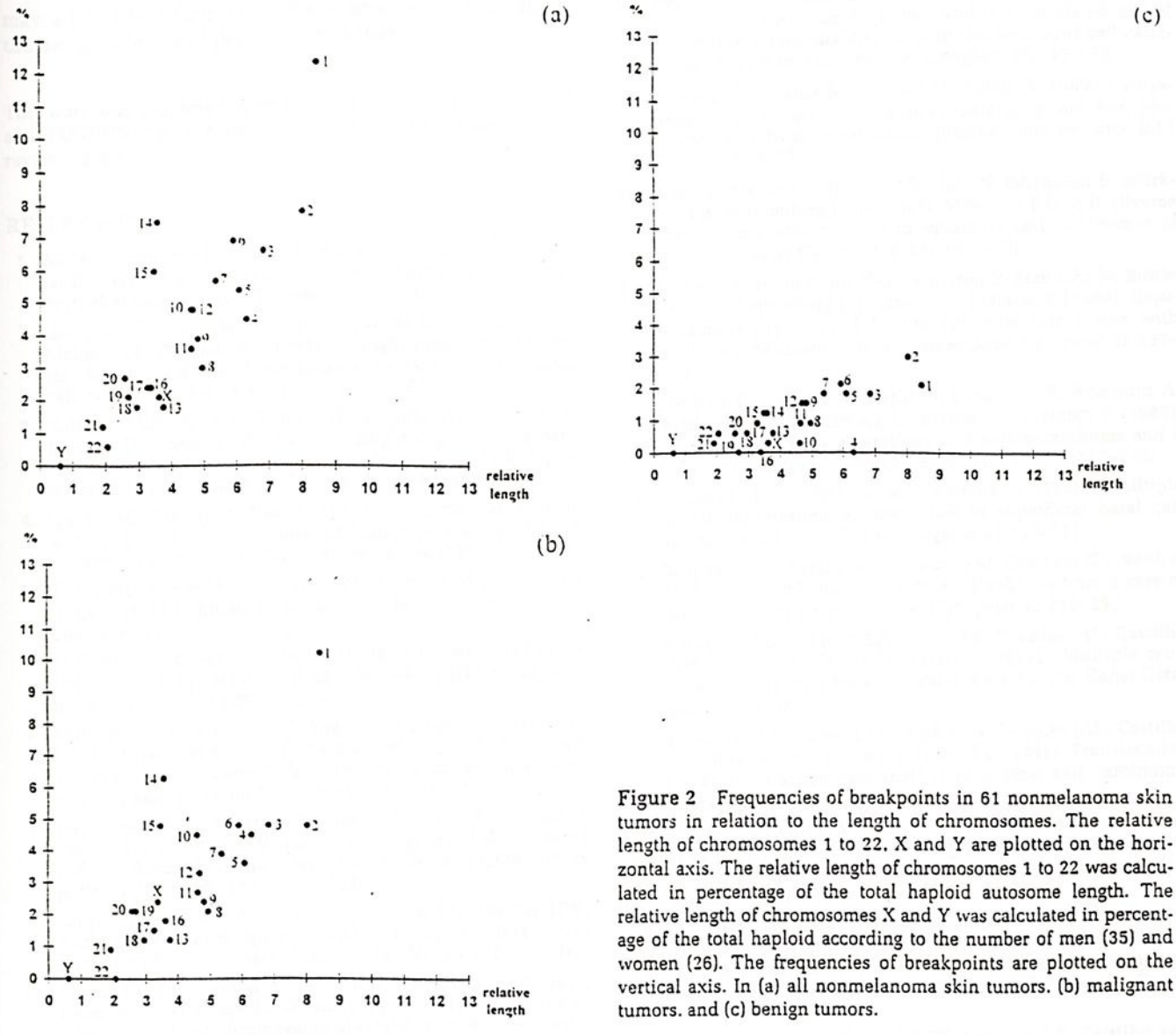


Figure 2 Frequencies of breakpoints in 61 nonmelanoma skin tumors in relation to the length of chromosomes. The relative length of chromosomes 1 to 22, X and Y are plotted on the horizontal axis. The relative length of chromosomes 1 to 22 was calculated in percentage of the total haploid autosome length. The relative length of chromosomes X and Y was calculated in percentage of the total haploid according to the number of men (35) and women (26). The frequencies of breakpoints are plotted on the vertical axis. In (a) all nonmelanoma skin tumors. (b) malignant tumors. and (c) benign tumors.

It can be seen that the breakpoints were distributed throughout the genome but some tended to cluster (Fig. 1). The major cluster was in chromosome 1. which is in fair agreement with the findings for others neoplasms. Taking into account the size differences among chromosomes [28], highest frequencies of breakpoints were observed in chromosomes with high relative length. However, chromosomes 14 and 15, in special bands 14p11-13 and 15p11-13, were more often affected despite their size, particularly in malignant tumors (Fig. 2).

The nucleolus organizer regions (NORs) are found in the satellite stalks of the short arms of the five acrocentric chromosomes. Investigation of NORs in malignant cells has indicated that the distribution and rearrangement of these regions may be important in tumorigenesis. Ectopic location of NORs could result in activation or alteration of adjacent genes, associated with progression of the cell along a malignant pathway. either because the mutation alters the expression of neighboring oncogenes, eliminates tumor suppressor genes, or creates oncogenic fusion genes [29–31].

The prevalence of breakpoints in the short arm of specific acrocentric chromosomes provides a starting point for more detailed studies of nonmelanoma skin cancers. which

Figure 1 Diagrammatic representation of the location of all identified breakpoints in rearrangements observed in skin tumors. Each arrowhead or circle represents one breakpoint (white arrowheads: BCCs. black arrowheads: SCCs and circles: benign tumors).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

may allow identification of the mechanisms involved in the development and progression of these tumors.

This work was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPESP and FUNDUNESP. We thank Dr. James Robert Coleman for reviewing the text.

REFERENCES

1. Molès J-P, Moyret C, Guillot B, Jeanteur P, Guilhou J-J, Theillet C, Basset-Sèguin N (1993): p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. Oncogene 8:583–588.
2. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, McLean DI, Threlfall WJ (1995): Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer I. Basal cell carcinoma. Arch Dermatol 131:157–163.
3. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ (1995): Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer II. Squamous cell carcinoma. Arch Dermatol 131:164–169.
4. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL (1994): Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss. Cancer Res 54:4756–4759.
5. Tornaletti S, Pfeifer GP (1994): Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. Science 263:1436–1438.
6. Li G, Ho VC, Berean K, Tron VA (1995): Ultraviolet radiation induction of squamous cell carcinomas in p53 transgenic mice. Cancer Res 55:2070–2074.
7. Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H (1996): Characterization of p53 gene mutations in basal-cell carcinomas: comparison between sun-exposed and less-exposed skin areas. Int J Cancer 65:778–780.
8. Daya-Grosjean L, Robert C, Drougard C, Suarez H, Sarasin A (1993): High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. Cancer Res 53:1625–1629.
9. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994): Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. Nature 372:773–776.
10. Mertens F, Jin Y, Heim S, Mandahl N, Jonsson N, Mertens O, Persson B, Salemark L, Wennerberg J, Mitelman F (1992): Clonal structural chromosome aberrations in nonneoplastic cells of the skin and upper aerodigestive tract. Genes Chromosom Cancer 4:235–240.
11. Pavarino EC, Antonio JR, Pozzeti EMO, Larranãga HJA, Tajara EH (1995): Cytogenetic study of neoplastic and nonneoplastic cells of the skin. Cancer Genet Cytogenet 85:16–19.
12. Severi-Aguiar GDC, Fiori JM, Larranãga HJA, Pozzeti EMO, Antônio JR (1995): Cytogenetic analyses of patients with skin tumors. Cancer Genet Cytogenet 85:88.
13. Fitchett M, Downing RG, Hopkinson DA, Bayley AC (1984): Interstitial deletion of chromosome band 13q14 associated with squamous cell carcinoma. J Med Genet 21:399.
14. Aledo R, Aurias A, Chrétien B, Dutrillaux B (1988): Jumping translocation of chromosome 14 in a skin squamous cell carcinoma from a xeroderma pigmentosum patient. Cancer Genet Cytogenet 33:29–33.
15. Atkin NB, Baker MC, Petkovic I (1988): Squamous cell carcinoma of the skin with an unusual marker chromosome. Cytobios 54:161–166.
16. Heim S, Jin Y, Mandahl N, Biörklund A, Wennerberg J, Jonsson N, Mitelman F (1988): Multiple unrelated clonal chromosome abnormalities in an in situ squamous cell carcinoma of the skin. Cancer Genet Cytogenet 36:149–153.
17. Aledo R, Dutrillaux B, Lombard M, Aurias A (1989): Cytogenetic study on eleven cutaneous neoplasms and two pretumoral lesions from xeroderma pigmentosum patients. Int J Cancer 44:79–83.
18. Heim S, Mertens F, Jin Y-s, Mandahl N, Johansson B, Biörklund A, Wennerberg J, Jonsson N, Mitelman F (1989): Diverse chromosome abnormalities in squamous cell carcinomas of the skin. Cancer Genet Cytogenet 39:69–76.
19. Mertens F, Heim S, Jin Y-s, Johansson B, Mandahl N, Biörklund A, Wennerberg J, Jonsson N, Mitelman F (1989): Basosquamous papilloma A benign epithelial skin tumor with multiple cytogenetic clones. Cancer Genet Cytogenet 37:235–239.
20. Mertens F, Heim S, Mandahl N, Johansson B, Rydholm A, Biörklund A, Wennerberg J, Jonsson N, Mitelman F (1989): Clonal chromosome aberrations in a keratoacanthoma and a basal cell papilloma. Cancer Genet Cytogenet 39:227–232.
21. Scappaticci S, Fraccaro M, Orecchia G (1989): Multiple clonal chromosome abnormalities in superficial basal cell epithelioma. Cancer Genet Cytogenet 42:309–311.
22. Scappaticci S, Lambiase S, Fraccaro M, Orecchia G (1989): A clonal t(9;12)(q32;q21) in cultured fibroblasts from a case of Bowen's disease. Cancer Genet Cytogenet 43:249–250.
23. Kawasaki RS, Caldeira LF, André FS, Gasques JAL, Castilho WH, Bozola AR, Thomé JA, Tajara EH (1991): Multiple cytogenetic clones in a basal cell carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 54:33–38.
24. Kawasaki RS, Caldeira LF, André FS, Gasques JAL, Castilho WH, Bozola AR, Thomé JA, Tajara EH (1991): Translocation (4;14) and concomitant inv(14) in a basal cell carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 56:177–180.
25. Mertens F, Heim S, Mandahl N, Johansson B, Mertens O, Persson B, Salemark L, Wennerberg J, Jonsson N, Mitelman F (1991): Cytogenetic analysis of 33 basal cell carcinomas. Cancer Res 51:954–957.
26. Worsham MJ, Carey TE, Benninger MS, Gasser KM, Kelker W, Zarbo RJ, Van Dyke DL (1993): Clonal cytogenetic evolution in a squamous cell carcinoma of the skin from a xeroderma pigmentosum patient. Genes Chromosom Cancer 7:158–164.
27. Kawasaki-Oyama RS, André FS, Caldeira LF, Castilho WH, Gasques JAL, Bozola AR, Thomé JA, Tajara EH (1994): Cytogenetic findings in two basal cell carcinomas. Cancer Genet Cytogenet 73:152–156.
28. ISCN (1985): An International System For Human Cytogenetic Nomenclature. DG Harnden, FRC Path, HP Klinger, eds Karger, Basel, p. 117.
29. DeLozier-Blanchet CD, Walt H, Engel E (1986): Ectopic nucleolus organizer regions (NORs) in human testicular tumors. Cytogenet Cell Genet 41:107–113.
30. Neerman-Arbez M, DeLozier-Blanchet CD, Bolle J-F, Ronde R, Morris M (1993): High incidence of ectopic nucleolar organizer regions in human testicular tumors. Cancer Genet Cytogenet 65:58–63.
31. Atkin NB, Baker MC (1995): Ectopic nucleolar organizer regions. A common anomaly revealed by Ag-NOR staining metaphases from nine cancers. Cancer Genet Cytogen 85:129–132.

ASSESSMENT OF METHODS FOR EXTRACTING DNA FROM PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE AND CONDITIONS FOR PCR-SSCP ANALYSIS OF THE *TP53* SUPPRESSOR GENE

Érika Cristina Pavarino Bertelli, Flávia Cristina Carvalho Rodrigues, Eloiza Helena Tajara

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (ECPB, FCCR, EHT), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Eloiza Helena Tajara

Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, CP 136.

15054-000, São José do Rio Preto, S.P, Brazil.

Fone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

e-mail: tajara@bio.ibilce.unesp.br

ABBREVIATED TITLE: Extraction of DNA from archival tissues for PCR amplification.

KEY WORDS: *TP53* gene

DNA

SSCP

Polymerase chain reaction

ABSTRACT

In the present study, we have evaluated different techniques for extracting DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded samples that consistently yield successful PCR detection. In addition, we evaluated a number of factors that affect single-strand conformation polimorphism (SSCP) technique used for screening *TP53* mutations. Significant yields of DNA were obtained from archival tissues by overnight digestion with two additions of proteinase K without purification. We extracted DNA from 34 archival epithelial carcinoma samples, diagnosed in 1989-1997 and we were able to detect PCR products of 140-300 bp. Results of polyacylamide electrophoresis showed that the banding patterns in SSCP analysis not only vary with conditions of electrophoresis applied, especially acrylamide concentration and temperature, but also depends on the conditions of sample amplification.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

INTRODUCTION

Retrospective studies using polymerase chain reaction (PCR) have become possible with the advent of DNA extraction methods applicable to formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Such methods of extracting DNA from archival tissues have included deparaffinization of the sections with organic solvents and separation and purification steps utilizing phenol-chloroform extractions and/or ethanol precipitation (Dracopoli *et al.*, 1996; Iwamoto *et al.*, 1996). Although these methods are successful in recovering high molecular weight DNA for Southern blot analysis, they are not necessarily optimal for PCR amplification and require several steps increasing opportunities for cross-transfer of samples or introduction of contaminants (Wright and Manos, 1990; Wash *et al.*, 1991; Banerjee *et al.*, 1995; Dracopoli *et al.*, 1996). Futhermore, phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation reduce the final yield of DNA when starting with the small amount present in a paraffin section (Frank *et al.*, 1996).

Successful PCR amplification of DNA from fixed tissues is largely dependent on the type of fixative, duration of fixation, age of the paraffin block, and size of the PCR product (Greer *et al.*, 1995; Dracopoli *et al.*, 1996). A number of other factors involved in the proper amplification process also are vital to the outcome of a PCR and include annealing temperature, secondary structure of the DNA, degradation of the template, enzyme inactivation and $MgCl_2$ concentration (Mukhopadhyay and Roth, 1993).

In this study, we have evaluated different techniques for extracting DNA from archival material and parameters that consistently influence the specificity, fidelity, and yield of the product in the PCR analysis. In addition, we evaluated a number of factors that affect single-strand conformation polimorphism (SSCP) technique used for screening *TP53* mutations.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

MATERIAL AND METHODS

Tumor samples

Paraffin blocks of 16 basal cell carcinomas, 12 squamous cell carcinomas, 5 solar keratosis and 1 breast carcinoma were used in this study. All tissues were fixed in 10% non-buffered formalin for 1 to 4 days, paraffin embedded and stored for one to nine years.

DNA Extraction Methods

Method A (Dewaxing with Xylene, followed by Phenol-Chloroform Extraction)

To dissolve the parraffin, two tissue sections (10 μm) were washed three times with xylene. Next 500 μL of 100% ethanol was added to facilitate pelleting, and the samples were gently mixed (without vortexing) and spun on a microcentrifuge at 12,000 rpm for 10 min. The xylene-ethanol mixture was decanted, and the tissue pellets were dried at room temperature. The pellet was resuspended in 200 μL DNA extraction buffer (10 mM Tris, pH 8.3, 10 mM EDTA), proteinase K was added one or two times to each tube (final concentration 200-400 μg/mL), and samples were digested overnight or during 5 days at 45°C. Following digestion, the microcentrifuge tubes were immersed in boiling water for 10 min to inactivate proteinase K. After phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction was completed, 1/10 vol of 3 M sodium acetate, pH 5.2, and 2 vol of ethanol were added, the DNA was precipitated, and the mixture remained at -20°C overnigth. After centrifugation at 12,000 rpm for 20 min, the DNA pellet was left at room temperature to dry. The DNA was resuspended in 50 μL TE buffer (10 mM Tris, pH7.2, 1 mM EDTA).

unesp

Method B (Dewaxing with Xylene, followed by Chelex and Phenol-Chloroform Extraction)

The tissue sections were dewaxed and digested in 200 µL DNA extraction buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM EDTA and 200-400 µg/mL proteinase K exactly as for Method A. After digestion, 100 µL Chelex 100 50% was added. The microcentrifuge tubes containing the mixture were immersed in boiling water for 10 min and centrifuged for 5 min at 12,000 rpm. Supernatants containing DNA lysate were pipetted into new sterile tubes and subjected to phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation as above. The pellet was resuspended in 50 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.2, 1 mM EDTA).

Method C (Dewaxing without Xylene, without Phenol-Chloroform Extraction)

The tissue sections were placed directly in 200 µL of digestion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA and 0.5% Tween 20). The microcentrifuge tubes were immersed in water at 70°C to melt paraffin. Afterward the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at room temperature. Following centrifugation the solid paraffin ring that formed above the buffer, containing the tissue pellet, was removed by gently loosening it from the wall of the microcentrifuge tube with a sterile pipet tip and then extracting it from the tube. Paraffin-free tissue pellets were suspended in digestion buffer by gently shaking, and 2 µL of 20 mg/mL of proteinase K was added one or two times to each tube (final concentration 200-400 µg/mL), and samples were digested overnight at 45°C. Alternatively, the digestion step was enlarged to 5 days. After digestion, tubes were centrifuged for 5 min at 6,000 rpm. Supernatants containing DNA lysate were pipetted into new sterile tubes and were then boiled for 10 min to inactive proteinase K. The extracted DNA was used for PCR without purification.

Method D (Dewaxing without Xylene, with Silica Particles Extraction)

The tissue sections were dewaxed and digested with 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20 and 200-400 µg/mL of proteinase K exactly as for Method C. After digestion, tubes were centrifuged for 5 min at 6,000 rpm. Supernatants containing DNA lysate were pipetted into new sterile tubes and 50 µL of silica particles was added to each tube. Following incubation for 20 min at room temperature, tubes were centrifuged for 3 min at 12,000 rpm. The samples were then washed three times with washing buffer (6 M GuSCN, 100 mM Tris-HCl, pH 6.4), three times with 70% ethanol, dried, and resuspended in 70 µL distilled water. Following incubation for 20 min at 55°C, the samples were centrifuged for 2 min at 12,000 rpm and supernatants were pipetted into new sterile tubes.

PCR-SSCP Analysis

We screened mutations in exons 5 through 9 of the *TP53* gene. Primers were as follows:

exon 5, 5'-CTCCCCTGCCCTCAACAAG, 5'-GCTGCTCACCATCGCTATCTG;

exon 6, 5'-CACTGATTGCTCTTAGGTCT, 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAG;

exon 7, 5'-CTAGGTTGGCTCTGACTGTA, 5'-TGACCTGGAGTCTTCCAGTG;

exon 8, 5'-CCTACTCTGAGTAGTGGTAA, 5'-GTCCTGCTTGCTTACCTCG;

exons 8-9, 5'-AGTGGTAATCTACTGGGACG; 5'-TCTCCATCCAGTGGTTTCTT.

Standard PCR was carried out in 25 or 50 µL solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5-3 mM $MgCl_2$, 200 µM each dNTP, 0.5 pmol/µL each primer, 100-300 ng template DNA and 2 U Taq DNA polymerase (Gibco-BRL). DNA was amplified for 35 cycles and PCR was performed with different amplification conditions as

follows: exon 5, PCR buffer with 0, 5 or 10% glycerol or with 0 or 10% dimethyl sufoxide (DMSO), annealing at 55°C or 58°C for 30s - 1 min, and extension for 1 min; exon 7, PCR buffer with 0 or 5% glycerol, annealing at 55°C or 63°C for 1 min, and extension for 1 min; exon 6, 8, and 8-9, PCR buffer without enzyme and initial denaturation at 98°C for 10 min followed by addition of Taq polymerase at 72°C, annealing at 55 or 58°C for 1 min, and extension for 1 min. In some instances, consecutive reactions using nested primers were required for amplification of the exon 8. Amplification of DNAs were checked by 2% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. For SSCP 8-14 μL PCR products were 1:2 diluted in 95% formamide, 0.5 M EDTA, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol blue, heat denatured at 94°C for 10 min, and quickly chilled on ice before loading onto nondenaturing 7.5% or 12% polyacrylamide gels (concentration of cross-linking agent or ratio of the percent concentration of *N,N'* -methylenebisacrylamide to the concentration of total acrylamide monomer = 2%C) containing 0, 5 or 10% glycerol (Sambrook *et al.*, 1989). Electrophoresis was carried out at 3 W of constant power for 2-4 hr, at 4°C or room temperature (18-24°C). After migration, gels were subjected to silver staining as describred by Bassam and Caetano-Anollés (1993) with modifications. In brief, gels were fixed for 10 min in solution containing 10% ethanol and 0.75% glacial acetic acid, stained for 10 min with 0.3% silver solution, washed in distilled water for 2 min (2 times) and developed for 10 min in solution containing 3% NaOH and 0.3% formaldehyde. Finally, the gels were fixed as above and preserved in cellophane.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

RESULTS AND DISCUSSION

The amount of intact DNA that can be successfully extracted from archival paraffin-embedded fixed tissue blocks depends upon variables such as the preservative used in tissue processing, the length of fixation, and the age of the specimen (Greer *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 1996). In general, tissue that has been fixed in neutral, buffered formalin for less than 8 hr contains DNA from which PCR products 600 bp or more in length can be reliably amplified. When fixed for more than 8 hr, the length of the PCR product that can be amplified is roughly inversely proportional to the duration of fixation (Karlsen *et al.*, 1994; Dracopoli *et al.*, 1996). Fixatives other than neutral, buffered formalin often yield DNA from which only short PCR products, if any, can be produced (Jackson *et al.*, 1990, Greer *et al.*, 1995).

In this study, we extracted DNA from blocks fixed in 10% non-buffered formalin for 1 to 4 days, stored for one to nine years and we were able to detect PCR products of 140-300 bp. The effect of prolonged tissue storage and the length of time in fixative did not seem to influence results, although the successful amplification of the 300 bp fragment (exon 8-9) decreased in relation to amplification of the 140-190 bp fragments (exons 5, 6, 7, 8).

Most reports describing the extraction of DNA from paraffin-embedded material involve a modification of the fresh tissue proteinase K incubation extraction technique, and are capable of producing good yields of relatively high molecular weight DNA. For example, Jackson *et al.* (1991) have found that increasing the length of the proteinase K incubation from 24 h up to 5 days results in up to tenfold increase in the yield of extracted DNA with a molecular weight of up to 5 kb. Others have used simplified methods such as sonication and boiling (Heller *et al.*, 1991,1992; Kallio *et al.*, 1991; Frank *et al.*, 1996) although these procedures do not extract longer DNA fragments as efficiently as proteinase

K digestion (Greer *et al.*, 1995). Here, significant yields of DNA were obtained from archival tissues by overnight digestion with two additions of proteinase K without purification. Extension of the time of the proteinase K incubation to up to 5 days following phenol-chloroform, Chelex or silica particles treatment was no more effective than overnight incubation without purification (Figure 1). The present observations demonstrated that extracting DNA without purification consistently yields adequate quantities of DNA, which can be used to amplify products up to 300 base pairs, is less time-consuming and requires fewer manipulations.

A number of other factors involved in the proper amplification process should be carefully monitored (Saiki, 1992). For example, sequence complementarity between the two primers or homology of one primer sequence within the amplification domain often results in exponential amplification of nonspecific or smaller target DNA. A strong secondary DNA structure also may interfere with the amplification process (Innis and Gelfand, 1990; Mukhopadhyay and Roth, 1993). Denaturating agent (DMSO) and performing annealing and denaturation at a high temperature are used to solve the problem.

The annealing time and temperature were different for each exon, because of dependence on the base composition, and more stringent conditions resulted in fewer nonspecific products (Figure 2; lanes 5-8). Additional sensitivity for amplification could be achieved by using hot start and nested PCR and 5 or 10% glycerol in the PCR reaction buffer (Figure 2; lanes 3, 4, 7, 8, 19). $MgCl_2$ concentration in the buffer can also have a profound effect on the specificity and yield of an amplification. Concentrations of about 1.5 mM are usually optimal (with 200 µM each dNTP), but under some circumstances, different amounts to Mg^{2+} may prove necessary. Generally, excess Mg^{2+} will result in the accumulation of nonspecific amplification products and insufficient Mg^{2+} will reduce the yield (Saiki, 1992). Here, changing the $MgCl_2$ concentration improved the yield of target

DNA. For example, the amplification of exons 6 to 9 were performed using $MgCl_2$ concentrations higher (3 and 4.5 mM) than the standard (1.5 mM) (Figure 3).

Results of polyacrylamide electrophoresis showed that a number of factors affect SSCP analysis. Gels with low cross-linking (%C), such as used in this study, have remarkably increased pore size and seem to be more sensitive to conformation (Hayashi, 1991). We also found that the best separation of the complementary single strands was achieved when samples were electrophoresed using a gel containing 5% glycerol. In fact, the presence of low concentrations (5-10%) of glycerol in a gel frequently improve separation of mutated sequences (Orita *et al.*, 1989). The reasons for this are unknown. Hayashi (1991) suggest that glycerol, because of its weak denaturing action on nucleic acids, partially opens the folded structure of single-strand DNA so that more surface area of the molecule is exposed, and thus there is more chance for the acrylamide fibres to sense locally confined structural diferences caused by mutation.

In SSCP gel, one DNA strand can be separated in two or more bands (Orita *et al.*, 1989). In the present study, the number of bands varied from the PCR conditions and from the exon analysed (Figure 4). Two bands were observed when the samples were subjected to PCR amplification with 5-10% glycerol or 10% DMSO in PCR buffer (Figure 2; lanes 3, 4, 7, 8, 19, 20) or when PCR amplification was performed with annealing at high temperature for less time (Figure 2; lanes 5-8). When the samples were subjected to PCR amplification without glycerol or DMSO and annealing at a lower temperature for more time, several bands were detected reflecting nonspecific products (Figure 2; lanes 1 ,2, 9-18). The temperature running during SSCP eletrophoresis also influenced the number of the bands detected. For example, decreasing the temperature resulted in different mobility patterns with more bands (Figure 5).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

We conclude that the banding patterns in SSCP analysis not only vary with conditions of electrophoresis applied, especially acrylamide concentration and temperature, but also depends on the conditions of sample amplification. Therefore, comparison of products obtained from separate PCR reactions must take into account even small differences between parameters that influence the amplification and electrophoresis process.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dra. L. L. Villa and N. A. Pinheiro for helpful suggestions. This work was supported by CAPES, CNPq, FAPESP and FUNDUNESP.

REFERENCES

Banerjee, S.K., Makdisi, W.F., Weston, A.P., Mitchell, S.M. and **Campbell, D.R.** (1995). Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques, 18*: 769-773.

Bassam, B.J. and **Caetano-Anollés, G.** (1993). Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Appl. Biochem. Biotechnol., 42*: 181-188.

Dracopoli, N.C., Haines, J.L., Korf, B.R., Mori, D.T., Morton, C.C., Seidman, C.E., Seidman, J.G. and **Smith, D.R.** (1996). *Current Protocols in Human Genetics*, John Willey & Sons, USA.

Frank, T.S., Svoboda-Newman, S.M. and **Hsi, E.D.** (1996). Comparison of Methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagn. Mol. Pathol. 5*: 220-224.

Greer, C.E., Wheeler, C.M. and **Manos, M.M.** (1995). PCR amplification from paraffin-embedded tissues: sample preparation and the effects of fixation. In: *PCR primer, a laboratory manual* (Dieffenback, C.W. and Dveksler, G.S., eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 99-112.

Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl., 1*: 34-38.

Heller, M.J., Burgart, L.J., TenEyck, C.J., Anderson, M.E., Greiner, T.C. and **Robinson, R.A.** (1991). An eficient method for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by sonication. *BioTechniques, 11*: 372-377.

Heller, M.J., Robinson, R.A., Burgart, L.J., TenEyck, C.J. and **Wilke, W.W.** (1992). DNA extraction by sonication: A comparison of fresh, frozen, and paraffin-embedded tissues for use in polymerase chain reaction assays. *Mod. Pathol., 5:* 203-206.

Innis, M.A. and **Gelfand, D.H.** (1990). Optimization of PCRs. In: *PCR protocols - A guide to methods and applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., eds). Academic Press, San Diego, pp.2-12.

Iwamoto, K.S., Mizuno, T., Ito, T., Akiyama, M., Takeichi, N., Mabuchi, K. and **Seyama, T.** (1996). Feasibility of using decades-old archival tissues in molecular oncology/epidemiology. *Am. J. Pathol. 149*: 399-406.

Jackson, D., Lewis, F., Taylor, G., Boylston, A. and **Quirke, P.** (1990). Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol., 43*: 499-504.

Jackson, D.P., Jeremy, D.H. and **Quirke, P.** (1991). Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In: *PCR - A pratical approach* (Mc Pherson, M.J., Quirde, P. and Taylor, G.R., eds.). Oxford University Press, Oxford, pp. 29-50.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Kallio, P., Syrjanen, A., Tervahauta, A. and **Syrjanen, K.** (1991). A simple method for isolation of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples for PCR. *J. Virol. Methods, 35*: 39-47.

Karlsen, R., Kalantari, M., Chitemerere, M., Johansson, B. and **Hagmar, B.** (1994). Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab. Invest., 71*: 604-611.

Mukhopadhyay, T. and **Roth, J.A.** (1993). *p53* gene mutations in human premalignant and malignant tissues. In: *Gene and chromosome analysis - methods in molecular genetics* (Adolph, K.W., ed.). v. 2, Academic Press, San Diego, pp.104-128.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and **Sekiya, T.** (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86*: 2766-2770.

Saiki, R.K. (1992). The design and optimization of the PCR. In: *PCR technology - Principles and applications for DNA amplification* (Erlich, H.A., ed.). Oxford University Press, New York, pp.7-16.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and **Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2a. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Walsh, P.S., Metzger, D.A. and **Higuchi, R.** (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTecniques, 10*: 506-513.

Wright, D.K. and **Manos, M.M.** (1990). Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: *PCR protocols - A guide to methods and applications* (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., eds.). Academic Press, San Diego, pp.153-158.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

LEGENDS

Figure 1. Agarose gel analysis of DNA extracted by different methods from one archival squamous cell carcinoma in A; lane 1: without phenol-chloroform (*method C*); lane 2: with silica particles (*method D*); lane 3: with Chelex and phenol-chloroform (*method B*); lane 4: with phenol-chloroform (*method A*). Sections were dewaxed by heating (lanes 1 and 2) or by using xylene and ethanol (lanes 3 and 4). DNA was extracted by digested overnight. The PCR products from the *TP53* exon 5 are shown respectively in B. The marker (lane M) is DNA ladder of 100 bp (Gibco-BRL).

Figure 2. PCR-SSCP analysis of *TP53* exon 5. PCR was performed with different amplification conditions: PCR buffer without glycerol or DMSO (lanes 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14), with glycerol (lanes 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15-19) or with DMSO (lane 20); annealing temperature at 55°C (lanes 1-4, 9-12, 17, 18) or 58°C (lanes 5-8, 13-16, 19, 20) for 30s (lanes 1-8) or 1 min (lanes 9-20). Eletrophoresis was carried out at 3 W of power constant for 3 hr, at 21°C in 7.5% gel containing 5% glycerol. (GLY = glycerol).

Figure 3. Effect of Mg^{+2} concentration on PCR specificity and yield. $MgCl_2$ was varied from 1.5 mM (lanes 1, 4, and 7); 3 mM (lanes 2, 5, and 8) and 4.5 mM (lanes 3, 6 and 9) for exon 8. PCR buffer without glycerol or DMSO (lanes 1, 2 and 3); with 10% DMSO (lanes 4, 5, and 6) and with 5% glycerol (lanes 7, 8 and 9). The optimum concentration of $MgCl_2$ was 3 mM in PCR buffer without glycerol or DMSO (lane 2), 4.5 mM in PCR buffer with 10% DMSO (lane 6) and 3 mM in

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

PCR buffer with 5% glycerol (lane 8). The marker (lanes M) is DNA ladder of 100 bp (Gibco-BRL).

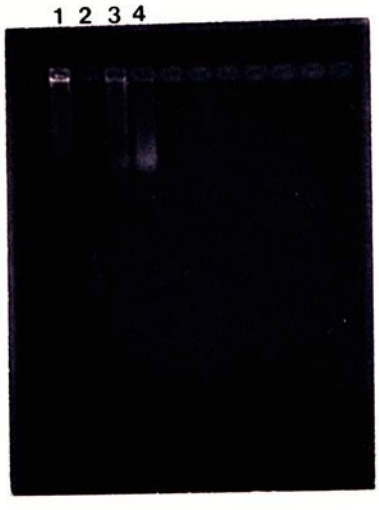
Figure 4. PCR-SSCP analysis of *TP53* exon 5 (lanes 1-3), exon 6 (lanes 4-6), exon 7 (lanes 7-9), exon 8 (lanes 10-12) and exons 8-9 (lanes 13-15). Each lane contain PCR products from different patients. Patients exhibiting mobility shift of single-strand DNA fragments (lanes 2, 5, 8, 11) are shown along with patients having normal migration patterns (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15). PCR was performed with different amplification conditions for each exon: exon 5, PCR buffer with 5% glycerol, annealing at 55°C for 30s; exon 7, PCR buffer with 5% glycerol, annealing at 55°C for 1 min, exon 6, 8, and 8-9, PCR buffer without glycerol, annealing 58°C for 1 min. Eletrophoresis was carried out at 3 W of power constant for 3 hr and 30 min, at 21°C in 7.5% gel containing 5% glycerol.

Figure 5. PCR-SSCP analysis of *TP53* exon 5. PCR amplification was performed with 5% glycerol in PCR buffer, annealing at 58 °C for 30 s (lanes 1 and 3) and without glycerol or DMSO, annealing at 55 °C for 30 s (lanes 2 and 4). Eletrophoresis was carried out at 3 W of power constant for 3 hr, in 7.5% gel containing 5% glycerol, at 21 °C (A) or 4 °C (B).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

FIGURE 1

A



B

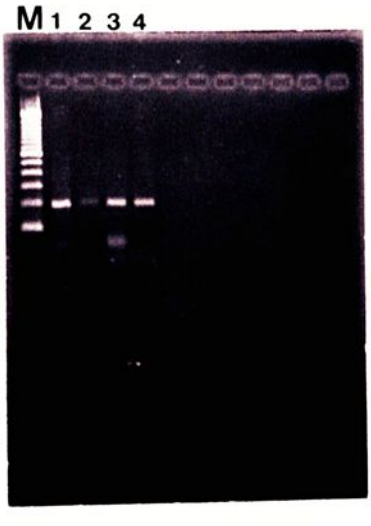


FIGURE 2

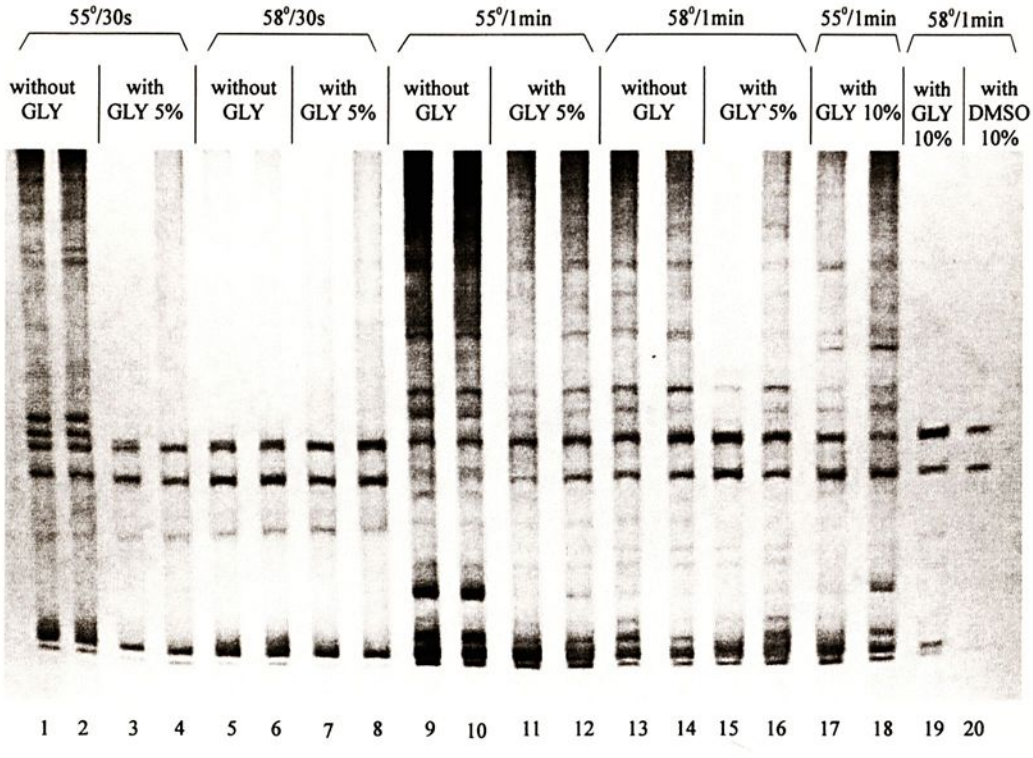

55°/30s
58°/30s
55°/1min
58°/1min
55°/1min
58°/1min
without GLY
with GLY 5%
without GLY
with GLY 5%
without GLY
with GLY 5%
without GLY
with GLY`5%
with GLY 10%
with GLY 10%
with DMSO 10%
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

FIGURE 3

M 1 2 3 4 5 6
M 7 8 9

FIGURE 4

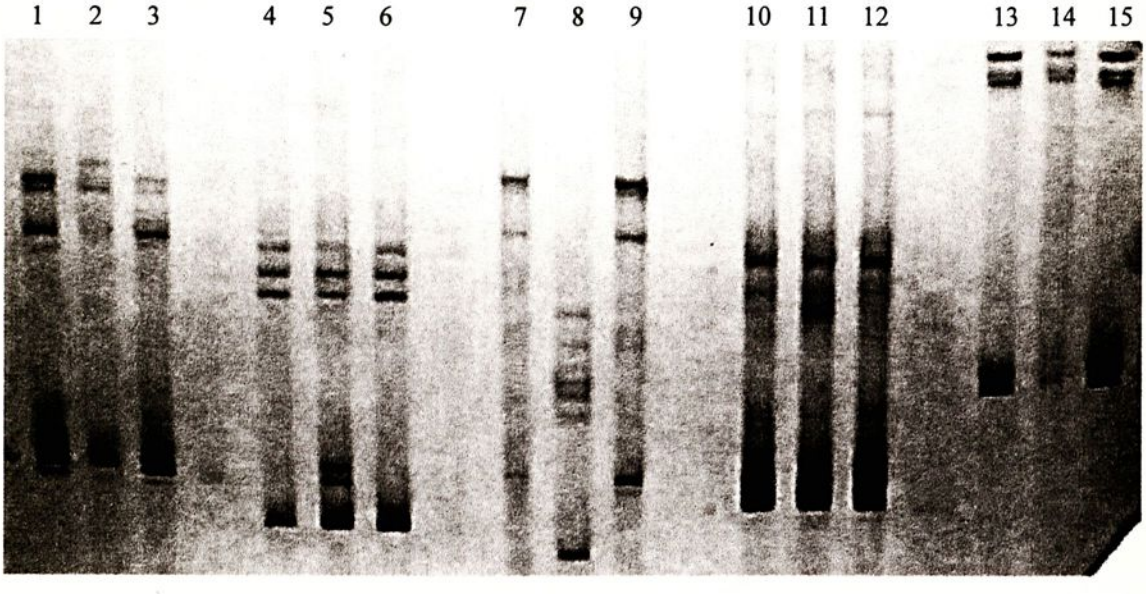
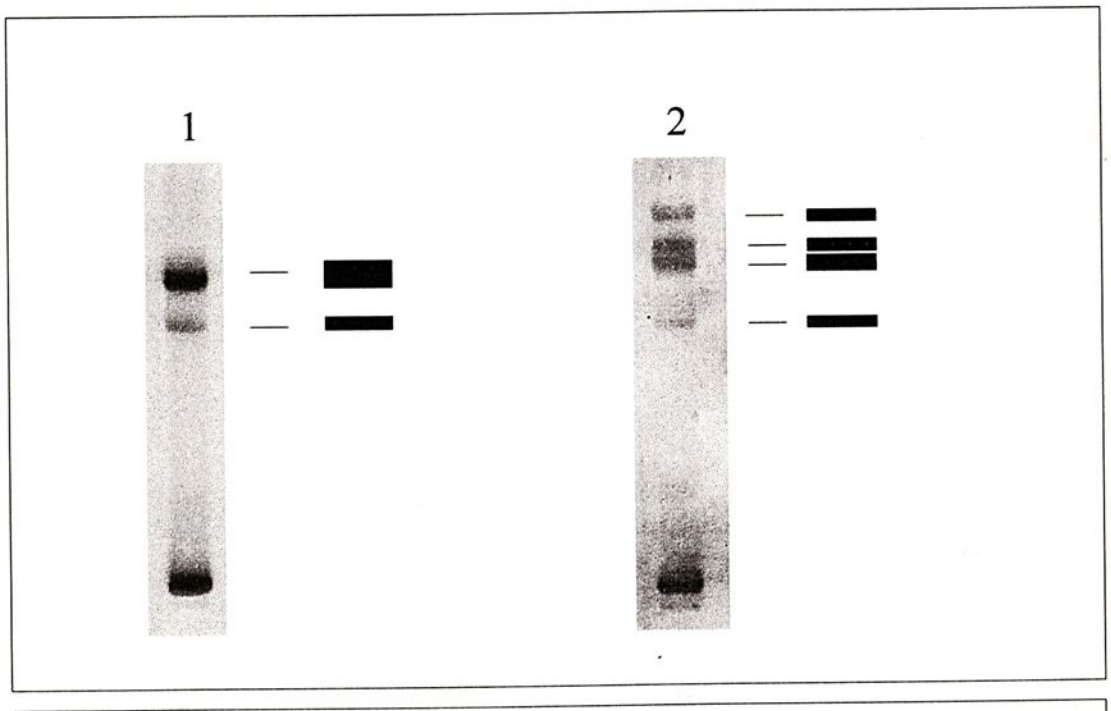
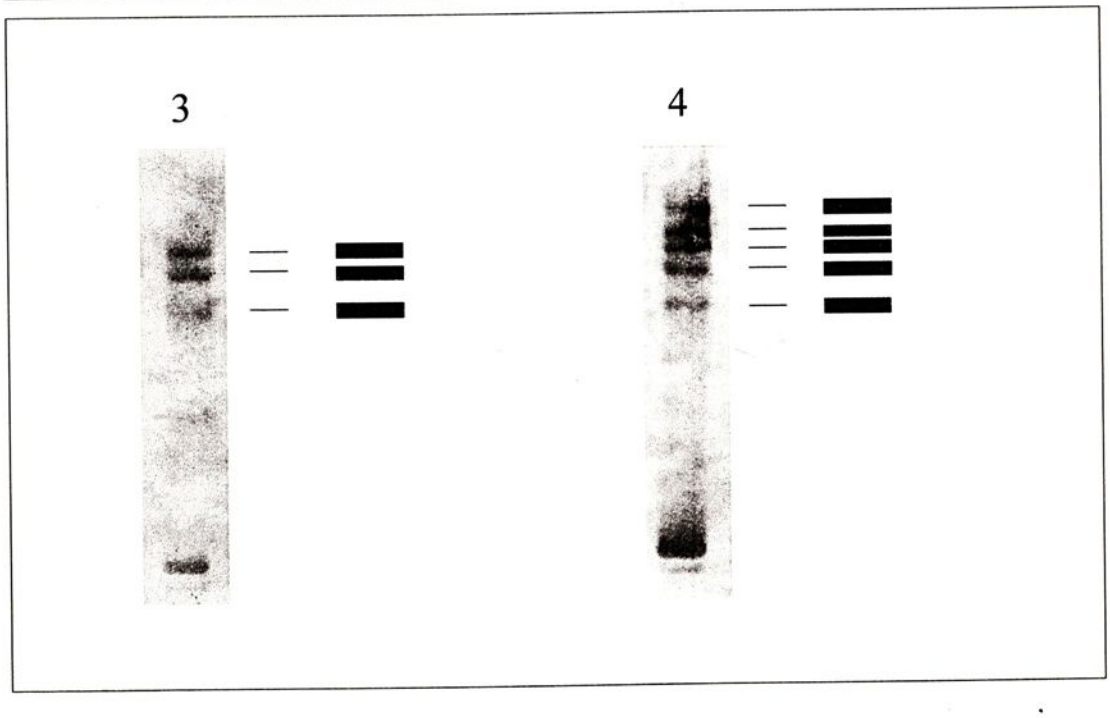

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

FIGURE 5


A
1
2


B
3
4

SKIN CARCINOGENESIS IN SOUTHEAST BRAZIL I: ANALYSIS OF *TP53* GENE IN NORMAL EPIDERMIS FROM SUN-EXPOSED AND NON-SUN-EXPOSED SITES

Érika Cristina Pavarino Bertelli, Flávia Cristina Carvalho Rodrigues, Antonio Roberto Bozola, Eloiza Helena Tajara

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (ECPB, FCCR, EHT), IMAGEM - Hospital de Cirurgia Plástica (ARB), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO: Eloiza Helena Tajara

Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, CP 136.

15054-000, São José do Rio Preto, S.P, Brazil.

Fone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

e-mail: tajara@bio.ibilce.unesp.br

ABBREVIATED TITLE: Analysis of *TP53* gene in normal epidermis.

KEY WORDS: *TP53* gene

Skin cancer

Normal skin

Hair follicle

UV radiation

ABSTRACT

The *TP53* tumor suppressor gene, which is frequently mutated in human cancers, is believed to be an early target in UV radiation-associated cutaneous carcinogenesis. Since no studies on the prevalence of *TP53* mutation in skin samples have been performed in Brazil, we analysed normal epidermis from sun-exposed and non-sun-exposed sites of subjects living in Southeast Brazil, an area with high levels of sun exposure. Mutations of the *TP53* gene were screened by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis in 41 normal skin and 16 hair follicle samples. No mutations were detected. Our results suggest that *TP53* mutations may not be obligatorily frequent in skin from subjects living in areas with high levels of sun exposition and factors such as ethnic composition of populations may be important in determining their incidence.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

INTRODUCTION

Nonmelanoma skin cancers (NMSC), including basal cell carcinomas (BCC) and squamous cell carcinomas (SCC), are the most common malignant neoplasms in the white populations (Corona, 1996). Epidemiologic studies from different countries have revealed a positive correlation between the incidence of NMSC and ultraviolet radiation (UVR) exposure, as well as an inverse relationship with degree of skin pigmentation (Strom and Yamamura, 1997). Actually, skin cancer is more common in white than in black, Chinese, and Japanese populations (Corona, 1996; Takata *et al.*, 1997). High susceptibility to developing NMSC is also more frequent in fair-skinned populations, especially those of Irish, Scottish, and Welsh ancestry, who sunburn easily (Strom and Yamamura, 1997). This is probably due to the protective effect exerted by melanin or to other genetic differences. An inverse correlation between incidence of NMSC and latitude (the closer to the equator, the higher the rate) in various countries has also been demonstrated in several studies (Corona, 1996) and the latitudinal gradient is more apparent for SCC than for BCC (Marks, 1995).

Anatomic sites can be considered as indirect indicators of different patterns of UV-light exposure, with respect to lifetime duration, intensity and intermittency of exposure (Franceschi *et al.*, 1996). Most SCCs occur in chronically solar exposed, UV-damaged areas such as the nose, cheeks, lower lip, tops of ears, and backs of hands. About the same body distribution is observed for BCCs and, although the majority are found on head and neck (commonly on nose and cheeks), an increasing percentage are being detected on the male trunk and female leg (Taylor and Sober, 1996).

Although skin cancers typically arise in patients aged 50-70, epidemiologic evidence indicates that much of the critical sunlight exposure is received before the age of 18 (Kricker *et al.*, 1991). The early role of sunlight in cutaneous carcinogenesis is

supported by the finding of UV-induced mutations in the *TP53* tumor suppressor gene in actinic keratosis, the precancerous lesion for SCC, and in chronically sun-exposed epidermis (Ziegler *et al.*, 1994; Nakazawa *et al.*, 1994). P53-mutated clones have also been detected in both interfollicular epidermis and at hair follicles (Jonason *et al.*, 1996), which are the locations of the presumed stem cells in skin and appear to be the source of tumors in experimental animals (Miller *et al.*, 1993). Thus, UV-specific *TP53* mutations may accumulate in normal skin with frequencies which may directly reflect an individual's skin type (Whittaker, 1996) and serve as an initial step that starts the cells on a path toward cancer (Kraemer, 1997). We were interested in examining normal epidermis from sun-exposed and non-sun-exposed sites of subjects living in Southeast Brazil, an area with high levels of sun exposure, since no studies on the prevalence of *TP53* mutation have been performed for Brazilian populations.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

MATERIAL AND METHODS

Sample. Forty-one fresh samples of normal skin were analyzed in the present study and obtained from discarded cosmetic surgery tissue of healthy subjects (39 women, one men) ranging from 19 to 59 years (Table I). Twenty-one samples of normal skin were taken from sun-exposed sites (face, preauricular and auricular) and twenty were taken from non-sun-exposed sites (breast). Hair follicle from 13 healthy volunteers (11 women, two men, aged between 70 and 86) and three albininos (one woman, two men, aged between 13 and 32) were also obtained by plucking from sun-exposed sites (face and hand) (Table I). All subjects were living in geographic areas with high levels of sun exposure but most referred no outdoor work (Table I). Protocols were approved by an institutional human subject committee; informed consent was obtained from all volunteers.

DNA Extraction. DNA from normal skin and hair follicle cells were isolated by standard proteinase K digestion and phenol-chloroform extraction, as previously described (Sambrook *et al.*, 1989). Some DNA extractions were also performed as described by Bannerjee *et al.* (1995), with modifications. Briefly, the samples were placed directly in digestion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20 and 200 μg/mL proteinase K) and digested overnight at 45°C. After digestion, tubes were centrifuged for 5 min at 6,000 rpm. Supernatants containing DNA lysate were pipetted into new sterile tubes and were then boiled for 10 min to inactive proteinase K. The extracted DNA was used for PCR without purification.

PCR-SSCP analysis. We screened mutations in exons 5 through 9 of *TP53* gene. The primers used were as follows:

exon 5, 5'CTCCCCTGCCCTCAACAAG, 5'GCTGCTCACCATCGCTATCTG;

exon 6, 5'CACTGATTGCTCTTAGGTCT, 5'AGTTGCAAACCAGACCTCAG;

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

exon 7, 5'CTAGGTTGGCTCTGACTGTA, 5'TGACCTGGAGTCTTCCAGTG;

exon 8, 5'CCTACTCTGAGTAGTGGTAA, 5'GTCCTGCTTGCTTACCTCG;

exons 8-9, 5'AGTGGTAATCTACTGGGACG; 5'TCTCCATCCAGTGGTTTCTT.

Genomic DNA (100-300 ng) were subjected to 35 cycles of PCR at 94, 55-63, and 72°C for 60, 30-60, and 60 sec, respectively, for denaturation, annealing, and elongation in 50 µL of reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0-10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0-5% glycerol, 1.5-3 mM $MgCl_2$, 200 µM each dNTP, 0.5 pmol/µL each primer, and 2 U Taq DNA polymerase (Gibco-BRL). PCR products were diluted in loading dye, heat denatured and loaded onto 7.5%-12% non-denaturing acrylamide gel with 5% glicerol. Gels were run at constant power and at 4 °C or room temperature. After migration, gels were subjected to silver staining as described by Bassam and Caetano-Anollés (1993), with modifications.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA damage by UV radiation plays an essential role in skin cancer induction (Burren *et al.*, 1998). UV ligth is absorbed by DNA within epidermal keratinocytes and produces two types of photoproducts, namely the cyclobutane dimer and the pyrimidine/pyrimedone (6/4) photoproduct (Whittaker, 1997). All these photoproducts are removed in normal cells by DNA excision repair (Hall *et al.*, 1996; Kraemer, 1997).

Unrepaired photoproducts may block DNA replication leading the cell to death. Alternativaly, bypass of unrepaired lesions during replication may result in incorporation of the incorrect base opposite the photoproducts causing a mutation (D'Errico *et al.*, 1996; Leffel and Brash, 1996). Two-thirds of these UV-specific mutations are C→T substitutions and approximately 10% are CC→TT mutations (Brash, 1997; Whittaker, 1997). They have been frequently found in the *TP53* gene in skin cancer samples (Basset-Séguin *et al.*, 1994; Ziegler *et al.*, 1994; Matsumura *et al.*, 1996; D'Errico *et al.*, 1997; Pontén *et al.*, 1997) as well as in chronically sun-exposed epidermis (Nakazawa *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1998).

In the present study, no samples of normal skin from sun-exposed and non-sun-exposed sites showed *TP53* gene alteration (Figure 1). Our analysis on hair follicle samples also exibited no alteration including those from albinos. The results were particularly unexpected in albinos because they lack in melanin protection and present significant increase of skin cancer risk. Our findings could be due to relatively low mean age (46,7 years) of subjects, since *TP53* mutations are frequently observed in normal skin from old persons (Nakazawa *et al.*, 1994; Ziegler *et al.*, 1994). Also, most of our patients referred no outdoor work and *TP53* alterations may be related to continuos and cumulative sun exposure during work although Ouhtit *et al.* (1998) demonstrated no statistically

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

significant association between *TP53* mutation frequency and age or total lifetime sun exposure.

Our results suggest that *TP53* mutations are not obligatorily frequent in chronically sun-exposed skin samples, but may be related to individual features as age, DNA-repair capacity or immune response against mutant cells (Wei *et al.*, 1993; Strickland and Kripke, 1997). Thus, the results may also be explained by differences in skin type related to ethnic composition of the populations and degrees of melanin content which should influence the risks of NMSC. However, we can not exclude that very small mutated clones and normal cells were mixed in the samples. The frequency of mutations measured would then depend on wheter the biopsy included large numbers of abnormal cells and on the sensitivity of detection system.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dra. L. L. Villa and N. A. Pinheiro for helpful suggestions. This work was supported by CAPES, CNPq, FAPESP and FUNDUNESP.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

REFERENCES

BANERJEE, S.K., MAKDISI, W.F., WESTON, A.P., MITCHELL, S.M. and CAMPBELL, D.R., Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques*, **18**, 769-773 (1995).

BASSAM, B.J. and CAETANO-ANOLLÉS, G., Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **42,** 181-188 (1993).

BASSET-SÈGUIN, N., MÒLES, J.-P., MILIS, V., DEREURE, O. and GUILHOU, J.-J., TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, **103,** 102S-106S (1994).

BRASH, D.E., Sunlight and the onset of skin cancer. *TIG*, **13**, 410-414 (1997).

BURREN, R., SCALETTA, C., FRENK, E., PANIZZON, R.G. and APPLEGATE, L.A., Sunlight and carcinogenesis: expression of *p53*and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. *Int. J. Cancer*, **76,** 201-206 (1998).

CORONA, R., Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: a review. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **32**, 37-42 (1996).

D'ERRICO, M., CALCAGNILE, A. and DOGLIOTTI, E., Genetic alterations in skin cancer. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **32**, 53-63 (1996).

D'ERRICO, M., CALCAGNILE, A.S., CORONA, R., FUCCI, M., ANNESSI, G., BALIVA, G., TOSTI, M.E., PASQUINI, P. and DOGLIOTTI, R., p53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res.*, **57**, 747-752 (1997).

FRANCESCHI, S., LEVI, F., RANDIMBISON, L. and LA VECCHIA, C., Site distribution of different types of skin cancer: new aetiological clues. *Int. J. Cancer*, **67**, 24-28 (1996).

HALL, J., ARTUSO, M. and ENGLISH, D.R., Molecular epidemiology of skin cancers: DNA repair and non-melanocytic skin cancer. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **32**, 43-51 (1996).

JONASON, A.S., KUNALA, S., PRICE, G.J., RESTIFO, R.J., SPINELLI, H.M., PERSING, J.A., LEFFELL, D.J., TARONR, R.E. and BRASH, D.E., Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1425-1429 (1996).

KRAEMER, K.H., Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11-14 (1997).

KRICKER, A., ARMSTRONG, B.K., ENGLISH, D.R. and HEENAN, P.J., Pigmentary and cutaneous risk factors for non-melanocytic skin cancer - a case - control study. *Int. J. Cancer*, **48**, 650-662 (1991).

LEFFEL, D.J. and BRASH, D.E., Sunlight and skin cancer. *Sci. Am.*, **275**, 38-43 (1996).

MARKS, R., An overview of skin cancers: Incidence and causation. *Cancer*, **75**, 607- 612 (1995).

MATSUMURA, Y., NISHIGORI, C., YAGI, T., IMAMURA, S. and TAKEBE, H., Characterization of p53 gene mutations in basal-cell carcinomas: comparison between sun-exposed and less-exposed skin areas. *Int. J. Cancer*, **65**, 778-780 (1996).

MILLER, S.J., SUN, T.-T. and LAVKER, R.M., Hair follicles, stem cells, amd skin cancer. *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 288S-294S (1993).

NAKAZAWA, H., ENGLISH, D., RANDELL, P.L., NAKAZAWA, K., MARTEL, N., ARMSTRONG, B.K.and YAMASAKI, H., UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 360-364 (1994).

OUHTIT, A., NAKAZAWA, H., ARMSTRONG, B.K., KRICKER, A., TAN, E., YAMASAKI, H. and ENGLISH, D.R., UV-radiation-specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 523-531 (1998).

PONTÉN, F., BERG, C., AHMADIAN, A., REN, Z.P., NISTER, M., LUNDEBERG, J., UHLEN, M. and PONTEN, J., Molecular pathology in basal cell cancer with p53 as a genetic marker. *Oncogene*, **15**, 1059-1067 (1997).

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T., *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2a. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (1989).

STRICKLAND, F.M. and KRIPKE, M.L., Immune response associated with nonmelanoma skin cancer. *Clin. Plast. Surg.*, **24**, 637-647 (1997).

STROM, S.S. and YAMAMURA, Y., Epidemiology of nonmelanoma skin cancer. *Clin. Plast. Surg.*, **24**, 627-636 (1997).

TAKATA, M., REHMAN, I. and REES, J.L., *p53* mutation spectrum in japanese bowen's disease suggests a role mutagens other than ultraviolet light. *Int. J. Cancer*, **71**, 370-372 (1997).

TAYLOR, C.R. and SOBER, A.J., Sun exposure and skin disease. *Annu. Rev. Med.*, **47**, 181-191 (1996).

WEI, Q., MATANOSKI, G.M., FARMER, E.R., HEDAYATI, M.A. and GROSSMAN, L., DNA repair and aging in basal cell carcinoma. A molecular epidemiology study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1614-1618 (1993).

WHITTAKER, S., Sun and skin cancer. *Br. J. Hosp. Med.*, **56**, 515-518 (1996).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

WILLIAMS, C., PONTÉN, F., AHMADIAN, A., REN, Z.P., LING, G., ROLLMAN, O., LJUNG, A., JASPERS, N.G., UHLEN, M., LUNDEBERG, J. and PONTÉN, J. Clones of normal keratinocytes and a variety of simultaneously present epidermal neoplastic lesions contain a multitude of p53 gene mutations in axeroderma pigmentosum patient. *Cancer Res.*, **58**, 2449-2455 (1998).

ZIEGLER, A., JONASON, A.S., LEFFELL, D.J., SIMON, J.A., SHARMA, H.W., KIMMELMAN, J., REMINGTON, L., JACKS, T. and BRASH, D.E., Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, **372**, 773-776 (1994).

TABLE I. Characterization of the subjects as to sex (F: female; M: male), age (year), occupattion and site of the sample (NS: normal skin; HF: hair follicle; IE: inferior eyelid; SE: superior eyelid; EB: eyebrow; NR: no referred).

Subject	Sample	Sex	Age	Occupattion	Site
1	NS-1	F	36	Secretary	Breast
2	NS-2	F	29	Secretary	Breast
3	NS-4	F	23	Architect	Breast
4	NS-5	F	19	Student	Breast
5	NS-6	F	42	Lawyer	Breast
6	NS-7	F	47	Housewife	Breast
7	NS-8	F	28	Clerk	Breast
8	NS-9	F	45	Teacher	Breast
9	NS-11	F	44	Revenue inspector	Face (IE)
10	NS-13	F	36	Computer operator	Face (IE)
11	NS-15	F	57	Teacher	Face (IE)
12	NS-17	F	46	Teacher	Face (IE)
13	NS-18	F	41	Merchant	Breast
14	NS-19	F	33	School supervisor	Breast
15	NS-20	M	51	Physician	Preauricular
16	NS-23	F	19	Student	Breast
17	NS-25	F	52	Teacher	Face (IE)
18	NS-26	F	31	Bank clerk	Breast
19	NS-27*	F	46	School principal	Breast
	NS-28*				Face (SE)
20	NS-29	F	38	Journalist	Breast
21	NS-22	F	20	Teacher	Breast
22	NS-31	F	28	Teacher	Breast
23	NS-32	F	47	Social worker	Breast
24	NS-33	F	44	Housewife	Auricular
25	NS-34	F	42	Journalist	Face (IE)
26	NS-35	F	55	Housewife	Preauricular
27	NS-36	F	44	Farmer	Auricular
28	NS-37	F	30	Housewife	Breast
29	NS-38	F	34	Merchant	Breast
30	NS-39	F	49	Teacher	Face (IE)
31	NS-40	F	42	Merchant	Face (IE)
32	NS-41	F	19	Student	Breast
33	NS-42	F	46	Farmer	Face (IE)
34	NS-44	F	38	Translator interpreter	Face (IE)
35	NS-45	F	52	Police investigator	Face (IE)
36	NS-46	F	45	Businesswoman	Face (IE)
37	NS-47	F	41	Psychologist	Face (IE)
38	NS-48	F	40	Housewife	Face (IE)
39	NS-49	F	41	School principal	Face (IE)
40	NS-50	F	59	Housewife	Face (IE)
41	HF-1	M	79	Businessman	Face (EB)
42	HF-2	F	71	Housewife	Face (EB)
43	HF-3	F	84	Housewife	Face (EB)
44	HF-4	F	84	Housewife	Face (EB)
45	HF-6	F	86	Housewife	Face (EB)
46	HF-8	F	74	Housewife	Face (EB)
47	HF-9	F	86	NR	Face (EB)
48	HF-10	F	82	NR	Face (EB)
49	HF-11	F	77	Housewife	Face (EB)
50	HF-12	F	75	Housewife	Face (EB)
51	HF-13	M	76	Mechanic	Face (EB)
52	HF-14	F	70	Housewife	Face (EB)
53	HF-15	F	72	Restaurant cook	Face (EB)
54	HF-A1**	M	32	Night guard	Hand
55	HF-A2**	M	13	Student	Face (EB)
56	HF-A3**	F	21	Housewife	Face (EB)

* samples from same subject

** albino

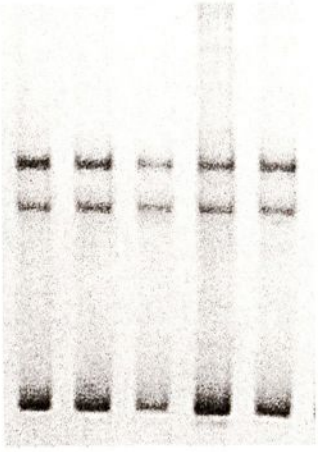
LEGEND

Figure 1. PCR-SSCP analysis of *TP53* exon 5 (A), exon 6 (B), exon 7 (C) and exon 8-9 (D). Each lane contain PCR products from different patients exhibiting normal migration patterns. PCR was performed with different amplification conditions for each exon: exon 5, PCR buffer with 5% glycerol, annealing at 55°C for 30 s; exon 7, PCR buffer with 5% glycerol, annealing at 63°C for 60 s, exon 6, 8, and 8-9, PCR buffer without glycerol, annealing 58°C for 60 s. Eletrophoresis was carried out at 3 W of power constant for 3 hr , at 21°C in 7.5% gel containing 5% glycerol.

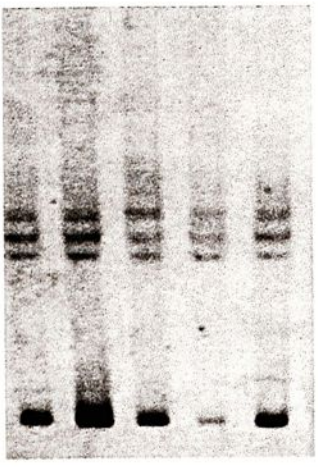
cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

FIGURE 1

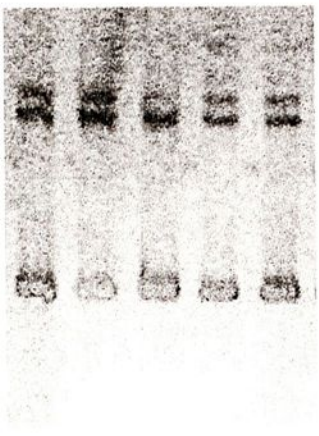
A



B



C



D

SKIN CARCINOGENESIS IN SOUTHEAST BRAZIL II: ANALYSIS OF *TP53* GENE IN NONMELANOMA SKIN TUMORS

Érika Cristina Pavarino Bertelli, Rosane Gomes de Paula Queiroz, Flávia Cristina Carvalho Rodrigues, Wilson Araújo Silva Júnior, Luiz Irineu Tapparo, Eloiza Helena Tajara

From Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (ECPB, RGPQ, FCCR, EHT), Departamento de Ciências Básicas - Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de Base (LIT), São José do Rio Preto; Fundação Hemocentro - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (WASJ), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ADDRESS REPRINT REQUESTS TO : Eloiza Helena Tajara

Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP, CP 136.

15054-000, São José do Rio Preto, S.P, Brazil.

Fone Number: (5517) 2212200

Fax Number: (5517) 2212390

e-mail: tajara@bio.ibilce.unesp.br

ABBREVIATED TITLE: *TP53* alterations in nonmelanoma skin tumors.

KEY WORDS: Protein p53

TP53 gene

Human skin tumors

UV radiation

ABSTRACT

In this study we have analysed the expression of the p53 protein using monoclonal antibody Pab 1801 in 92 skin lesions. Nuclear immunostaining was detected in 5/30 (16.6%) cases of solar keratosis, in 11/31 (35.5%) of squamous cell carcinomas and in 16/31 (51.6%) of basal cell carcinomas, all from sun-exposed body sites. In addition to immunohistochemical detection, we screened for *TP53* mutations by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and direct DNA sequencing analysis in 32 lesions with positive nuclear immunoreactivity. Of these, only five basal cell carcinomas and one squamous cell carcinoma revealed *TP53* gene mutations, all in previously reported hotspots sites of the gene. These findings showed a low correlation between p53 immunopositivity and *TP53* mutation and may be attributed to the fact that mutations occurred outside the region investigated or reflect stabilization of p53 protein via interations with other proteins or post-transcriptional modification.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

INTRODUCTION

Skin cancers are the most common type of human cancer and several lines of evidence indicate that these tumors are associated with sun exposure. Epidemiological studies strongly implicate UV-light of sunlight as the oncogenic agent (Strom and Yamamura, 1997). It is known that UV radiation produces DNA damage predominantly at dipyrimidine sites, which results mainly in C→T and sometimes in CC→TT transitions (Taylor, 1994). These mutations have been found in the *TP53* tumor suppressor gene in a large percentage of such cancers (Basset-Sèguin *et al.*, 1994; Matsumura *et al.*, 1996; D'Errico *et al.*, 1997; Dumaz *et al.*, 1997; Pontén *et al.*, 1997).

The *TP53* gene encodes a nuclear phosphoprotein which is thought to play an important role in the control of cellular proliferation, DNA repair and cell death (Wang and Harris, 1997; Hetts, 1998) and is present at very low concentration, amounting to only a few thousand molecules per cell (Ro *et al.*, 1993). This very low concentration of normal p53 protein is consequence of a short protein half-life and result in extremely difficult detection using conventional immunochemical or histochemical methods. In contrast, mutant p53 protein is more stable and has a greatly extended intracellular half-life, accumulating at very high concentrations in the nucleus. Thus, detection of p53 protein with conventional methods suggests that mutation has occurred (Ro *et al.*, 1993; Hall and Lane, 1994).

Although positive immunocytochemistry has been used as a marker of mutation, some data indicate that this assumption may not always be valid. Firstly, the induction of p53 expression in normal human skin has been demonstrated after mild exposure to UV light, so that the non-mutant form can be observed immunochemically (Hall *et al.*, 1993; Burren *et al.*, 1998). Secondly, there is increasing evidence that different agents interact with p53 inactivating it, such as viral and cellular proteins (Lane, 1994). Also, in normal

cells of patients with inherited germline p53 mutation, mutant p53 protein has not been detectable (Felix *et al.*, 1993). In contrast, positive immunostaining was seen in normal tissues of patients with familial cancer syndromes and no p53 mutation (Barnes *et al.*, 1992; MacGeoch *et al.*, 1995). It is clear, therefore, that immunoreactivity cannot be used to indicate malignancy in a straightforward manner (Campbell *et al.*, 1993).

A further consideration is the numerical aspect of p53 overexpression investigated by immunohistochemical methods (Hall and Lane, 1994). Some tumors show p53 overexpression in the majority of cells with very intense staining. In contrast, other tumors show variable levels of expression with occasional cells expressing high levels of p53 (Midgley *et al.*, 1992; Ren *et al.*, 1996). Thus, the quantitative aspect of p53 expression, and specifically the proportion of cells that show overexpression, may be very important (Hall and Lane, 1994).

In the present study, we investigated the relationship between *TP53* mutation and p53 immunostaining in skin cancers of patients living in Southeast Brazil, an area with high levels of sun exposure, by means of immunocytochemical staining, single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and direct DNA sequencing methods.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

MATERIAL AND METHODS

Routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues, stored for five to nine years, from 30 cases of solar keratosis (SK), 31 squamous cell carcinomas (SCC) and 31 basal cell carcinomas (BCC) were used in the present study. Of these, 83 cases were excised from sun-exposed body sites (Table I, II and III). The patients consisted of 27 men and 42 women, ranging in age from 17 to 90 years (mean, 63 years), all living in geographic areas with high levels of sun exposure.

For immunohistochemical stains, sections (6μm) were cut and mounted on glue-coated slides, de-waxed and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was blocked with 1% hydrogen peroxide in methanol and non-specific binding sites were blocked with 20% normal horse serum in phosphate-buffered saline (PBS). The sections were incubated overnight at room temperature with the anti-p53 antibody Pab 1801 (Oncogene Science) at 1:500 dilution. Biotinylated anti-mouse IgG and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) were added in sequence (Vectastain ABC kit, Vector), followed by the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB). Finally, the slides were stained with Harris hematoxylin, dehydrated in xylene, and coverslipped with Entelan (Merck). Immunoperoxidase-stained sections were examined by light microscopy. Negative controls were obtained by the same experimental procedure without primary antibody, and a section of squamous cell carcinoma of the penis with high p53 expression was included as a positive control.

The positivity for p53 was identified by the presence of brown reaction products in the nuclei. The following semiquantitative evaluation and scoring system was used in low power field (x 40): negative immunoreactivity (less than 1% of positive nuclei), focal immunoreactivity (1% to 5% of positive nuclei), positive immunoreactivity (more than 5% of positive nuclei). Scoring of the number of positive cells was performed in high

power fields (x 400). In heavily stained areas, 500 tumor cells were counted and the percentage of immunoreactivity of positive nuclei was estimated. The intensity was graded as weak if nuclear staining was clearly visible as a light brown color, moderate if staining were medium brown, and strong if staining were dark brown.

Genomic DNAs from 32 paraffin-embedded tumor tissues with positive nuclear immunoreactivity were subject to PCR-SSCP analysis using *TP53* exons 5 to 9. To obtain the genomic DNA from paraffin blocks, two unstained 10μm sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissue were deparaffinized with or without xilene. Microdisection was performed in most samples. Paraffin-free tumor tissue were suspended in digestion buffer with proteinase K (final concentration 200μg/mL) overnight at 45°C, followed or not by extraction with phenol/chloroform.

In the SSCP-PCR procedure, the primers used for *TP53* gene exons were as follows:

exon 5, 5'-CTCCCCTGCCCTCAACAAG, 5'-GCTGCTCACCATCGCTATCTG;

exon 6, 5'-CACTGATTGCTCTTAGGTCT, 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAG;

exon 7, 5'-CTAGGTTGGCTCTGACTGTA, 5'-TGACCTGGAGTCTTCCAGTG;

exon 8, 5'-CCTACTCTGAGTAGTGGTAA, 5'-GTCCTGCTTGCTTACCTCG;

exons 8-9, 5'-AGTGGTAATCTACTGGGACG; 5'-TCTCCATCCAGTGGTTTCTT.

PCR was carried out using standard conditions. Genomic DNA (100-300ng) was incubated in a total volume of 25-50 μL containing each dNTP at 200 μM, 0.5 pmol/μL of each primer, 2 U Taq DNA polymerase (Gibco-BRL), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM potassium chloride, 1.5-3 mM magnesium chloride, 0-10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0-5% glycerol. DNA was amplified for 35 cycles consisting of 1 min at 94°C, 30 s to 1 min at 55-63°C and 1 min at 72°C. For an optimal reaction, initial inhibition of polymerase

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

activity (hot start method) was performed for exons 6, 8 and 8-9. In some instances, consecutive reactions using nested primers were required for amplification of exon 8. PCR products were diluted in loading dye (95% formamide, 0.5*M* EDTA, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol blue), heat denatured, and loaded onto 7.5% non-denaturing polyacrylamide gel containing 5% glycerol. Electrophoresis was carried out at 3 W of constant power for 4 hr at 4°C or room temperature. After migration, gels were subjected to silver staining as described by Bassam and Caetano-Anollés (1993) with slight modifications.

DNA sequences of sense and antisense strands of the PCR products were determined by fluorescence based dideoxy terminator cycle sequencing followed by gel electrophoresis, data collection, and analysis on an automated DNA sequencer (Model ABI Prism 377, Applied Biosystems Inc.)

RESULTS

Nuclear positivity was observed in 16.6% (5/30) of SK, in 35.5% (11/31) of SCC and in 51.6% (16/31) of BCC (Figure 1), all from sun-exposed sites of the body. Of the nine non-sun-exposed lesions, only two cases of SK showed focal positivity. Focal immunoreactivity was also found in ten sun-exposed samples (Table IV). The proportion of tumor cells showing p53 positivity is shown in Table V, according to the scoring system mentioned above. Nuclear staining varied in intensity and was more extensive in malignant lesions (Table VI).

SSCP analysis of exons 5-9 revealed alterations in the mobility shift of the single-strand DNAs subsequently confirmed by direct DNA sequencing. Four of these mutations would have resulted in a change in the amino acid sequence of the p53 protein and one would have been silent; one introduced a premature stop codon resulting in a truncated protein. The mutations observed included two transversions (one C→A and one A→T), three transitions (one G→A and two C→T) and a double-base change (CC→TT). The sites of detected mutations were at codon 136, 139, 142, 154, 178/179 in exon 5, and codon 273 in exon 8 (Table VII; Figure 2).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

DISCUSSION

The present study detected aberrant expression of p53 protein in a low proportion of benign epidermal lesions and in a moderate proportion of malignant skin lesions. Also, the staining intensity and the percentage of cells exhibiting nuclear reactivity were more extensive in malignant lesions. The present result of nuclear positivity observed in 16.6% of SK, in 35.5% of SCC and in 51.6% of BCC agree with previous reports which have identified overexpression of p53 in a range of 21-74% of SK, 8-61% of SCC and 10-92% of BCC (Gusterson *et* al., 1991; Barbareshi *et* al., 1992; McGregor *et* al., 1992; Shea *et* al., 1992; Sim *et* al., 1992; Slater *et* al., 1992; Stephenson *et* al., 1992; Urano *et* al., 1992; Campbell *et al.*, 1993; Helander *et* al., 1993; Molès *et* al., 1993; Nagamo *et* al., 1993; Ro *et al.*, 1993; Taguchi *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993; Kershmann *et al.*, 1994; Kubo *et al.*, 1994; Oram *et al.*, 1994; Kay *et al.*, 1996). There also have a few studies reporting no nuclear p53 immunoreactivity in benign and malignant nonmelanoma skin lesions (Gusterson *et al.*, 1991; Urano *et al.*, 1992; Helander *et al.*, 1993) and such discrepancies in percentage of positive and negative cases may be related to different sample handling and different antibodies (Cristofolini *et al.*, 1993). Nuclear accumulation of p53 protein in benign conditions can be a marker of malignant progression and indicative of lesions more prone to malignancy. Actually, the development of squamous cell carcinoma from solar keratosis is not uncommon (Marks, 1996).

Although an accumulation of the p53 protein in the nuclei is suggestive of the presence of mutation, our data showed a low correlation between immunohistochemical p53 positivity and *TP53* gene mutation. In 26 samples, all with nuclear positivity, mutations could not be detected by using SSCP analysis. This discrepancy may reflect stabilization of the p53 protein via interactions with other proteins, mutation in the noncoding sequence that affect the regulation of p53 protein expression, and/or post-

transcriptional modification of p53 protein. We also cannot exclude the possibility that *TP53* mutations occurred outside the evolutionarily conserved region of the gene (exon 5-8). Nevertheless, exons 5 through 9 were screened because correspond to the region containing the mutational hotspots sites described in human cancers, including skin cancers (Basset-Sèguin *et al.*, 1994), and mutations outside this region are reported to be extremely rare (Greenblat *et al.*, 1996). Also, the antibody used to detect p53 protein, Pab 1801, is a mouse monoclonal antibody that binds to, but does not discriminate between, wild-type and mutant forms of p53 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues sections (Banks *et al.*, 1986). This antibody bind to epitopes in a highly conserved region near the N-terminus that is outside the area usually affected by mutations (Vojtesek *et al.*, 1992). Thus, false positive reactions may account for discrepancies between immunohistochemical and mutation screening results.

Using direct sequencing of PCR product, mutations were detected in five BCCs and one SCC developed in sun-exposed areas: one CC→TT double-base change and one C→T transition that occurred at cytosine dimer, which are only known to be induced by UV, two transversions (one C→A and one A→T) and one G→A transition, which are noninformative because can be caused by many different mutagens and one silent C→T transition, which is not likely to have had any effect on the p53 protein structure. Mutations at codons 136, 139, 142, 154, 178/179 and 273 were in known mutational hotspots (Basset-Séguin *et al.*, 1994; Pontén *et al.*, 1997; Hussain and Harris, 1998).

Our results likely underestimated the proportion of *TP53* mutations since inevitable mixing of normal and tumor cells in the samples reduce the sensitivity of the detection system used in this study. Actually, the sensitivity of the screening system is an important parameter that may influence the results. For example, Hayes *et al.* (1998) found eight

mutations in 22 astrocytomas (36%) using DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) assay. Such result is significantly different from the mutation frequency of 1.9% previously found for the same tumor type using SSCP technique (Hunter *et al.*, 1993; Ohgaki *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 1994; Litofsky *et al.*, 1994; Felix *et al.*, 1995; Schiffer *et al.*, 1995; Patt *et al.*, 1996). Conversely, although the frequency of *TP53* mutations was low in our sample of the squamous (9%) and basal cell carcinomas (31%), it was similar to those detected by Pierceall *et al.* (1991), Móles *et al.* (1993), Kanekura *et al.* (1995) and D'Errico *et al.* (1997) who found 15-25% and 0-24% in squamous and basal cell carcinomas, respectively. Our findings imply that, although *TP53* gene mutation and UV exposure play an important role in the carcinogenesis of some skin cancers, other mechanisms may be involved.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J.R. Santos, R. Silistino (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, SP) and A.M. Abreu (Laboratório de Patologia - Hospital das Clínicas, Ribeirão Preto, SP) for technical assistance, Dr. C. Korch (University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA), Dr. M.A. Zago, Dr. L.G. Tone, W.A. da Silva Júnior, J.A.R. Lemos (Faculdade de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, SP) for technical help in sequencing the samples and Dra. L.L. Villa (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo, SP) for kindly donating the p53 antibody. This work was supported by CAPES, CNPq, FAPESP and FUNDUNESP.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

REFERENCES

BANKS, L. MATTASHEWSKI, G. and CRAWFORD, L., Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies if human p53 expression. *Eur. j. Biochem.*, **159,** 529-534 (1986).

BARBARESHI, M., GIRLANDO, S., CRISTOFOLINI, P., CRISTOFOLINI, M., TOGNI, R. and BOI, S., p53 protein expression in basal cell carcinomas. *Histopathology*, **21,** 579-581 (1992).

BARNES, D.M., HAMBY, A.M., GILLETT, C.E., MOHAMED, S., HODGSON, S., BOBROW, L.G., LEIGH, I.M., PURKIS, T., MacGEOCH, C., SPURR, N.K., PARTEK, J., VOJTESEK, B., PICKSLEI, S.M. and LANE, D.P. Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet*, **340,** 259-263 (1992).

BASSAM, B.J. and CAETANO-ANOLLÉS, G., Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **42,** 181-188 (1993).

BASSET-SÈGUIN, N., MÒLES, J.-P., MILIS, V., DEREURE, O. and GUILHOU, J.-J., TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, **103,** 102S-106S (1994).

BURREN, R., SCALETTA, C., FRENK, E., PANIZZON, R.G. AND APPLEGATE, L.A., Sunlight and carcinogenesis: expression of *p53*and pyrimidine dimers in human skin following UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. *Int. J. Cancer*, **76,** 201-206 (1998).

CAMPBELL, C., QUINN, A.G., ANGUS, B. and REES, J.L., The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.*, **129,** 235-241 (1993).

CRISTOFOLINI, M., BOI, S., GIRLANDO, S., ZUMIANI, G., CRISTOFOLINI, P., PALMA, P.D., DOGLIONI, C. and BARBARESHI, M., p53 protein expression in nevi and melanomas. *Arch. Dermatol.*, **129,** 739-743 (1993).

D'ERRICO, M., CALCAGNILE, A.S., CORONA, R., FUCCI, M., ANNESSI, G., BALIVA, G., TOSTI, M.E., PASQUINI, P. and DOGLIOTTI, E., *p53* mutations and chromosome instability in basas cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res.*, **57,** 747-752 (1997).

DUMAZ, N., van KRANEN, H.J., de VRIES, A., BERG, R.J., WESTER, P.W., van KREIJL, C.F., SARASIN, A., DAYA-GROSJEAN, L. and de Gruijl, F.R., The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice. *Carcinogenesis*, **18,** 897-904 (1997).

FELIX, C.A., STRAUSS, E.A., D'AMICO, D., TOSOKOS, M., WINTER, S., MITSUDOMI, T., NAU, M.M., BROWN, D.L., LEAHEY, A.M., HOROWITZ, M.E., POPLACK, D.G., COSTIN, D. and MINNA, J.D., A novel germiline p53 splicing mutation in a pediatric patient with a second malignat neoplasm. *Oncogene*, **8,** 1203-1210 (1993).

FELIX, C.A., SLAVE, I., DUNN, M., STRAUSS, E.A., PHILLIPS, P.C., RORKE, L.B., SUTTON, L., BUNIN, G.R. and BIEGEL, J.A., p53 gene mutations in pediatric brain tumors. *Med. Pediatr,* **25,** 431-436 (1995).

GREENBLAT, M.S., GROLLMAN, A.P. and HARRIS, C.C., Deletions and Insertions in the *p53* tumor suppressor gene in human cancers: confirmation of the DNA polymerase slippage/misalignment model. *Cancer Res.*, **56,** 2130-2136 (1996).

GUSTERSON, B.A., ANBAZHAGAN, R., WARREN, W., MIDGELY, C., LANE, D.P., O'HARE, M., STAMPS, A., CARTER, R. and JAYATILAKE, H., Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*, **6,** 1785-1789 (1991).

HALL, P.A. and LANE, D.P., p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? - Revisited! *J. Pathol.*, **172,** 1-4 (1994).

HALL, P.A., McKEE, P.H., MENAGE, H.du P., DOVER, R., and LANE, D.P., High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*, **8,** 203-207 (1993).

HAYS, V.M., DIRVEN, C.M.F., DAM, A., VERLINDE, E., KOUDSTAAL, J., MOLENAAR, W.M., MOOIJ, J.J.A., HOFSTRA, R.M.W. and BUYS, C.H.C.M., High frequency of TP53 mutations in juvenile pilocytic astrocytomas. (Abstract). In: 6th EUROPEAN CONFERENCE ON CYTOGENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF HUMAN SOLID TUMORS, Saarbrücken, Germany, p.83 (1998).

HELANDER, S.D., PETERS, M.S. and PITTELKOW, M.R., Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathologic conditions. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **29,** 741-748 (1993).

HETTS, S.W., To die or not to die - An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, **279,** 300-307 (1998).

HUNTER, S.B., BANDEA, C., SWAN, D., ABBOTT, K. and VARMA, V.A., Mutations in the p53 gene in human astrocytomas: detection by single-strand conformation polymorphism analysis and direct DNA sequencing. *Mod. Pathol.*, **6,** 442-445 (1993).

HUSSAIN, S.P. and HARRIS, C.C., Molecular Epidemiology of human cancer: contribution of mutations spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.*, **58,** 4023-4037 (1998).

KANEKURA,T., KANZAKI, T., KANEKURA, S., KAWAHARA, K., NAKASHIMA, T., KITAJIMA, I. and MARUYAMA, I., p53 gene mutations in skin cancers with underlying disorders. *J. Dermatol. Sci.*, **9,** 209-214 (1995).

KAY, E.W., WALSH, C.J.B., WHELAN, D., O'GRADY, A.and LEADER, M.B., Inter-observer variation of p53 immunohistochemistry - an assessment of a partical problem and comparison with other studies. *Br. J. Biomed. Sci.*, **53,** 101-107 (1996).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

KERSCHMANN, R.L., McCALMONT, T.H. and LeBOIT, P.E., p53 oncoprotein expression and proliferation index in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, **130,** 181-186 (1994).

KUBO, Y., URANO, Y., YOSHIMOTO, K., IWAHANA, H., FUKUHARA, K., ARASE, S. and ITAKURA, M., p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J. Invest. Dermatol.*, **102,** 440-444 (1994).

LANE, D.P., p53 and human cancers. *Br. Med. Bull.*, **50,** 582-599 (1994).

LANG, F.F., MILLER, D.C., PISHARODY, S., KOSLOW, M. and NEWCOMB, E.W., High frequency of p53 protein accumulation without p53 gene mutation in human juvenile pilocytic, low grade and anaplastic astrocytomas. *Oncogene,* **9,** 949-954, 1994.

LITOFSKY, N.S., HINTON, D. and RAFFEL, C., The lack of a role for p53 in astrocytomas in pediatric patients. *Neurosurgery,* **34,** 967-972 (1994).

MacGEOCH, C., TURNER, G., BOBROW, L.G., BARNES, D.M., BISHOP, D.T., SPURR, N.K., Heterogeneity in Li-Fraumeni families: p53 mutation anlysis and immunohistochemical staining. *J. Med. Genet.*, **32,** 186-190 (1995).

MARKS, R., Skin cancer quartet - Squamous cell carcinoma. *Lancet*, **347,** 735-738 (1996).

MATSUMURA, Y., NISHIGORI, C., YAGI, T., IMAMURA, S. and TAKEBE, H., Characterization of *p53* gene mutations in basal-cell carcinomas: comparison between sun-exposed and less-exposed areas. *Int. J. Cancer*, **65,** 778-780 (1996).

McGREGOR, J.M., YU, C.C., DUBLIN, E.A., LEVISON, D.A. and MacDONALD, D.M., Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.*, **127,** 463-469 (1992).

MIDGLEY, C.A., FISHER, C.J. and BARTÈK, J., Analysis of p53 expression in human tumors: an antibody raised against human p53 expressed in Escherichia coli. *J. Cell Sci*, **101,** 183-189 (1992).

MOLÈS, J.P., MOYRET, C., GUILLOT, B., JEANTEUR, P., GUILHOU, J.-J., THEILLET, C. and BASSET-SÈGUIN, N., p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene*, **8,** 583-588 (1993).

NAGANO, T., UEDA, M. and ICHIHASHI, M., Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet light-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Arch. Dermatol.*, **129,** 1157-1161 (1993).

OHGAKI, H., SCHWAB, M., REICHEL, M.B., MARIANI, L., GEHRING, M., PETERSEN, I., HOLL, T., WIESTER, O.D. and KLEIHUES, P., Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms the human nervous system. *Mol. Carcinog.*, **8,** 74-80 (1993).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ORAM, Y., ORENGO, I., BAER, S.C. and OCAL, T., p53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **31,** 417-422 (1994).

PATT, S., GRIES, H., GIRALDO, M., CERVOS-NAVARRO, J., MARTIN, H., JANISH, W. and BROCKMOLLER, J., p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. *Hum. Pathol,* **27**, 586-589 (1996).

PIERCEALL, W.E., MUKHOPADHYAY, T., GOLDBERG, L.H. and ANANTHASWAMY, H.N., Mutations in the P53 tumor suppressor gene in human cutaneous squamous cell carcinomas. *Mol. Carcinogenesis*, **4**, 445-449 (1991).

PONTÉN, F., BERG, C., AHMADIAN, A., REN, Z.P., NISTER, M., LUNDEBERG, J., UHLEN, M. and PONTÉN, J., Molecular pathology in basal cell cancer with p53 as a genetic marker. *Oncogene*, **15,** 1059-1067 (1997).

REN, Z.-P., PONTÉN, F., NISTÉR, M. and PONTÉN, J., Two distinct p53 immunohistochemical patterns in human squamous-cell skin cancer, precursors and normal epidermis. *Int. J. Cancer*, **69,** 174-179 (1996).

RO, Y.S., COOPER, P.N., LEE, J.A., QUINN, A.G., HARRISON, D., LANE, D., HORNE, C.H.W., REES, J.L., ANGUS, B., p53 protein expression in benign and malignant skin tumours. *Br. J. Dermatol.*, **128,** 237-241 (1993).

SCHIFFER, D., CAVALLA, P., DI SAPIO, A., GIORDANA, M.T. and MAURO, A., Mutations and immunohistochemistry of p53 proliferation markers in astrocytic tumors of childhood. *Childs Nerv. Syst.*, **11,** 517-522 (1995).

SHEA, C.R., MCNUTT, N.S., VOLKENANDT, M., LUGO, J. PRIOLEAU, P.G. and ALBINO, A.P., Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. *Am. J. Pathol.*, **141,** 25-29 (1992).

SIM, C.S., SLATER, S. and MCKEE, P.H., Mutant p53 expression in solar keratosis: an immunohistochemical study. *J. Cutan. Pathol.*, **19,** 302-308(1992).

SLATER, S.D., MCGRATH, J.A., HOBBS, C., EADY, R.A.J. and McKEE, P.H., Expression of mutant p53 gene in squamous carcinoma arising in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Histopathology*, **20,** 237-241 (1992).

STEPHENSON, T.J., ROYDS, J., SILCOCKS, P.B. and BLEEHEN, S.S., Mutant p53 oncogene expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, **127,** 566-570 (1992).

STROM, S.S. and YAMAMURA, Y., Epidemiology of nonmelanoma skin cancer. *Clin. Plast. Surg.*, **24,** 627-636 (1997).

TAGUCHI, M., WATANABE, S., YASHIMA, K., MURAKAMI, Y., SEKIYA, T. and IKEDA, S., Aberrations of the suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin (1994) *J. Invest. Dermatol.*, **103,** 500-503 (1993).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

TAYLOR, J.-S., Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer. *Acc. Chem. Res.*, **27,** 76-82 (1994).

URANO, Y., OURA, H., SAKAKI, A., NAGAE, H., MATSUMOTO, K., FUKUHARA, K., NAGAE, T., ARASE, S., NIOMIYA, Y., NAKANISHI, H., SHIGEMI, F. and TAKEDA, K., Immunohistological analysis of p53 expression in human skin tumors. *J. Dermatol. Sci.*, **4,** 69-75 (1992).

VOJTESEK, B., BARTEK, J., MIDGLEY, C.A. and LANE, D.P., An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53: new monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Meth.*, **151,** 237-244 (1992).

WANG, X.W. and HARRIS, C.C., *p53* tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J. Cell. Physiol.*, **173,** 247-255 (1997).

ZIEGLER, A., LEFFELL, D.J., KUNALA, S., SHARMA, H.W., GAILANI, M., SIMON, J.A., HALPERIN, A.J., BADEN, H.P., SHAPIRO, P.E., BALE, A.E. and BRASH, D.E., Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **90,** 4216-4220 (1993).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

TABLE I. Sex (F: female; M: male), age (year), isolate (I) or multiple (Mt) occurrence and site of the sample (Fa: face; Ch: chest; Ne: neck; LA: leg or arm) in 30 solar keratosis (SK) patients. (UnK: unknow).

Sample	Sex	Age	Occurrence	Site
SK-1*	F	55	Mt	Fa
SK-2	M	69	Mt	LA
SK-3	M	63	Mt	Fa
SK-4*	F	66	Mt	LA
SK-5	F	45	I	Ch
SK-6	F	70	I	Fa
SK-7	M	75	I	Ne
SK-8	M	68	I	LA
SK-9	M	44	I	Fa
SK-10	F	78	Mt	LA
SK-11*	F	52	Mt	LA
SK-12	F	17	I	Fa
SK-13	M	67	I	Ch
SK-14	M	68	Mt	Fa
SK-15	M	64	Mt	LA
SK-16	F	45	I	Fa
SK-17	F	60	Mt	LA
SK-18	F	54	Mt	Fa
SK-19	M	75	I	Ch
SK-20	F	90	Mt	Fa
SK-21	F	50	I	Fa
SK-22	F	76	Mt	Fa
SK-23	F	79	UnK	Ch
SK-24	F	69	Mt	Fa
SK-25	M	78	Mt	Fa
SK-26	F	45	I	Fa
SK-27*	F	50	UnK	Fa
SK-28	F	63	I	Fa
SK-29*	M	56	I	Fa
SK-30	F	69	Mt	Ch

* PCR-SSCP analysis

TABLE II. Sex (F: female; M: male), age (year), isolate (I) or multiple (Mt) occurrence and site of the sample (Fa: face; Ch: chest: LA: leg or arm) in 31 squamous cell carcinoma (SCC) patients.

Sample	Sex	Age	Occurrence	Site
SCC-1	M	69	Mt	LA
SCC-2*	M	58	Mt	Fa
SCC-3*	F	78	Mt	Fa
SCC-4	F	80	Mt	Ch
SCC-5	M	54	I	Fa
SCC-6	F	78	Mt	LA
SCC-7*	F	76	Mt	Fa
SCC-8	F	81	I	LA
SCC-9	F	76	Mt	Ch
SCC-10	M	63	Mt	Fa
SCC-11	M	63	Mt	Fa
SCC-12	M	71	Mt	Fa
SCC-13*	F	87	Mt	Fa
SCC-14	F	62	Mt	LA
SCC-15	F	78	Mt	LA
SCC-16	M	50	Mt	Fa
SCC-17	F	63	I	Fa
SCC-18*	F	62	Mt	Fa
SCC-19*	M	76	Mt	Fa
SCC-20	F	61	I	Fa
SCC-21	F	61	I	Fa
SCC-22*	M	67	Mt	Fa
SCC-23*	F	47	Mt	Ch
SCC-24	F	21	I	Fa
SCC-25	F	63	Mt	Fa
SCC-26*	M	74	I	Fa
SCC-27*	M	68	Mt	Fa
SCC-28	M	64	Mt	LA
SCC-29*	F	62	Mt	Fa
SCC-30	M	51	Mt	LA
SCC-31	M	45	I	Fa

* PCR-SSCP analysis

TABLE III. Sex (F: female; M: male), age (year), isolate (I) or multiple (Mt) occurrence and site of the sample (Fa: face; Ne: neck; Ch: chest; LA: leg or arm) in 31 basal cell carcinoma (BCC) patients.

Sample	Sex	Age	Occurrence	Site
BCC-1*	M	70	Mt	Fa
BCC-2	M	70	Mt	Fa
BCC-3	F	56	I	Fa
BCC-4*	F	76	Mt	Fa
BCC-5*	M	63	I	Ne
BCC-6*	M	74	Mt	Fa
BCC-7*	F	77	Mt	Fa
BCC-8*	F	77	Mt	Fa
BCC-9*	M	49	I	Fa
BCC-10*	M	58	Mt	Fa
BCC-11	F	55	Mt	Fa
BCC-12*	F	68	I	Fa
BCC-13	F	55	Mt	Fa
BCC-14	M	72	Mt	Fa
BCC-15	F	55	Mt	Fa
BCC-16*	F	55	Mt	Fa
BCC-17*	M	72	Mt	Ne
BCC-18*	F	33	I	Fa
BCC-19	M	62	I	Ne
BCC-20	M	71	Mt	Fa
BCC-21	M	64	Mt	Ch
BCC-22*	F	88	Mt	Fa
BCC-23	F	85	Mt	Fa
BCC-24	F	53	Mt	Fa
BCC-25*	F	78	Mt	LA
BCC-26	F	52	Mt	LA
BCC-27	F	67	Mt	Fa
BCC-28	M	76	Mt	Fa
BCC-29*	M	68	Mt	Fa
BCC-30	F	76	Mt	Fa
BCC-31*	M	78	Mt	Fa

* PCR-SSCP analysis

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

TABLE IV. p53 immunoreactivity in 92 skin lesions analysed. (SE = sun-exposed; NSE = non-sun-exposed; SK = solar keratosis; SCC = squamous cell carcinoma; BCC = basal cell carcinoma).

TYPE OF LESION		IMMUNOREACTIVITY NUCLEAR			TOTAL DE LESION
		+ No. (%)	- No. (%)	FOCAL No. (%)	
SK	SE	5 (16.6)	19 (63.3)	1 (3.3)	25
	NSE	0 (0)	3 (10)	2 (6.6)	5
SCC	SE	11 (35.5)	11 (35.5)	6 (19.3)	28
	NSE	0 (0)	3 (9.7)	0 (0)	3
BCC	SE	16 (51.6)	11 (38.7)	3 (9.7)	30
	NSE	0 (0)	1 (3.2)	0 (0)	1

(+) positive immunoreactivity; (-) negative immunoreactivity

TABLE V. Proportion of p53 positive cells in tumor samples.

PERCENTAGE OF IMMUNOREACTIVITY *	SOLAR KERATOSIS No. (%)	SQUAMOUS CELL CARCINOMA No. (%)	BASAL CELL CARCINOMA No. (%)
< 1%	22 (73.3)	14 (45.2)	12 (38.7)
1 - 5%	3 (10)	6 (19.3)	3 (9.7)
5 - 25%	4 (13.3)	4 (12.9)	6 (19.3)
26 - 50%	0 (0)	5 (16.1)	6 (19.3)
51 - 75%	1 (3.3)	2 (6.4)	2 (6.4)
76 - 100%	0 (0)	0 (0)	2 (6.4)
TOTAL (> 5%)	5 (16.6)	11 (35.5)	16 (51.6)

* Negative immunoreactivity (<1% of positive nuclei); focal immunoreactivity (1-5%); positive immunoreactivity (>5%).

TABLE VI. Staining intensity of p53 immunoreactivity in nuclei of 32 skin lesions. The intensity was graded as weak if nuclear staining was clearly visible as a light brown color, moderate if stainig was medium brown. And strong if staining was dark brown. (SK = solar keratosis, SCC = squamous cell carcinoma, BCC = basal cell carcinoma).

TYPE OF LESION	INTENSITY		
	WEAK	MODERATE	STRONG
	No.	No.	No.
SK	0	5	0
SCC	3	2	6
BCC	4	7	5

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

TABLE VII. Characterization of *TP53* mutations for SSCP-mutated samples. (SCC = squamous cell carcinoma, BCC = basal cell carcinoma).

Sample No.	Exon	Codon	Mutation	Amino acid substitution
BCC-1	5	136	Caa→Taa	Gln→stop
SCC-19	5	139	aAg→aTg	Lys→Met
BCC-7	5	142	Cct→Act	Pro→Thr
BCC-10	5	154	ggC→ggT	Gly→Gly
BCC-31	5	178/179	caCCat→caTTat	His-His→His-Tyr
BCC-25	8	273	cGt→cAt	Arg→His

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

LEGENDS

Figure 1. Examples of positive p53 immunohistochemistry. (A) Solar keratosis. Nuclear immunoreactivity in the basal and parabasal layers (250x). (B) Basal cell carcinoma with positively stained nuclei confined to the tumor area (100x). (C) Squamous cell carcinoma with positively stained nuclei (250x). (D) Detail of a basal cell carcinoma with nuclear p53 positivity (400x). Layers of keratin are seen in the upper part of the figure.

Figure 2. Examples of nucleotide sequencing of the *TP53* gene. Results of three of six sample are shown. A) *upper panel*, the normal sequence of codon 154 - 159; *lower panel*, the altered sequence (C→T transition at codon 154) in DNA sample of BCC-10; B) *upper panel*, the normal sequence of codon 175 - 181; *lower panel*, the altered sequence (CC→TT transition at codons 178/179) in DNA sample of BCC-31; C) *upper panel*, the normal sequence of codon 272 - 278; *lower panel*, the altered sequence (G→A transition at codon 273) in DNA sample of BCC-25. *Asterisk*, the bases at which mutation was detected.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

FIGURE 1

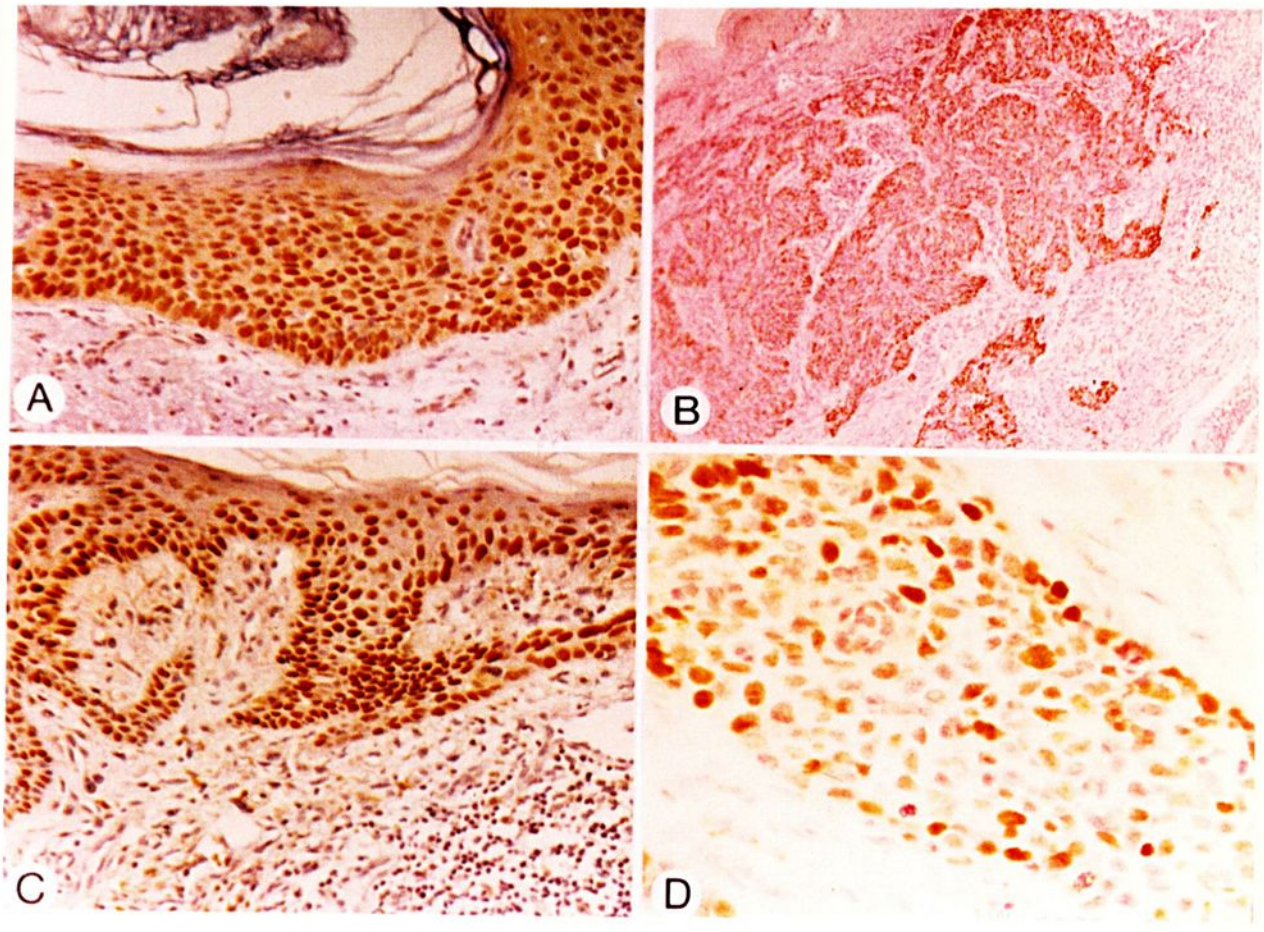
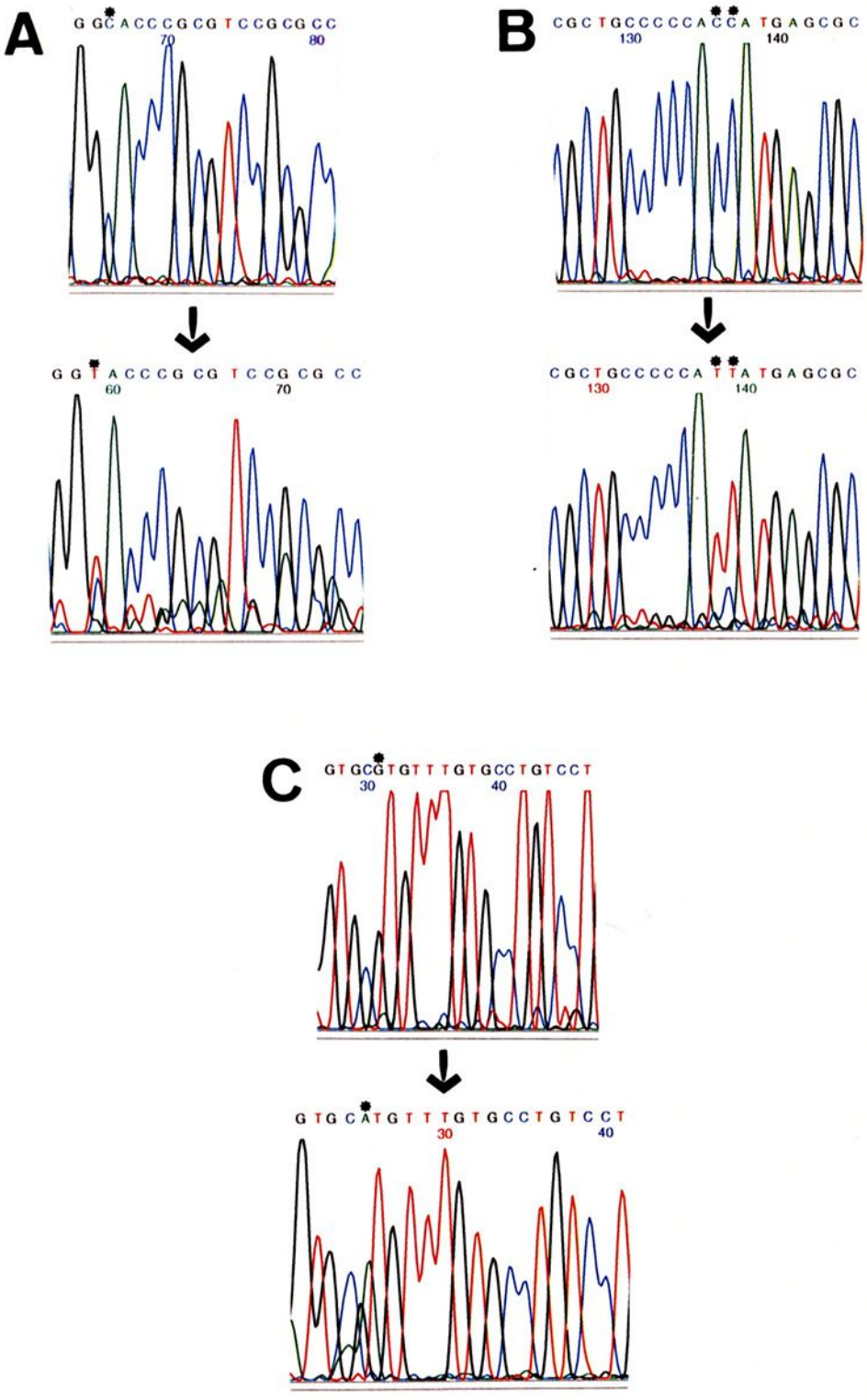

A
B
C
D

FIGURE 2


A
G G C A C C C G C G T C C G C G C C
70
80
G G T A C C C G C G T C C G C G C C
60
70
B
C G C T G C C C C C A C C A T G A G C G C
130
140
C G C T G C C C C C A T T A T G A G C G C
130
140
C
G T G C G T G T T T G T G C C T G T C C T
30
40
G T G C A T G T T T G T G C C T G T C C T
30
40

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os carcinomas cutâneos não-melanocíticos, representados pelos carcinomas baso e espinocelulares, estão entre os tipos mais comuns de câncer e atingem principalmente a população idosa e de pele clara procedente de regiões muito ensolaradas (Corona, 1996; Franceschi *et al.*, 1996; Strom e Yamamura, 1997). No presente trabalho, com exceção de dois indivíduos de pele morena, a maioria dos pacientes com tumores de pele estudados era caucasóide, do sexo feminino e com idade média de 63 anos. A representação maior do sexo feminino contradiz os dados epidemiológicos, que mostram lesões não melanocíticas mais frequentes em homens (Strom e Yamamura, 1997). A explicação para esse resultado pode estar nas diferenças de taxas de sobrevida (Goldstein, 1971), de preocupações com a saúde, ou mesmo estéticas, que ocorrem entre os sexos e podem ser distintas nas várias populações.

Foi observado que a maioria das lesões analisadas nesse estudo foi proveniente de regiões do organismo expostas ao sol, sendo a face a área mais atingida. Ao contrário do esperado, uma grande parte dos indivíduos da amostra foi de trabalhadores ocupacionalmente não expostos à radiação solar, embora essa informação seja, muitas vezes, subjetiva (Karagas, 1994) e, por isso, deve ser avaliada com cautela. Os dados já existentes na literatura mostram que a frequência das neoplasias cutâneas é realmente maior em partes expostas do corpo, em especial no caso dos carcinomas espinocelulares (Franceschi *et al.*, 1996).

A maioria dos tumores foi proveniente de pacientes com idades entre 50 e 70 anos ou mesmo superiores a 70 anos na época da exérese. Tal achado era esperado pois as pessoas que sofreram ação consistente da luz solar e possuem uma baixa proteção do tegumento a esse agente têm maior probabilidade de desenvolver câncer de pele (Klein-

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Szanto, 1989; Corona, 1996). Outro fator importante a ser considerado em idosos é a deficiência da capacidade de reparo do DNA, uma hipótese controversa mas que explicaria um aumento de frequência de lesões causadas pela UV (Warner e Price, 1989; Wei *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1996). Tais lesões podem afetar genes importantes na fisiologia celular e que participam do processo da tumorigênese. Um desses genes é o *TP53*, que está envolvido no controle do ciclo celular, nos processos que desencadeiam o reparo do DNA e na apoptose (Wang e Harris, 1997; Hetts, 1998).

Com o objetivo de investigação de alterações nesse gene provocadas pela luz UV, foi utilizada a técnica de PCR-SSCP para amplificação dos exons 5 a 9, que correspondem a regiões frequentemente envolvidas em mutações nos tumores de pele e em outros tipos já estudados pela literatura (Basset-Séguin *et al.*, 1994; Greenblat *et al.*, 1994; 1996). Essa técnica é bastante empregada no rastreamento de alterações genéticas mas apresenta algumas dificuldades na sua otimização. Por exemplo, no presente trabalho, o DNA de tumores apresentou maior dificuldade de amplificação que o de pele normal. Esse resultado deve depender, em grande parte, dos procedimentos de fixação do material, uma vez que esse foi tratado, logo após a exérese, com formol não tamponado por períodos variáveis. Embora o tipo de fixador e seu tamponamento sejam considerados decisivos para a obtenção de DNA de qualidade satisfatória (Goelz *et al.*, 1985; Greer *et al.*, 1991; O'Leary *et al.*, 1994, Greer *et al.*, 1995), o tempo de fixação também parece ser importante para esse processo. Geralmente, quando os tecidos são fixados por mais de 8 hr, o tamanho do fragmento de DNA que pode ser amplificado por PCR é inversamente proporcional ao tempo de fixação (Karlsen *et al.*, 1994; Dracopoli *et al.*, 1996).

O êxito da amplificação a partir de tecidos arquivados é igualmente dependente da idade do bloco parafinado e do tamanho do fragmento de interesse (Greer *et al.*, 1995; Dracopoli *et al.*, 1996). Neste estudo, foi extraído DNA de tecidos guardados

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

por um a nove anos e a reação de PCR foi realizada com sucesso utilizando fragmentos de até 300 pb, embora os melhores resultados tenham sido observados com fragmentos de 140-190 pb, correspondentes aos exons 5, 6 e 7 do gene *TP53*.

O tipo de extração de DNA foi importante no caso de amostras tumorais e de folículo piloso. Uma quantidade significativa do ácido nucléico foi obtida quando o processo de fenolização foi omitido, provavelmente, em função das perdas que ocorrem durante as passagens requeridas nesse processo (Frank *et al.*, 1996). Outro fator que mostrou-se valioso na obtenção de DNA em quantidades satisfatórias foi a adição repetida de proteinase K durante a sua extração.

Condições utilizadas no processo de amplificação, como presença de glicerol ou de DMSO (*dimethyl sulfoxide*), influenciaram o seu resultado. Ambos os componentes aumentam a especificidade da reação e o último facilita a desnaturação do DNA (Mukhopadhyay e Roth , 1993). A concentração de $MgCl_2$ no tampão de PCR também possui um grande efeito na especificidade da reação e, embora concentrações acima do padrão (1.5 mM) geralmente resultem em amplificação inespecífica (Saiki, 1992), os melhores resultados no caso dos exons 6 a 9 foram obtidos com concentrações de 3 mM e 4.5 mM.

O tempo e a temperatura de anelamento dos *primers* ou iniciadores foram diferentes para cada exon porque dependem da composição das bases do fragmento, mas, de maneira geral, condições mais estringentes mostraram decréscimo de produtos inespecíficos. Uma maior sensibilidade de amplificação também foi atingida por inativação inicial da enzima polimerase pelo método *hot start*.

Em relação à técnica de SSCP, os resultados mostraram que vários fatores podem influenciar sua análise. Esse método, descrito primeiramente por Orita *et al.* (1989), consiste na desnaturação do DNA amplificado por PCR e na sua aplicação em um gel de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

poliacrilamida não-desnaturante. A visualização dos produtos, por meio de coloração radioativa ou não, permite a detecção de mutação em ponto por migração diferencial decorrente da conformação da cadeia simples de DNA (Grompe, 1993).

Os géis com baixa %C (bisacrilamida:acrilamida + bisacrilamida), como aqueles utilizados nesse estudo, apresentam poros maiores e, por isso, parecem ser mais sensíveis à variação de conformação (Hayashi, 1991). A presença de substâncias no gel, como o glicerol, costumam melhorar a separação de sequências normais e mutantes (Orita *et al.*, 1989). Realmente, esse fato foi confirmado nos experimentos realizados com a adição, em gel 7.5%, de glicerol 5%.

Após a corrida eletroforética no gel de SSCP, as fitas de DNA podem ser separadas em duas ou mais bandas (Orita *et al.*, 1989). No presente estudo, o número de bandas foi dependente das condições de amplificação. Duas bandas foram observadas quando o tampão de PCR foi preparado com glicerol ou DMSO e quando o anelamento dos *primers* foi realizado com temperaturas elevadas e por períodos curtos de tempo. Nas amostras submetidas a tempos de anelamento prolongados, várias bandas foram detectadas, refletindo produtos não-específicos. A temperatura de corrida durante a eletroforese também foi importante e sua diminuição foi inversamente proporcional ao número de bandas, sendo também responsável pela mudança no padrão de mobilidade.

Com a otimização da técnica, foi possível investigar, no presente trabalho, a presença de mutações nos exons 5-9 do gene *TP53* em 41 amostras de pele normal e em 16 amostras de folículo pilosoe, além disso, em 32 lesões cutâneas que já haviam sido analisadas para expressão elevada da proteína p53 por método imuno-histoquímico.

Vários estudos revelaram que alterações no gene *TP53* são frequentes em carcinomas da pele (Basset-Séguin, *et al.*, 1994; Pónten *et al.*, 1997). Nos carcinomas espinocelulares, Brash *et al.* (1991) detectaram 58% de mutações enquanto Pierceall *et al.*

(1991) e Molès *et al.* (1993) observaram somente 20% e 15 %, respectivamente. A maioria foi representada por mutações em ponto nos exons 5, 7 e 8, com envolvimento principal dos códons 245, 247/248, 273, 278 e 285/286, mas microdeleções também foram vistas nos exons 4 e 5. Substituições nas sequências dipirimidínicas, em especial do tipo citosina para timina, constituíram o denominador comum em todos os estudos. Essas mutações têm sido significativamente associadas à radiação UV e, em lesões de pele de pacientes com xeroderma pigmentoso, correspondem à grande maioria das alterações detectadas no gene *TP53*. Tal achado é de grande importância porque mostra, nessa doença, a associação da alta incidência de tumores cutâneos em sítios do organismo expostos ao sol com a deficência de reparo das lesões induzidas por UV (Dumaz *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1993, Gherardini *et al.*, 1997).

As investigações de alterações no gene *TP53* em carcinoma *in situ* (doença de Bowen) e em ceratose actínica, lesões provavelmente precursoras do carcinoma espinocelular (CSC), mostram resultados controversos. Alguns autores detectaram 25% de mutações nesse gene (Campbell *et al.*, 1993b) ou mesmo 64% de perda de heterozigosidade no segmento cromossômico que o contém (Rehman *et al.*, 1996) enquanto outros não encontraram qualquer alteração nos casos estudados (Molès *et* al., 1993).

Nos carcinomas basocelulares (CBC) estudados por Rady *et al.* (1992), Molès *et al.* (1993), Ziegler *et al.* (1993) e Matsumura *et al.* (1996), as frequências de mutações no gene *TP53* foram respectivamente, 50%, 48%, 56% e 37% e, do mesmo modo que nos CSC, a maioria foi observada nos exons 5, 7 e 8. Entretanto, alguns códons foram mais frequentemente afetados em CBC, como o 196, o 282 e o 342. Substituições de nucleotídios em sítios dipirimidínicos foram também muito referidas, sugerindo o papel da luz UV na gênese dessas lesões (Ziegler *et al.*,1993). Entretanto, os dados de Matsumura *et*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

al. (1996) em carcinomas basocelulares provenientes de áreas menos expostas ao sol falam a favor da participação de outros fatores na tumorigênese dessas lesões.

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram padrão anormal de corrida eletroforética subsequentemente confirmados por sequenciamento do DNA. As mutações observadas, ocorreram nos códons 136, 139, 142, 154, 178/179 e 273 que constituem *hotspots* para mutações em câncer de pele e em outros tumores (Basset-Séguin *et al.*, 1994; Pontén *et al.*, 1997; Hussain e Harris, 1998) e foram representadas por: uma transição CC→TT, específica da luz UV, duas transversões (C→A e A→T) e uma transição G→A, que não são informativas porque podem ser causadas por diferentes mutágenos, e duas transições C→T, uma delas foi silenciosa e provavelmente não teve qualquer efeito na estrutura da proteína e, a outra ocorreu em sítio de dipirimidina sugerindo a participação da luz UV. As seis amostras com sequência alterada já haviam sido previamente analisadas quanto à expressão do gene *TP53* e mostrado imunorreação nuclear positiva. O acúmulo da proteína geralmente sugere a presença de mutação pois reflete modificações que resultam na sua estabilidade, permitindo sua detecção por técnicas imuno-histoquímicas (Cristofolini *et* al., 1993; Taguchi *et al.*, 1994). A sua expressão elevada nas lesões estudadas pode, portanto, ter sido realmente resultado de mutação e, embora a análise dos exons 5 a 9, que são os mais frequentemente afetados, não tenha confirmado essa sugestão em 26 amostras, alterações em outros segmentos do gene podem estar presentes ou a mistura de células normais e tumorais foi responsável por esse resultado.

Essa discrepância também pode ser resultante do anticorpo utilizado para detectar a proteína p53 nesse estudo. O anticorpo monoclonal Pab 1801 não discrimina formas mutantes e selvagem da proteína p53 em tecidos fixados em parafina (Banks *et al.*, 1986). Além disso, é capaz de ligar-se a região próxima ao N-terminal da proteína, que é geralmente não afetada por mutações (Vojtesek *et al.*, 1992).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

Uma outra hipótese para expressão elevada da p53 sem alteração da sequência codificadora seria a presença de mutações em genes relacionados com o *TP53*, entre eles o *MDM-2*, o *GADD45* e o *WAF1/CIP1/SID1*. O gene *MDM-2* foi originalmente descrito amplificado em uma linhagem celular e sabe-se que seu produto gênico interage com a proteína p53 inativando sua atividade transcricional. Então, é provável que a amplificação de *MDM-2* constitua um modo alternativo de inativação mutacional daquela proteína (Meltzer *et al.*, 1994).

O gene *WAF1* tem sido identificado como um potente inibidor de quinases dependentes de ciclinas e é controlado diretamente pela proteína p53 (El-Deiry *et al.*, 1993). É sabidamente conhecido que células com danos no DNA rapidamente aumentam os níveis de proteína p53 e que a indução de p53 resulta na ativação de genes dependentes da p53, entre eles o *WAF1*. Considerando que o produto gênico do gene *WAF1* atua em etapas posteriores ao *TP53* nas vias de controle do ciclo celular e é regulado por ele, é provável que, na ausência da atividade normal desse efetor, o *TP53* apresente sua expressão elevada e a proteína correspondente pode sofrer acúmulo (Greenblatt *et al.*, 1994; Hartwell e Kastan, 1994).

Em relação às amostras de pele normal, os dados da literatura têm mostrado a presença da proteína p53 mutante em células aparentemente normais do tegumento provenientes de áreas expostas à luz UV e sua ausência naquelas de áreas protegidas do sol (Shea *et al.*, 1992; McNutt *et al.*, 1994). Também têm revelado mutações no gene *TP53* do tipo CC→TT em pele normal exposta ao sol e menos frequentemente, ou mesmo ausente, naquelas não-expostas (Tornaletti *et al.*, 1993; Nakazawa *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1998), implicando num papel importante da radiação solar no desenvolvimento de câncer de pele. Ao contrário desses dados, no presente trabalho, a análise dos exons 5 a 9 através da técnica PCR-SSCP não mostrou qualquer alteração nas amostras de pele normal não-

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

expostas e expostas à radiação solar e mesmo naquelas de folículo piloso. Também não foram observadas nas amostras de albinos, ao contrário do esperado, porque esses indivíduos, pela ausência de melanina, apresentam um risco significativo de desenvolver câncer de pele. Esse resultado pode ter ocorrido em consequência da idade média relativamente baixa (46,7 anos) dos indivíduos estudados, desde que alterações em *TP53* são frequentemente observadas na pele de indivíduos idosos (Nakazawa *et al.*, 1994; Ziegler *et al.*, 1994). Além disso, a frequência de mutações pode estar relacionada com a exposição solar contínua e cumulativa recebida durante as atividades ocupacionais e, neste estudo, a maioria dos indivíduos da amostra foi de trabalhadores ocupacionalmente não expostos à radiação solar. Entretanto, os dados de Ouhtit *et al.* (1998) não revelam uma associação estatísticamente significante entre a frequência de alterações em *TP53* e a idade ou tempo de vida em que o indivíduo foi exposto à radiação solar.

Os dados obtidos sugerem, portanto, que mutações no gene *TP53* não são obrigatoriamente frequentes nas amostras de pele normal exposta ao sol, mas podem estar relacionadas com características individuais como, por exemplo, capacidade de reparo ou resposta imune contra as células mutantes (Wei *et al.*, 1993; Strickland e Kripke, 1997). Além disso, não pode ser excluído o fato de que pequenos clones mutados e células normais estivessem misturados na amostra e não foram detectados em função da sensibilidade da metodologia utilizada. De fato, a presença desses clones têm sido amplamente referida pela literatura e é um exemplo de instabilidade genômica da qual podem participar outros genes, além do *TP53*, como aqueles mapeados em regiões heterocromáticas (Pavarino *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos também podem refletir diferenças na composição étnica da população e no grau de pigmentação da pele. Realmente, é sabidamente conhecido que o risco de desenvolver carcinomas de pele varia de acordo com a raça e o grupo étnico

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

(Strom e Yamura, 1997). Esse fato indica que os fatores genéticos relacionados com a susceptibilidade hereditária ao câncer devem participar também do processo tumorigênico.

85995

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - S. J. Rio Preto
BIBLIOTECA

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

V. RESUMO

Os métodos de extração de DNA a partir de tecidos emblocados em parafina têm tornado possível o estudo retrospectivo de várias doenças através da utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR), proporcionando assim valiosos dados epidemiológicos. No presente estudo, nós avaliamos diferentes técnicas de extração de DNA a partir de material arquivado e parâmetros que influenciam consistentemente a especificidade, a fidelidade e o rendimento dos produtos obtidos pela reação de PCR. Além disso, nós avaliamos vários fatores que afetam a técnica de polimorfismo conformacional de fita simples de DNA (SSCP). Em relação aos métodos de extração, o DNA de material arquivado foi obtido com sucesso utilizando-se digestão protéica com duas adições de proteinase K e métodos sem purificação por fenol-clorofórmio. Os resultados da análise de SSCP mostraram que o padrão de bandamento observado no gel varia não somente com as condições de eletroforese aplicada, especialmente a concentração de acrilamida e a temperatura, mas também é dependente das condições em que a amostra é amplificada.

Com a otimização da técninca, nós utilizamos a combinação dos métodos de PCR-SSCP para investigar a presença de mutações no gene *TP53* na epiderme normal proveniente de regiões expostas ou não-expostas de indivíduos que habitam o sudeste do Brasil, uma área de alto nível de exposição solar. O gene *TP53*, que está frequentemente mutado no câncer humano, parece ser um alvo inicial na carcinogênese cutânea associada à radiação UV. No presente estudo, nenhuma mutação foi detectada em 41 amostras de pele nomal e em 16 de folículo piloso. Nossos resultados sugerem, portanto, que mutações nesse gene não são obrigatoriamente frequentes nas amostras de pele normal de indivíduos que habitam áreas de alto nível de exposição solar e fatores tais como capacidade de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

reparo, resposta imune contra células mutantes, grau de pigmentação da pele e composição étnica da população podem ser importantes na determinação de sua incidência.

No presente estudo, nós também investigamos mutações no gene *TP53* através da análise de SSCP e sequenciamento do DNA. Em 32 lesões de pele com imunorreatividade positiva para a proteína p53 somente cinco carcinomas basocelulares e um espinocelular revelaram alterações no gene, todas em códons que constituem *hotspots* para mutações em câncer de pele e em outros tumores. Esses achados mostraram uma baixa correlação entre imunorreatividade positiva e mutação, o que pode ser atribuído a alterações em outros segmentos do gene ou refletir estabilização de formas não mutantes da proteína pela ligação a outras proteínas ou por sua modificação pós-transcricional.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

VI. SUMMARY

Retrospective studies using polymerase chain reaction (PCR) have become possible with the advent of DNA extraction methods applicable to formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. These retrospective studies may provide valuable epidemiological data on several diseases. In the presenty study, we have evaluated different techniques for extracting DNA from archival material and parameters that consistently influence the specificity, fidelity, and yield of the product in the PCR analysis. In addition, we evaluated a number of factors that affect single-strand conformation polimorphism (SSCP) technique. In relation to the methods for extracting DNA, significant yields of DNA were obtained from archival tissues by overnight digestion with two additions of proteinase K without purification. Results of polyacylamide electrophoresis showed that the banding patterns in SSCP analysis not only vary with conditions of electrophoresis applied, especially acrylamide concentration and temperature, but also depends on the conditions of sample amplification.

After optimization the technique, we used a combination of the PCR and SSCP methods to investigate mutations affecting the *TP53* tumor suppressor gene in normal epidermis from sun-exposed and non-sun-exposed sites of subjects living in Southeast Brazil, an area with high levels of sun exposure. The *TP53* gene is frequently mutated in human cancers, is believed to be an early target in UV radiation-associated cutaneous carcinogenesis. Here, no mutations were detected in 41 normal skin and 16 hair follicle samples. Our results suggest that *TP53* mutations may not be obligatorily frequent in skin from subjects living in areas with high levels of sun exposition and factors such as DNA-repair capacity, immune response against mutant cells, differences in skin type related to ethnic composition of populations may be important in determining their incidence.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

In this study, we also screened for *TP53* mutations by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and direct DNA sequencing analysis in 32 skin lesions with positive nuclear immunoreactivity for p53 protein. Of these, only five basal cell carcinomas and one squamous cell carcinoma revealed gene mutations, all in previously reported hotspots sites. These findings showed a low correlation between immunopositivity and mutation which may be attributed to alterations outside the region investigated or reflect stabilization of p53 protein via interations with other proteins or post-transcriptional modification.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASAKA, T., MIURA, I., TAKAHASHI, N., AKASAKA, H., YONETANI, N., OHNO, H., FUKUHARA, S., OKUMA, M. A recurring translocation, t(3;6)(q27;p21), in non-Hodgkin's lymphoma results in replacement of the 5' regulatory region of BCL6 with a novel H4 histone gene. *Cancer Res.*, v.57, p.7-12, 1997.

AKERVALL, J.A., MICHALIDES, R.J., MINETA, H., BALM, A., BORG, A., DICTOR, M.R., JIN, Y., LOFTUS, B., MERTENS, F., WENNERBERG, J.P. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer*, v.79, p.380-389, 1997.

AKSLEN, L.A., MØRKVE, O. Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer*, v.52, p.13-16, 1992.

AKSLEN, L.A., MONSTAD, S.E., LARSEN, B., STRAUME, O., OGREID, D. Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type. *Int. J. Cancer*, v.79, p.91-95, 1998.

ARROWSMITH, C., MORIN, P. New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene*, v.12, p.1379-1385, 1996.

BALDIN, V., CANS, C., KNIBIEHLER, M., DUCOMMUN, B. Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J Biol. Chem.*, v.272, p.32731-32734, 1997.

BANKS, L. MATTASHEWSKI, G., CRAWFORD, L. Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies if human p53 expression. *Eur. J. Biochem.*, v.159, p.529-534, 1986.

BARBARESCHI, M., GIRLANDO, S., CRISTOFOLINI, P., CRISTOFOLINI, M., TOGNI, R., BOI, S. P53 protein expression in basal cell carcinomas. *Histopathology*, v.21, p.579-581, 1992.

BASSET-SÉGUIN, N., MÒLES, J-P., MILS, V., DEREURE, O., GUILHOU, J-J. TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, v.103, p.102S-106S, 1994.

BELLAMY, C.O.C. p53 and apoptosis. *Br. Med. Bull.*, v.53, p.522-538, 1997.

BITO, T., UEDA, M., ITO, A., ICHIHASHI, M. Less expression of cyclin E in cutaneos squamous cell carcinomas than in benign and premalignant keratinocytic lesions. *J. Cutan. Pathol.*, v.24, p.305-308, 1997.

BLAGOSKLONNY, M.V. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene*, v.15, p.1889-1893, 1997.

BRASH, D.E., RUDOLPH, J.A., SIMON, J.A., LIN, A., McKENNA, G.J., BADEN, H.P., HALPERIN, A.J., PONTÈN, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.10124-10128, 1991.

BRINGUIER, P.P., TAMIMI, Y., SCHUURING, E., SCHALKEN, J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene*, v.12, p.1747-1753, 1996.

BURNS, J.E., BAIRD, M.C., CLARK, L.J., BURNS, P.A., EDINGTON, K., CHAPMAN, C., MITCHELL, R., ROBERTSON, G., SOUTAR, D., PARKINSON, E.K. Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br. J. Cancer*, v.67, p.1274-1284, 1993.

CAMPBELL, C., QUINN, A.G., ANGUS, B., REES, J.L. The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.*, v.129, p.235-241, 1993a.

CAMPBELL, C., QUINN, A.G., RO, Y-S., ANGUS, B., REES, J.L. p53 mutations are common and early events that preced tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J. Invest. Dermatol.*, v.100, p.746-748, 1993b.

CARDOSO, M.C., LEONHARDT, H., NADAL-GINARD, B. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication : cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell*, v.74, p.979-992, 1993.

CASTRESANA, J.S., RUBIO, M.P., VÁZQUEZ, J.J., IDOATE, M., SOBER, A.J., SEIZINGER, B.R., BARNHILL, R.L. Lack of allelic deletions and point mutation as a mechanism of p53 activation in human malignant melanoma. *Int. J. Cancer*, v.55, p.562-565, 1993.

CHANG, F., SYRJÄNEN, S., TEREVAHAUTA, A., SYRJÄNEN, K. Tumourigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene. *Br. J. Cancer*, v.68, p.653-661, 1993.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

CHAO, Y., SHIH, Y.L., CHIU, J.H., CHAU, G.Y., LUI, W.Y., YANG, W.K., LEE, S.D., HUANG, T.S. Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, v.58, p.985-990, 1998.

CORONA, R. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: a review. *Ann. Ist. Super. Sanità*, v.32, p.37-42, 1996.

COURJAL, F., LOUASON, G., SPEISER, P., KATSAROS, D., ZEILLINGER, R., THEILLET, C. Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int. J. Cancer*, v.69, p.247-253, 1996.

CRISTOFOLINI, M., BOI, S., GIRLANDO, S., ZUMIANI, G., CRISTOFOLINI, P., PALMA, P.D., DOGLIONI, C., BARBARESCHI, M. P53 protein expression in nevi and melanomas. *Arch. Dermatol.*, v.129, p.739-743, 1993.

D'ERRICO, M., CALCAGNILE, A., DOGLIOTTI, E. Genetic alterations in skin cancer. *Ann. Ist. Super. Sanità*, v.32, p.53-63, 1996.

D'ERRICO, M., CALCAGNILE, A.S., CORONA, R., FUCCI, M., ANNESSI, G., BALIVA, G., TOSTI, M.E., PASQUINI, P., DOGLIOTTI, R. p53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res.*, v.57, p.747-752, 1997.

DAL CIN, P., WANSCHURA, S., CHRISTIAENS, M.R., Van Den BERGHE, I., MOERMAN, P., POLITO, P., KAZMIERCZAK, B., BULLERDIEK, J., Van Den BERGHE, H. Hamartoma of the breast with involvement of 6p21 and rearrangement of HMGIY. *Genes Chrom. Cancer*, v.20, p.90-92, 1997.

De GRUIJL, F.R. UV carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol.*, v.42, p.177-178, 1994.

DELFINO, A.B.M., BARRETO, E.C., SILVA Jr., E.T., MENDONÇA, R.G., ORNELLAS, M.H. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose - Carcinogênese. *Rev. Bras. Cancerol.*, v.43, p.173-186, 1997.

DOWDY, S.F., HINDS, P.W., LOVIE, K., REED, S.I., ARNOLD, A., WEINBERG, R.A. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, v.73, p.499-511, 1993.

DRACOPOLI, N.C., HAINES, J.L., KORF, B.R., MORI, D.T., MORTON, C.C., SEIDMAN, C.E., SEIDMAN, J.G., SMITH, D.R. *Current Protocols in Human Genetics*. USA: John Willey & Sons, 1996.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

DULIC, V., LEES, E., REED, S.I. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, v.257, p.1958-1961, 1992.

DUMAZ, N., DROUGARD, C., SARASIN, A., DAYA-GROSJEAN, L. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Sci. USA*, v.90, p.10529-10533, 1993.

DUMAZ, N., VAN KRANEN, H.J., DE VRIES, A., BERG, R.J., WESTER, P.W., VAN KREIJL, C.F., SARASIN, A., DAYA-GROSJEAN, L., DE GRUIJL, F.R. The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice. *Carcinogenesis*, v.18, p.897-904, 1997.

EASTON, J., WEI, T., LAHTI, J.M., KIDD, V.J. Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. *Cancer Res.*, v.58, p.2624-2632, 1998.

EL-DEIRY, W.S., TOKINO, T., VELCULESCU, V.E., LEVY, D.B., PARSONS, R., TRENT, J.M., LIN, D., MERCER, W.E., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, v.75, p.817-825, 1993.

ERLANSON, M., PORTIN, C., LINDERHOLM, B., LINDH, J., ROOS, G., LANDBERG, G. Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood*, v.92, p.770-777, 1998.

ESSNER, R., KUO, C.T., WANG, H., WEN, D.R., TURNER, R.R., NYGUYEN, T., HOON, D.S.B. Prognostic inplications of p53 overexpression in cutaneous melanoma from sun-exposed and nonexposed sites. *Cancer*, v.82, p.309-316, 1998.

EVANS, T., ROSENTHAL, E.T., YOUNGBLOM, J., DISTEL, D., HUNT, T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, v.33, p.389-396, 1983.

EWEN, M.E., SLUSS, H.K., WHITEHOUSE, L.L., LIVINGSTON, D.M. TGFβ inhibition of cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell*, v.74, p.1009-1020, 1993.

FISHER, R.P., MORGAN, D.O. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK - activating kinase. *Cell*, v.78, p.713-724, 1994.

FLORES-ROZAS, H., KELMAN, Z., DEAN, F.B., PAN, Z.-Q., HARPER, J.W., ELLEDGE, S.J., O'DONNEL, M., HURWITZ, J. Cdk - interating protein 1 directly binds proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase δ holenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 8655-8659, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

FRANCESCHI, S., LEVI, F., RANDIMBISON, L., LA VECCHIA, C. Site distribution of different types of skin cancer: new aetiological clues. *Int. J. Cancer*, v.67, p.24-28, 1996.

FRANK, T.S., SVOBODA-NEWMAN, S.M., HSI, E.D. Comparison of Methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagn. Mol. Pathol.*, v.5, p. 220-224, 1996.

GENG, Y., WEINBERG, R.A. Transforming growth factor β effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, p.10315-10319, 1993.

GHERARDINI, G., BHATIA, N., STAL, S. Congenital syndromes associated with nonmelanoma skin cancer. *Clin. Plast. Surg.*, v.24, p.649-661, 1997.

GIRARD, F., STRAUSFELD, U., FERNANDEZ, A., LAMB, N.J.C. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, v.67, p.1169-1179, 1991.

GLOTZER, M., MURRAY, A.W., KIRSCHNER, M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, v.349, p.132-138, 1991.

GOELZ, S.E., HAMILTON, S.R., VOGELSTEIN, B. Purification of DNA from formaldehyde fixade and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.130, p.118-126, 1985.

GOLDSTEIN, S. The biology of aging. *N. Engl. J. Med.* , v.285, p.1120-1129, 1971.

GRAÑA, X., REDDY, P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene*, v.11, p.211-219, 1995.

GRAY-BABLIN, J., ZALVIDE, J., FOX, M.P., KNICKERBOCKER, C.J., DeCAPRIO, J.A., KEYOMARSI, K. Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, p.15215-15220, 1996.

GREENBLAT, M.S., GROLLMAN, A.P., HARRIS, C.C., Deletions and Insertions in the *p53* tumor suppressor gene in human cancers: confirmation of the DNA polymerase slippage/misalignment model. *Cancer Res.*, v.56, p.2130-2136, 1996.

GREENBLATT, M.S., BENNETT, W.P., HOLLSTEIN, M., HARRIS, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, v.54, p.4855-4878, 1994.

GREER, C. E., PETERSON, S. L., KIVIAT, N. B., MANUS, M. M. PCR amplification from paraffin embedded tissues. *Anat. Pathol.*, v.95, p.117-124, 1991.

GREER, C.E., WHEELER, C.M., MANOS, M.M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: sample preparation and the effects of fixation. In: DIEFFENBACK, C.W., DVEKSLER, G.S. (Ed.) *PCR primer, a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. p.99-112.

GROMPE, M. The rapid detection of unknow mutations in nucleic acids. *Nature Genet.*, v.5, p.111-117, 1993.

GROSSMAN, D., LEFFEL, D.J. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer. *Arch. Dematol.*, v.133, p.1263-1270, 1997.

GURSTERSON, B.A., ANBAZHAGAN, R., WARREN, W., MIDGLEY, C., LANE, D.P., O'HARE, M., STAMPS, A., CARTER, R., JAYATILAKE, H. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*, v.6, p.1785-1789, 1991.

HALL, J., ARTUSO, M., ENGLISH, D.R. Molecular epidemiology of skin cancers: DNA repair and non-melanocytic skin cancer. *Ann. Ist. Super. Sanità*, v.32, p.43-51, 1996.

HALL, P.A., McKEE, P.H., MENAGE, H. du P., DOVER, R., LANE, D.P. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*, v.8, p.203-207, 1993.

HANNA, Z., JANKOWSKI, M., TREMBLAY, P., JIANG, X., MILATOVICH, A., FRANCKE, U., JOLICOEUR, P. The *vin-1* gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene*, v.8, p.1661-1666, 1993.

HANNON, G.J., BEACH, D. $p^{15INK4B}$ is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest, *Nature*, v. 371, p. 257-260, 1994.

HARTMANN, A., BLASZYK, H., McGOVERN, R.M., SCHROEDER, J.J., CUNNINGHAM, J., De VRIES, E.M.G., KOVACH, J.S., SOMMER, S.S. p53 gene mutations inside and outside of exons 5-8: the patterns differ in breast and other cancers. *Oncogene*, v.10, p.681-688, 1995.

HARTWELL, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, v.71, p.543-546, 1992.

HARTWELL, L.H., KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. *Science*, v.266, p.1821-1828, 1994.

HARTWELL, L.H., WEINERT, T.A. Chekpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, v.246, p.629-634, 1989.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.*, v.1, p.34-38, 1991.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

HEICHMAN, K.A., ROBERTS, J.M. Rules to replicate by. *Cell*, v.79, p.557-562, 1994.

HELANDER, S.D., PETERS, M.S., PITTELKOW, M.R. Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathologic conditions. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.29, p.741-748, 1993.

HETTS, S.W. To die or not to die - An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, v.279, p.300-307, 1998.

HIRAMA, T., KOEFFLER, P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*, v.86. p.841-854, 1995.

HOFFMAN, B., LIEBERMANN, D.A. Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive & negative modulators. *Oncogene*, v.9, p.1807-1812, 1994.

HOLLSTEIN, M., RICE, K., GREENBLATT, M.S., SOUSSI, T., FUCHS, R., SØRLIE, T., HOVIG, E., SMITH- SØRENSEN, B., MONTESANO, R., HARRIS, C.C. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*, v.22, p.3551-3555, 1994.

HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C. p53 mutations in human cancers. *Science*, v.253, p.49-53, 1991.

HOLLSTEIN, M., SOUSSI, T., THOMAS, G., von BREVERN, M.-C., BARTSCH, H. *P53* gene alterations in human tumors: perspectives for cancer control. *Recent Results Cancer Res.*, v.143, p.369-389, 1997.

HUISMAN, O., D'ARI, R. An inducible DNA replication - cell division coupling mechamism in *E. coli*. *Nature*, v.290, p.797-799, 1981.

HUNTER, T., PINES, J. Cyclins and cancer II : cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, v.79, p.573-582, 1994.

HUSSAIN, S.P., HARRIS, C.C. Molecular Epidemiology of human cancer: contribution of mutations spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.*, v.58, p.4023-4037, 1998.

INABA, T., MATSUSHIME, H., VALENTINE, M., ROUSSEL, M.F., SHERR, C.J., LOOK, A.T. Genomic organization, chromosoml localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics*, v.13, p.565-574, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

IOLASCON, A., GIORDANI, L., MORETTI, A., BASSO, G., BORRIELLO, A., DELLA RAGIONE, F. Analysis of CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, and cyclin Ds gene status in hepatoblastoma. *Hepatology*, v.27, p.989-995, 1998.

ISOBE, M., EMANUEL, B.S., GIVOL, D., OREN, M., CROCE, C.M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, v.320, p.84-85, 1986.

JANSEN-DÜRR, P. How viral oncogenes make the cell cycle. *TIG*, v.12, p.270-275, 1996.

JONASON, A.S., KUNALA, S., PRICE, G.J., RESTIFO, R.J., SPINELLI, H.M., PERSING, J.A., LEFFELL, D.J., TARONR, R.E., BRASH, D.E. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, p.1425-1429, 1996.

KARAGAS M.R. Ocurrence of cutaneous basal cell and squamous cell malignancies among those with a prior history of skin cancer. *J. Invest. Dermatol.*, v.102, p.10S-13S, 1994.

KARLSEN, R., KALANTARI, M., CHITEMERERE, M., JOHANSSON, B., HAGMAR, B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab. Invest.*, v.71, p.604-611, 1994.

KAWASAKI, R.S., CALDEIRA, L.F., ANDRÉ, F.S., GASQUES, J.A.L., CASTILHO, W.H., BOZOLA, A.R., THOMÉ, J.A., TAJARA, E.H: Multiple cutogenetic clones in a basal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.54, p.33-38, 1991.

KAWASAKI-OYAMA, R.S., ANDRÉ, F.S., CALDEIRA, L.F., CASTILHO, W.H., GASQUES, J.A.L., BOZOLA, A.R., THOMÉ, J.A., TAJARA, E.H. Cytogenetic findings in two basal cell carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.73, p.152-156, 1994.

KAY, E.W., BARRY WALSH, C.J., WHELAN, D, O'GRADY, A. Inter-observer variation of p53 immunohistochemistry - an assessment of a practical problem and comparison with other studies. *Br. J. Biomed. Sci.*, v.53, p.101-107, 1996.

KERSCHMANN, R.L., Mc CALMONT, T.H., LEBOIT, P.E. p53 Oncoprotein Expression and proliferation index in Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Arch. Dermatol.*, v.130. p.181-186, 1994.

KING, R.W., DESHAIES, R.J., PETERS, J-M., KIRSCHNER, M.W. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, v.274, p.1652-1658, 1996.

KING, R.W., JACKSON, P.K., KIRSCHNER M.W. Mitosis in transition. *Cell*, v.79, p.563-571, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

KLEIN-SZANTO, A.J.P. Pathology of human and experimental skin tumors. In: CONTI, C.J. *et al.*.(Ed.). *Skin tumors: experimental and clinical aspects*. New York: Raven Press, 1989. p.19-53.

KOFF, A., GIORDANO, A., DESAI, D., YAMASHITA, K., HARPER, J.W., ELLEDGE, S., NISHIMOTO, T., MORGAN, D.O., FRANZA, B.R., ROBERTS, J.M. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during G1 phase of the human cell cycle. *Science*, v.257, p.1689-1694, 1992.

KORNMANN, M., ISHIWATA, T., ITAKURA, J., TANGVORANUNTAKUL, P., BEGER, H.G., KORC, M. Increased cyclin D1 in human pancreatic cancer is associated with decreased postoperative survival. *Oncology*, v.55, p.363-369, 1998.

KRAMER, K.H. Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, p.11-14, 1997.

KRICKER, A., ARMSTRONG, B.K., ENGLISH, D.R., HEENAN, P.J. A dose-response curve for sun exposure and basal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, v.60, p.482-488, 1995.

KUBO, Y., URANO, Y., YOSHIMOTO, K., IWAHANA, H., FUKUHUARA, K., ARASE, S., ITAKURA, M. p53 gene mutation in human skin cancers and precancerous lesions: Comparison with immunohistochemical analysis. *J. Invest. Dermatol.*, v.102, p.440-444, 1994.

KUERBITZ, S.J., PLUNKETT, B.S., WALSH, W.V., KASTAN, M.B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.89, p.7492-7495, 1992.

LASTARZA, R., WLODARSKA, I., MATTEUCCI, C., FALZETTI, D., BAENS, M., MARTELLI, M.F., Van den BERGHE, H., MARYNEN, P, MECUCCI, C. Rearrangement between the MYH11 gene at 16p13 and D12S158 at 12p13 in a case of acute myeloid leukemia M1 (AML-M1). *Genes Chrom. Cancer*, v.23, p.10-15, 1998.

LANE, D.P. p53 and human cancers. *Br. Med. Bull.*, v.50, p.582-599, 1994.

LARSEN, C.-J. $p16^{INK4a}$: a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression. *Oncogene*, v.12, p.2041-2044, 1996.

LASKEY, R.A., FAIRMAN, M. P., BLOW, J.J. S phase of the cell cycle. *Science*, v.246, p.609-614, 1989.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

LEACH, F.S., ELLEDGE, S.J., SHERR, C.J., WILLSON, J.K., MARKOWITZ, S., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res.*, v.53, p.1986-1989, 1993.

LEE, J.M., ABRAHAMSON, J.L., BERNSTEIN, A. DNA damage, oncogenesis and the p53 tumour-supressor gene. *Mutat. Res.*, v.307, p.573-581, 1994.

LEFFEL, D.J., BRASH, D.E. Sunlight and skin cancer. *Sci. Am.*, v.275, p.38-43, 1996.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 1993. 1013p.

LEVINE, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, v.88, p.323-331, 1997.

LEVINE, A.J. The tumor suppressor genes. *Ann. Review Biochem.*, v.62, p.623-651, 1993.

LEVINE, A.J., PERRY, M.E., CHANG, A., SILVER, A., DITTMER, D., WU, M., WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-supressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, v.69, p.409-416, 1994.

LEWIN, B. *Genes VI*. New York: Oxford University Press, 1997. 1260p.

LI, R., WAGA, S., HANNON, G.J., BEACH, D., STILLMAN, B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA - dependent DNA replication and repair. *Nature*, v.371, p.534-537, 1994.

LI, S.F., SHIOZAWA, T., NAKAYAMA, K., NIKAIDO, T., FUJII, S. Stepwise abnormality of sex steroid hormone receptors, tumor suppressor gene products (p53 and Rb), and cyclin E in uterine endometrioid carcinoma. *Cancer*, v.77, p.321-329, 1996.

LU, X., LANE, D. P. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation : defects in chromosome instability syndromes? *Cell*, v.75, p.765-778, 1993.

MARX, J. New link found between p53 an DNA repair. *Science*, v.266, p.1321-1322, 1994.

MATSUMURA, Y., NISHIGORI, C., YAGI, T., IMAMURA, S., TAKEBE, H. Characterization of p53 gene mutations in basal-cell carcinomas: comparison between sun-exposed and less-exposed skin areas. *Int. J. Cancer*, v.65, p.778-780, 1996.

McGREGOR, J.M., YU, C.C-W., DUBLIN E.A., BARNES, D.M., LEVISON, D.A., MACDONALD, D.M. p53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. *Br. J. Dermatol.*, v. 128, p.606-611, 1993.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

McGREGOR, J.M., YU, C.C-W., DUBLIN, E.A., LEVISON, D.A., MACDONALD, D.M. Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.*, v.127, p.463-469, 1992.

McNUTT, N.S., SAENZ-SANTAMARIA, C., VOLKENANDT, M., SHEA, C.R., ALBINO, A.P. Abnormalities of p53 protein expression in cutaneos disorders. *Arch. Dermatol.*, v.130, p.225-232, 1994.

MELTZER, P.S. MDM2 and p53: a question of balance. *J. Nat. Cancer Instit.*, v.86, p.1265-1266, 1994.

MERTENS, F., JIN, Y-S., HEIM, S., MANDAHL, N., JONSSON, N., MERTENS, O., PERSSON, B., SALEMARK, L., WENNERBERG, J., MITELMAN, F. Clonal structural chromosome aberrations in noneoplastic cells of the skin and upper aerodigestive tract. *Genes Chrom. Cancer*, v.4, p.235-240, 1992.

MICHALIDES, R., HAGEMAN, P., van TINTEREN, H., HOUBEN, L., WIENTJENS, E., KLOMPMAKER, R.., PETERSE, J. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br. J. Cancer*, v.73, p.728-734, 1996.

MITSUNNAGA, S.J., ZHANG, S.Y., RUGGERI, B.A., GIMENEZ-CONTI, I., ROBLES, A.I., CONTI, C.J., KLEIN-SZANTO, A.J. Positive immunohistochemical staining of p53 and cyclin D in advanced mouse skin tumors, but not in precancerous lesions produced by beno[a]pyrene. *Carcinogenesis*, v.16, p.1629-1635, 1995.

MOLÈS, J.P., MOYRET, C., GUILLOT, B., JEANTEUR, P, GUILHOU, J.J., THEILLET, C., BASSET-SÈGUIN, W. p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene*, v.8, p.583-588, 1993.

MONTANO, X., SHAMSHER, M., WHITEHEAD, P., DAWSON, K., NEWTON, J. Analysis of p53 in human cutaneous melanoma cell lines. *Oncogene*, v.9, p.1455-1459, 1994.

MORGAN, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, v.374, p.131-134, 1995.

MOTOKURA, T., BLOOM, T., KLIM, H.G., JÜPPNER, H., RUDERMAN, J.V., KRONENBERG, H.M., ARNOLD, A. A novel cyclin encoded by a *bcl*-linked candidate oncogene. *Nature*, v.350, p.512-515, 1991.

MOTOKURA, T., KEYOMARSI, K., KRONENBERG, H.M., ARNOLD, A. Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the Prad1/cyclin D1 proto-oncogene. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.20412-20415, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

MUKHOPADHYAY, T., ROTH, J.A. *p53* gene mutations in human premalignant and malignant tissues. In: ADOLPH, K.W. (Ed.) *Gene and chromosome analysis - methods in molecular genetics*, San Diego: Academic Press, 1993. v.2, p.104-128.

MURRAY, A.W., KIRSCHNER, M.W. What controls the cell cycle. *Sci. Am.*, v.264, p.56-63, 1991.

NAGANO, T., UEDA, M., ICHIHASHI, M. Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet ligh-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Arch. Dermatol.*, v.129, p.1157-1161, 1993.

NAKAZAWA, H., ENGLISH, D., RANDELL, P.L., NAKAZAWA, K., MARTEL, N., ARMSTRONG, B.K., YAMASAKI, H. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, p.360-364, 1994.

NASMYTH, K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, v.274, p.1643-1645, 1996.

NAYLOR, M.F. Erythema, skin cancer risk, and sunscreens. *Arch. Dermatol.*, v.133, p.373-375, 1997.

NEVINS, J.R. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, v.258, p.424-429, 1992.

NIELSEN, N.H., ARNERLÖV, C., EMDIN, S.O., LANDBERG, G. Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. *Br. J. Cancer*, v.74, p.874-880, 1996.

NURSE, P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, v.256, p.547, 1975.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, v.344, p.503-508, 1990.

O'LEARY , J.J., BROWNE, G., LANDRES, R.J., CROWLEY, M., BAILEY, H.I., STREET, J.T., POLLOCK, A.M., MURPHY, J., JOHNSON, M.I., LEWIS, F.E., MOHAMDEE, O., CULLINANE, C., DOYLE, C.T. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution - phase polymerase chain reaction and PCR *in situ hybridization*. *Histochem. J.*, v.26, p.337-346, 1994.

ONODERA, H., NAKAMURA, S., SUGAI, T. Cell proliferation and p53 protein expression in cutaneous epithelial neoplasms. *Am. J. Dermathol.*, v.18, p.580-588, 1996.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

ORAN, Y., ORENGO, I., BAER, S.C., OCAL, T. p53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-exposed sites. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.31, p.417-422, 1994.

ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K., SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel eletrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.86, p.2766-2770, 1989.

OUHTIT, A., NAKAZAWA, H., ARMSTRONG, B.K., KRICKER, A., TAN, E., YAMASAKI, H., ENGLISH, D.R. UV-radiation-specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.90, p.523-531, 1998.

PAINTER, R.B., YOUNG, B.R. Radiosensitivity in ataxia-telangectasia: a new explation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.77, p.7315-7317, 1980.

PAVARINO, E.C., ANTONIO, J.R., POZZETI, E.M.O., LARRANÃGA, H.J.A., TAJARA, E.H. Cytogenetic study of neoplastic and nonneoplastic cells of the skin. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.85, p.16-19, 1995.

PAVARINO, E.C., ROSSIT, A.R.B., TAJARA, E.H. Chromosome breakpoints distribution in non-melanoma skin cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.99, p.81-84, 1997.

PENG, S.Y., CHOU, S.P., HSU, H.C. Association of downregulation of cyclin D1 and of overexpression of cyclin E with p53 mutation, high tumor grade and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, v.29, p.281-289, 1998.

PFEIFER, G.P., HOLMQUIST, G.P. Mutagenesis the *P53* gene. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1333, p.M1-M8, 1997.

PICCININ, S., DOGLIONI, C., MAESTRO, R., VUKOSAVLJEVIC, T., GASPAROTTO, D., D'ORAZI, C., BOIOCCHI, M. p16/CDK2 and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Int. J. Cancer*, v.74, p. 26-30, 1997.

PIERCEALL, W.E., MUKHOPADHYAY, T., GOLDBERG, L.H., ANANTHASWAMY, H.N. Mutations in the P53 tumor suppressor gene in human cutaneous squamous cell carcinomas. *Mol. Carcinogenesis*, v.4, p.445-449, 1991.

POLYAK, K., XIA, Y., ZWEIER, J.L., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, v.389, p.300-305, 1997.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

PONTÉN, F., BERG, C., AHMADIAN, A., REN, Z.P., NISTER, M., LUNDEBERG, J., UHLEN, M., PONTÉN, J. Molecular pathology in basal cell cancer with p53 as a genetic marker. *Oncogene*, v.15, p.1059-1067, 1997.

RADY, P., SCINICARIELLO, F., WAGNER, R.F., TYRING, S.K. p53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res.*, v.52, p.3804-3806, 1992.

REHMAN, I., TAKATA, M., WU, Y.-Y, REES, J.L. Genetic change in actinic keratoses. *Oncogene*, v.12, p.2483-2490, 1996.

REN, Z-P., PONTÉN, F., NISTÉR, M., PONTÉN, J. Two distinct p53 immunohistochemical patterns in human squamous-cell skin cancer, precursos and normal epidermis. *Int. J. Cancer*, v.69, p.174-179, 1996a.

REN, Z-P., HEDRUM, A., POTÉN, F., NISTÉR, M., AHMADIAN, A., LUNDEBERG, J., UHLEN, M., PONTÉN, J. Human epidermal cancer and accompanying precursors have identical p53 mutations different from p53 mutations in adjacent areas of clonally expanded non-neoplastic keratinocytes. *Oncogene*, v.12 , p.765-73, 1996b.

RO, Y.S., COOPER, P.N., LEE, J.A., QUINN, A.G., HARRISON, D., LANE, D., HORNE, C.H., REES, J.L., ANGUS, B. p53 protein expression in benign and malignant skin tumours. *Br. J. Dermatol.*, v.128, p.237-241, 1993.

ROESLER, J.M., LIVINGSTON, E.H., SRIVATSAN, E., CHANG, P., WANG, M.B. Deletion of P15 (MTS2) in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Surg. Res.*, v.77, p.50-54, 1998.

SAGE, E., LAMOLET, B., EMMANUEL, B., MOUSTACCHI, E., CHÂTEAUNEUF, A., DROBETSKY, E.A. Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, p.176-180, 1996.

SAIKI, R.K. The design and optimization of the PCR. In: Erlich, H.A. (Ed.) *PCR technology - Principles and applications for DNA amplification*. New York: Oxford University Press, 1992. p.7-16.

SATO, M., NISHIGORI, C., ZGHAL, M., YAGI, T., TAKEBE, H. Ultraviolet specific mutations in p53 gene in skin tumors in Xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res.*, v.53, p.2944-2946, 1993.

SERRANO, M., HANNON, G. J., BEACH, D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature*, v.366, p.704-707, 1993.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

SHEA, C.R., McNUTT, N.S., VOLKENANDT, M., LUGO, J., PRIOLEAU, P.G., ALBINO, A.P. Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. *Am. J. Pathol.*, v.141, p.25-29, 1992.

SHEARD, M.A. Apoptosis update: To be, or not to be, and how to arrange the latter. *Neoplasma*, v.44, p.220-204, 1997.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. *Science*, v.274, p.1672-1677, 1996.

SHERR, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, v.79, p.551-555, 1994.

SHERR, C. J. Mammalian G1 cyclins. *Cell*, v.73, p.1059-1065, 1993.

SHIMAZAKI, C., GOTO, H., ARAKI, S., TATSUMI, T., TAKAHASHI, R., HIRAI, H., KIKUTA, T., YAMAGATA, N., ASHIHARA, E., INABA, T., FUJITA, N., SUZUKI, R., NAKAGAWA, M. Overexpression of PRAD1/cyclin D1 in plasma cell leukemia with t(11;14)(q13;q32). *Int. J. Hematol.*, v.66, p.111-115, 1997.

SIDRANSKY, D., HOLLSTEIN, M. Clinical implications of p53 gene. *Annu. Rev. Med.*, v.47, p.285-301, 1996.

SIM, C.S., SLATER, S., McKEE, P.H. Mutant p53 protein is expressed Bowen's disease. *Am. J. Dermatopathol.*, v.14, p.195-199, 1992a.

SIM, C.S., SLATER, S., McKEE, P.H. Mutant p53 expression in solar keratosis: an immunohistochemical study. *J. Cutan. Pathol.*, v.19, p.302-308, 1992b.

SLATER, S.D., McGRATH, J.A., HOBBS, C., EADY, R.A., McKEE, P.H. Expression of mutant p53 gene in squamous carcinoma arising in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Histopathology*, v.20, p.237-241, 1992.

STEPHENSON, T.J., ROYDS, J., SILCOCKS, P.B., BLEEHEN, S.S. Mutant p53 oncogene expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, v.127, p.566-570, 1992.

STILLMAN, B. Cell cycle control of DNA replication. *Science*, v.274, p.1659-1663, 1996.

STRAUME, O., AKSLEN, L.A. Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer*, v.74, p.535-539, 1997.

STRETCH, J.R., GATTER, K.C., RALFKIER, E., LANE, D.P., HARRIS, A.L. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res.*, v.51, p.5976-5979, 1991.

STRICKLAND, F.M., KRIPKE, M.L. Immune response associated with nonmelanoma skin cancer. *Clin. Plast. Surg.*, v.24, p.637-647, 1997.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

STROM, S.S., YAMAMURA, Y. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer. *Clin. Plast. Surg.*, v.24, p.627-636, 1997.

SUTTER, T., DOI, S., CARNEVALE, K.A., ARBER, N., WEINSTEIN, I.B. Expression of cyclins D1 and E in human colon adenocarcinomas. *J. Med.*, v.28, p.285-309, 1997,

SZEKERES, G., GIACOMONI, P. Ki-67 and p53 expression in cutaneous Bowen's Disease: an immunohistochemical study of fixed-embedded tissue sections. *Acta Derm. Venereol.*, v.79, p.95-97, 1994.

TAGUCHI, M., WATANABE, S., YASHIMA, K., MURAKAMI, Y., SEKIYA, T., IKEDA, S. Aberrations of the tumor supressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, v.103, p.500-503, 1994.

TAYLOR, J.S. Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer. *Acc. Chem. Res.*, v.27, p.76-82, 1994.

TORNALETTI, S., ROZEK, D., PFEIFER, G.P. The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene*, v.8, p.2051-2057, 1993.

TORNALETTI, S.; PFEIFER, G.P. Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science*, v.263, p.1436-1438, 1994.

URANO, Y., OURA, H., SAKAKI, A. Immunohistochemical analysis of p53 expression in human skin tumors. *J. Dermatol. Sci.*, v.4, p.69-75, 1992.

van der RIET, P., KARP, D., FARMER, E., WEI, Q., GROSSMAN, L., TOKINO, K., RUPPERT, J.M., SIDRANSKY, D. Progression of basal cell carcinoma through loss of chromosome 9q and inactivation of a single *p53* allele. *Cancer Res.*, v.54, p.25-27, 1994.

VOET, D., VOET, J. G. *Biochemistry*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.

VOJTESEK, B., BARTEK, J., MIDGLEY, C.A., LANE, D.P. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53: new monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Meth.*, v.151, p.237-244, 1992.

WAGA, S., HANNON, G., BEACH, D., STILLMAN, B. The p21 inhibitor of cyclin - dependent kinases controls DNA replication by interation with PCNA. *Nature*, v.369, p.574-578, 1994.

WAGNER, S.N., WAGNER, C., BRIEDIGKEIT, L., GOOS, M. Homozygous deletion of the p16INK4a and the p15INK4b tumour suppressor genes in a subset of human sporadic cutaneous malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.*, v.138, p.13-21, 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

WANG, A., YOSHIMI, N., SUZUI, M., YAMAUCHI, A., TARAO, M., MORI, H. Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v.122, p.122-6, 1996.

WANG, J.Y.J. Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection.*Current Opinion in Genetics & Development*, v.7, p.39-45, 1997.

WANG, X.W., HARRIS, C.C. *p53* tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J. Cell. Physiol.*, v.173, p.247-255, 1997.

WARNER, H.R., PRICE, A.R. Involvement of DNA repair in cancer and aging. *J. Gerontol.*, v.44, p.45-54, 1989.

WEI, Q., MATANOSKI, G.M., FARMER E.R., HEDAYATI, M.A., GROSSMAN, L. DNA repair and aging in basal cell carcinoma. A molecular epidemiology study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, p.1614-1618, 1993.

WEISS, J., SCHWECHHEIMER, K., CAVENEE, W.K., HERLYN, M., ARDEN, K.C. Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. *Int. J. Cancer*, v.54, p.693-699, 1993.

WHITEMAN, D.C., PARSONS, P.G., GREEN, A.C. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *Int. J. Cancer*, v.77, p.843-848, 1998.

WHITTAKER, S. Sun and skin. *Br. J. Hosp. Med.*, v.56, p.515-518, 1996.

WILLIAMS, C., PONTÉN, F., AHMADIAN, A., REN, Z.P., LING, G., ROLLMAN, O., LJUNG, A., JASPERS, N.G., UHLEN, M., LUNDEBERG, J., PONTÉN, J. Clones of normal keratinocytes and a variety of simultaneously present epidermal neoplastic lesions contain a multitude of p53 gene mutations in a xeroderma pigmentosum patient. *Cancer Res.*, v.58, p.2449-2455, 1998.

WIMAN, K.G. p53: Emergncy brake and target for cancer therapy. *Exp. Cell Res.*, v.237, p.14-18, 1997.

WUARIN, J., NURSE, P. Regulating S phase: CDKs, licensing and proteolysis. *Cell*, v.85, p.785-787, 1996.

XIAO, G., WHITE, D., BARGONETTI, J. p53 binds to a constitutively nucleosome free region of the mdm2 gene. *Oncogene*, v.16, p.1171-1181, 1998.

XIONG, Y., HANNON, G. J., ZHANG, H., CASSO, D., KOBAYASHI, R., BEACH, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, v. 366, p. 701-704, 1993.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

XIONG, Y., MENNINGER, J., BEACH, D., WARD, D.C. Moleculcar cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-types cyclins. *Genomics*, v.13, p.575-584, 1992.

YAMAMOTO, M., TAKAHASHI, H. Immunohistochemical detection of the p53 oncoprotein in tumours of melanocytic origin. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, v.422, p.127-132, 1993.

YASUI, W., KUNIYASU, H., YOKOZAKI, H., SEMBA, S., SHIMAMOTO, F., TAHARA, E. Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: correlation with expression of Ki-67 antigen and p53 protein. Virchows Arch., v.429, p.13-19, 1996.

ZIEGLER, A., JONASON, A.S., LEFFELL, D.J., SIMON, J.A., SHARMA, H.W., KIMMELMAN, J., REMINGTON, L., JACKS, T., BRASH, D.E. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, v.372, p.773-776, 1994.

ZIEGLER, A., LEFFELL, D.J., KUNALA, S., SHARMA, H.W., GAILANI, M., SIMON, J.A., HALPERIN, A.J., BADEN, H.P., SHAPIRO, P.E., BALE, A.E., BRASH, D.E. Mutation hot spots due to sunlight in the p53 gene of non-melanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, p.4216-4220, 1993.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17