

Rosa Sayoko Kawasaki-Oyama

Análise dos Genes p21 waf1/cip1 e PTCH em
Células Normais e Neoplásicas de Pele por
Técnicas de Biologia Molecular

São José do Rio Preto

2000



1910000991



Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

**ANÁLISE DOS GENES $p21^{WAF1/CIP1}$ E $PTCH$ EM
CÉLULAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS DE PELE POR
TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR**



T991/C1

Tese apresentada para obtenção do
Grau de Doutor em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em
Genética, do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Júlio de
Mesquita Filho – UNESP.

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

**São José do Rio Preto
2000**

IG16-006
098a

Tumores. Neoplasmas

Assunto CAPES: 4.01.01.04-5 - Cancerologia

Rosa Sayoko Kawasaki Oyama

Análise dos genes $p21^{WAF1/CIP1}$ e *PTCH* em células normais e neoplásicas de pele por técnicas de biologia molecular.

São José do Rio Preto – SP, 2000.

130p

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – (UNESP)

- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| 1. Câncer de pele. | 2. Gene $p21^{WAF1/CIP1}$ |
| 3. Gene <i>PTCH</i> . | 4. Carcinoma basocelular. |
| 5. Carcinoma espinocelular. | |

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, com Auxílio Financeiro da FAPESP, CAPES, CNPq e FUNDUNESP.



DEDICO:

Esta tese é dedicado ao meu tesouro mais valioso:

Hitochi, esposo, amigo e companheiro que, sempre com muita paciência, amor e carinho me deu o suporte necessário para a conclusão deste trabalho.

Danilo e Liliane, meus queridos filhos, que muitas e muitas vezes sofreram com a minha ausência.

Sr Masato, meu amado pai, que infelizmente não suportou o avanço da doença que o fez partir precocemente, Saudades.....

Sra Michiko, minha querida mãe que, graças a sua ajuda no cuidado aos meus filhos, pude dedicar o meu tempo ao desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Mais esta etapa de minha caminhada está se concluindo e a todos que direta ou indiretamente me apoiaram e colaboraram para que até aqui eu chegasse, meu Muito Obrigado.

Agradeço em especial à minha Orientadora e amiga Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, pela sua orientação no meu mestrado e neste doutorado e que, apesar das dificuldades, sempre encontrou tempo para me ajudar..

Á Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte pelo tempo dispensado à leitura da Proforma da Tese e pelas valiosas sugestões. Agradeço também pela sua atenção e amizade nas horas dedicadas ao meu estágio no Ambulatório de Genética da FAMERP, o que me auxiliou muito no dia a dia do nosso Laboratório.

À Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo, pelos longos anos de amizade e companheirismo, sempre me incentivando nos momentos mais difíceis e, apesar da pouca disponibilidade de tempo, dedicou-se à leitura e avaliação da Proforma da Tese.

Ao Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão, pela leitura e sugestões da Proforma da Tese. Agradeço em especial à sua amizade e empenho junto à direção da Faculdade de Medicina de Marília, visando o afastamento de minhas atividades junto ao

Laboratório , para a execução da parte experimental e redação da Tese.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Matos pelo tempo dedicado à leitura e pelas sugestões da Proforma da Tese.

Ao Marcos Estécio, amigo e companheiro de Pós-Graduação, pelos inúmeros favores prestados, sempre solícito e paciente, minha eterna gratidão.

A Flávia Cristina, amiga e companheira, por toda sua ajuda.

Às amigas Paula, Mirian e Janaína que, graças a colaboração de todas pude concluir o seqüenciamento de minhas amostras

Aos Professores e companheiros de Pós-Graduação do Departamento de Física, pela ajuda inestimável durante a fase inicial do meu trabalho, auxiliando-me no entendimento dos complicados programas de computação para análise e quantificação dos primers e amostras de DNA.

Aos Médicos e Enfermeiras do Serviço de Dermatologia e Serviço de Cirurgia Plástica da FAMERP, pela coleta das amostras de tumores de pele.

Aos Médicos, Enfermeiras e Secretárias do Hospital de Cirurgia Plástica - Imagem de São José do Rio Preto , pela coleta das amostras de pele normal.

Aos Médicos, Enfermeiras e Secretárias de Clínicas Particulares de Cirurgia Plástica de São José do Rio Preto, pela coleta de amostras de tumores de pele.

Aos voluntários que cederam os folículos pilosos.

Aos Professores do Departamento de Biologia pela difícil tarefa de sempre transmitir novos conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca, por todos os serviços prestados.

A todos os meus familiares que sempre estenderam a mão, principalmente no cuidado com meus filhos, em todos os finais de semana e feriados que me dediquei a este projeto. Em especial à Sra Tomoe, Hatsue, Maria, Ilza, Lervina e Milton, meu muito obrigado.

Às amigas Anete e Márcia, pela ajuda e sugestões na confecção da tese.

À amiga Ligia, pela grande ajuda no trabalho de digitação.

Às amigas Mary e Nilce, companheiras em todos esses anos, sempre me incentivando e cobrando o final desta tese.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular da FAMEMA, Rosimeire, Roger, Vanessa, Flávia, Juliana, Luciano, Ricardo, Rodrigo e Vagner, pelas palavras de incentivo nas difíceis horas de cansaço e desânimo.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação e estagiários Érika, Andréa Borduchi, Andréa Rossit, Ana Cristina, Alessandra, Sheila, Marcelo, enfim a todos pelo companheirismo e amizade.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas e São José do Rio Preto - IBILCE/UNESP, pelas recursos materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

À direção da Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA, pelo afastamento concedido para execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FUNDUNESP, pelo suporte financeiro.

"Não basta saber, é preciso aplicar.

Não basta querer, é preciso fazer."

(Goethe)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	13
1. Câncer de pele não melanocítico	13
2. Genes supressores de tumor e o controle do ciclo celular	16
3. O gene <i>PTC</i> nos padrões de sinalização Hedgehog e Wingless	25
4. Padrões de sinalização Hedgehog e Wingless e desenvolvimento neoplásico.....	35
II. OBJETIVOS	40
III. MATERIAL E MÉTODOS	41
1. Caracterização das amostras	41
2. Extração de DNA	47
3. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	50
4. Análise do polimorfismo conformacional de DNA de cadeia simples (Single Strand Conformation Polymorphism – SSCP)	53
5. Seqüenciamento automático	55
IV. RESULTADOS	59
1. Casuística	59
2. Extração de DNA	62
3. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	62
4. Análise do polimorfismo conformacional de DNA de cadeia simples (SSCP).....	69
5. Seqüenciamento automático	85
V. DISCUSSÃO	90
VI. CONCLUSÃO	99
VII. RESUMO	101
VIII. ABSTRACT	102
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- APC:** Adenomatous polyposis coli
- Arm:** Armadillo
- ATP:** Adenosina trifosfato
- BMP:** bone-morphogenetic-proteins
- CBC:** Carcinoma basocelular
- CBP:** CREB binding protein
- CDC2:** Cell division cycle 2
- CDK:** ciclin dependent kinase
- Ce:** Ceratose solar
- ci:** gene *cubitus interruptus*
- CIP1:** Cyclin-dependent Kinases interacting protein-1
- Cos-2:** costal 2
- CSC:** Carcinoma espinocelular
- C-terminal:** Carboxila terminal
- DNA:** Desoxiribonucleic acid
- Dpp:** gene decapentaplegic
- Dhh:** gene *Desert hedgehog*
- Dsh:** dishevelled
- en:** gene engrailed
- E2F:** fator de transcrição
- Fu:** quinase fused
- Fz:** gene frizzled
- Gli:** gene glioblastoma
- GSK-3:** glycogen syntase kinase 3B
- HIP:** Hedgehog-interacting protein
- Hh:** gene *Hedgehog*
- lhh:** gene *Indiana hedgehog*
-

mad: gene mothers against DPP

N-terminal: amino terminal

PCNA: Proliferation cellular nuclear antigen

PMA: Phorbol 12 myristate 13-acetato

pRB: proteína retinoblastoma

PKA: proteína kinase A

ptc: gene *patched* de *Drosophila*

PTCH: ortólogo humano do *patched*

PTCH-2: homólogo humano do gene *PTCH*

Rb1: gene retinoblastoma

SCBCN: Síndrome do carcinoma basocelular nevíde

SDI1: Senescence cell-derived inhibitor 1

Shh: gene *Sonic hedgehog*

Smo: gene *smoothened*

SNBC: Síndrome do nevus basocelular

Su(fu): Suppressor fused

TGF- β : tumor growth factor β

UV: Radiação ultravioleta

Wg: gene *Wingless*

Wnt: gene relacionado ao *Wg* .

Wt1: gene tumor de Wilm's

I. INTRODUÇÃO

1. Câncer de Pele Não Melanocítico

O câncer de pele não melanocítico, incluindo os carcinomas basocelulares (CBC) e os carcinomas espinocelulares (CSC), representa a neoplasia maligna mais comum no homem, ocorrendo em uma frequência igual à de todos os outros cânceres combinados (Liu & Pelling 1995; Grossman & Leffell 1997). Existem fortes evidências de que os carcinomas basocelulares (CBCs) surgem de apêndices foliculares, enquanto os carcinomas espinocelulares (CSCs), as ceratoses solares (Ce) e outras lesões relacionadas têm origem primariamente na epiderme interfolicular (Miller *et al.*, 1993). Os ceratoacantomas, embora indistinguíveis histologicamente dos carcinomas espinocelulares, têm regressão espontânea e não ocorrem em regiões sem pêlo, mostrando muita semelhança morfológica com o infundíbulo do folículo piloso de onde muitos patologistas acreditam que eles derivem (Klein-Szanto, 1989).

Embora muitos fatores ambientais e genéticos contribuam para o desenvolvimento do câncer de pele, a exposição à radiação ultravioleta (UV) da luz solar é considerada o fator etiológico mais importante (D'Errico *et al.*, 1997). A radiação UV que atinge a superfície terrestre é composta principalmente pela luz UV tipo A (UV-A) (320-499 nm) e uma pequena parcela de luz UV-B (290-320nm) (Barker *et al.*, 1995). A luz UV-C (200-290nm) é completamente filtrada pela camada de ozônio (Petrocelli *et al.*, 1996). Entretanto, com a depleção dessa camada, que atua como um filtro para os raios UV-B e UV-C, espera-se um aumento na penetração desses raios na atmosfera, resultando em um aumento na incidência de câncer de pele. (Barker *et al.*, 1995). A UV-B é



a mais ativa na indução dos efeitos genotóxicos e fotocarcinogênicos (Liu & Pelling, 1995).

O risco de desenvolvimento do câncer de pele não melanocítico está relacionado à dose cumulativa de radiação UV e é diretamente proporcional à dose recebida (Krickler *et al.*, 1995a, b). A UV pode causar mutações no DNA porque a absorção dos fótons dessa radiação pela molécula produz um estado de excitação seguido de rearranjo de elétrons que leva à formação de fotoprodutos. Os fotoprodutos melhor caracterizados são os dímeros de pirimidinas ciclobutano (DPC), responsáveis pelos efeitos carcinogênicos da radiação UV e compreendem 85% das lesões primárias no DNA irradiado com UV. A formação dos dímeros envolve a redistribuição dos elétrons em pirimidinas adjacentes, o que leva à ligação dos carbonos nas posições 5 e 6, originando um anel de ciclobutano (Grossman & Leffell, 1997). Esses fotoprodutos são removidos por processos de reparo por excisão do DNA, induzidos pela proteína p53.

Diversos trabalhos têm referido a inativação do gene correspondente, o *TP53*, em carcinomas e em algumas lesões pré-malignas de pele (Basset-Séguin *et al.*, 1994; Taguchi *et al.*, 1994) mas poucos em melanomas (Greenblatt *et al.*, 1994). Sua incidência atinge valores superiores a 90% entre os carcinomas espinocelulares (Brash *et al.*, 1991; Mòles *et al.*, 1993; Basset-Séguin *et al.*, 1994; Ziegler *et al.*, 1994) e 12 a 56% nos carcinomas basocelulares (Rady *et al.*, 1992; Mòles *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1994; Matsumura *et al.*, 1996). Nos processos benignos, alguns dados controversos têm sido observados e amostras maiores são necessárias para identificar o papel das mutações do *TP53* no desenvolvimento dessas lesões (Campbell *et al.*, 1993; Mòles *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1994). As divergências provavelmente resultam da heterogeneidade das amostras e das



diferenças metodológicas entre os experimentos (Basset-Séguin *et al.*, 1994). De qualquer maneira, os diversos trabalhos concordam que as mutações mais freqüentes em sítios de dipirimidinas são as transições C-T, além do tipo CC-TT, que são sabidamente específicas da radiação UV (Greenblatt *et al.*, 1994). Esse fato e os achados de que essas alterações no gene *TP53* são detectadas preferencialmente em tumores de pele de regiões expostas à luz solar, mas são raras em tumores de órgãos internos (Dumaz *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994), reforçam novamente o papel desse carcinógeno na origem de tais mutações (Greenblatt *et al.*, 1994).

O produto do gene supressor de tumor *TP53* é um fator de transcrição que se expressa após dano no material genético e induz a transcrição de genes que levam ao bloqueio do ciclo celular ou à apoptose. Desse modo, mutações em genes situados acima ou abaixo do *TP53* nessa cascata de eventos também podem contribuir para o desenvolvimento neoplásico (Koopman *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995). Um candidato a esse gene é o *p21^{WAF1/CIP1}*, um inibidor de quinases dependentes de ciclinas, que atua no bloqueio transitório do ciclo celular em G1 (El-Deiry *et al.*, 1993). Sua participação no controle do ciclo celular e seu possível envolvimento nos processos neoplásicos serão discutidos posteriormente.

Outro gene relacionado com a tumorigênese cutânea é o *PTCH*. Estudos recentes realizados em carcinomas basocelulares esporádicos, identificaram 16 diferentes mutações nesse gene, sete delas resultantes de substituições C→T nos sítios de dipirimidina, como observado no gene *TP53*. Além disso, todos os tumores que apresentaram essas mutações foram retirados de regiões do organismo expostas à luz solar, indicando o papel da UV na gênese desses tumores. (Gailani *et al.*, 1996). A freqüência estimada de mutações no gene *PTCH*



em CBCs esporádicos é de cerca de 12 a 38% (Aszterbaum *et al.*, 1998; Gailani *et al.*, 1996; Unden *et al.*, 1997. Wolter *et al.*, 1997), ao passo que a perda de heterozigosidade de marcadores presentes na região 9q, onde esse gene se localiza, é superior a 50% (Gailani *et al.*, 1992).

2. Genes Supressores de Tumor e o controle do ciclo celular

O câncer é uma doença degenerativa decorrente de alterações em genes envolvidos na regulação do crescimento e da diferenciação celular que, de acordo com seu mecanismo de ação, podem ser classificados em oncogenes ou genes supressores de tumor. O primeiro grupo compreende formas mutantes dominantes ou codominantes que codificam proteínas relacionadas com a cascata de sinais estimuladores da divisão celular. Os genes supressores de tumor, ao contrário, exercem um controle negativo sobre a proliferação e seu papel na tumorigênese depende da inativação de ambos os alelos (Lewin, 1998).

Atualmente mais de 20 genes supressores de tumor já foram identificados e compreendem reguladores do ciclo celular, moléculas de adesão intercelular, moléculas sinalizadoras e moduladores diretos de proteínas oncogênicas, entre outros (Weinberg, 1995). Dentre as diferentes classes já identificadas, aquelas envolvidas no controle do ciclo celular merecem especial atenção em virtude de sua função, que é assegurar a duplicação correta do DNA durante a fase de síntese (fase S), a distribuição exata das cópias cromossômicas para as duas células filhas, durante a fase mitótica (fase M) e promover a progressão do ciclo através dos pontos de transição, também conhecidos como pontos de checagem ou *checkpoints* (Hartwell & Weinert, 1989; Heichman & Roberts, 1994; Pardee, 1989).

A regulação do ciclo celular em mamíferos é efetuada pela ativação ordenada de um grupo de enzimas catalíticas conhecidas como quinases dependentes de ciclina (CDK), cuja atividade é regulada, em parte, por sua associação a uma subunidade reguladora denominada ciclina (Sherr, 1993). São conhecidas pelo menos cinco CDKs em mamíferos, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6 e CDC2, que são intimamente relacionadas no tamanho (30 – 40Kd) e na sequência de aminoácidos, cuja similaridade é superior a 40%. (Kaffman *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1994; Lew *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1994). Cada subunidade da CDK contém um centro catalítico denominado *core*, composto de 300 aminoácidos, que é inativo na forma monomérica e não fosforilada (Morgan, 1995). Por exemplo, a estrutura da CDK2 humana é mantida em um estado inativo por pelo menos duas grandes estruturas, o sítio da ligação ao substrato, que é bloqueado por uma alça denominada *loop T*, e o sítio de ligação com o ATP, cujas cadeias laterais são orientadas de modo a dificultar a transferência de fosfatos (De Bondt *et al.*, 1993).

As ciclinas (A-E) são os reguladores primários da atividade das CDKs e foram originalmente identificadas por apresentarem uma oscilação em seus níveis durante o ciclo celular. Atualmente, as ciclinas são conhecidas como membros da família de proteínas estruturalmente relacionadas que se ligam às CDKs e ativam sua subunidade catalítica. A homologia entre as ciclinas está limitada a um domínio relativamente conservado de cerca de 100 aminoácidos, denominado *box* da ciclina, e cada uma delas é responsável pela ligação e ativação de CDKs específicas (Kobayashi *et al.*, 1992; Lees & Harlow, 1993; Morgan, 1995)

A função das ciclinas é inicialmente controlada por alterações nos níveis da própria proteína, que aumentam caracteristicamente nos estágios específicos do ciclo celular. A sua

síntese constante durante as fases G1, S, e G2 resulta em um aumento linear na concentração, que decai rapidamente durante a mitose, devido ao aumento abrupto de sua degradação. Essa degradação provavelmente envolve uma maquinaria proteolítica dependente da ubiquitina e requer uma pequena sequência motivo, denominada "box de destruição", próximo à região amino-terminal da ciclina (Glutzer *et al.*, 1991).

A ligação das CDKs às ciclinas ativa parcialmente as CDKs, que necessitam de um segundo evento para sua completa ativação. A fosforilação do resíduo conservado de treonina, a treonina 161 (Thr 161) na CDC2 ou a treonina 160 (Thr 160) na CDK2 humanas, é o evento requerido (De Bondt *et al.*, 1993). A fosforilação das CDKs pode potencializar a sua ligação com as ciclinas ou, ao contrário, a sua ligação com as ciclinas pode potencializar a sua própria fosforilação (Ducommun *et al.*, 1991; Desai *et al.*, 1995). Uma vez ativado, o complexo ciclina/CDK fosforila a proteína supressora de tumor pRB, que é o ponto de ligação entre o relógio do ciclo celular com a maquinaria transcricional. A pRB fosforilada desencadeia uma série de eventos responsáveis pela expressão de vários genes que comandam o avanço da célula em direção à divisão (citado por Weinberg, 1995). Na sua forma hipofosforilada, ao contrário, bloqueia o ciclo celular ligando-se ao fator de transcrição E2F e inibindo sua atividade transcricional sobre genes, cujos produtos são requeridos para a entrada da célula na fase S (Chellappan *et al.*, 1991, Nevins, 1992).

Pelo menos cinco membros da família E2F já foram isolados E2F-1, E2F-2, E2F-3, E2F-4 e E2F-5 (citado por Nevins, 1992), que se associam às proteínas DP (DP-1, DP-2 e DP-3) formando heterodímeros (Sardet *et al.*, 1995; Girling *et al.*, 1993). Entre eles, apenas o E2F-2, e o E2F-3 são controlados diretamente pela proteína pRB, ao passo que o E2F-4 e o E2F-5 são regulados por outros membros



da família pRb, o p107 e o p130 (Cao *et al.*, 1992; Shirodkar *et al.*, 1992). O E2F-1 por sua vez, pode ser regulado tanto pela pRB como pela p130 (Johnson, 1995). Após a fosforilação dessas proteínas, o E2F é liberado e ativa a transcrição de genes como o da ciclina E, cuja expressão é crítica para a passagem G1-S (Geng *et al.*, 1996).

Na fase final de diferenciação celular, por outro lado, o ciclo é bloqueado em G1, provavelmente devido à inibição e à inativação da atividade do complexo ciclina/CDK pela ação da fosfatase KAP, que remove o fosfato dos resíduos 160/161 de Thr (Hannon & Beach., 1994; Poon & Hunter, 1998) ou pela ação da proteína Weel, que fosforila a treonina 14 (Thr 14) e a tirosina 15 (Tyr 15), localizadas próximas à região N-terminal da CDK (Coleman & Dumphy, 1994). Entretanto, a fosforilação/desfosforilação não é o único meio de regular a atividade desse complexo (Hitomi *et al.*, 1998). Um grande número de proteínas inibidoras de CDK (CKI) já foram identificadas e, de acordo com a homologia de suas seqüências, foram classificadas em duas famílias, KIP e INK. A família KIP inclui as proteínas p21^{WAF/CIP1}, p27^{kip1}, p57^{kip2}, que, além de atuar sobre o fator de crescimento tumoral β (TGF- β), ligam-se às Thr160/161 da CDK, inibindo a atividade quinase. A família INK é composta pelas proteínas p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D}, que ligam-se às CDK4 e CDK6, impedindo sua associação com as ciclinas D (citado por Gartel & Tyner, 1999). Outra proteína inibidora do crescimento que também atua sobre as CDKs é o GADD45 (Smith, 1994)

As proteínas CKIs são reguladas por diferentes mecanismos. A expressão da p15^{INK4B}, por exemplo, é potencializada pelo TGF- β (Hannon & Beach, 1994), ao passo que a expressão da p16^{INK4} está relacionada à senescência celular de fibroblastos, queratinócitos e células uroepiteliais (Alcorta *et al.*, 1996; Loughran *et al.*, 1996; Reznikoff *et al.*, 1996; Robles e Adami, 1998). O GADD45 pode ser induzido



transcricionalmente pela p53 após radiação ionizante (Kastan *et al.*, 1992; Gujuluva *et al.*, 1994), mas também pode se expressar em células quiescentes normais. É capaz de bloquear o ciclo celular na fase de G1, inibindo a atuação das quinases dependentes de ciclinas por meio de sua interação com a p21^{WAF1/CIP1} (Kearsey *et al.*, 1995). Dentre esses inibidores de quinases, a p21^{WAF1/CIP1} é o mais intensamente investigado, devido ao seu envolvimento no ciclo celular, na diferenciação e na senescência celular. Seu gene foi clonado independentemente por vários grupos de pesquisadores que utilizaram diferentes estratégias de pesquisa. El-Deiry e colaboradores, em 1993, identificaram-no como um gene ativado pela proteína p53, denominando-o *WAF1* (*Wild Type TP53 Activated Fragment 1*). Harper e colaboradores, em 1993, denominaram-no *CIP1* (*Cyclin-dependent Kinase interactin protein-1*), devido à interação de seu produto com a CDK2. Xiong *et al.* (1993) e Gu *et al.* (1993), por sua vez, também identificaram-no como sendo responsável pela subunidade reguladora do complexo ciclina/CDK2 em células de mamíferos, designando-o de *p21* e *CAP20*, respectivamente. Posteriormente, em 1994, Noda e colaboradores clonaram esse gene, dando a ele o nome de *SDI1* (*senescence cell-derived inhibitor 1*) porque seu produto encontrava-se em níveis elevados em fibroblastos senescentes.

Em células humanas normais, a proteína p21^{WAF1/CIP1} forma um complexo quaternário com uma ciclina, uma CDK e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). A ligação da p21^{WAF1/CIP1} com o complexo ciclina/CDK ocorre no seu domínio N-terminal (Goubin e Ducommun, 1995; Chen *et al.*, 1995a; Xiong *et al.*, 1992), uma região altamente conservada, que apresenta uma grande similaridade com a sequência das proteínas p27^{KIP1} (Polyaki *et al.*, 1994; Toyoshima e Hunter, 1994) e p57^{KIP2} (Lee *et al.*, 1998; Matsuoka *et al.*, 1995). Essa

ligação é suficiente para inibir a função do complexo ciclina/CDK responsável pela transição dos principais pontos de restrição do ciclo celular (Chen *et al.*, 1995a; Chen *et al.*, 1996; Sekiguchi & Hunter, 1998; Zakut & Givol, 1995). A ligação com o PCNA, por sua vez, ocorre no resíduo 22 da região C-terminal da p21^{WAF1/CIP1} (Chen *et al.*, 1996; Goubin & Ducommun, 1995; Gulbis *et al.*, 1996) acarretando o bloqueio da duplicação do DNA (Chen *et al.*, 1995a; Chen *et al.*, 1996). O PCNA é um co-fator da DNA polimerase δ (Tsurimoto & Stillman, 1990) e ϵ (Aboussekhra *et al.*, 1995), que estão envolvidas nos passos de síntese de DNA durante o processo de reparo por excisão de nucleotídeos (Stucki *et al.*, 1998). A região C-terminal, da p21^{WAF1/CIP1}, ao contrário da região N-terminal, não apresenta similaridade com a p27^{KIP1} e P57^{KIP2} e é a única capaz de ligar-se ao PCNA (Luo *et al.*, 1995). A ligação com o PCNA, além de inibir a síntese de DNA (Waga *et al.*, 1994), é capaz de bloquear o ciclo celular nos pontos de transição de G1/S e G2/M, em células neoplásicas humanas (Cayrol *et al.*, 1998). Desse modo, a p21^{WAF1/CIP1} pode impedir a divisão atuando sobre o complexo ciclina/CDK ou sobre o PCNA (Cayrol & Ducommun, 1998; Luo *et al.*, 1995).

A sequência do gene p21^{WAF1/CIP1} foi mapeada em 6p21.2 e consiste de três exons de 68, 450 e 1600 pares de bases, dos quais apenas o exon 2 e parte do exon 3 são traduzidos, produzindo uma proteína de 164 aminoácidos. (El-Deiry *et al.*, 1993). Sua região promotora possui vários sítios de ligação para diferentes sinalizadores capazes de provocar o bloqueio do crescimento celular. Pelo menos três sítios de ligação já foram identificados e encontram-se localizados a cerca de 1300, 1700 e 2200pb, respectivamente, anteriores ao primeiro exon da p21^{WAF1/CIP1}. Esses sítios encontram-se conservados tanto na sua sequência como na sua posição. Dois desses sítios contêm elementos que reconhecem a proteína p53 (El-Deiry *et al.*, 1995) e é composto por

quatro pentâmeros de PuPuPuC(AT), em tandem (Zhang *et al.*, 1995). A região promotora do $p21^{WAF1/CIP1}$ possui, ainda, regiões específicas responsáveis pela resposta a fatores de crescimento extra-celulares e a hormônios. Pelo menos três classes de reguladores do $p21^{WAF1/CIP1}$ já foram identificados: a) a classe de proteínas supressoras de tumor p53, p73 e BRCA1 (El-Deiry *et al.*, 1993; Zeng & El-Deiry, 1996; Somassundaran *et al.*, 1997); b) os fatores de crescimento extra-celulares que atuam em um mecanismo independente da p53, tais como o fator de necrose tumoral α , o phorbol 12 myristate 13-acetato (PMA), o fator de crescimento transformante β (TGF- β), o ácido retinóico, entre outros (Datto *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1994; Moustakas & Kardassis 1998); c) os fatores que induzem a diferenciação celular de muitos tipos de células, tais como queratinócitos, células do epitélio intestinal e monócitos (Steinman *et al.*, 1994; Missero *et al.*, 1995).

A p21 é estimulada pela forma normal, mas não mutante, da proteína supressora de tumor p53, durante a resposta a lesões provocadas no DNA, resposta essa que resulta na supressão do crescimento e na apoptose (El-Deiry *et al.*, 1993; 1994; Mousses *et al.*, 1995). A p53 atua como um fator de transcrição ligando-se ao DNA de modo sequência-específico, regulando vários processos biológicos, tais como, o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação celular (Martinez *et al.*, 1998). Além disso, desempenha um papel crucial na manutenção da estabilidade genômica e da homeostase celular (Barley *et al.*, 1998), funcionando como o coordenador central da resposta celular aos danos no DNA (Amundson *et al.*, 1998; Gurley *et al.*, 1998), tais como aqueles causados por luz ultravioleta (UV), radiação ionizante (RI) ou agentes alquilantes (El-Deiry *et al.*, 1994). Essa resposta manifesta-se através do bloqueio transitório do ciclo celular em G1, proporcionando um tempo para que as células reparem esse dano, prevenindo que elas

iniciem a síntese de DNA ou a mitose na presença de mutação (Facher *et al.*, 1997; Gallo *et al.*, 1996). A proteína p53 participa diretamente no processo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN), removendo os produtos do dano no DNA, tais como os dímeros de pirimidina induzidos pela luz UV (Barley *et al.*, 1998). A incapacidade da célula em manter esse intervalo pode levar ao acúmulo de mutações, resultando no desbalanço do controle positivo e negativo da proliferação celular e provocando instabilidade genômica com conseqüente transformação e progressão tumoral (Dulic *et al.*, 1994; El-Deiry *et al.*, 1994; Hartwell e Kastan, 1994; Reed *et al.*, 1998; Sherr, 1996).

Quando as células sofrem inúmeras injúrias que excedem um determinado limiar (Winters *et al.*, 1998), a p53 pode disparar o processo de apoptose ou morte celular programada, eliminando células potencialmente oncogênicas (Gallo *et al.*, 1996; Pitkänen *et al.*, 1998). A apoptose é um processo de múltiplos estágios, iniciada por diferentes estímulos (Li *et al.*, 1998), incluindo estresse e interrupção do ciclo celular (Dragovich *et al.*, 1998), e é indispensável para a manutenção da homeostase de organismos multicelulares (Suzuki *et al.*, 1998)

A proteína p53 encontra-se, normalmente, em níveis extremamente baixos devido à sua meia-vida muito curta, cuja duração não ultrapassa 30 minutos (Artuso *et al.*, 1995; Pitkänen *et al.*, 1998). Entretanto, esses níveis podem aumentar drasticamente em resposta à exposição a diferentes agentes causadores de danos no DNA (Ohtsubo *et al.*, 1998). Essa elevação deve-se ao aumento de sua estabilidade, que é controlada pela fosforilação de sítios nos domínios de ativação N-terminal e de oligomerização C-terminal (Barley *et al.*, 1998), levando a um aumento do período de sua meia-vida (Artuso *et al.*, 1995; Fuchs *et al.*, 1998) de 30 minutos para cerca de uma hora. Concomitantemente à sua estabilização, ocorre um aumento de sua ligação ao DNA e a ativação da



transcrição de genes com as quais possui sítios de ligação (Artuso *et al.*, 1995).

Mutações no gene *TP53* constituem a alteração genética mais comumente relatada em câncer humano, presente em cerca de 50% dos tumores (Harris & Hollstein, 1993; Arrowsmith & Morin 1996; Holgren *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1998). Do mesmo modo, são freqüentes as mutações em genes situados acima ou abaixo do *TP53* na cascata de eventos participando do mesmo processo regulador e podem ter efeito oncogênico semelhante (Li *et al.*, 1995). Teoricamente, o $p21^{WAF1/CIP1}$ é um deles, uma vez que alterações de suas funções podem constituir mecanismos alternativos para inativação da p53 ou contribuir para o desenvolvimento de tumores que possuam p53 normal (Koopman *et al.*, 1995). Entretanto, mutações nesse gene têm sido raramente detectadas em câncer humano (Bhatia *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Balbin *et al.*, 1996; Malkowicz *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Furutani *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998). Esses resultados são incompatíveis com a idéia de que inativação mutacional da $p21^{WAF1/CIP1}$ seja importante no controle da tumorigênese de diferentes neoplasias (Wan *et al.*, 1996). Por outro lado, vários autores têm observado variantes polimórficas (Chedid *et al.*, 1994; Shiohara *et al.*, 1994; Koopmann *et al.*, 1995; Law e Deka, 1995; Li *et al.*, 1995; Mousses *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Tenan *et al.*, 1995; Akama *et al.*, 1996; Balbin *et al.*, 1996; Milner *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996; Sjalander *et al.*, 1996; Terry *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 1996; Facher *et al.*, 1997; Lukas *et al.*, 1997; McKenzie *et al.*, 1997; Panpadreou *et al.*, 1997; Clasen *et al.*, 1998; Hachiya *et al.*, 1999; Bahl *et al.*, 2000; Ralhan *et al.*, 2000; Yair *et al.*, 2000) que, em certos casos, são significativamente mais freqüentes nas amostras provenientes de tumores sem mutação do *TP53* que em amostras de pessoas normais e, surpreendentemente, também de tumores com p53 mutantes (Mousses



et al., 1995). Tais achados sugerem que esses polimorfismos não sejam benignos e que poderiam levar a um risco maior de neoplasias.

3. O Gene *PTCH* nos Padrões de Sinalização Hedgehog e Wntless

Os dados já publicados sobre genes supressores de tumor e sobre animais geneticamente modificados sugerem a participação desses genes nos processos de diferenciação e organogênese. Como exemplos, podem ser citados o gene *Rb1*, cuja inativação homozigota leva à letalidade embrionária e múltiplas alterações (Jacks *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992), e o *Wt1*, cuja deficiência resulta em agenesia renal e malformações cardíacas em camundongos (Kreidberg *et al.*, 1993).

Um gene supressor de tumor caracterizado, que participa da morfogênese humana, o *PTCH* (*human patched*), foi mapeado no segmento cromossômico 9q22.3 e é responsável, quando mutado, pelo desenvolvimento da síndrome do carcinoma basocelular nevoide (SCBCN), também conhecida como síndrome do nevus basocelular (SNBC) ou síndrome de Gorlin (Gailani *et al.*, 1992; Hahn *et al.*, 1996c). A SCBCN é uma doença autossômica dominante que predispõe tanto ao câncer como a defeitos de desenvolvimento, tais como malformações esqueléticas, incluindo polidactilia, pectus excavatum, espina bífida e alterações de costelas; anomalias craniofaciais, como palato fendido, estrabismo e macrocefalia; além de cistos odontogênicos e calcificação intracraniana progressiva (Shanley *et al.*, 1994; Gorlin, 1995). Os portadores também podem apresentar neoplasias, especialmente carcinomas basocelulares, que são detectados em idade mais precoce e em número muito maior do que as formas esporádicas desse câncer decorrentes de exposição à luz solar e observadas em pessoas idosas e de pele clara. Além disso, é referido um risco elevado de

meduloblastomas, fibromas ovarianos e cardíacos, meningiomas, fibrossarcomas e rabdomiossarcomas (Shimkests *et al.*, 1996; Kimonis *et al.*, 1997).

O *PTCH* é o ortólogo humano do gene *ptc* (*patched*) de *Drosophila* (Gailani *et al.*, 1992; Hahn *et al.*, 1996a) e está mutado não apenas nos pacientes com SCBCN mas também nas células neoplásicas de indivíduos com carcinomas basocelulares (Chindambaram *et al.*, 1996; Gailani *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996; Unden *et al.*, 1996; Wicking *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Aszterbaum *et al.*, 1998), meduloblastomas e outros tumores esporádicos (Pietsch *et al.*, 1997; Raffel *et al.*, 1997; Vorechovsky *et al.*, 1997 a, b; Xie *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Maesawa *et al.*, 1998; McGarvey *et al.*, 1998), indicando que esse gene é um importante supressor de tumor e que seu produto tem atuação em diferentes tecidos (Currie, 1998). É interessante que, nos casos de SCBCN, mutações idênticas em genealogias distintas resultam em fenótipos muito diferentes, o que deve ser reflexo da influência do *background* genético nas características neoplásicas ou no desenvolvimento dos afetados (Unden *et al.*, 1996).

O gene *PTCH* humano possui 67% de similaridade no nível de nucleotídeos e 60% no nível de aminoácidos do seu produto com o gene *ptc* de *Drosophila* (Hahn *et al.*, 1996a). Esse último já foi bem caracterizado e é essencial no desenvolvimento embrionário e na definição dos limites entre os segmentos do embrião da mosca (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980; Hooper & Scott, 1989; Nakano *et al.*, 1989). Muitos mutantes produzem um fenótipo letal com duplicação e deleção de partes dos segmentos ou crescimento excessivo do compartimento anterior da asa e perda de estruturas costais (Phillips *et al.*, 1990). O gene codifica uma glicoproteína transmembrânica (Ptc) que constitui o principal

componente do padrão de sinalização Hedgehog (Perrimon, 1994; Chen & Struhl, 1996).

O padrão Hedgehog (Hh) constitui uma cascata de sinais que se inicia na membrana citoplasmática e chega até o núcleo, onde ativa a transcrição de vários genes. Foi originalmente descrito em *Drosophila* e os seus sinais estão envolvidos no disparo de uma variedade de processos, incluindo segmentação do embrião e estabelecimento de polaridade ântero-posterior, além de modelagem do sistema nervoso, patas, asas e olhos (Basler & Struhl, 1994; Tabata & Kornberg, 1994; Jiang & Struhl, 1995; Bhat, 1996; Dominguez & Hafen, 1997; Keys *et al.*, 1999). Esse padrão de sinalização é também crucial durante o desenvolvimento de vertebrados, induzindo a polarização dorso-ventral do tubo nervoso e determinando o destino dos neurônios motores e o eixo ântero-posterior dos membros (citado por Weed *et al.*, 1997, citado por Goodrich & Scott, 1998).

Diferentemente de vertebrados, que possuem múltiplos membros da família Hh, as moscas possuem apenas um gene *Hh*, que foi identificado por meio da análise de mutações responsáveis pela desorganização da modelagem e da polaridade dos segmentos larvais como citadas acima. Como as larvas mutantes homozigotas exibem uma cutícula recoberta por espinhos ou dentículos, o gene correspondente recebeu o nome de *hedgehog* (ouriço em inglês), embora o mesmo fenótipo seja desencadeado por mutações em outros membros do padrão de sinalização (Ingham, 1998).

Como ilustrado na Figura 1, o produto Hedgehog (Hh) na *Drosophila* é uma molécula secretada e seu receptor na membrana citoplasmática é a proteína Ptc, que tem 12 domínios transmembrânicos e duas grandes alças extracelulares (Hooper & Scott, 1989; Nakano *et al.*, 1989; Goodrich *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 1996b). Quando o Hh está

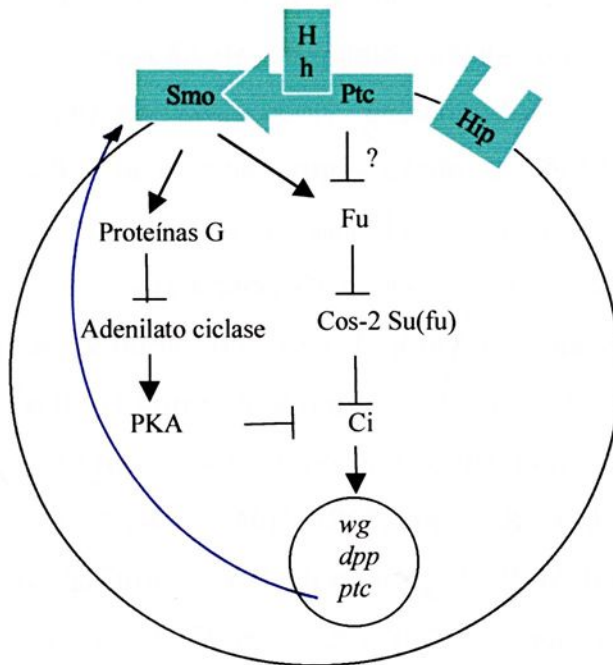


Figura 1. Modelo do padrão de sinalização Hedgehog. Para ativar seus genes alvos, tais como o *wg*, *dpp* e o *ptc*, a proteína Hh liga-se ao complexo *ptc*/Smo liberando a Smo, que por sua vez desencadeia uma cascata de sinais cujo resultado é a ativação dos genes *wg*, *dpp* e *ptc*. A síntese de nova proteína Ptc suprime a atividade de Smo e desliga o processo num mecanismo de *feedback* (Adaptado de Alcedo e Nowell 1997). → ativação; ⊥ inativação.

ausente, a Ptc forma um complexo inativo com o produto do gene *smoothed* (*Smo*), uma outra proteína de membrana com similaridade a proteínas receptoras Frizzled (*fz*) (Vinson *et al.*, 1989). Por outro lado, quando presente, o Hh liga-se à Ptc e a proteína Smo é liberada, desencadeando uma cascata de sinais que incluem a ativação de proteínas G e a inativação de adenilato ciclase, além de uma série de outros eventos não completamente esclarecidos. Entre eles estão a redução da função da quinase dependente de AMP cíclico (PKA) e, provavelmente, a ativação da quinase Fused (*Fu*). Nessa seqüência, o fator de transcrição denominado Ci é ativado, levando à transcrição de vários genes relacionados com a morfogênese, incluindo o *Wingless/Wg* (homólogo *Wnt* em vertebrados) e o *decapentaplegic/Dpp* (um membro da família do fator de crescimento tumoral TGF- β), bem como o próprio *Ptc* (Alcedo *et al.*, 1996; Alcedo & Noll, 1997; Basler & Struhl, 1994; Capdevila *et al.*, 1994; Chen & Struhl, 1998; Hepker *et al.*, 1997; Ingham *et al.*, 1991; Ingham & Hidalgo, 1993; Stone *et al.*, 1996; Tabata & Kornberg, 1994; von Ohlen *et al.*, 1997). Todos são importantes na modelagem e na determinação do destino celular em muitas estruturas durante o desenvolvimento da *Drosophila* e fazem parte do padrão Hedgehog (Goodrich. *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 1996b; Marigo *et al.*, 1996).

Como resultado da cascata de sinais e, conseqüentemente, da síntese de novas proteínas Ptc, a Smo, que havia sido liberada no início do processo, é novamente sequestrada pelas Ptcs, desligando o circuito num mecanismo de *feedback*. Recentemente, um outro componente desse sistema de sinalização foi identificado em vertebrados, o Hip (*Hedgehog-interacting protein*), uma glicoproteína de membrana que se liga às proteínas Hedgehog. Quando em níveis elevados, parece competir com Ptc pelo Hh e atuar, portanto, como um transdutor negativo (Chuang & McMahon, 1999).



Outro membro do padrão Hedgehog inclui o fator de transcrição Ci, da família *zinc finger* Gli, codificado pelo gene *cubitus interruptus* (*ci*) (Kinzler & Vogelstein, 1990; Orenic *et al.*, 1990). Sua expressão é inibida pelo produto do gene *Engrailed* (*en*), em determinados compartimentos do embrião (Schwartz *et al.*, 1995), pelos produtos dos genes *Suppressor of fused* [*Su (fu)*] e *costal-2* (*cos-2*) que, por sua vez, parecem ser regulados positivamente por PKA e negativamente por Fu (Forbes *et al.*, 1993; Preat *et al.*, 1993). Estas interligações tornam o processo muito complexo mas permitem que ocorra controle em várias etapas da cascata de sinais, como foi esquematizado na Figura 1.

Como referido anteriormente, os genes alvos do padrão Hedgehog incluem, além do *ptc*, o *Wg* e o *Dpp*. O gene *Wg* (*Wingless*), um membro da família à qual pertencem os genes *Wnt* dos vertebrados, foi, do mesmo modo que o *Hh*, identificado em *Drosophila*, onde participa de funções importantes, que incluem o estabelecimento do destino das células durante a definição do padrão dorso-ventral e a formação dos membros. Embora as proteínas Wg e Hh sejam produzidas por células diferentes e seus sinais transmitidos por processos distintos, elas estão intimamente relacionadas no ectoderma embrionário. As células que expressam Wg e Hh são adjacentes e a transcrição de uma delas ocorre após o sinal desencadeado pela outra, num padrão parácrino ($Hh \leftrightarrow Wg$) e autócrino ($Wg \leftrightarrow Wg$) (Orsulic & Peifer, 1996). O receptor de Wg é, do mesmo modo que a Smo, uma proteína transmembrânica da classe serpentina, chamada Frizzled (Vinson *et al.*, 1989) e a transdução do sinal recebido por esse receptor é feita por componentes como Dishevelled (Dsh), Zw3, Armadillo, juntamente com o fator de transcrição da família TCF/LEF. Nos vertebrados, outros transdutores são conhecidos, como o APC (*adenomatous polyposis coli*), o GSK-3 (*glicogen syntase kinase 3B*),



a β -catenina e a CBP (*CREB binding protein*). Entretanto, esse quadro está incompleto (Figura 2) e outras proteínas do padrão Wg/Wnt devem estar envolvidas na transmissão de sinais necessários para a diferenciação e também para o controle da proliferação celular (citado por Orsulic & Peifer, 1996; Nusse, 1999).

Outro alvo citado da cascata Hedghogh é o produto do gene *Decapentaplegic* (*Dpp*), um membro da superfamília TGF- β , que inclui as proteínas BMPs (*bone-morphogenetic-proteins*), essas últimas com papéis fundamentais no desenvolvimento de membros e vísceras. Sabe-se que o TGF- β pode agir como um regulador negativo do crescimento celular em muitos tecidos (Serra & Moses, 1996) e o sinal desencadeado por ele é transduzido por proteínas como a DCP4 e regula a fosforilação da pRB (Hannon & Beach, 1994). Assim o padrão Dpp/TGF- β /BMP, do mesmo modo que o Wg/Wnt, converge para o núcleo e regula a divisão e a diferenciação (Figura 2).

A conservação do padrão Hedgehog na escala zoológica é evidente. Os vertebrados, por exemplo, possuem dois homólogos com afinidade semelhante ao ligante hedgehog, o *PTCH* e o *PTCH2* (Carpenter *et al.*, 1998; Motoyama *et al.*, 1998a) e, ao contrário da *Drosophila* que só apresenta um gene *ci*, exibem pelo menos três membros da família Gli (Hui *et al.*, 1994).

Vários homólogos do *Hh*, como o *Sonic hedgehog* (*Shh*), o *Indiana hedgehog* (*Ihh*) e o *Desert hedgehog* (*Dhh*), também foram isolados em diferentes espécies de vertebrados, cada um deles diferindo em seu padrão de expressão, bem como em seus eventos indutores (citado por Currie, 1998). Enquanto os transcritos *Shh*, *Dhh* e *Ihh* são identificados em tecidos periféricos, o *Shh* é visto também no cérebro nos testículos, onde é essencial na formação dessas estruturas (Bitgood & McMahon, 1995; Bitgood *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). O *Shh*



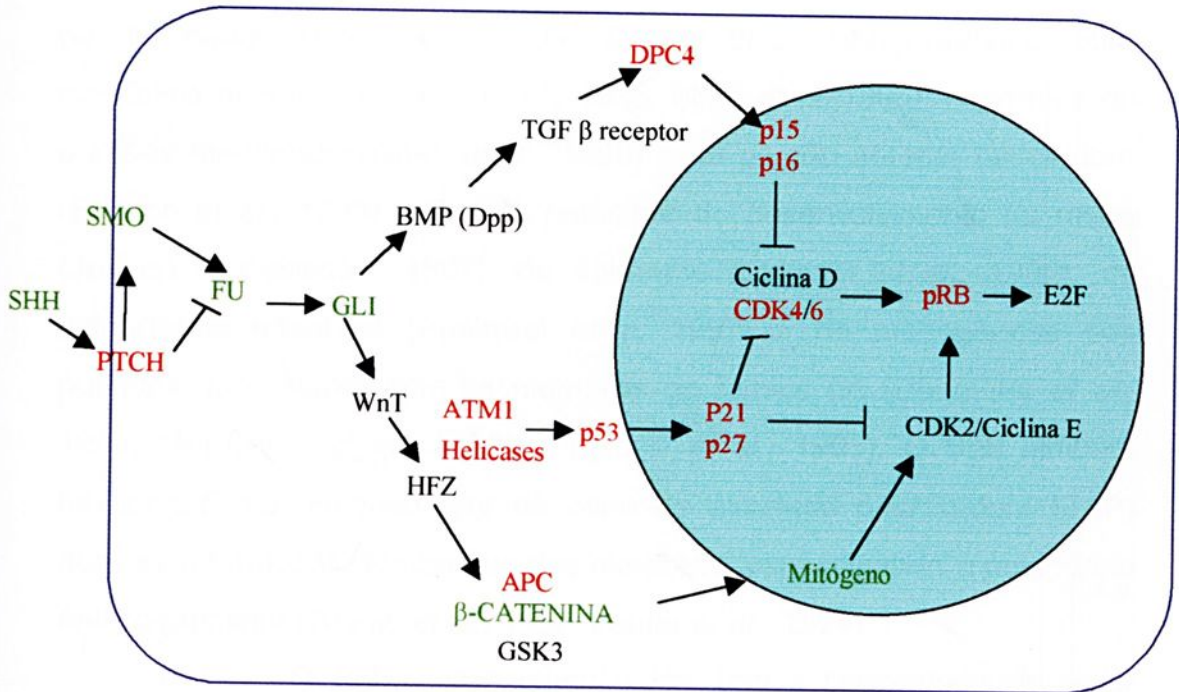


Figura 2. Padrão de sinalização Wnt e sua ligação com o padrão Shh (Adaptado de Dean, 1998). A ativação do Gli leva à ativação do Wnt, causando liberação da β -catenina do complexo APC/GSK3 e à ativação de Dpp, que libera a cascata de sinais do TGF- β e do DPC4. A β -catenina atua, provavelmente, como um fator mitogênico ativando o complexo ciclina E/CDK2 e o pRB. O TGF- β inibe a divisão celular por meio da repressão da fosforilação da pRB (Adaptado de Dean, 1998). Genes supressores de tumor em vermelho e oncogenes em verde. $\rightarrow$ ativação; $\perp$ inativação.

nos testículos, onde é essencial na formação dessas estruturas (Bitgood & McMahon, 1995; Bitgood *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). O Shh desempenha um papel chave na determinação do eixo dorso-ventral dos somitos (Borycki *et al.*, 1998), no desenvolvimento do sistema nervoso central (Echelard *et al.*, 1993; Wechsler-Reya & Scott, 1999) e do assoalho do tubo neural (Roelink *et al.*, 1995; Ericson *et al.*, 1997), atuando sobre neurônios motores (Roelink *et al.*, 1995; Marti *et al.*, 1995), neurônios de porções medianas (Hynes *et al.*, 1995) e da porção anterior do cérebro (Ericson *et al.*, 1995), além de participar do desenvolvimento da retina (Jensen & Wallace, 1997), da epiderme (Laforest *et al.*, 1998), da mesoderme intestinal (Apelqvist *et al.*, 1997) e da morfogênese dos pulmões, juntamente com os membros da família Gli (Litingtung *et al.*, 1998; Motoyama *et al.*, 1998b; Pepicelli *et al.*, 1998). O Shh também funciona como um mediador da zona de atividade polarizadora (ZAP) durante a formação dos botões dos membros, especificando a polaridade ântero-posterior (Riddle *et al.*, 1993; Laufer *et al.*, 1994).

O Shh, assim como o Hh, tem a capacidade de atuar como fator de sinalização, modulando o destino das células a curta e a longa distância (Johnson & Tabin, 1995). Por exemplo, durante o estabelecimento da polaridade de segmentos no início da embriogênese de *Drosophila*, o Hh tem efeito a curta e a longa distância: por meio da expressão do *wg* nas células anteriores adjacentes (Lee *et al.*, 1994) ou por sinais secundários que induzem efeitos em locais distantes, durante a modelagem dos discos imaginários (Basler & Struhl, 1994; Tabata & Kornberg, 1994). Nos vertebrados, o Shh induz a formação do assoalho do tubo neural de modo dependente de contato (Martí *et al.*, 1995), enquanto em outros casos, como na indução do esclerótomo, atua a longa distância (Fan *et al.*, 1995). Entretanto, esses tipos de atuação provavelmente não refletem diferenças fundamentais nos mecanismos de

sinalização dependente ou independente do contato mas, simplesmente, representam uma diferença na resposta provocada pela alta ou pela baixa concentração dos sinais do Hh (Roelink *et al.*, 1995).

Em camundongos, a perda completa da atividade Shh resulta na perda do desenvolvimento ventral do sistema nervoso central. Quando ocorre na região anterior do cérebro, dá origem a um fenótipo aberrante chamado holoprosencefalia, com frequente ciclopia e várias outras anomalias faciais. Na espécie humana, mutações em ponto do *Shh* também são responsáveis por alguns casos de holoprosencefalia (Belloni *et al.*, 1996; Roessler *et al.*, 1996). O porquê da participação desse gene em uma anomalia grave provavelmente reside no fato da molécula de Shh sofrer autoproteólise pós-síntese, que resulta na produção de duas subunidades, a N- e a C-terminal, permanecendo a primeira fortemente ligada à superfície celular e associada ao colesterol, enquanto a outra é difusível (Lee *et al.*, 1994; Porter *et al.*, 1996; Beachy *et al.*, 1997). Alterações na ligação do peptídeo N ao colesterol devem resultar na holoprosencefalia, uma vez que certas drogas ou doenças hereditárias que afetam a biossíntese do colesterol também podem levar ao mesmo fenótipo (Strauss, 1998).

4. Padrões de Sinalização Hedgehog e Wiggless e Desenvolvimento Neoplásico

Muitos genes envolvidos nos processos do desenvolvimento embrionário continuam a desempenhar importantes papéis na proliferação e na diferenciação celular após a embriogênese e há fortes evidências de que mutações em alguns desses genes podem levar à carcinogênese (Gailani & Bale, 1997). O primeiro gene a ser ligado a esse processo foi o do fator de transcrição Gli1, um dos homólogos humanos de *ci*, que encontra-se amplificado em glioblastomas e em diversos tipos de neoplasias, incluindo carcinomas basocelulares (Roberts *et al.*, 1989; Dahmane *et al.*, 1997; Kinzler *et al.*, 1987). Em *Drosophila*, o aumento nos níveis de *ci* leva diretamente à elevação dos níveis dos transcritos de seus genes alvo, como por exemplo, dos genes *Wg* e *Dpp* (Citado por Currie, 1998).

Outros genes dos padrões Hh e Wg implicados na indução de neoplasias estão apresentados na Tabela 1. Por exemplo, o gene *PTCH*, além do papel na tumorigênese de CBC esporádicos e familiares, como descrito anteriormente (Chindambaram *et al.*, 1996; Gailani *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1996; Unden *et al.*, 1996; Wicking *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Aszterbaum *et al.*, 1998), encontra-se mutado em células neoplásicas de alguns pacientes com meduloblastomas e com outros tumores esporádicos (Pietsch *et al.*, 1997; Raffel *et al.*, 1997; Vorechovsky *et al.*, 1997a, b; Xie *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Maesawa *et al.*, 1998; McGarvey *et al.*, 1998). Em *Drosophila*, mutações nesse gene levam à desrepressão de genes alvo e à proliferação celular excessiva em alguns tecidos (Ingham, 1994). Camundongos heterozigotos *ptc*^{+/-} são maiores que os normais e alguns deles desenvolvem meduloblastomas de forma similar aos pacientes



TABELA 1. Genes do padrão *Hedgehog* (HH) e *Wingless* (Wg) de vertebrados e seus homólogos em *Drosophila*, função de seus produtos e relação com doenças humanas (Adaptado de Currie, 1998).

Gene		Função da Proteína	Doença Humana
Vertebrado	<i>Drosophila</i>		
Shh	<i>hh</i>	Ligante	Holoprosencefalia, Carcinomas
PTCH	<i>Ptc</i>	Receptor transmembrânico	Síndrome de Gorlin
Gli	<i>Ci</i>	Ligante	Glioblastoma
TGF- β	<i>dpp</i>	Ligante	Defeitos de membros e vísceras
Wnt	<i>Wg</i>	Ligante	Tumor de mama
DPC4	<i>Mad</i>	Modulador de TGF- β	Câncer pancreático
β -Catenina	<i>Armadillo</i>	Adesão celular	Câncer
APC	—	Associado a β -Catenina	Câncer de cólon

heterozigotos com a Síndrome de Gorlin (Goodrich *et al.*, 1997). É possível então que o *PTCH* realmente atue como um supressor de tumor. As formas mutantes de Ptc não devem ser capazes de ligar-se à proteína Smo na membrana e, portanto, de bloquear a cascata de sinalização iniciada pelo ligante (Stone *et al.*, 1996).

O homólogo *PTCH2* é preferencialmente expresso na pele (Motoyama *et al.*, 1998c) e nos testículos, onde parece mediar a ação de Dhh, que é requerida para o desenvolvimento da célula germinativa. É interessante que mais de 30% dos tumores testiculares apresentam deficiência da região 1p32-36, onde o *PTCH2* foi mapeado (Summersgill *et al.*, 1998). Esses dados levantam a possibilidade de que esse gene, como o *PTCH* em CBC e meduloblastoma, seja um supressor de tumor em células nas quais regula a atividade de Dhh (Carpenter *et al.*, 1998). Mutações no *Shh* também já foram detectadas em CBCs de camundongos, em meduloblastomas e em carcinomas de mama na espécie humana, o que reforça seu papel na indução de neoplasias (Belloni *et al.*, 1996, Oro *et al.*, 1997). A ativação desse gene pode mimetizar a perda da função do *PTCH*. Realmente, camundongos transgênicos expressando altos níveis de Shh na pele desenvolvem muitas características da Síndrome de Gorlin (Oro *et al.*, 1997).

Assim, o modelo de Knudson da predisposição genética ao câncer, com inativação de um gene na linhagem germinativa e, posteriormente, uma mutação somática no tecido alvo, explica bem o desenvolvimento dos tumores de pele na Síndrome de Gorlin. A observação de mutações no *PTCH* em carcinomas basocelulares esporádicos fornece a evidência de seu papel como gene supressor de tumor. Entretanto, as demais anomalias fenotípicas observadas na síndrome são mais dificilmente explicadas e podem refletir apenas efeitos

de dosagem gênica durante o desenvolvimento e não perdas somáticas do segundo alelo (Currie, 1998).

No caso dos genes *Wnt2* e *Wnt3*, sua ativação tem sido correlacionada à formação de tumores de glândula mamária em camundongo (Nusse & Varmus, 1992). Dado que esses tumores são de origem epitelial, é provável que os genes *Wnt*, juntamente com o *PTCH*, atuem no controle da divisão das células tronco do epitélio. O envolvimento de *Wnt2* e *3* nesse processo sugere que outros homólogos *Wg* de *Drosophila* participem da regulação da proliferação em diferentes órgãos (Parisi & Lin, 1998). Realmente, o padrão *Wnt* também tem sido implicado na tumorigênese de cólon. Foi observado que o oncogene *MYC* está entre aqueles ativados em carcinomas desse órgão (He *et al.*, 1998), talvez como resultado da deficiência de TCF, um componente do padrão *Wnt*. Entretanto, o camundongo transgênico, homozigoto nulo para *Tcf4*, manifesta depleção de células tronco e não tumores de cólon, indicando uma relação mais complexa do que a esperada (Korinek *et al.*, 1998).

Um outro membro do padrão *Wnt* é a β -catenina, que forma um complexo com a molécula E-caderina, participando da manutenção da adesão das células epiteliais (Ozawa *et al.*, 1990; Kintner, 1992). A β -catenina tem sua regulação controlada pela proteína APC, cujo gene (*APC- adenomatous polyposis coli*) é um supressor de tumor relacionado com a progressão do câncer colorretal (Figura 2). As formas mutantes APC têm afinidade reduzida pela β -catenina, o que pode resultar na perda de contato ou de comunicação intercelular e contribuir para a tumorigênese (Rubinfeld *et al.*, 1993).

A CBP, que é um outro membro do padrão *Wnt*, tem sido implicada na acetilação de histonas e na reconfiguração da cromatina no sítio de iniciação da transcrição e está entre as proteínas associadas a receptores de esteróides (Chen *et al.*, 1997). Dessa forma, sua



contribuição para o processo neoplásico é ampla, considerando seu papel como co-ativador de fatores de transcrição.

Em relação às proteínas Dpp, deve ser referido que o TGF- β , ao qual estão relacionadas, desencadeia sinais negativos para proliferação em muitos tecidos, como já referido acima (Serra & Moses, 1996; Hannon & Beach, 1994). O receptor Dpp é um complexo dimérico que transduz esses sinais via produto do gene *mad* (Peifer, 1996). O *DPC4*, que é um gene relacionado ao *mad*, está frequentemente deletado em tumores pancreáticos. Na ausência de *DPC4*, o sinal negativo não é transmitido para inibidores de quinases do ciclo celular (Figura 2), com consequente aumento de atividade dessas enzimas, fosforilação da proteína pRB e liberação de fatores de transcrição (Hahn *et al.*, 1996c).

Assim, fica evidente que os padrões Wnt e Shh convergem para o núcleo por diferentes rotas e participam do controle de divisão e diferenciação celular como foi ilustrado na Figura 2. Na verdade, muitos de seus membros são supressores de tumor ou oncogenes ou são candidatos a essas funções. Se tais padrões forem comuns a muitos tecidos, um grande número de alvos para quimioterapia em câncer está disponível e poderá, no futuro, ter ampla aplicação (Dean, 1998). Além disso, uma forte conexão entre os processos de organogênese e carcinogênese fica demonstrada e confirma a elevada conservação de padrões de sinalização na escala zoológica.

II. OBJETIVOS

Considerando que as alterações na expressão ou função do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ podem levar a um controle anormal da proliferação celular e predispor ao câncer e que mutações no gene *PTCH* podem levar ao desenvolvimento de carcinomas basocelulares hereditários e esporádicos, foi proposto o presente trabalho que teve como objetivos:

1. Investigar a ocorrência de mutações e/ou polimorfismos na região codificadora (exons 2 e 3) e promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, em amostras de pele normal, folículo piloso, tumores benignos e malignos de pele, pela técnica de PCR-SSCP e seqüenciamento de DNA;
2. Investigar a ocorrência de mutações nos exons 3, 8 e 16 do gene *PTCH*, em amostras frescas e arquivadas de carcinomas basocelulares esporádicos, pela técnica de PCR-SSCP e seqüenciamento de DNA.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização das amostras

No presente trabalho, foram analisados os exons 2 e 3 e a região promotora do gene *p21^{WAF1/CIP1}* e os exons 3, 8 e 16 do gene *PTCH* em 42 amostras de pele normal exposta e não exposta à luz solar, em 17 amostras de folículos pilosos, em 71 tumores de pele e em 20 amostras de sangue, num total de 150 amostras de 119 indivíduos, obtidas no período de março de 1996 a junho de 1997.

O presente trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética Médica do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

As amostras foram coletadas após informação ao paciente e assinatura do termo de consentimento.

Amostras de pele normal (PN)

As amostras de pele normal de regiões do organismo expostas (21 casos) e não expostas (21 casos) à luz foram provenientes de 40 indivíduos saudáveis, submetidos a cirurgia plástica de pálpebra e mama em hospitais e clínicas particulares de São José do Rio Preto. Desse total, 14 foram processadas imediatamente após a exérese e 28 foram processadas após congelamento a -70°C por períodos que variaram de cinco a 18 meses.

Os dados relativos à caracterização das amostras quanto a sexo, idade, profissão e local da biópsia dos pacientes estão resumidos na Tabela 2.



Tabela 2. Caracterização de 57 indivíduos controles quanto a sexo (F: feminino; M: masculino), idade (em anos), profissão e local de retirada da amostra (PN= pele normal; FP= folículo piloso; SN= sangue de indivíduo normal).

Indivíduo	Amostra		Sexo	Idade	Profissão	Local da Amostra
	FP	Sangue				
1	PN-1	SN-1	F	36	Secretária	Mama
2	PN-2		F	29	Secretária	Mama
3	PN-3		F	23	Arquiteta	Mama
4	PN-4		F	19	Estudante	Mama
5	PN-5		F	42	Advogada	Mama
6	PN-6		F	47	Do lar	Mama
7	PN-7		F	28	Comerciária	Mama
8	PN-8		F	45	Professora	Mama
9	PN-9		F	44	Fiscal de renda	Pálpebra inferior
10	PN-10		F	36	Operadora de computador	Pálpebra inferior
11	PN-11		F	57	Professora	Pálpebra inferior
12	PN-12		F	46	Professora	Pálpebra inferior
13	PN-13		F	41	Comerciante	Mama
14	PN-14		F	33	Supervisora escolar	Mama
15	PN-15A		M	51	Médico	Pré-auricular
	PN-15B					Auricular
16	PN-16		F	20	Professora	Mama
17	PN-17		F	19	Estudante	Mama
18	PN-18		F	52	Professora	Pálpebra inferior
19	PN-19		F	31	Bancária	Mama
20	PN-20A		F	46	Diretora escolar	Mama
	PN-20B					Mama
21	PN-21		F	38	Jornalista	Mama
22	PN-22		F	28	Professora	Mama
23	PN-23	SN23	F	47	Assistente Social	Mama
24	PN-24		F	44	Do lar	Auricular
25	PN-25		F	42	Jornalista	Pálpebra inferior
26	PN-26		F	55	Do lar	Pré-auricular
27	PN-27		F	44	Agropecuária	Auricular
28	PN-28	SN-28	F	30	Do lar	Mama
29	PN-29		F	34	Comerciante	Mama
30	PN-30		F	49	Professora	Pálpebra inferior
31	PN-31		F	42	Comerciante	Pálpebra inferior
32	PN-32		F	19	Estudante	Mama
33	PN-33		F	46	Agropecuária	Pálpebra inferior
34	PN-34	SN-34	F	38	Tradutora intérprete	Pálpebra inferior
35	PN-35		F	52	Investigadora de polícia	Pálpebra inferior
36	PN-36		F	45	Empresária	Pálpebra inferior
37	PN-37	SN-37	F	41	Psicóloga	Pálpebra inferior
38	PN-38		F	40	Do lar	Pálpebra inferior
39	PN-39		F	41	Diretora escolar	Pálpebra inferior
40	PN-40		F	59	Do lar	Pálpebra inferior
41	FP-41		M	80	Empresário	Sobrancelha
42	FP-42		F	72	Do lar	Sobrancelha
43	FP-43		F	84	Do lar	Sobrancelha
44	FP-44		F	84	Do lar	Sobrancelha
45	FP-45	SN-45	F	86	Do lar	Sobrancelha
46	FP-46	SN-46		60	Do lar	Sobrancelha
47	FP-47		F	74	Do lar	Sobrancelha
48	FP-48		F	86	NR	Sobrancelha
49	FP-49		F	82	NR	Sobrancelha
50	FP-50		F	77	Do lar	Sobrancelha
51	FP-51	SN-51	F	75	Do lar	Sobrancelha
52	FP-52	SN-52	M	76	Ex-mecânico	Sobrancelha
53	FP-53	SN-53	F	70	Freira	Sobrancelha
54	FP-54	SN-54	F	72	Cozinheira	Sobrancelha
55	FP-55*		M	32	Vigia noturno	Sobrancelha
56	FP-56*		M	13	Estudante	Sobrancelha
57	FP-57*		F	21	Do lar	Sobrancelha
$\Sigma=57$	$\Sigma=59$	$\Sigma=11$				

*= Pacientes albinos



Amostras de folículo piloso (FP)

Em virtude da dificuldade na obtenção de pele normal de indivíduos com idades superiores a 60 anos, foram também utilizadas amostras de folículo piloso, que é formado por células originadas da camada basal da epiderme.

No total, foram processadas 17 amostras de folículo piloso provenientes de regiões expostas do organismo (sobrancelha) de 14 indivíduos saudáveis, que compreenderam voluntários ou internos do Lar São Vicente de Paulo de São José do Rio Preto e de três pacientes albinos.

Os dados relativos à caracterização das amostras quanto a sexo, idade, profissão e local da biópsia estão resumidos na Tabela 2.

Amostras arquivadas de lesões de pele (TA)

As 50 amostras estudadas de lesões cutâneas emblocadas em parafina foram cedidas pelo Laboratório de Patologia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Tais amostras compreenderam cinco ceratoses solares (CE), 15 carcinomas espinocelulares (CSC), 28 carcinomas basocelulares (CBC), um corno cutâneo e uma epiderme atrófica.

Os dados relativos a tipos de tumores, sexo, idade, profissão, exposição ocupacional, ocorrência isolada ou múltipla e região afetada dos pacientes estão apresentados na Tabela 3.



Tabela 3. Caracterização de 62 indivíduos portadores de tumores de pele (TA= amostras arquivadas de tumores, TF= amostras frescas de tumor) quanto a sexo (M= masculino; F= feminino), idade (em anos), profissão, exposição ocupacional à radiação solar, ocorrência isolada (I) ou múltipla (Mt) dos tumores e região afetada (MMS= membros superiores; MMI= membros inferiores; NR= não referido). Ce= ceratose solar, CSC= carcinoma espinocelular, CBC= carcinoma basocelular; EA= epiderme atrófica; CC= como cutâneo; TIF= tumor do infundíbulo folicular; ST= sangue de indivíduo com tumor.

Indivíduo	Amostra		Tumor	Sexo	Idade	Profissão	Exposição Ocupacional	Ocorrência	Região afetada
	TA/TF	Sangue							
58	TA-58		CBC	M	70	NR	NR	Mt	Face
59	TA-59		CBC	F	76	Do lar	-	Mt	Face
60	TA-60		CBC	M	63	NR	NR	I	Pescoço
61	TA-61		CBC	M	74	Lavrador	+	Mt	Face
62	TA-62		CBC	M	58	NR	NR	Mt	Face
63	TA-63		CBC	M	49	NR	NR	I	Face
64	TA-64A		CBC	F	77	Do lar	-	Mt	Face
	TA-64B		CBC	F	77	Do lar	-	Mt	Face
65	TA-65		CBC	F	55	NR	NR	Mt	Face
66	TA-66		CBC	F	68	Doméstica	-	I	Face
67	TA-67		CBC	F	55	NR	NR	Mt	Face
68	TA-68		CBC	M	72	NR	NR	Mt	Face
69	TA-69		CBC	F	55	Do lar	-	Mt	Face
70	TA-70		CBC	M	72	NR	NR	Mt	Pescoço
71	TA-71		CBC	F	33	Do lar	-	I	Face
72	TA-72		CBC	M	62	NR	NR	I	Pescoço
73	TA-73		CBC	M	71	NR	NR	Mt	Face
74	TA-74A		CBC	F	88	Do lar	-	Mt	Face
	TA-74B		EA						Face
	TA-74C		CC						MMS
75	TA-75		CBC	F	85	NR	NR	Mt	Face
76	TA-76		CBC	F	53	NR	NR	Mt	Face
77	TA-77		CBC	F	78	Lavradora	+	Mt	MMI
78	TA-78		CBC	F	67	NR	NR	Mt	Face
79	TA-79		CBC	M	76	NR	NR	Mt	Face
80	TA-80		CBC	M	68	NR	NR	Mt	Face
81	TA-81		CBC	F	76	NR	NR	Mt	Face
82	TA-82		CBC	M	78	Agricultor	+	Mt	Face
83	TA-83		Ce	F	55	Do lar	-	Mt	Face
84	TA-84		Ce	F	66	NR	NR	Mt	MMS
85	TA-85A		Ce	F	51	Do lar	-	Mt	MMS
	TA-85B		CBC						MMS
86	TA-86		Ce	F	50	NR	NR	NR	NR
87	TA-87		Ce	M	56	NR	NR	I	Face
88	TA-88A		CSC	F	78	Do lar	-	Mt	Face
	TA-88B		CSC						Face
89	TA-89		CSC	M	58	NR	NR	Mt	Face
90	TA-90A		CSC	F	87	Do lar	-	Mt	Face
	TA-90B		CSC						Face
	TA-90C		CSC						Face
91	TA-91		CSC	F	62	Doméstica	-	Mt	Face
92	TA-92		CSC	M	76	Lavrador	+	Mt	Face
93	TA-93		CSC	M	67	Militar	-	Mt	Face
94	TA-94	ST-94	CSC	F	47	Doméstica	-	Mt	Tórax
95	TA-95		CSC	M	74	NR	NR	I	Face
96	TA-96A		CSC	M	68	Lavrador	+	Mt	Face
	TA-96B		CBC						MMS
	TA-96C		CSC						MMS
97	TA-97		CSC	F	62	Do lar	-	Mt	Face
98	TA-98		CSC	F	76	Do lar	-	Mt	Face
99	TF-99		CBC	M	73	Ex-lavrador	+	Mt	Face
100	TF-100		CBC	F	55	Lavadeira	+	Mt	Face

Tabela 3. Continuação

Indivíduo	Amostra		Tumor*	Sexo	Idade	Profissão	Exposição Ocupacional	Ocorrência	Região afetada
	TA/TF	Sangue							
101	TF-101	ST-102	CBC	M	64	Ex-lavrador	+	Mt	Face
102	TF-102		CBC	F	41	Ex-lavadora	+	Mt	Face
103	TF-103		CBC	M	52	Ex-lavrador	+	I	Face
104	TF-104		CBC	M	73	Carroceiro	+	I	Face
105	TF-105		CBC	F	60	Ex-lavadora	+	Mt	Face
106	TF-106	ST-107	CBC	F	61	Ex-telefonista	-	I	Pescoço
107	TF-107		CBC	M	74	Ex-lavrador	+	Mt	Braço
108	TF-108		CBC	F	65	Ex-lavadora	+	Mt	Braço
109	TF-109		CBC	F	51	Lavadora	+	Mt	Esterno
110	TF-110		CBC	M	75	Ex-lavrador	+	Mt	Pré-auricular
111	TF-111	ST-111	CBC	M	60	Pedreiro	+	Mt	Face
112	TF-112	ST-112	CBC	F	74	Do Lar	-	I	Esterno
113	TF-113	ST-113	CBC	M	76	Lavrador	+	Mt	Face
114	TF-114	ST-114	CBC	F	53	Do Lar	-	I	Esterno
115	TF-115	ST-115	CBC	M	80	Ex-viajante	+	I	Face
116	TF-116	ST-116	CSC	M	72	Ex-mecânico	+	Mt	Pescoço
117	TF-117		CSC	M	69	Caminhoneiro	+	Mt	Dorsal
118	TF-118		CSC	F	59	Ex-lavadeira	+	Mt	Face
119	TF-119	ST-119	TIF		40	Caminhoneiro	+	Mt	Face
$\Sigma=62$	$\Sigma=71$	$\Sigma=9$			$\bar{X}=63,0$				

Amostras frescas de tumores de pele (TF)

Além dos casos arquivados, foram processadas 21 amostras frescas de tumores, obtidas após biópsia ex-vivo por *punch* de 3-5mm. Os espécimens foram cedidos pelo Serviço de Dermatologia da FAMERP e por clínicas particulares de cirurgia plástica de São José do Rio Preto e diagnosticados clinicamente ou histopatologicamente como sendo 17 carcinomas basocelulares, três carcinomas espinocelulares e um tumor do infundíbulo folicular.

Os dados relativos aos tipos de tumores, sexo, idade, profissão, exposição ocupacional, ocorrência isolada ou múltipla e região afetada dos pacientes, estão apresentados na Tabela 3.

Amostras de sangue

Foram também processadas 20 amostras de sangue provenientes de nove pacientes (ST) e 11 controles (SN) que apresentaram suspeita de variantes polimórficas do gene $p21^{WAF1/CIP1}$.

Os dados relativos a indivíduos doadores de amostras de sangue estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Dentre as 150 amostras analisadas no presente trabalho, 32 foram também avaliadas por outros pesquisadores para mutações no gene *RAS*, 72 para o gene *TP53* e 42 para expressão da proteína p53.

2. Extração de DNA

Tecido fresco (pele normal e amostras frescas de tumores)

A extração de DNA a partir de tecido fresco foi desenvolvida segundo técnica descrita por Banerjee *et al.* (1995) com modificações, descrita a seguir.

O material, com cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, foi cortado com auxílio de tesoura e pinça em placa de Petri descartável e transferido para tubo de microcentrifuga estéril de 1,5mL, contendo 400 μ L de tampão de digestão (tris-HCl 50mM pH 8,5, EDTA 1mM, Tween 20 0,5%) e proteinase K (concentração final 200 μ g/mL). O material foi cuidadosamente ressuspensionado e mantido em banho-maria a 42°-45°C *overnight* ou a 55°C por 3 horas, para digestão protéica. Após esse período, o material foi centrifugado a 6.000rpm por 5 minutos e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro tubo de centrifuga estéril e aquecido a 95°C por 10 minutos para desnaturação da proteinase K e proteínas contaminantes. O DNA obtido foi estocado a -20°C.

Tecido arquivado

A extração de DNA de material arquivado também foi desenvolvida segundo técnica de Banerjee *et al.* (1995), com um passo inicial para retirada da parafina.

Cerca de dois a quatro cortes histológicos de 10 μ m, obtidos a partir de blocos de parafina, foram colocados em tubo de microcentrifuga de 1,5mL, contendo 200 μ L de tampão de digestão (tris-HCl 50mM pH 8,5, EDTA 1mM, Tween 20 0,5%). O tubo foi



hermeticamente fechado e aquecido em banho-maria a 70°C até ocorrer a fusão da parafina e, então, centrifugado a 12.000rpm por 10 minutos. O anel de parafina formado na porção superior do tubo foi totalmente removido com auxílio de uma espátula odontológica e o material recebeu proteinase K (concentração final 200µg/mL), foi homogeneizado e mantido em banho-maria a 42-45°C *overnight* ou a 55°C por 3 horas. Após essa etapa, o procedimento seguiu as etapas descritas para tecido fresco.

Folículo piloso

Para a extração de DNA de folículo piloso, além da técnica de Banerjee *et al.* (1995), foi utilizada a técnica de Sambrook *et al.* (1989), com modificações, descrita a seguir.

Anteriormente à retirada dos folículos pilosos, foi realizada a limpeza da área com álcool 70% e, então, extraídos cerca de 3 a 6 folículos pilosos, que foram imediatamente acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5mL contendo 100µL de tampão de digestão (Tris-HCl 10mM, EDTA 100mM), SDS 0,5% e proteinase K (concentração final 100µg/mL) e incubados por um período de 16 a 20 horas a 37°C. O DNA obtido foi purificado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e então precipitado com adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol e mantido a -20°C *overnight*. No dia seguinte, o DNA foi centrifugado por 20 minutos a 12.000rpm e o sobrenadante foi desprezado. O DNA foi mantido à temperatura ambiente até evaporação do etanol e, posteriormente, ressuspendido em tampão (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) e acondicionado em freezer a -20°C.



Sangue

A extração de DNA a partir de sangue foi desenvolvida segundo técnica descrita por Pena *et al.* (1991), com modificações, descrita a seguir.

Aproximadamente 5mL de sangue foram colhidos em tubo *vacutainer* com EDTA e posteriormente transferidos para tubo de centrifuga de 15mL, ao qual foram adicionados 5mL de solução de lise (sacarose 0,32M, Tris-HCl 10mM, $MgCl_2$ 5mM, Triton X-100%). O material foi homogeneizado por inversão durante 3 minutos e centrifugado a 3.000rpm por 30 minutos. Ao sedimento desagregado em vórtex, foram acrescentados 4,5mL de solução contendo NaCl 0,075M, EDTA 0,02M e SDS 0,5%. Após homogeneização por inversão, foi adicionada proteinase K (concentração final 200 μ g/mL) e o material foi novamente incubado em banho-maria a 37°C por 16 horas ou a 42°C por três horas. Após esse período, recebeu 5mL de fenol, foi homogeneizado por inversão durante três minutos e centrifugado a 3.000rpm por 30 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo, que recebeu 5mL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 3.000rpm por 30 minutos. Esse procedimento foi repetido uma vez e a fase superior obtida foi colocada em tubo contendo 500 μ L de KCl 2M, ao qual foi acrescentado etanol absoluto gelado até completar aproximadamente 14mL. O material foi homogeneizado por inversão até precipitação de todo o DNA, que foi "pescado" e lavado duas vezes em etanol 70%, seco à temperatura ambiente por um minuto e ressuspendido em cerca de 100 μ L de tampão de extração. Em seguida, foi aquecido em banho-maria a 60-66°C por 30 minutos, mantido por uma noite à temperatura ambiente e acondicionado em freezer a -20°C.



3. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação do DNA, foi utilizada a técnica de Saiki *et al.*, (1988), com modificações. A reação foi processada em ciclador de temperatura MJ Research (16 tubos) e GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem), em volume de 45 μ L contendo 50 a 100ng de DNA genômico, Tris-HCl 10mM (pH 8.3), KCl 50mM, MgCl₂ 1,5- 3,0mM, dNTPs 0,2mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 μ moles de cada iniciador (ou oligo), 2U de Taq polimerase (BRL), DMSO 0-2,5% e glicerol 0-10%. Ao volume final, foram adicionados 30 μ L de óleo mineral para evitar evaporação. A mistura da reação foi submetida a 35 ciclos de amplificação, com um primeiro ciclo de cinco minutos a 94°C para inativação de possíveis proteases que pudessem interferir na reação enzimática. Cada ciclo seguinte consistiu de 60 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 60 segundos para *annealing* dos iniciadores a temperaturas que variaram para cada par e 120 segundos a 72°C para extensão das cadeias. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta para confirmação do sucesso da reação.

Foram utilizados dois pares de iniciadores para os segmentos do exon 2, designados 2A e 2B, um par para o exon 3 e um par para a região promotora (PR) do gene *p21^{WAF1/CIP1}*, sendo as temperaturas de *annealing* iguais a 56°C, 57°C, 58°C e 63°C e tendo os produtos de amplificação tamanhos de 180, 170, 300 e 247 pares de bases, respectivamente. Esses segmentos correspondem a toda a região codificadora do gene e encontram-se representados esquematicamente na Figura 3. As seqüências dos iniciadores bem como sua localização no gene, temperaturas de *annealing* e tamanho dos fragmentos amplificados estão resumidos na Tabela 4.



Tabela 4: Descrição dos iniciadores, genes envolvidos, sua posição e orientação no gene, tamanho do fragmento amplificado, temperatura de anelamento (TA), e referência bibliográfica utilizada.

Iniciador	Gene	Posição* /Orientação	Tamanho do fragmento	TA	Seqüência (5'-3')	Bibliografia
PR	<i>p21^{WAF1}</i>	2144-2165/sense	247	63°C	attcccctaccccatgctgctc	**
PR	<i>p21^{WAF1}</i>	2371-2392/anti-sense			catccccttctccctgaaaac	**
2A	<i>p21^{WAF1}</i>	88-107/sense	180	56°C	gctggggatgtccgtcagaa	**
2A	<i>p21^{WAF1}</i>	249-268/anti-sense			aggcgaagtcaccctccagt	**
2B	<i>p21^{WAF1}</i>	246-265/sense	170	57°C	accacttgagggtgacttg	**
2B	<i>p21^{WAF1}</i>	396-415/anti-sense			acaggtccacatggtcttc	**
W3	<i>p21^{WAF1}</i>	Região intrônica/sense	≅ 300	58°C	cccagggaagggtgtcctg	Law e Deka, 1995
W3	<i>p21^{WAF1}</i>	698-716/anti-sense			gggcggccagggtatgtac	Law e Deka, 1995
PTC3	<i>PTCH</i>	383-405/sense	313	56°C	ctattgtgtatccaatggcagg	Hahn <i>et al.</i> , 1996
PTC3	<i>PTCH</i>	563-582/anti-sense			attagtaggtggacgcggc	Hahn <i>et al.</i> , 1996
PTC8	<i>PTCH</i>	1056-1076/sense	256	55°C	gaggcagtggaaactgcttc	Hahn <i>et al.</i> , 1996
PTC8	<i>PTCH</i>	1182-1203/anti-sense			ttgcataaccagcgagtcctg	Hahn <i>et al.</i> , 1996
PTC16	<i>PTCH</i>	2692-2717/sense	268	63°C	aacccattctcaaaggcctcggtc	Hahn <i>et al.</i> , 1996
PTC16	<i>PTCH</i>	2852-2875/anti-sense			cacctctgtaagttcccagacct	Hahn <i>et al.</i> , 1996

* Os números indicam a posição dos nucleotídeos no gene.

** Iniciadores desenhados a partir de seqüências gênicas obtidas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

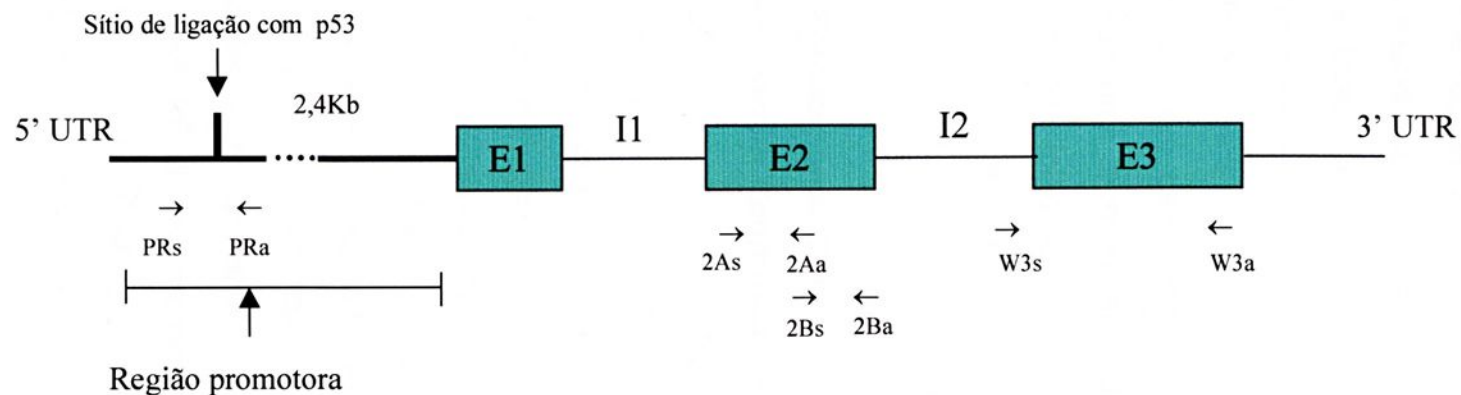


Figura 3. Representação esquemática do gene *p21^{WAF1/CIP1}*. A barra representa o sítio de ligação com a proteína p53. Os retângulos representam os exons (E) 1, 2 e 3, com os introns (I1 e I2) correspondente. As setas indicam a localização dos iniciadores utilizados (s= sense; a= anti-sense).

Para análise do gene *PTCH*, foram utilizados iniciadores para os exons 3, 8 e 16, sendo as temperaturas de *annealing* iguais a 56°C, 55°C e 60°C e tendo os produtos de amplificação tamanhos de 313, 256 e 268 pares de bases, respectivamente. O gene *PTCH* contém 23 exons e os segmentos escolhidos para análise correspondiam, no início do presente trabalho, aos exons referidos na literatura como apresentando mutações em carcinomas basocelulares esporádicos. A Figura 4 mostra o esquema representativo dos exons e introns do gene *PTCH*. As seqüências dos iniciadores bem como sua localização no gene, temperaturas de *annealing* e tamanhos dos fragmentos amplificados estão resumidos na Tabela 4.

4. Análise do Polimorfismo Conformacional de DNA de Cadeia Simples (*Single-Strand Conformation Polymorphism - SSCP*)

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram submetidas a análise por SSCP, segundo técnica de Orita *et al.* (1989), com modificações. Esse método inclui etapas de desnaturação do DNA e sua aplicação em gel de poliacrilamida não desnaturante. A visualização dos produtos, por marcação radioativa ou não, permite a detecção de mutações, inclusive aquelas correspondentes à troca de um único par de bases, em virtude da migração diferencial da cadeia mutante causada por mudança na sua conformação (Grompe, 1993).

O DNA foi diluído na proporção 2:1 em *stop solution* (formamida 98%, EDTA 10mM, pH 8.0, azul de bromofenol 0,025% e xileno cianol 0,025%), desnaturado a 94°C por 10 minutos e acondicionado em gelo. Em seguida, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% ou 10% com glicerol 5% (22,5mL ou 21,0mL de H₂O miliQ autoclavada, 4,5mL ou 6,0mL de Instagel 50%, 1,5mL de TEB

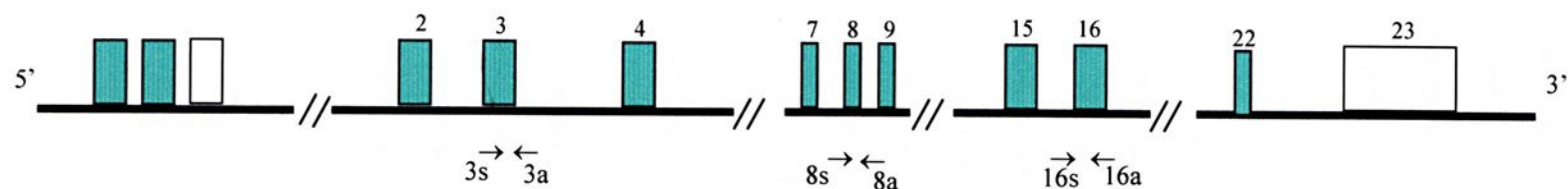


Figura 4. Representação esquemática do gene *PTCH*. Os exons codificadores são representados como retângulos preenchidos e os exons não codificadores são representados como retângulos em branco. A região 5' possui três segmentos que atuam como exon 1 após processamentos alternativos do transcrito primário (s=sense; a= anti-sense)

10X, 1,5mL de glicerol, 300 μ L de persulfato de amônia 10% e 30 μ L Temed) em placas de 16cmx19cm e 0,8mm de espessura (aparato GIBCO-BRL), contendo tampão (Tris-borato 90mM pH 8.3, EDTA 4mM) por 3 a 4 horas em potência constante de 3W (fonte BioRad 3000Xi), em temperatura ambiente de 18°C a 26°C. Após esse período, o gel foi fixado por 10 minutos em solução fixadora contendo etanol 10% e ácido acético glacial 7,5%, sob agitação leve e constante. O fixador foi aspirado e o gel foi corado por 10 minutos em solução contendo nitrato de prata 0,3%, também sob agitação constante. A solução foi novamente aspirada e o gel foi lavado duas vezes em água desionizada para retirada do excesso de prata. Em seguida, o gel foi revelado por 10 minutos em uma solução contendo hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,3%. A solução foi descartada por aspiração e o gel fixado novamente por 1-10 minutos. Após essas etapas, o gel foi seco em papel celofane e glicerol 10%, segundo técnica desenvolvida por Ceron *et al.* (1992) e arquivado.

5. Seqüenciamento automático

O seqüenciamento automático das amostras com padrões variantes foi realizado em equipamento **ABI Prism 377** (*Applied Biosystems Inc*). Para o sucesso do seqüenciamento, as amostras selecionadas foram submetidas a várias etapas que compreenderam a reamplificação do DNA, a purificação, a reação de seqüenciamento, a precipitação e a desnaturação.

Purificação das amostras de DNA

O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 2% e submetido a eletroforese a 80 volts por 30 a 40 minutos. A banda obtida foi recortada, transferida para tubo de 1,5mL, pesada e então purificada utilizando-se o Kit comercial *Concert Matrix Gel-11457-017* (Gibco), segundo as instruções do fabricante, descritas a seguir.

Para cada 10mg de gel foram adicionados 30 μ L de tampão de solubilização do gel (L1) e 1 μ L de resina de sílica. A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex e incubada em banho-maria a 50°C por 15 minutos, sendo ressuspendida a cada 3 minutos, para a completa solubilização do gel. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 12.000rpm por 30 segundos e o sobrenadante desprezado. Ao sedimento foi adicionado o mesmo volume de tampão L1, a mistura foi ressuspendida em vórtex, centrifugada a 12.000rpm por 30 segundos e o sobrenadante desprezado. Em seguida, a amostra foi lavada duas vezes com o mesmo volume de tampão de lavagem contendo etanol (L2), seguindo os mesmos passos de homogeneização e centrifugação utilizados anteriormente. A resina de sílica foi seca em estufa a 37°C por 10 a 15 minutos e então adicionados 20-50 μ L de tampão de eluição do DNA (TE). A resina foi ressuspendida em vórtex, incubada em banho-maria a 50°C por 5 minutos, com uma etapa de homogeneização nesse período. Em seguida, foi centrifugada a 12.000rpm por 30 segundos, o sobrenadante contendo DNA foi transferido cuidadosamente para novo tubo e o DNA purificado foi quantificado em gel de agarose 2%, utilizando-se o marcador de peso molecular *DNA low mass* (Gibco).

Reação de seqüenciamento

Cada amostra foi submetida a uma reação de seqüenciamento com 2 μ L de *Big Dye Terminator*, 3,2pmoles de iniciador sense e antisense, separadamente, e 10ng de DNA purificado. A reação, realizada em placas de 96 pocinhos, compreendeu uma primeira etapa de 5 minutos a 95°C para completa desnaturação da cadeia de DNA, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C para *annealing* e 4 minutos a 60°C para extensão das cadeias.

Precipitação

As amostras foram precipitadas com 100 μ L de etanol absoluto, 5 μ L de acetato de potássio (KOAc) 3M e 30 μ L de água. A placa foi selada com plástico e o material foi homogeneizado por inversão, mantido à temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugado a 3.200rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado por inversão. Foram acrescentados 200 μ L de etanol 70%, a placa foi novamente selada com plástico e as amostras foram homogeneizadas por inversão, centrifugadas a 12.000rpm por 7 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e a placa, em posição invertida, foi centrifugada a 720rpm por 3 minutos a 4°C. As amostras foram, então, incubadas em estufa a 37°C por cerca de 30 minutos, armazenadas à temperatura ambiente e envoltas em papel alumínio, no máximo por uma semana.

Desnaturação

Após a precipitação, as amostras foram diluídas em 2 μ L de *loading buffer* (formamida e blue dextran), desnaturadas a 95°C por 2 minutos e mantidas no gelo até o momento de aplicação no gel de poliacrilamida 2% do seqüenciador.

Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados **GenBank**, utilizando o programa **BLAST** (Basic Local Aligment Search Tool) desenvolvido no **NCBI** (National Center for Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1990).

IV. RESULTADOS

1. Casuística

Amostras de pele normal

Foi avaliado um total de 21 amostras de pele normal não expostas ao sol, provenientes de 20 pacientes saudáveis do sexo feminino, que se submeteram a cirurgia plástica de mama. As amostras foram retiradas da região inferior da mama, por compreender a região de menor exposição à luz solar. A idade dos indivíduos variou de 19 a 47 anos ($\bar{X}$ = 32,7) e nenhum deles referiu exposição diária ao sol por um período superior a oito horas em decorrência de atividades profissionais.

Em relação às amostras de pele normal exposta à luz solar, foi obtido um total de 21 amostras de 20 indivíduos, das quais 16 foram provenientes da pálpebra inferior, três da região auricular e duas da região pré-auricular. As amostras PN-15A e PN-15B foram obtidas do mesmo indivíduo, porém de locais diferentes (região pré-auricular direita e auricular esquerda). Com exceção de um paciente, todos os demais eram do sexo feminino, com idades variando de 37 a 59 anos ($\bar{X}$ = 46,2). Em nenhum dos casos houve, em decorrência de atividades profissionais, exposição ao sol por período superior a oito horas diárias.

O grupo de pele normal foi utilizado como controle no estudo de investigação de alterações nas regiões codificadora (exon 2 e 3) e promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$.



Amostras de folículo piloso

Um total de 17 amostras de folículo piloso obtidas da região da sobrancelha foi submetido a investigação de alterações nas regiões codificadora (exon 2 e 3) e promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$. Tais amostras foram provenientes de 14 indivíduos saudáveis e de três albinos, que compreenderam quatro homens e 12 mulheres, com idades variando entre 13 a 86 anos ($\bar{X}=63,7$) e profissões sem exposição ao sol.

Amostras arquivadas de lesões de pele

Para investigação de alterações na região codificadora (exons 2A, 2B e 3) e promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, foram utilizadas 32 amostras arquivadas de tumores (casos 58-64, 66, 69-71, 74, 77, 80, 82-98), que compreenderam cinco ceratoses solares, 11 carcinomas espinocelulares e 16 carcinomas basocelulares, provenientes de 14 homens e de 18 mulheres, geralmente com tumores múltiplos, idades variando entre 33 a 88 anos ($\bar{X}=66,4$) e profissões atuais, quando referidas, sem exposição ao sol na maioria dos casos.

O estudo dos exons 3, 8 e 16 do gene *PTC* foi realizado em 26 amostras de carcinomas basocelulares (casos 58-83), 16 delas também utilizadas no estudo do gene $p21^{WAF1/CIP1}$. Essas amostras foram provenientes de 12 homens e 14 mulheres, cujas idades variaram de 33 a 88 anos ($\bar{X}=67,5$), e a maioria apresentou lesões cutâneas múltiplas em locais expostos do organismo. Em muitos casos, os dados relativos às profissões não encontravam-se referidos nos prontuários.



Cinco indivíduos (casos 74, 85, 88, 90 e 96) que apresentaram suspeita de mutação ou presença de polimorfismo nos exons 2A, 3 e região promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, não retornaram ao hospital quando solicitado, para colheita de sangue. Foram, então, utilizadas oito amostras de outros tumores arquivados procedentes dos mesmos pacientes para confirmação de polimorfismo.

Em resumo, foram analisadas 50 amostras arquivadas de tumores, provenientes de 42 indivíduos, dos quais apenas cinco citaram exposição diária ao sol por períodos superiores a oito horas, 16 negaram exposição ao sol e 21 não referiram esse dado. A região mais frequentemente afetada foi a face, seguida dos membros superiores e pescoço.

Amostras frescas de tumores de pele

Um total de 21 amostras frescas de tumores foram avaliadas quanto a alterações nas regiões codificadora (exon 2A, 2B e 3) e promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$. Tais amostras compreenderam 17 carcinomas basocelulares, três carcinomas espinocelulares e um tumor do infundíbulo folicular, provenientes de 12 indivíduos do sexo masculino e nove do sexo feminino, cujas idades variaram de 40 a 80 anos ($\bar{X}=63,2$), todos de pele branca e profissões geralmente ligadas à exposição ao sol.

Para investigação dos exons 3, 8 e 16 do gene *PTCH*, foram utilizadas apenas 17 amostras de carcinomas basocelulares desse grupo (casos 99-115), provenientes de nove indivíduos do sexo masculino e oito do sexo feminino.



Amostras de sangue

Foram investigadas amostras de sangue de 20 indivíduos que apresentaram suspeita de mutação ou presença de polimorfismo nos exons 2A, 3 e região promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, após análise por PCR/SSCP. Dentre essas amostras, cinco foram provenientes de indivíduos que apresentaram padrão migratório variante, tanto para o exon 2A como para a região promotora (indivíduos 28, 37, 94, 103 e 115), seis foram provenientes de indivíduos que apresentaram padrão variante apenas para o exon 2A (indivíduos 45, 52, 53, 54, 111 e 117) e oito para a região promotora (indivíduos 23, 34, 46, 51, 107, 109, 116 e 119).

2. Extração de DNA

Um total de 150 amostras foram submetidas a extração de DNA e compreenderam 42 peles normais, sendo 21 da região não exposta à luz solar e 21 da região exposta, 17 folículos pilosos, 50 tumores emblocados em parafina, 21 amostras frescas de tumores e 20 amostras de sangue. O processo foi realizado com sucesso em todos os casos.

3. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com o objetivo de otimizar as condições de amplificação de cada par de oligos, para cada grupo de amostras, foram realizados testes que determinaram as melhores concentrações de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) a serem utilizadas (1,5mM, 2,0mM, 3,0mM ou 4,5mM) nas



reações, bem como a presença ou não de DMSO (5%) ou glicerol (5% e 10%).

Os melhores resultados que mostraram bandas mais nítidas do amplificado e ausência de bandas inespecíficas para o exon 2A do gene *p21^{WAF1/CIP1}* em amostras frescas de tumores, de pele normal e de sangue ocorreram em condições com MgCl_2 1,5mM, sem glicerol e com DMSO 5%. Para as amostras de tumores emblocados em parafina, as condições ideais foram aquelas com MgCl_2 2,0mM, sem glicerol e sem DMSO, ao passo que, para as amostras de folículos pilosos, foram aquelas com MgCl_2 3,0mM, sem glicerol e sem DMSO. Esses dados encontram-se resumidos na Tabela 5.

Testes semelhantes aos utilizados para o exon 2A foram aplicados para os exons 2B, 3 e para a região promotora do gene *p21^{WAF1/CIP1}* e para os exons 3, 8 e 16 do gene *PTC*. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 e Figuras 5 e 6.

Dentre as 110 amostras (40 amostras de pele normal, 17 folículos pilosos, 32 tumores arquivados e 21 amostras frescas de tumores de pele) submetidas a amplificação, 105 puderam ser amplificadas com sucesso para a região promotora, 110 para os exons 2A e 2B, e 107 para o exon 3 do gene *p21^{WAF1/CIP1}*. Após análise por SSCP, mais duas amostras de pele normal, oito de tumores emblocados em parafina e 19 amostras de sangue, todas pertencentes a indivíduos que apresentaram padrão de banda com suspeita de presença de mutação ou polimorfismo, também foram amplificadas. Os resultados relativos ao sucesso de amplificação estão apresentados na Tabela 6 e Figura 7.

Tabela 5. Resultados dos testes sobre condições de amplificação de segmentos do DNA obtidos a partir de diferentes amostras, em reações contendo $MgCl_2$ nas concentrações de 1,5mM, 2,0mM, 3,0mM e 4,5mM ou também com DMSO 5%, glicerol 5% ou 10% (- = fraco, $\pm$ = regular, + = bom, ++ ótimo). PR= região promotora; caracteres em azul indicam as condições escolhidas.

Amostra	Segmento de DNA/exon	$MgCl_2$				$MgCl_2$ + DMSO				$MgCl_2$ + Glicerol 5%				$MgCl_2$ + Glicerol 10%			
		1,5	2,0	3,0	4,5	1,5	2,0	3,0	4,5	1,5	2,0	3,0	4,5	1,5	2,0	3,0	4,5
Pele normal	WAF PR	-		-	-	+		-	-	-		-	-				
	WAF 2A	$\pm$		+	+	++		+	+	$\pm$		+	+				
	WAF 2B	+		+	$\pm$	+		+	$\pm$	+		+	$\pm$	++		$\pm$	-
	WAF 3	-		$\pm$	$\pm$	++		$\pm$	$\pm$	+		$\pm$	$\pm$				
Folículo piloso	WAF PR	$\pm$	$\pm$	$\pm$		$\pm$		$\pm$	$\pm$	-		++	+				
	WAF2A	-		++	+	-		+	$\pm$	$\pm$		-	+				
	WAF2B	$\pm$		-	-	-		+	-	-		-	-				
	WAF3	-		$\pm$	-	-		-	-	-		+	$\pm$				
Tumor embocado	WAF PR	-		+	$\pm$	-		-	-	-		-	-				
	WAF 2A	+		+		-	-	$\pm$		+	+	+					
	WAF 2B	+		+	+	++		+	+	-		$\pm$	$\pm$	-		$\pm$	-
	WAF 3	-		-	-	-		-	-	$\pm$		-	-				
	PTC 3	+		-	-	-		-	-	-		$\pm$	-				
	PTC 8	-		-	-	-		+	-	-		-	-				
	PTC 16	-		-	-	+		$\pm$	-	-		-	-				
Tumor fresco	WAF PR	$\pm$		$\pm$	-	++		+	$\pm$	+		$\pm$	-				
	WAF 2A	+		++	++	++		++	+	-		+	+				
	WAF 2B	+		+	-	+		+	-	+		+	-	++		$\pm$	-
	WAF 3	-		-	-	+		$\pm$	$\pm$	++		$\pm$	$\pm$				
	PTC 3	+		++	+	+		+	+	-		$\pm$	-				
	PTC 8	+		++	+	+		+	+	+		+	+				
	PTC 16	+		+	$\pm$	++		+	$\pm$	+		+	+				
Sangue	WAF PR	$\pm$		$\pm$	-	++		+	+	$\pm$		$\pm$	$\pm$				
	WAF 2A	+		++	++	++		++	+	-		+	+				

Tabela 6. Frequência de amplificação da região promotora, dos exons 2A, 2B e 3 do gene *p21^{WAF1/CIP1}* e dos exons 3, 8 e 16 do gene *PTC* nas amostras em estudo (número de amostras amplificadas/total de amostras). PR= região promotora

Tipo de amostra	<i>WAF1</i>				<i>PTC</i>		
	PR	Exon 2A	Exon 2B	Exon 3	Exon 3	Exon 8	Exon 16
Pele normal	40/40	40/40	40/40	40/40			
Tumor embocado	32/32	32/32	32/32	32/32	25/26	25/26	24/26
Folículo piloso	12/17	17/17	17/17	14/17			
Tumor fresco	21/21	21/21	21/21	21/21	17/17	17/17	17/17
Sangue	11/11	11/11					

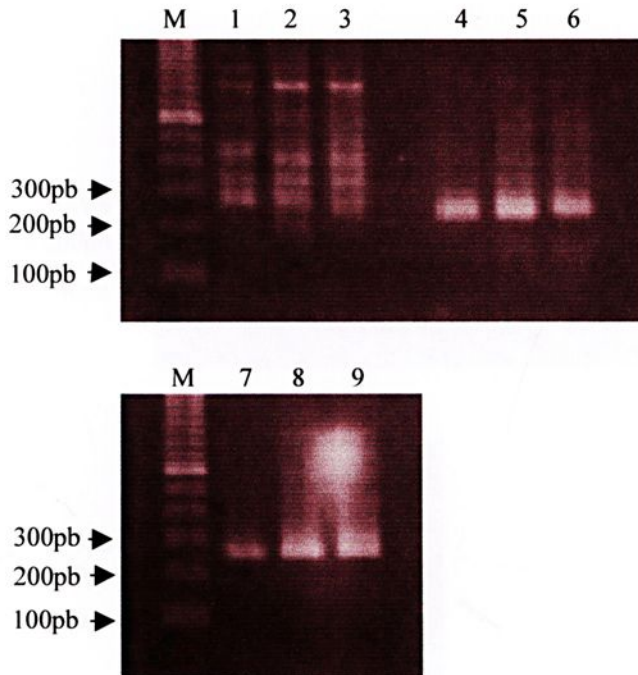


Figura 5. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando o produto de PCR da região promotora do gene *p21^{WAF1}* (caso PN-6), nas seguintes condições de amplificação: com MgCl_2 1,5mM (linhas 1, 4 e 7), MgCl_2 3,0mM (linhas 2, 5 e 8) e MgCl_2 4,5mM (linhas 3, 6 e 9), sem DMSO e sem glicerol (linhas 1, 2 e 3), com DMSO 5% (linhas 4, 5 e 6) e com glicerol 5% (linhas 7, 8 e 9). M= marcador de peso molecular de 100pb.

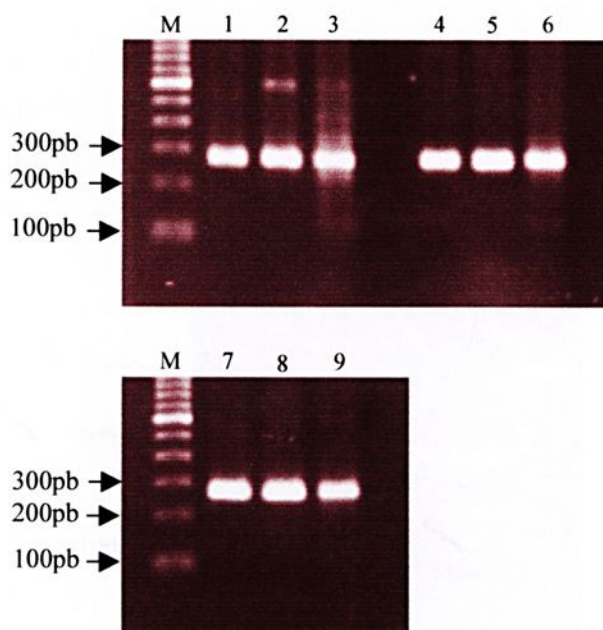


Figura 6. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando o produto de PCR do exon 16 do gene *PTC* (caso TF-111), nas seguintes condições de amplificação: MgCl_2 1,5mM (Linhas 1, 4 e 7), MgCl_2 3,0mM (Linhas 2, 5 e 8) e MgCl_2 4,0mM (Linhas 3, 6 e 9), sem DMSO e sem glicerol (Linhas 1, 2 e 3), com DMSO 5% (Linhas 4, 5 e 6) e com glicerol 5% (Linhas 7, 8 e 9). M= marcador de peso molecular de 100pb.

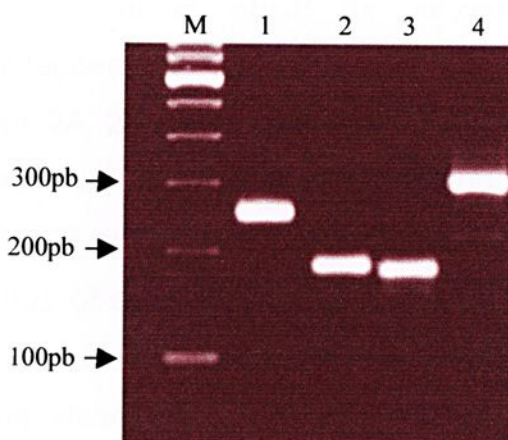


Figura 7. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos amplificados para a região promotora e os exons 2A, 2B, 3 do gene *p21^{WAF1/CIP1}* do caso PN-7 (linhas 1, 2, 3 e 4), com 247, 180, 170 e ≈ 300 pb, respectivamente. M= marcador de peso molecular de 100pb.

Das 26 amostras de carcinomas basocelulares emblocados em parafina investigadas para mutações no gene *PTC*, 25 puderam ser amplificadas para os exons 3 e 8 e 24 para o exon 16. Esses resultados encontram-se apresentados na Tabela 6 e Figura 8.

4. Análise do polimorfismo conformacional de cadeia simples de DNA (SSCP)

A técnica de SSCP foi utilizada para investigar a presença de mutações ou polimorfismos na região promotora e codificadora (exons 2A, 2B e 3) do gene *p21^{WAF1/CIP1}* e nos exons 3, 8 e 16 do gene *PTC*. Todas as amostras amplificadas por PCR foram avaliadas pela técnica de SSCP em géis de poliacrilamida 7,5% e 10%, sendo os melhores resultados observados em géis a 10%, que exibiram melhor separação das bandas e permitiram a identificação de padrões eletroforéticos bem definidos e, por conseguinte sua classificação em padrões fenotípicos (f) de corrida eletroforética.

Na região promotora do gene *p21^{WAF1/CIP1}*, de 105 amostras amplificadas e analisadas pela técnica de SSCP, foram identificados quatro diferentes padrões eletroforéticos, o *f1^{PR}*, o *f2^{PR}*, o *f3^{PR}* e o *f4^{PR}* (Figura 9). Entretanto, após seqüenciamento, o padrão *f3^{PR}*, observado nos casos PN-8, TF-112 e TF-113 e o padrão *f4^{PR}*, observado nos casos PN-23 e FP-46, revelaram seqüências semelhantes ao *f1^{PR}* e foram reclassificados como *f1^{PR}*. Desse modo, o padrão *f1^{PR}* esteve presente em 44 das 52 amostras controle (84,6%) e em 33 das 53 amostras tumorais (62,3%), ao passo que o fenótipo *f2^{PR}* esteve presente em oito das 52 amostras controles (15,4%) e em 20 das 53 amostras tumorais (37,7%). Esses dados encontram-se apresentados nas Tabelas

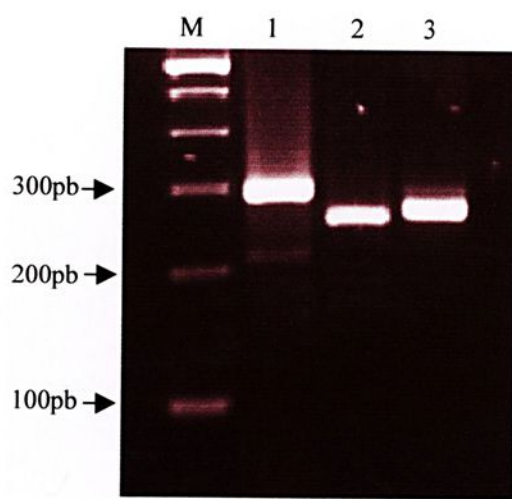


Figura 8. Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos amplificados para os exons 3, 8 e 16 do gene *PTC* do caso TF-103 (linhas 1, 2 e 3), com 313, 256 e 268 pb respectivamente. M= marcador de peso molecular de 100pb.

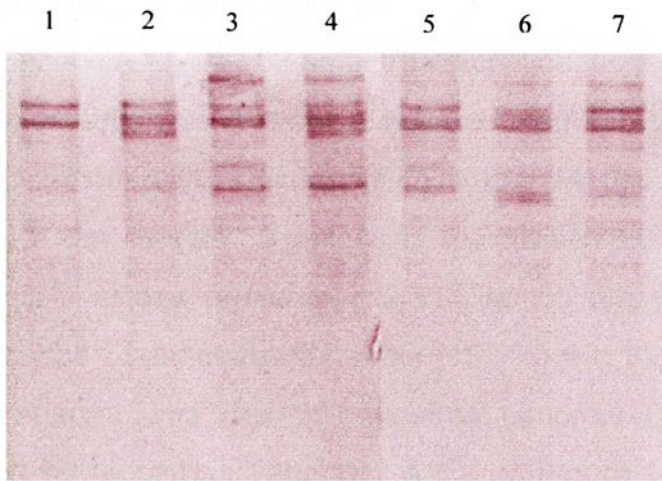


Figura 9. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, mostrando padrões migratórios $f1^{PR}$ para a região promotora do gene *p21^{WAF1/CIP1}* (linhas 1, 5 e 7) nas amostras PN-21, PN-7 e PN-13) e variantes $f2^{PR}$ (linhas 2 e 4), $f3^{PR}$ (linha 6) e $f4^{PR}$ (linha 3) nas amostras PN-15A, PN-28, PN-8 e PN-23, respectivamente.

7 e 8. O teste de χ^2 apresentou diferenças estatisticamente significantes nos dois grupos ($\chi^2 = 6,71$; $p = 0,01$).

Para confirmação da presença de polimorfismo constitucional foram analisados outros tecidos do mesmo indivíduo em um total de 14 casos (11 amostras de sangue periférico, uma amostra de pele normal proveniente de região diferente do organismo e quatro amostras de outros tumores arquivados dos mesmos indivíduos). Todos os casos avaliados apresentaram o mesmo padrão observado previamente, como ilustrado na Figura 10.

No exon 2A de 108 amostras amplificadas e avaliadas por SSCP, foram detectados três diferentes padrões eletroforéticos, o $f1^{2A}$, o $f2^{2A}$ e o $f3^{2A}$. O fenótipo $f1^{2A}$ foi identificado em 44 das 55 amostras controles (80%) e em 42 das 53 amostras tumorais (79,2%), ao passo que o fenótipo $f2^{2A}$ esteve presente em 11 das 55 amostras controle (20%) e em oito das 53 amostras tumorais (15,1%) e o fenótipo $f3^{2A}$ foi observado em apenas uma das 53 amostras tumorais (1,9%). Esses dados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8 e na Figura 11. O teste de χ^2 não apresentou diferenças estatisticamente significantes nos dois grupos ($\chi^2 = 1,37$; $p = 0,50$).

Para confirmação da presença de polimorfismo, foi realizada a análise comparativa em 15 casos, utilizando-se para isso 11 amostras de sangue periférico, uma amostra de pele normal proveniente de região diferente do mesmo indivíduo e três amostras de tumores arquivados. Os resultados mostraram que o sangue do indivíduo 94 (ST-94) apresentou padrão $f4^{2A}$, diferentemente do padrão $f2^{2A}$ observado no tumor (TE-94). Todas as demais amostras repetiram o padrão previamente observado. A Figura 12 mostra a comparação dos padrões variantes obtidos em amostras distintas do mesmo indivíduo.



Tabela 7. Padrões eletroforéticos obtidos após análise por PCR-SSCP em amostras de pele normal (PN), folículo piloso (FP) e sangue de indivíduos controle (SN). PR= região promotora; f2^{PR} = padrão fenotípico 2 da região promotora; e f2^{2A} = padrão fenotípico 2 do exon 2A; e f2^{W3}= padrão fenotípico 2 do exon 3 do gene *p21^{WAF1/CIP1}*; NR= não realizado.

Indivíduo	Amostra		Gene WAF1			
	PN/FP	Sangue	PR*	Exon 2A*	Exon 2B*	Exon 3*
1	PN-1					
2	PN-2					
3	PN-3					
4	PN-4		f2 ^{PR}			
5	PN-5					
6	PN-6					
7	PN-7					
8	PN-8			f2 ^{2A}		
9	PN-9					
10	PN-10					
11	PN-11					
12	PN-12					
13	PN-13			f2 ^{2A}		
14	PN-14			f2 ^{2A}		
15	PN-15A		f2 ^{PR}			
	PN-15B		f2 ^{PR}	NR	NR	NR
16	PN-16					
17	PN-17					
18	PN-18					
19	PN-19					
20	PN-20A			f2 ^{2A}		
	PN-20B		NR	f2 ^{2A}	NR	NR
21	PN-21					
22	PN-22					
23	PN-23	SN-23				
24	PN-24					
25	PN-25					
26	PN-26					
27	PN-27		f2 ^{PR}			
28	PN-28	SN-28	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}	f2 ^{2A} /f2 ^{2A}		
29	PN-29					
30	PN-30			f2 ^{2A}		f2 ^{W3}
31	PN-31					
32	PN-32					
33	PN-33					
34	PN-34	SN-34	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}			
35	PN-35					
36	PN-36					
37	PN-37	SN-37	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}	f2 ^{2A} /f2 ^{2A}		
38	PN-38					
39	PN-39					
40	PN-40					
41	FP-41					
42	FP-42					
43	FP-43		NR			
44	FP-44		NR			
45	FP-45	SN-45		f2 ^{2A} /f2 ^{2A}		NR
46	FP-46	SN-46				
47	FP-47		NR			
48	FP-48			NR		
49	FP-49		f2 ^{PR}	NR		
50	FP-50		NR			
51	FP-51	SN-51	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}			
52	FP-52	SN-52		f2 ^{2A} /f2 ^{2A}		NR
53	FP-53	SN-53		f2 ^{2A} /f2 ^{2A}		
54	FP-54	SN-54		f2 ^{2A} /f2 ^{2A}		
55	FP-55					
56	FP-56					
57	FP-57		NR			
Σ= 57	Σ= 59	Σ= 10				

*= São indicados apenas os casos com padrões fenotípicos f2. Os demais casos apresentam padrão fenotípico f1.



Tabela 8. Padrões eletroforéticos obtidos após análise por PCR-SSCP em amostras arquivadas de tumores de pele (TA), amostras frescas de tumores (TF) e em sangue de indivíduos portadores de tumor (ST). PR= região promotora; f2^{PR}= padrão fenotípico 2 da região promotora; f2^{2A}, f3^{2A} e f4^{2A}= padrões fenotípicos 2, 3 e 4 do exon 2A, f2^{W3}= padrão fenotípico 2 do exon 3 do gene *p21^{WAF1/CIP1}*. NR= não realizado.

Indivíduo	Amostra		WAF1				PTC		
	Tumor	Sangue	PR*	Exon 2A*	Exon 2B*	Exon 3*	Exon 3*	Exon 8*	Exon 16*
58	TE-58								
59	TE-59								
60	TE-60								
61	TE-61		f2 ^{PR}						
62	TE-62		f2 ^{PR}						
63	TE-63			f2 ^{2A}					
64	TE-64A		f2 ^{PR}						
	TE-64B		f2 ^{PR}						
65	TE-65						NR	NR	NR
66	TE-66		f2 ^{PR}	f2 ^{2A}					
67	TE-67								
68	TE-68								
69	TE-69								
70	TE-70								
71	TE-71								
72	TE-72								
73	TE-73								
74	TE-74-A		f2 ^{PR}			f2 ^{W3}			
	TE-74-B		f2 ^{PR}	NR	NR	f2 ^{W3}	NR	NR	NR
	TE-74-C		f2 ^{PR}	NR	NR	f2 ^{W3}	NR	NR	NR
75	TE-75								
76	TE-76								
77	TE-77								
78	TE-78								
79	TE-79								
80	TE-80		f2 ^{PR}						
81	TE-81								
82	TE-82								
83	TE-83						NR	NR	NR
84	TE-84						NR	NR	NR
85	TE-85A					f2 ^{W3}	NR	NR	NR
	TE-85B		NR	NR	NR	f2 ^{W3}	NR	NR	NR
86	TE-86		f2 ^{PR}				NR	NR	NR
87	TE-87						NR	NR	NR
88	TE-88A			f2 ^{2A}			NR	NR	NR
	TE-88B		NR	f2 ^{2A}	NR	NR	NR	NR	NR
89	TE-89						NR	NR	NR
90	TE-90A		f2 ^{PR}				NR	NR	NR
	TE-90B		f2 ^{PR}	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	TE-90C		f2 ^{PR}	NR	NR	NR	NR	NR	NR
91	TE-91						NR	NR	NR
92	TE-92						NR	NR	NR
93	TE-93		f2 ^{PR}				NR	NR	NR
94	TE-94	ST-94	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}	f2 ^{2A} /f4 ^{2A}			NR	NR	NR
95	TE-95		f2 ^{PR}				NR	NR	NR
96	TE-96A			f2 ^{2A}			NR	NR	NR
	TE-96B		NR	f2 ^{2A}	NR	NR	NR	NR	NR
	TE-96C		NR	f2 ^{2A}	NR	NR	NR	NR	NR
97	TE-97						NR	NR	NR
98	TE-98						NR	NR	NR
99	TF-99		f2 ^{PR}						
100	TF-100								

Tabela 8. Continuação

Indivíduo	Amostra		WAFI				PTC		
	Tumor	Sangue	PR*	Exon 2A*	Exon 2B*	Exon 3*	Exon 3*	Exon 8*	Exon 16*
101	TF-101								
102	TF-102	ST-102	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}	f2 ^{2A} /f2 ^{2A}					
103	TF-103								
104	TF-104								
105	TF-105								
106	TF-106								
107	TF-107	ST-108	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}						
108	TF-108								
109	TF-109	ST-109	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}						
110	TF-110								
111	TF-111	ST-111		f2 ^{2A} /f2 ^{2A}					
112	TF-112								
113	TF-113								
114	TF-114	ST-114	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}						
115	TF-115	ST-115	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}	f2 ^{2A} /f2 ^{2A}					
116	TF-116	ST-116	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}				NR	NR	NR
117	TF-117	ST-117		f3 ^{2A} /f3 ^{2A}			NR	NR	NR
118	TF-118						NR	NR	NR
119	TF-119	ST-119	f2 ^{PR} /f2 ^{PR}				NR	NR	NR
Σ= 61	Σ= 68	Σ= 10							

*= São indicados apenas os casos com padrão fenotípico f2, f3 e f4. Os demais casos apresentam o padrão fenotípico f1.

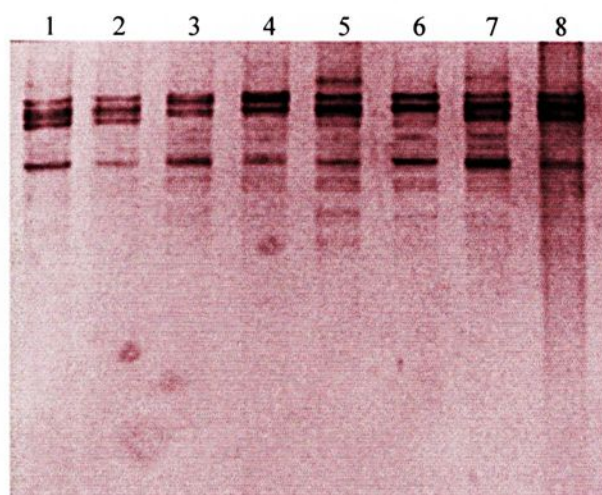


Figura 10. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, obtido em amostras distintas do mesmo indivíduo. Linhas 3, 4, 5 e 6 mostram padrão fenotípico $f1^{PR}$ e linhas 1, 2, 7 e 8 mostram padrão fenotípico $f2^{PR}$. Nas linhas 1 e 2 estão as amostras PN-37 e o sangue (SN-37) do indivíduo 37, nas linhas 3 e 4 estão as amostras TF-102 e o sangue (ST-102) do indivíduo 102, nas linhas 5 e 6 estão as amostras FP-46 e o sangue (SN-46) do indivíduo 46, nas linhas 7 e 8 estão as amostras TF-115 e o sangue (ST-115) do caso 115.

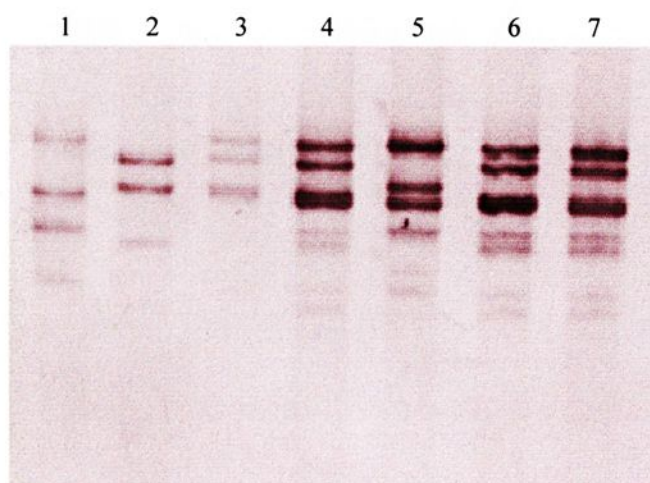


Figura 11. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata mostrando padrões fenotípicos $f1^{2A}$ para o exon 2A do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ na amostra PN-3 (linha 1), padrão fenotípico $f2^{2A}$ nas amostras SN-45, SN-53, ST-111 e ST-115 (linhas 3, 4, 6 e 7), padrão fenotípico $f3^{2A}$, na amostra ST-117 (linha 5) e padrão fenotípico $f4^{2A}$ na amostra ST-94 (linha 2).

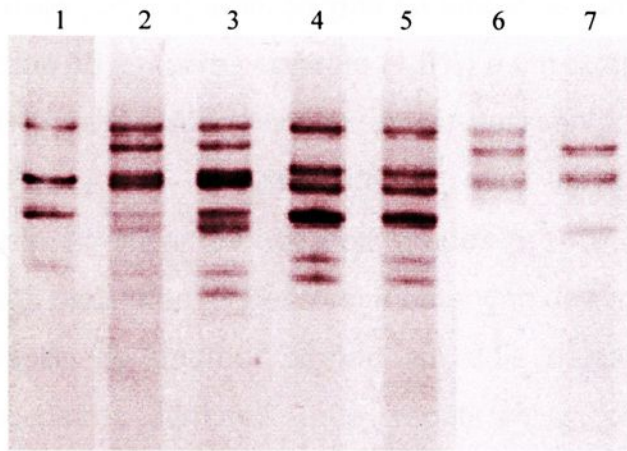


Figura 12. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, obtido em amostras distintas do mesmo indivíduo. Linha 1 mostra o padrão fenotípico $f1^{2A}$, linhas 2, 3 e 6 mostram padrão fenotípico $f2^{2A}$, linhas 4 e 5 mostram padrão $f3^{2A}$ e linha 7 mostra padrão $f4^{2A}$. Na linha 1 está a amostra PN-3, nas linhas 2 e 3 estão as amostras PN-28 e o sangue SN-28 do indivíduo 28, nas linhas 4 e 5 estão as amostras TF-117 e o sangue ST-117 do indivíduo 117 e nas linhas 6 e 7 estão as amostras TE-94 e o sangue ST-94 do indivíduo 94. As duas últimas amostras mostram padrões diferentes.

A avaliação, pela técnica de SSCP, nas 110 amostras amplificadas para o exon 2B do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ mostrou padrão idêntico de corrida no gel de poliacrilamida em todos os casos, sugerindo ausência de mutação ou polimorfismo. Esses dados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8 e representados na Figura 13.

No exon 3 do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, de 107 amostras amplificadas e avaliadas por SSCP, puderam ser identificados dois diferentes padrões eletroforéticos, o $f1^{W3}$, presente em 54 das 55 amostras controle (98,2%) e em 51 das 53 amostras tumorais (96,2%) e o $f2^{W3}$ em uma das 55 amostras controle (1,8%) e em duas das 53 amostras tumorais (3,8%). Esses dados encontram-se apresentados nas Tabelas 7 e 8 e na Figura 14. O teste de χ^2 não apresentou diferenças estatisticamente significantes nos dois grupos ($\chi^2 = 0,38$; $p = 0,54$). Em nenhum desses pacientes foi possível a obtenção de amostras de sangue para comparação do padrão, porém, em dois deles foram avaliadas amostras de outros tumores, que repetiram o padrão observado anteriormente.

A análise por PCR/SSCP dos exons 3, 8 e 16 do gene *PTCH* foi realizada em 42 amostras de carcinomas basocelulares, provenientes de 25 tumores emblocados em parafina e de 17 amostras frescas. Esses dados encontram-se resumidos na Tabela 8. Em todos os exons, apenas um padrão foi observado (Figuras 15, 16 e 17).

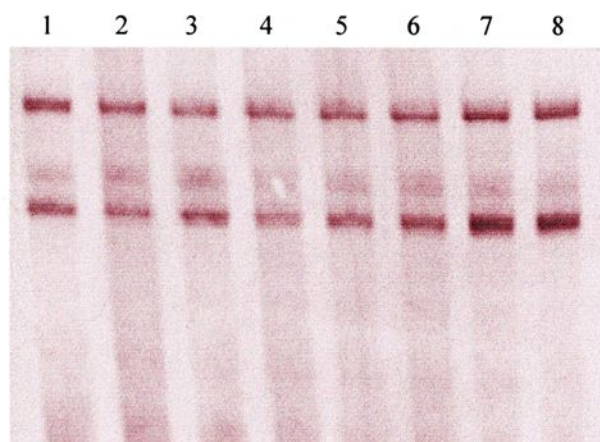


Figura 13. Gel de poliacrilamida 7,5%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, mostrando padrões migratórios normais (N), obtidos após avaliação por PCR/SSCP do exon 2B do gene *p21^{WAF1/CIP1}*, nas amostras TF-109, TF-110, TF-111, TF-119, TF-112, TF-113, TF-114 e TF-115 (linhas 1-8).

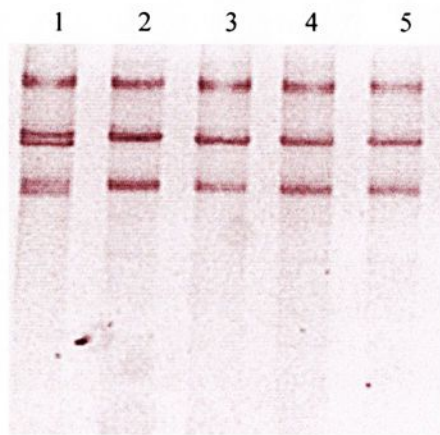


Figura 14. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, mostrando os padrões fenotípicos obtidos após análise por PCR/SSCP do exon 3 do gene *p21^{WAF1/CIP1}*. Linhas 2, 3, 4 e 5 mostram padrões fenotípicos f^{1W3} observados nas amostras PN-31, PN-33, PN-34 e PN-35. Linha 1 mostra padrão fenotípico f^{2W3} detectado na amostra PN-30.

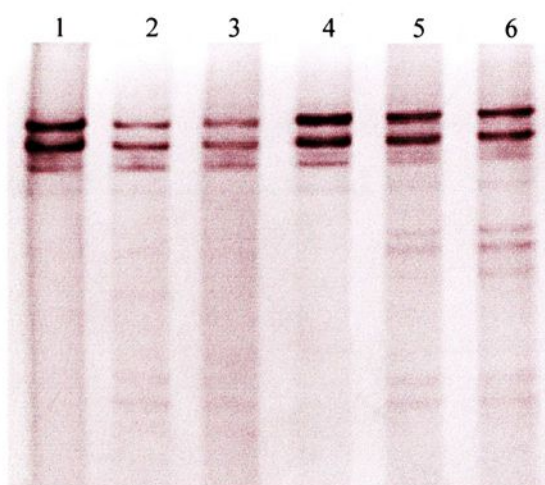


Figura 15. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, mostrando padrões migratórios normais (N), obtidos após avaliação por PCR/SSCP do exon 3 do gene *PTC*, nas amostras TF-99, TF-100, TF-101, TF-102, TF-103 e TF-104, linhas 1-6, respectivamente.

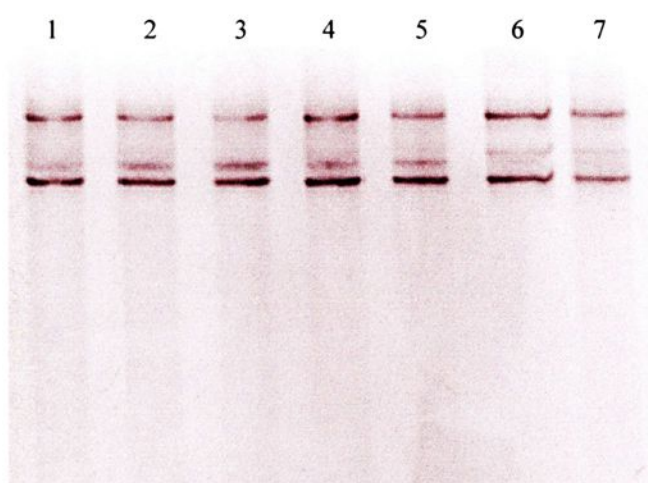


Figura 16. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, mostrando padrões migratórios normais (N), obtidos após avaliação por PCR/SSCP do exon 8 do gene *PTC*, nas amostras TF-114, TF-116, TF-117, TF-118, TF-119, TE-62 e TE-76, linhas 1-7, respectivamente.

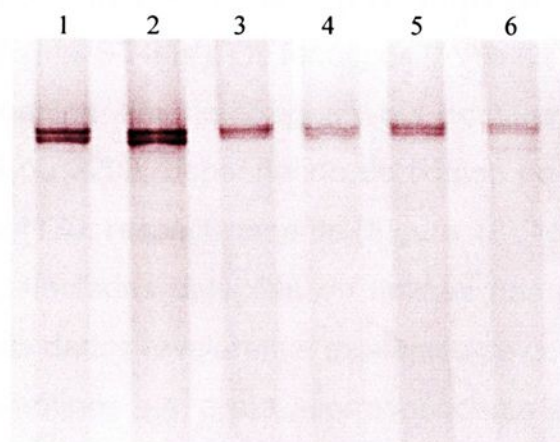


Figura 17. Gel de poliacrilamida 10%, com glicerol 5%, corado com nitrato de prata, mostrando padrões migratórios normais (N) obtidos após avaliação por PCR/SSCP do exon 16 do gene *PTC*, nas amostras TE-79, TE-81, TE-72, TE-71, TE-74 e TE-77.

5. Seqüenciamento Automático

Como os padrões eletroforéticos no gel de SSCP para os diversos segmentos do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ eram bem definidos, foram analisadas apenas algumas amostras de cada fenótipo, num total de 29 casos.

Para a região promotora foram seqüenciadas 13 amostras de oito indivíduos, sendo cinco com padrão $f1^{PR}$ (PN-3, PN-6, PN-8, PN-23/SN-23) e oito com padrão $f2^{PR}$ (PN-28/SN-28, PN-34/SN-34, TF-102/ST-102 e TF-114/ST-114). Os fenótipos $f1^{PR}$ e $f2^{PR}$ corresponderam à presença de guanina em homozigose ou de guanina e adenina no nucleotídeo 105 ou 2298, dependendo do código no GenBank ser HSU 50603 ou HSU 24170, respectivamente (Figura 18). No primeiro fenótipo, também foram detectadas deleções de timinas nas posições 12 e 187 (Figura 18). Esses dados revelaram a existência de dois diferentes alelos, a_1 e a_2 , e dos genótipos a_1a_1 e a_1a_2 , correspondente aos fenótipos $f1^{PR}$ e $f2^{PR}$, respectivamente. O genótipo a_2a_2 não foi observado. A freqüência dos alelos a_1 e a_2 foi de 92,3% e 7,7% nos controles e de 81,1% e 18,9% nos tumores, respectivamente, valores esses que diferiram estatisticamente nos dois grupos ($\chi^2 = 5,67$; $p = 0,05$).

A avaliação do exon 2A foi realizada em duas amostras com padrão $f1^{2A}$ (PN-3 e PN-6), em oito com padrão $f2^{2A}$ (PN-28/SN-28, TA-94, TF-102, TF-111/ST-111, TF-115/ST-115), em duas com padrão $f3^{2A}$ (TF-117/ST-117) e em uma com padrão $f4^{2A}$ (ST-94). Essa última foi proveniente do indivíduo 94, cuja análise revelou discordância entre o tumor e o sangue. Sempre que possível foram estudadas duas amostras distintas do mesmo indivíduo. O seqüenciamento revelou que os padrões $f1^{2A}$, $f2^{2A}$ e $f4^{2A}$ (GenBank HSU03106) corresponderam, na posição 168, à presença de citosina em homozigose, de adenina e citosina, ou de



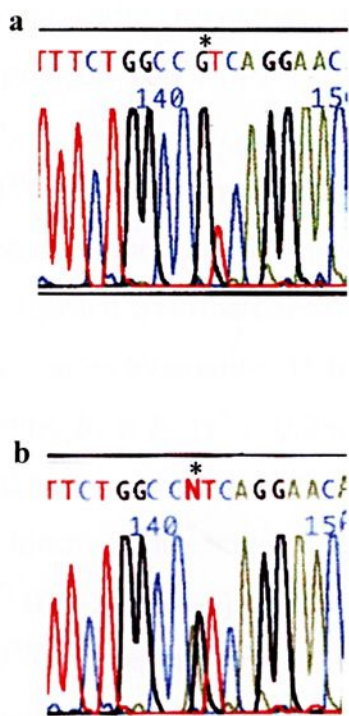


Figura 18. Cromatogramas dos casos TF-114 (a) e TF-102 (b) mostrando os fenótipos $f1^{PR}$ (a) e $f2^{PR}$ (b) da região promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, com presença de G ou G + A, no nucleotídeo 105, respectivamente. Os asteriscos indicam os nucleotídeos citados.

adenina em homozigose, respectivamente, o que resultou na presença de serina (AGC) ou de arginina (AGA) no códon 31 da proteína. O fenótipo $f3^{2A}$, por sua vez, correspondeu à presença de citosina e timina na posição 240 e não apenas citosina como os demais, o que, no entanto, não levou à mudança do aminoácido treonina (ACC ou ACT) no códon 55 da proteína (Figura 19). Esses dados revelaram a existência de quatro alelos diferentes (b_1 , b_2 na posição 168 e c_1 e c_2 na posição 240), e dos genótipos b_1b_1/c_1c_1 , b_1b_2/c_1c_1 , b_1b_1/c_1c_2 e b_2b_2/c_1c_1 , correspondentes aos fenótipos $f1^{2A}$, $f2^{2A}$, $f3^{2A}$ e $f4^{2A}$, respectivamente. O genótipo b_2b_2/c_1c_1 foi observado apenas no sangue do indivíduo 94. A frequência dos alelos b_1 , b_2 , c_1 e c_2 , foi de 90%, 10%, 100% e 0% nos controles e de 98,1%, 1,9%, 99,5% e 0,5% nos tumores, respectivamente. O teste de χ^2 não diferiu estatisticamente entre os alelos b_1 e b_2 ($\chi^2 = 0,25$; $p = 0,61$) e entre os alelos c_1 e c_2 ($\chi^2 = 1,04$; $p = 0,31$), nos dois grupos.

No exon 3, foram sequenciadas apenas três amostras, sendo duas com padrão $f1^{W3}$ (PN-3 e PN-6) e uma com padrão $f2^{W3}$ (PN-30). Os fenótipos $f1^{W3}$ e $f2^{W3}$ apresentaram as bases C (GenBank HSU03106) ou C + T, respectivamente, na posição 590, o que levou à mudança do aminoácido alanina (GCA) para valina (GUA) no códon 172 da proteína (Figura 20). Esses resultados indicam a existência de dois alelos diferentes, d_1 e d_2 , cujas frequências foram de 99,1% e 0,9% nos controles e de 98,1% e 1,9% nos tumores, respectivamente. O teste de χ^2 não apresentou diferenças estatisticamente significante nos dois grupos ($\chi^2 = 0,38$; $p = 0,54$). Os genótipos d_1d_1 e d_1d_2 corresponderam aos fenótipos $f1^{W3}$ e $f2^{W3}$ e o d_2d_2 não foi detectado.

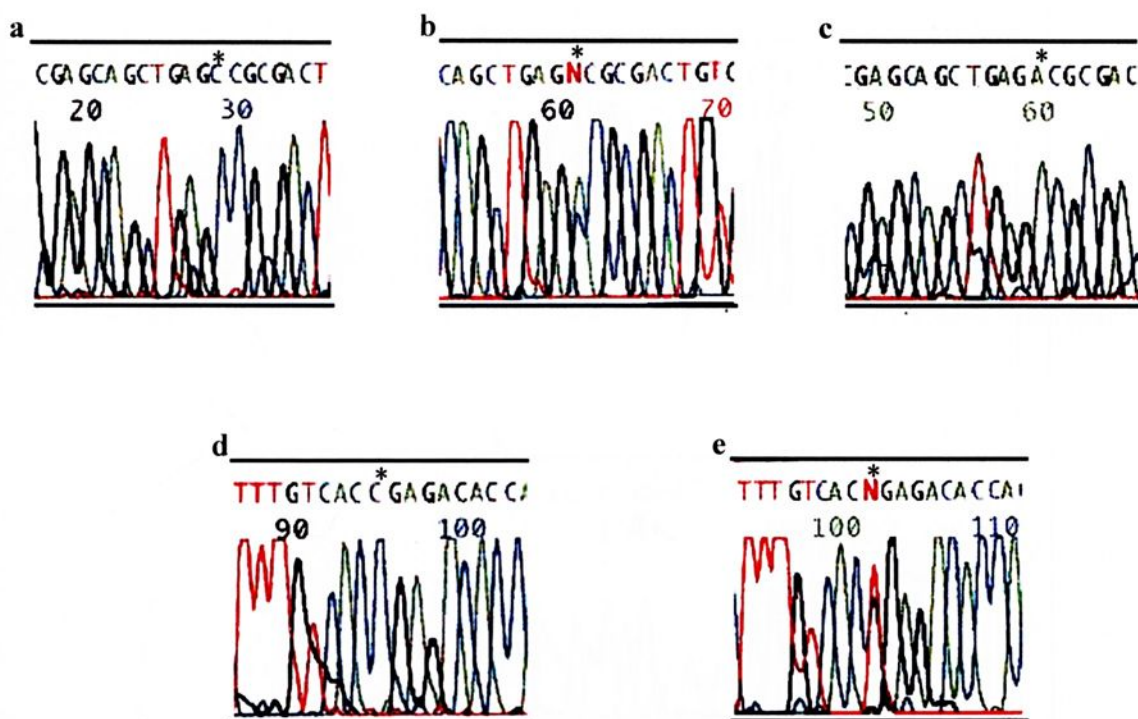


Figura 19. Cromatogramas dos casos PN-3 (a), TF-111 (b), ST-94 (c), PN-6 (d) e TF-117 (e) mostrando os fenótipos $f1^{2A}$ (a), $f2^{2A}$ (b), $f4^{2A}$ (c), $f1^{2A}$ (d) e $f3^{2A}$ (e) do exon 2A do gene *p21^{WAF1/CIP1}*. Em a, b, e c temos a presença de C, C+A ou A no nucleotídeo 168 (codon 31) e em d e e temos a presença de C ou C+T no nucleotídeo 240 (codon 55), respectivamente. Os asteriscos indicam os nucleotídeos citados.

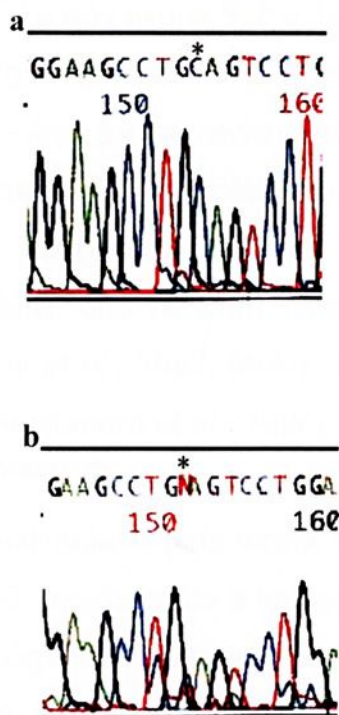


Figura 20. Cromatograma dos casos PN-6 (a) e PN-30 (b) mostrando os fenótipos $f1^{W3}$ (a) e $f2^{W3}$ (b) do exon 3 do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, com presença de C ou C+T no nucleotídeo 590 (códon 172), respectivamente. Os asteriscos indicam os nucleotídeos referidos.

V. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi proposto com o objetivo de investigar, em amostras de pele normal e tumoral, a ocorrência de mutações e/ou polimorfismos nas regiões codificadora (exon 2 e 3) e promotora do gene *p21^{WAF1/CIP1}* e nos exons 3, 8 e 16 do gene *PTCH*, pela técnica de PCR-SSCP. Algumas das amostras neoplásicas foram avaliadas anteriormente por outros pesquisadores do nosso laboratório e mostraram uma frequência baixa de mutações no gene *TP53* após as técnicas de PCR-SSCP e imuno-histoquímica. Tais dados diferem daqueles citados pela literatura, que referem valores próximos a 50% nesse grupo de tumores (Rady *et al.*, 1992; Molès *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1994; Matsumura *et al.*, 1996).

O gene *p21^{WAF1/CIP1}*, que participa no bloqueio celular inibindo as enzimas cdk's, é estimulado pela forma normal, mas não pela forma mutante da proteína p53, em resposta a lesões provocadas no DNA durante a exposição a carcinógenos, como a radiação solar (El Deiry *et al.*, 1993, Harper *et al.*, 1993). O seu produto é, portanto, um importante componente de ligação da p53 com o controle do ciclo celular e, teoricamente, quando ausente pode resultar na liberação de controles negativos do crescimento e contribuir para a transformação maligna. Assim, a avaliação de alterações em sua região promotora e codificadora parece justificável e foi realizada no presente trabalho.

Da mesma forma, a investigação de mutações no gene *PTCH* humano, que é homólogo ao gene *ptc* de *Drosophila*, foi proposta, levando em consideração que mutações nesse gene já foram implicadas no desenvolvimento de carcinomas basocelulares esporádicos, bem como naqueles presentes em indivíduos com a Síndrome de Gorlin (Hahn *et al.*, 1996c; Johnson *et al.*, 1996). Seu produto codifica um receptor de



membrana que reprime a transcrição de outros genes, incluindo o seu próprio, por meio de uma cascata complexa de sinais. Assim, paradoxalmente, a abundância dos transcritos de *PTCH* é um indicador do baixo nível da função da sua proteína e de outras seqüências alvo que pode levar a mudanças no programa de diferenciação celular durante o desenvolvimento e à excessiva proliferação de alguns tecidos (Goodrich *et al.*, 1997).

A análise do gene *p21^{WAF1/CIP1}* foi realizada em amostras de tumores de pele e em amostras controles de pele normal. Essas últimas foram procedentes de indivíduos saudáveis e obtidas de regiões do organismo expostas e não expostas ao sol, o que permitiu avaliar a freqüência de alterações causadas pela exposição crônica aos raios solares e seu papel na tumorigênese cutânea. As lesões estudadas incluíram apenas as neoplasias de pele não melanocíticas, mais especificamente os carcinomas basocelulares, os carcinomas espinocelulares e as ceratoses solares, cuja etiologia está diretamente relacionada à radiação ultra-violeta (D'Errico *et al.*, 1997). A avaliação do gene *PTCH*, por sua vez, foi realizada apenas em amostras de carcinomas basocelulares, tendo em vista os dados da literatura que referem o envolvimento desse gene apenas nesse grupo de lesões.

As amostras de pele normal foram obtidas de pacientes que se submeteram a cirurgias plásticas da face e da mama. Aquelas de regiões expostas foram provenientes de locais da face onde a incidência de raios solares é mais intensa, como as pálpebras inferiores, as regiões pré-auriculares e as auriculares, ao passo que as de regiões não expostas foram provenientes da parte inferior da mama que corresponde a local coberto pelo vestuário e que recebe pouca luz.

A utilização desse tipo de amostras, no entanto, introduziu diferentes variáveis, como predominância de indivíduos do sexo feminino,



média de idade muito inferior àquela dos indivíduos portadores de tumor e profissões distintas. Por exemplo, no grupo controle, apenas um indivíduo, dentre 40, era do sexo masculino. Isto é justificado pelo fato das amostras terem sido obtidas em cirurgias plásticas de face e mama. A explicação para essa discrepância é puramente comportamental, porque as cirurgias plásticas estéticas são quase exclusivamente realizadas em clientela feminina, embora esse comportamento esteja mudando gradativamente, conforme relatos informais dos cirurgiões. Essa diferença, no entanto, não ocorreu no grupo de amostras tumorais, visto que a ocorrência de câncer de pele parece ter pequena influência do sexo, mas muito mais da dose cumulativa de radiação UV recebida (INCA, Ministério da Saúde, 2000). Tal fato é particularmente confirmado em indivíduos de pele clara, cuja baixa concentração de melanina no tegumento não oferece proteção contra a ação do carcinógeno, favorecendo a ocorrência de mutações na molécula de DNA necessárias para o desencadeamento do processo maligno (Dulic et al, 1994; El Deiry et al, 1994; Hartwell e Kastan, 1994; Sherr, 1996, Reed et al, 1998).

A diferença entre a idade média dos indivíduos controles ($\bar{X}$ = 49,3 anos) e dos portadores de tumor ($\bar{X}$ = 66,4) é consequência do fato das mulheres saudáveis procurarem os serviços de cirurgias plásticas corretivas quando ainda relativamente jovens. Os indivíduos portadores de câncer de pele, ao contrário, procuram ajuda médica somente quando as lesões já se manifestaram, o que normalmente ocorre em idades superiores a 50 anos. Na tentativa de corrigir esse viés de amostragem, foram também analisadas amostras de folículos pilosos obtidos da sobrancelha de indivíduos saudáveis com idades superiores a 60 anos. A escolha do folículo piloso não foi casual, considerando que os mesmos são formados por células originadas da camada basal da epiderme (Jonason *et al.*, 1996). Além disso, a sua retirada é menos traumática e



dolorosa quando comparadas às biópsias de pele por "punch" e, portanto, mais aceitas.

Em relação a profissão, por se tratar de um grupo de maior poder econômico, a atividade exercida pela maioria dos indivíduos do grupo controle, era mais especializada e não exigia trabalho externo. A maioria dos indivíduos portadores de tumor, pertencia a classes sociais menos favorecidas e desempenhava, geralmente, atividades profissionais com longas horas de exposição diária ao sol. Além disso, esses indivíduos iniciaram tais atividades na infância ou na adolescência e muitos não frequentaram escolas, onde estariam protegidos da radiação. Também, em consequência do grau de escolaridade, tiveram pouco acesso a esclarecimentos em relação aos perigos da exposição ao sol, bem como aos métodos de prevenção do câncer de pele, como o simples uso de chapéu e camisas de manga longa. A evidência de que tais cuidados podem evitar os males causados pelos raios solares é que a maioria dos cânceres de pele, com etiologia relacionada à UV, ocorre na face, no pescoço e nos membros superiores, locais esses normalmente mais desprotegidos (English *et al.*, 1998).

Os dados obtidos pelo presente trabalho revelaram que, embora a escolha do grupo controle tenha introduzido as variáveis referidas acima, elas não parecem ter interferido na investigação de alterações do gene $p21^{WAF1/CIP1}$, uma vez que diferentes padrões eletroforéticos foram identificados em frequências similares tanto em amostras de pele normal como em amostras tumorais. A análise de diferentes tecidos do mesmo indivíduo, revelou que tais padrões corresponderam, na verdade, a variantes polimórficas e não a mutações, exceto um caso (TA-94 e ST-94).

A baixa frequência de mutações nesse gene pode, em parte, ser explicada pelo fato das amostras não terem sido submetidas à



microdissecção para separação das células tumorais. Se isso realmente ocorreu, pequenos clones de células mutantes teriam pequena probabilidade de serem detectados. Entretanto, a explicação mais convincente para a ausência de mutações nas amostras é que tais eventos são realmente raros. De fato, muitos trabalhos na literatura não observaram mutações do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ em neoplasias (Chedid *et al.*, 1994; Shiohara *et al.*, 1994; Koopmann *et al.*, 1995; Law e Deka, 1995; Li *et al.*, 1995; Mousses *et al.*, 1995; Tenan *et al.*, 1995; Akama *et al.*, 1996; Milner *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996; Sjalander *et al.*, 1996; Terry *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 1996; Facher *et al.*, 1997; Lukas *et al.*, 1997; McKenzie *et al.*, 1997; Panpadreou *et al.*, 1997; Clasen *et al.*, 1998; Hachiya *et al.*, 1999; Bahl *et al.*, 2000; Ralhan *et al.*, 2000; Yair *et al.*, 2000) embora existam alguns relatos em amostras de câncer de próstata, de cólon, carcinomas de mama, hepatocelulares e de células transicionais invasivas de bexiga (Gao *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Balbin *et al.*, 1996; Malkowicz *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Furutani *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998). Os polimorfismos, ao contrário, já foram identificados em diferentes tumores e em indivíduos normais (Chedid *et al.*, 1994; Shiohara *et al.*, 1994; Koopmann *et al.*, 1995; Law e Deka, 1995; Li *et al.*, 1995; Mousses *et al.*, 1995; Tenan *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Akama *et al.*, 1996; Balbin *et al.*, 1996; Milner *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996; Sjalander *et al.*, 1996; Terry *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 1996; Facher *et al.*, 1997; Lukas *et al.*, 1997; McKenzie *et al.*, 1997; Panpadreou *et al.*, 1997; Clasen *et al.*, 1998; Hachiya *et al.*, 1999; Bahl *et al.*, 2000; Ralhan *et al.*, 2000; Yair *et al.*, 2000).

A ausência de mutações no gene $p21^{WAF1/CIP1}$ nas amostras de câncer de pele e em outras neoplasias humanas sugere que tais mutações não desempenham um papel importante na origem e na progressão tumoral. Por se tratar de um inibidor universal de todas as



cdks, é possível que as alterações que levam à inativação da proteína sejam tão deletérias que resultem em morte celular. Por outro lado, aquelas em regiões não críticas do gene e, provavelmente, sem efeito importante, podem ser mantidas na população como polimorfismos, caso ocorram na linhagem germinativa.

O presente trabalho investigou praticamente toda a região codificadora e parte da região promotora do gene *p21^{WAF1/CIP1}* e identificou diferentes polimorfismos. Os polimorfismos observados na região promotora incluíram os fenótipos $f1^{PR}$ e $f2^{PR}$ que corresponderam aos genótipos a_1a_1 e a_1a_2 , com as bases G ou G e A, na posição 105 da sequência descrita no banco de dados GenBank HSU 50603, respectivamente. Embora o genótipo a_1a_2 estivesse presente tanto nas amostras controles (15,4%) quanto nas amostras tumorais (35,8%), o teste estatístico ($\chi^2 = 5,67$; $p = 0.05$) revelou que essa frequência foi significativamente maior no último grupo. Tendo em vista que esses polimorfismos envolvem nucleotídeos próximos ao sítio da região promotora de ligação à proteína p53, eles podem interferir na ativação realizada por essa proteína, bem como por outros fatores de transcrição, diminuindo assim a expressão da p21. É interessante que o genótipo a_2a_2 não foi observado, o que deve refletir sua baixa frequência na população ou algum efeito fenotípico deletério.

Em relação aos polimorfismos da região codificadora do gene *p21^{WAF1/CIP1}*, é importante referir que sua localização é observada em uma área altamente conservada do gene. Sua conservação na escala zoológica pode ser deduzida do fato da proteína p21 apresentar uma semelhança superior a 90% em relação ao gene de murinos (El Deiry *et al.*, 1993; Huppi *et al.* 1996) e de uma das variantes (referida no presente trabalho como alelo *b2* do exon 2A) corresponder à sequência de bases desse gene no camundongo.



Nas amostras estudadas, foram identificados três diferentes polimorfismos na região codificadora envolvendo dois nucleotídeos do exon 2A (168 e 240) e um do exon 3 (590) da sequência GenBank HSU 03106. Aqueles presentes no nucleotídeo 168 são mais frequentemente referidos pela literatura (Chedid *et al.*, 1994; Shiohara *et al.*, 1994; Koopmann *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995; Mousses *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Tenan *et al.*, 1995; Balbin *et al.*, 1996; Milner *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996; Terry *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 1996; Facher *et al.*, 1997; Lukas *et al.*, 1997; McKenzie *et al.*, 1997; Clasen *et al.*, 1998; Hachiya *et al.*, 1999; Bahl *et al.*, 2000; Yair *et al.*, 2000). O fenótipo f1^{2A} corresponde ao alelo *b*₁ com a base C em homozigose, já descrito por El Deiry *et al.* (1993), Harper *et al.* (1993) e Noda *et al.* (1994), e ao aminoácido serina (AGC) no codon 31 da proteína. O fenótipo f2^{2A}, por sua vez, corresponde à presença dos alelos *b*₁ e *b*₂ (bases C e A) enquanto o fenótipo f4^{2A} ao alelo *b*₂ em homozigose. No primeiro, dois produtos gênicos contendo os aminoácidos serina (AGC) e arginina (AGA) são observados; no segundo, apenas aquele com arginina está presente. Nesse polimorfismo, ocorre a substituição de um aminoácido sem carga (Ser) para um com carga positiva (Arg), sugerindo que as proteínas devem ser funcionalmente distintas. É importante salientar que existe um provável motivo *zinc finger* entre os aminoácidos 13 a 41 (El Deiry *et al.*, 1993, Huppi *et al.*, 1994) o que poderia ser importante para a atividade das p21 variantes. Entretanto, estudos de transfecção realizados em linhagens celulares de câncer de pulmão não evidenciaram diferenças significativas na atividade inibidora de crescimento entre os alelos de Ser31 e Arg31 (Chedid *et al.*, 1994).

O fenótipo f3^{2A} corresponde a um polimorfismo no nucleotídeo 240, ainda não descrito pela literatura e apresenta os alelos *c*₁ e *c*₂ (bases T e C), ambos determinando o mesmo aminoácido treonina

(ACC ou ACT), no codon 55 da proteína. Este fenótipo foi observado em apenas uma amostra de carcinoma espinocelular estudada, cuja etiologia está diretamente relacionada à exposição crônica à radiação UV solar. Sabe-se que a transição C para T ocorre frequentemente em sítios de dipirimidina, principalmente em consequência da radiação UV (Greenblatt *et al.*, 1994), o que reforça o papel deste carcinógeno na origem do tumor estudado.

No exon 3, o fenótipo f2^{3W} correspondeu a um alelo em homozigose, com substituição da base C por T no nucleotídeo 590 (GenBank HSU03106) e conseqüente mudança do aminoácido Alanina (GCA) para Valina (GUA), no codon 172 da proteína, mas sem alteração de cargas. Esse polimorfismo envolve novamente a transição C→T e, embora raro, já foi descrito por Shiohara *et al.* (1994) e por Shimizu *et al.* (1996).

A detecção de freqüências similares de variantes da p21^{WAF1/CIP1} em amostras controles e em amostras de tecidos tumorais indica que, ao contrário dos achados de alguns autores (Mousses *et al.*, 1995; Akama *et al.*, 1996; Sjalander *et al.*, 1996), sua presença parece não ser importante na tumorigênese cutânea. Entretanto, considerando seu papel como inibidor universal de todas as cdks, não é possível descartar a hipótese de que sua ocorrência simultânea com mutações em outros genes acelere o processo neoplásico.

Em relação ao gene *PTCH*, embora vários autores tenham detectado diferentes mutações, em carcinoma basocelular esporádico e familiar (Chindambaram *et al.*, 1996; Gailani *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 1996c; Johnson *et al.*, 1996; Unden *et al.*, 1996; Lench *et al.*, 1997; Wicking *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Aszterbaum *et al.*, 1998; Boochai *et al.*, 2000), como em diferentes tipos de neoplasias (Pietsch *et al.*, 1997; Raffel *et al.*, 1997; Vorechovsky *et al.*, 1997a; Vorechovsky *et*



al., 1997b; Xie *et al.*, 1997a; Maesawa *et al.*, 1998; McGarvey *et al.*, 1998), no presente trabalho não foi identificado qualquer alteração nos exons 3, 8 e 16.

Esse resultado pode estar relacionado com a sensibilidade da técnica de PCR-SSCP. A identificação de mutações também pode ter sido prejudicada pelo tamanho do fragmento amplificado. Alguns autores referem que os melhores resultados são obtidos em análises de fragmentos de aproximadamente 155pb (Hayashi, 1991). Considerando que os fragmentos relativos aos exons 3, 8 e 16 possuem 313, 256 e 268 pb, respectivamente, o tamanho do produto pode eventualmente ter influenciado a detecção de alterações. Uma evidência disso é o grande sucesso na identificação de polimorfismos que exibem substituição de uma única base como no exon 2A do gene *p21^{WAF1/CIP1}*, cujo fragmento possui 180pb. Nesse caso, a nitidez de bandas no gel de SSCP foi grande e permitiu a distinção de padrões muito semelhantes.

Um outro fator que poderia estar implicado nesses resultados, inclui a escolha dos exons a serem avaliados. Embora os critérios da seleção entre os 23 exons do gene *PTCH*, tenham sido baseados naqueles mais freqüentemente mutados em carcinoma basocelular, essa escolha pode não ter sido a ideal.



VI. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram investigadas alterações do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ em 40 amostras de pele normal, 17 folículos pilosos e 32 tumores arquivados em parafina e 21 amostras frescas de tumores. Também foram investigadas mutações do gene *PTCH* em 43 amostras de carcinoma basocelular. Foram identificados polimorfismos envolvendo os nucleotídeos 168, 240 e 590 da região codificadora e o nucleotídeo 105 da região promotora, além de uma mutação no nucleotídeo 168 da região codificadora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$. No gene *PTCH*, não foi detectada qualquer alteração. As principais conclusões do trabalho foram:

1. Diferentes variantes polimórficas do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ foram identificadas em frequências geralmente similares tanto em amostras de pele normal como em amostras tumorais, exceto aquela da região promotora do gene. Esse resultado indica que, ao contrário dos achados de alguns autores, sua presença parece não ser importante na tumorigênese cutânea. Entretanto, considerando seu papel como inibidor universal de todas as cdks, não é possível descartar a hipótese de que sua ocorrência simultaneamente com mutações em outros genes acelere o processo neoplásico.
2. Apenas uma mutação em $p21^{WAF1/CIP1}$ foi observada em um caso de tumor arquivado. A quase ausência de mutações nesse gene pode ser explicada pelo fato das amostras não terem sido submetidas à microdissecção para separação das células tumorais. Também pode ser explicada porque tais eventos são, na realidade, raros, provavelmente em função de seus efeitos deletérios.

3. Os fenótipos $f1^{PR}$ e $f2^{PR}$ da região promotora do gene $p21^{WAF1/CIP1}$ estiveram presentes tanto nas amostras controles quanto nas amostras tumorais, porém a frequência do fenótipo $f2^{PR}$ foi significativamente maior no último grupo. Uma vez que esses polimorfismos envolvem nucleotídeos próximos ao sítio de ligação à proteína p53 no promotor, eles podem interferir na ativação realizada por essa proteína, bem como por outros fatores de transcrição, diminuindo assim a expressão da p21.
4. Foram identificados três diferentes polimorfismos na região codificadora (nucleotídeos 168, 240 e 590). Naqueles presentes no nucleotídeo 168, ocorre a substituição de um aminoácido sem carga (AGC) por um com carga positiva (AGA), sugerindo que as proteínas podem ser funcionalmente distintas. O polimorfismo presente no nucleotídeo 240 ainda não foi descrito pela literatura e aquele na posição 590 corresponde a uma substituição da base C por T, indicando o papel da radiação solar na origem dessa variante nas famílias estudadas.
5. Em relação ao gene *PTCH*, embora vários autores tenham detectado diferentes mutações, tanto em carcinoma basocelular esporádico ou familiar como em diferentes tipos de neoplasias, no presente trabalho não foi identificada qualquer alteração nos exons 3, 8 e 16. Esse resultado pode estar relacionado com a sensibilidade da técnica de PCR-SSCP. A identificação de mutações também pode ter sido prejudicada pelo tamanho do fragmento amplificado ou pela escolha dos exons que foram avaliados.



VII. RESUMO

Os cânceres de pele não-melanocíticos, incluindo carcinomas basocelulares (CBC) e carcinomas espinocelulares (CEC), compreendem as neoplasias mais comuns na população branca. Acredita-se que a exposição crônica à radiação solar seja o seu principal fator etiológico. Mutações em genes que participam do processo de reparo de DNA, como o *TP53* e genes por ele ativados (*p21^{WAF1/CIP1}*), podem predispor certos indivíduos ao câncer de pele. Além disso, mutações em genes que participam de outros eventos celulares, incluindo o *PTCH*, são encontradas em pacientes com a síndrome de Gorlin e em um terço dos CBCs esporádicos. Os objetivos do presente trabalho foram investigar, por meio da técnica de PCR-SSCP, a ocorrência de mutações em diferentes regiões dos genes a) *p21^{WAF1/CIP1}* (40 amostras de pele normal, 17 folículos pilosos, 32 tumores arquivados em parafina e 21 amostras frescas de tumores) e b) *PTCH* (17 amostras frescas e 26 arquivadas de CBC). Foram encontrados um polimorfismo na região promotora e três polimorfismos e uma mutação na região codificadora do gene *p21^{WAF1/CIP1}*. Não foram identificadas alterações no *PTCH*. Os polimorfismos da região codificadora do gene *p21^{WAF1/CIP1}* são freqüentes, porém não parecem estar relacionados com a tumorigênese cutânea, ao passo que aqueles da região promotora podem interferir em sua ativação pela proteína p53, bem como por outros fatores de transcrição.

Palavras chaves: câncer de pele; gene *p21^{WAF1/CIP1}*; gene *PTCH*; carcinoma basocelular; carcinoma espinocelular

VI. RESUMO



VIII. ABSTRACT

Nonmelanoma skin cancer (NMSC) including basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC) are the most common neoplasia among the white population. Exposure to sunlight UV-radiation is believed to be the principal cause of the NMSC by inducing DNA damages. The *TP53* tumor suppressor gene product is expressed in response to DNA damage activating transcription of downstream genes that cause G1 arrest. One of these genes is the $p21^{WAF1/CIP1}$. Alterations in the expression or function of the $p21^{WAF1/CIP1}$ gene would be expected to cause aberrant control of cell proliferations and may predispose certain individual to cancer. Defective genes also may predispose to BCC, as suggested by point mutations in the *PTCH* gene detected in the Gorlin syndrome as well as in one third of sporadic BCC. The objectives of the present study were investigate mutations a) in the coding and promotor regions of the $p21^{WAF1/CIP1}$ gene (40 normal skin, 17 hair follicle, 32 paraffin-embedded skin tumors and 21 fresh tumor) and b) in exons 3, 8 and 16 of the *PTCH* gene (17 fresh tumor and 26 paraffin-embedded sporadic BCC), using PCR-SSCP technique. The findings included one polymorphism in the promotor region and three polymorphisms and one mutation in the coding region of the $p21^{WAF1/CIP1}$ gene. Any alteration in the *PTCH* gene was identified. Our results indicated that polymorphisms in the coding region of $p21^{WAF1/CIP1}$ are frequent and not related to skin tumorigenesis. Otherwise, polymorphisms in the promotor region may interfere in activation performed by p53, as well as by other transcription factors.

Key words: skin cancer; $p21^{WAF1/CIP1}$ gene; *PTCH* gene; basal cell carcinoma; squamous cell carcinoma

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSSEKHRA, A.; BIGGERSTAFF, M.; SHIVJI, M.K.K.; VILPO, J.A.; MONCOLIN, V.; PODUST, V.N.; PROTIC, M.; HÜBSCHER, U.; EGL, Y.J.M.; WOOD, R.D. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. **Cell**, v. **80**, p. 859-68, 1995.
- AKAMA, Y.; AKAGI, M.; YASUI, W.; YOKOZAKI, H.; TAHARA, H.; HARUMA, K.; KAJIYAMA, G.; TAHARA, E. No point mutations but a codon 31 polymorphism and decrease expression of the p21 gene in human gastric. **Mol. Cell. Diferen.**, v. **4**, p. 187-98, 1996.
- ALCEDO, J.; AYZENZON, M.; VON OHLEN, T.; NOLL, M.; HOOPER, J.E. The *Drosophila smoothened* gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. **Cell**, v. **86**, p. 221-2, 1996.
- ALCEDO, J.; NOLL, M. Hedgehog and its patched-smoothened receptor complex: A novel signalling mechanism at the cell surface. **Biol.Chem.**, v. **378**, p. 583-90, 1997.
- ALCORTA, A.D.; XIONG, Y.; PHELPS, D.; HANNON, G.; BEACH, D.; BARRE, J.C. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK^{4A}) in replicative senescence of normal human fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **93**, p. 13742-47, 1996.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J.; Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. **215**, p. 403-10, 1990.
- AMUNDSON, A.S.; MYERS, T.G.; FORNACE JUNIOR, A.J. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. **Oncogene**, v. **17**, p.3287-99, 1998.
- APELQVIST, A.; AHLGREN, U.; EDLUND, H. Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. **Curr. Biol.**, v. **7**, p. 801-4, 1997.
-



- ARROWSMITH, C.H.; MORIN, P. New insights into p53 function from structural studies. **Oncogene**, v. **12**, p. 1379-85, 1996.
- ARTUSO, M.; ESTEVE, A.; BRÉSIL, H.; VUILLAUME, M.; HALL, J. The role of the telangiectasia gene in the p53, WAF1/CIP1 (p21)- and GADD45-mediated response to DNA damage produced by ionising radiation. **Oncogene**, v. **11**, p. 1427-35, 1995.
- ASZTERBAUM, M.; ROTHMAN, A.; JOHNSON, R.L.; FISHER, M.; XIE, J.; BONIFAS, J.M.; ZHANG, X.; SCOOT, M.P.; EPSTEIN JUNIOR, E.H. Identification of mutations in the human *PATCHED* gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome. **J. Invest. Dermatol.**, v. **110**, p. 885-8, 1998.
- BAHL, R.; ARORA, S.; NATH, N.; MATHUR, M.; SHUKLA, N.K.; RALHAN, R. Novel polymorphism in p21 (waf1/cip1) cyclin dependent kinase inhibitor gene: association with human esophagal cancer. **Oncogene**, v. **19**, p. 323-8. 2000.
- BALBIN, M.; HANNON, G.J.; PENDÁS, A.M.; FERNANDO, A.A.; VIZOSO, F.; FUEYO, A.; LÓPEZ-OTÍN, C. Functional analysis of a p21^{WAF1/CIP1,SDI1} mutant (Arg⁹⁴ Trp) identified in a human breast carcinoma. **J. Biol. Chem.**, v. **271**, p. 17782-86, 1996.
- BANERJEE, S.K.; MAKDISI, W.F.; WESTON, A.P.; MITCHELL, S.M.; CAMPBELL, D.R. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. **BioTechniques**, v. **18**, p.769-73, 1995.
- BARKER, D.; DIXON, K.; MEDRANO, E.E.; SMALARA, D, IM, S.; MITCHELL, D.; BACOCK, G.; ABDEL-MALEK, Z.A. Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. **Cancer Res.**, v. **55**, p. 4041-46, 1995.
- BARLEY, R.D.C.; ENNS, L.; PATERSON, M.C.; MIRZAYANS, R. Aberrant p21^{WAF1} dependent growth arrest as the possible mechanism of abnormal resistance to ultraviolet light cytotoxicity in Li-Fraumeni

- syndrome fibroblast strains heterozygous for TP53 mutations. **Oncogene**, v. 17, p. 533-43, 1998.
- BASSET-SEGUIN, N.; MOLES, J-P.; MILS, V.; DEREURE, O.; GUILHOU, J-J. TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 103, p. 102-6, 1994.
- BASLER, K.; STRUHL, G. Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by *hedgehog* protein. **Nature**, v. 368, p. 208-14, 1994.
- BEACHY, P.A.; COOPER M.K.; YOUNG, K.E.; VON KESSLER, D.P.; PARK, W-J.; TANAKA, S.; HALL, T.M.; LEAHY, D.J.; PORTER, J.A. Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. **Cold Spring Harb. Symp. Quantit. Biol.**, LXII, p. 191-204, 1997.
- BELLONI, E.; MUENK, M.; ROSSLER, E.; TRAVERSO, G.; SIEGEL-BARTELT, J.; FRUMKIN, A.; MITCHELL, H.F.; DONIS-KELLER, H.; HELMS, C.; HING, A.V.; HENG, H.H.; KOOP, B.; MARTINDALE, D.; ROMMENS, J.M.; TSUI, L.C.; SCHERER, S.W. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 353-6, 1996.
- BHAT, K.M. The patched signaling pathway mediates repression of groosberry allowing neuroblast specification by wingless during *Drosophila* neurogenesis. **Development**, v. 122, p. 2921-32, 1996.
- BHATIA, K.; FAN, S.; SPANGLER, G.; WEINTRAUB, M.; O'CONNOR, P.M.; JUDD, J.G.; MAGRATH, I. A mutant p21 cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from a Burkitt's lymphoma. **Cancer Res.**, v. 55, p. 1431-5, 1995.
- BITGOOD, M.J.; McMAHON, A.P. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. **Dev. Biol.**, v. 172, p.126-38, 1995.



- BITGOOD, M.J.; SHEN, L.; McMAHON, A.P. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. **Cur. Biol.**, v. 6, p. 298-04, 1996.
- BORYCKI, A-G.; MENDHAM, L.; EMERSON JUNIOR, C.P. Control of somite patterning by Sonic hedgehog and its downstream signal response genes. **Development**, v. 125, p. 777-90, 1998.
- BRASH, D.E.; RUDOLPH, J.A.; SIMON, J.A.; LIN, A.; MCKENNA, G.J.; BADEN, H.P.; HALPERIN, A.J.; POTEN, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 10124-28, 1991.
- CAMPBELL, C.; QUINN, A.G.; ANGUS, B.; FARR, P.M.; RESS, J.L. Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. **Cancer Res.**, v. 53, p. 2697-99, 1993.
- CAO, L.; FAHA, B.; DEMBSKI, M.; TSAI, L.; HARLOW, E.; DYSON, N. Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. **Nature**, v. 355, p 176-79, 1992.
- CAPDEVILA, J.; ESTRADA, M.P.; SANCHEZ-HERRERO, E.; GUERRERO, I. The *Drosophila* segment polarity gene patched interacts with decapentaplegic in wing development. **EMBO**, v. 13, p. 71-82, 1994.
- CARPENTER, D.; STONE, D.M.; BRUSH, J.; RYANS, A.; ARMANINI, M.; FRANTZ, G.; ROSENTHAL, A.; SAUVAGE, F.J. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p.13630-34, 1998.
- CAYROL, C.; DUCOMMUN, B. Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. **Oncogene**, v. 17, p. 2437-44, 1998.
- CAYROL, C.; KNIBIEHLER, M.; DUCOMMUN, B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient. **Oncogene**, v. 16, 311-20, 1998.
-

- CERON, C.R.; SANTOS, J.R.; BICUDO, H.E.M.C. The use of gelatin to dry celoophane wound slab gels in na embroidering hoop. **Ver. Brasil. Genet.**, v. 15
- CHEDID, M.; MICIELI, P.; LENGEL, C.; HUPPI, K.; GIVOL, D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. **Oncogene**, v. 9, p. 3021-24, 1994.
- CHELLAPAN, S.P.; HIEBERT, S.; MUDRYJ, M.; HOROWITZ, J.M.; NEVINS, J.R. The E2F transcription factor is a celular target for the RB protein. **Cell**, v. 65, p. 1053-61, 1991.
- CHEN, J.; JACKSON, P.K.; KIRSCHNER, M.W.; DUTTA, A. Separate domains of p21 involved in the inibition of Cdk kinase and PCNA. **Nature**, v. 374, p 386-88, 1995a.
- CHEN, I-T.; SMITH, M.L.; O'CONNORP, M.; FORNACEA JUNIOR, A.J. Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21^{Waf1/Cip1} with PCNA. **Oncogene**, v. 11, p. 1931-37, 1995b.
- CHEN, I-T.; AKAMATSU, M.; SMITH, M.L.; LUNG, F-DT.; DUBA, D.; ROLLER, P.P.; FORNACE JUNIOR, A.J.; O'CONNOR, P.M. Characterization of p21^{Cip1/Waf1} peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction. **Oncogene**, v. 12, p. 595-07, 1996.
- CHEN, H.; LIN, R.J.; SCHILTZ, R.L.; CHAKRAVARTI, D.; NASH, A.; NAGY, L.; PRIVALSKY, M.L.; NAKATANI, Y.; EVANS, R.M. Nuclear recpetor coativator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with the P/CAF and CBP/P300. **Cell**, v. 90, p 569-80, 1997.
- CHEN, Y.; STRUHL, G. Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. **Cell**, v. 87, p. 553-63, 1996.
- CHEN, Y.; STRUHL, G. In vivo evidence that Patched and Smoothened constitute distinct binding and transducing componentes of a
-

- Hedgehog receptor complex. **Development.**; v. **125**, p. 4943-48, 1998.
- CHIDAMBARAM, A.; GOLDSTEIN, A.M.; GAILANI, M.R.; GERRARD, B.; BALE, S.J.; DIGIOVANNA, J.J.; BALE, A.E.; DEAN, M. Mutations in the human homologue of the *Drosophila patched* gene in caucasian and African-American nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. **Cancer Res.**, v. **56**, p. 4599-01, 1996.
- CHUANG, P-T.; MCMAHON, A.P. Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. **Nature**, v. **397**, p. 617-21, 1999.
- CLASEN, S.; SHULZ, W.A.; GERHARZ, C.D.; GRIMM, M.O.; CHRISTOPH, F.; SCHMITZ-DRÄGER, B.J. Frequent and heterogenous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. **Brit. J. Cancer**, v. **74**, p. 515-21, 1998.
- COLEMAN, T.; DUNPHY, W.G. Cdc2 regulatory factors. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. **6**, p. 877-82, 1994.
- CURRIE, P.D. Hedgehog's escape from Pandora's box. **J. Mol. Med.**, v. **76**, p. 421-33, 1998.
- DAHMANE, N.; LEE, J.; ROBINS, P.; HELLER, P.; ALTABA, A.R. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. **Nature**, v. **389**, p. 876-81, 1997.
- DATTO, M.B.; YU, Y.; WANG, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. **J. Biol. Chem.**, v. **270**, p. 28623-28, 1995.
- DEAN, M. Cancer as a complex developmental disorder-Nineteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. **Cancer Res.**, v. **58**, p. 5633-36, 1998.
- De BOND, H.L.; ROSENBLATT, J.; JANCARIK, J.; JONES, H.D.; MORGAN, D.O.; KIM, S.H. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. **Nature**, v. **363**, p. 595-602, 1993.
-

- D'ERRICO, M.; CALCAGNILE, A.S.; CORONA, R.; FUCCI, M.; ANNESSI, G.; BALIVA, G.; TOSTI, M.E.; PASQUINI, P.; DOGLIOTTI, E. p53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. **Cancer Res.**, v. **57**, p. 747-52, 1997.
- DESAI, D.; WESSLING, H.C.; FISHER, R.P.; MORGAN, D.O. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. **Mol. Cel. Biol.**, v. **15**, p. 345-50, 1995.
- DOMINGUEZ, M.; HAFEN, E. Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the *Drosophila* eye. **Genes Dev.**, v. **11**, p. 3254-64, 1997.
- DRAGOVICH, T.; RUDIN, C.M.; THOMPSON, C.B. Signal Transduction pathways that regulate cell survival and cell death. **Oncogene**, v. **17**, p. 3207-13, 1998.
- DUCOMMUN, B.; BRAMBILLA, P.; FELIX, M.A.; FRANZA JUNIOR, B.R.; KARSENTI, E.; DRAETTA, G. CDC2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. **EMBO J.**, v. **10**, p. 311-9, 1991.
- DULIC, V.; KAUFMANN, W.K.; WILSON, S.J.; TLSTY, T.D.; LEES, E.; HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J.; REED, S.I. **Cell**, v. **76**, p. 1013-23, 1994.
- DUMAZ, N.; STARY, A.; SOUSSI, T.; DAYA-GROSJEAN, L.; SARASIN, A. Can we predict solar ultraviolet radiation as the causal event in human tumors by analysing the mutation spectra of the p53 gene? **Mutat. Res.**, v. **307**, p. 375-386, 1994.
- ECHELARD, Y.; EPSTEIN, D.J.; ST-JACQUES, B.; SHEN, L.; MOHLER, J.; MCMAHON, J.Á.; MCMAHON, A.P. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. **Cell**, v. **75**, p. 1417-30, 1993.
- EI-DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V.E.; LEVY, D.B.; PARSONS, R.; TRENT, J.M.; LIN, D.; MERCER, W.E.; KINZIER, K.W.;
-



- VOGEISTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. **75**, p. 817-25, 1993.
- EI-DEIRY, W.S.; HARPER, J.W.; O'CONNOR, P.M.; VELCULESCU, V.E.; CANMAN, C.E.; JACKMAN, J.; PIETENPOL, J.Á.; BURRELL, M.; HILL, D.E.; WANG, Y.; WIMAN, K.G.; MERCER, W.E.; KASTAN, M.B.; KOHN, K.W.; ELLEDGE, S.J.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res.**, v. **54**, p. 1169-74, 1994.
- EI-DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; WALDMAN, T.; OLIVER, J.D.; VELCULESCU, V.E.; BURRELL, M.; HILL, D.E.; HEALY, E.; RESS, J.L.; HAMILTON, S.R.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Topological control of p21^{WAF1/CIP1} expression in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res.**, v. **55**, p. 2910-19, 1995.
- ENGLISH, D.R.; ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A.; WINTER, M.G.; HEENAN, P.J.; RANDELL, P.L. Case-control study of sun exposure and squamous cell carcinoma of the skin. **Int. J. Cancer**, v. **77**, p. 347-53, 1998.
- ERICSON, J.; MUHR, J.; PLACZEK, M.; LINTS, T.; JESSELL, T.M.; EDLUND, T. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. **Cell**, v. **81**, p. 747-56, 1995.
- ERICSON, J.; BRISCOE, J.; RASHBASS, P.; VAN HEYNINGEN, V.; JESSELL, T.M. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. **Cold Spring Harb. Symp. Quantit. Biol.**, v. **LXII**, p. 451-66, 1997.
- EVANS, T.; BOOCHAI, W.; SHANLEY, S.; SMYTH, I.; GILLIES, S.; GEORGAS, K.; WAINWRIGHT, B.; CHENEVIX-TRENCH, G.; WICKING, C. The spectrum of patched mutations in a collection of Australian basal cell carcinomas. **Hum. Mutat.**, v. **16**, p. 43-8, 2000.
- FACHER, E.A.; BECICH, M.J.; DEKA, A.; LAW, J.C. Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the
-

- p21^{Waf1/Cip1} cyclin-dependent kinase inhibitor gene. **Cancer**, v. 15, p. 2424-29, 1997.
- FAN, C-M.; PORTER, J.A.; CHIANG, C.; CHANG, D.T.; BEACHY, P.A.; TESSIER-LAVIGNE, M. Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. **Cell**, v. 81, p. 457-65, 1995.
- FORBES, A.J.; NAKANO, Y.; TAYLOR, A.M.; INGHAM, P.W. Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. **Development**, p. 115-24, Suppl., 1993.
- FORBES, A.J.; LIN, H.; INGHAM, P.W.; SPRALDLING, A.C. Hedgehog is required for the proliferation and specification of ovarian somatic cells prior to egg chamber formation in *Drosophila*. **Development**, v. 122, p. 1125-35, 1996.
- FUCHS, S.Y.; ADLER, V.; BUSCHANN, T.; WU, X.; RONAI, Z. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. **Oncogene**, v. 17, p.2543-47, 1998.
- FURUTANI, M.; ARII, S.; TANAKA, H.; MISE, M.; NIWANO, M.; HARADA, T.; HIGASHI, T.; IMAMURA, M.; FIJITA, J. Decreased expression and rare somatic mutation of the CIP1/WAF1 gene in human hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 111, p. 191-97, 1997.
- GAILANI, M.R.; BALE, S.J.; LEFFELL, D.J.; DIGIOVANNA, J.J.; PECK, G.L.; POLIAK, S.; DRUM, M.A.; PASTAKIA, B.; MCBRIDE, O.W.; KASE, R.; GREENE, M.; MULVIHILL, J.J.; BALE, A.E. Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. **Cell**, v. 69, p. 111-17, 1992.
- GAILANI, M.R.; STAHL-BÄCKDAHL, M.; LEFFELL, D.J.; GLYNN, M.; ZAPHIROPOULOS, P.G.; PRESSMAN, C.; UNDÉN, AB.; DEAN, M.; BRASH, D.E.; BALE, A.E.; TOFTGARD, R. The role of the human homologue of *Drosophila patched* in sporadic basal cell carcinomas. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 78-81, 1996.

- GAILANI, M.R.; BALE, A.E. Developmental genes and cancer: Role of Patched in basal cell carcinoma of the skin. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. **89**, p. 1103-9, 1997.
- GALLO, O.; HIARELLI, I.; BIANCHINI, S.; CALZOLARI, A.; SIMONETTI, L.; PORFIRIO, B. Loss of p53 gene mutation after Irradiation is associated with increased aggressiveness in recurring head and neck cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. **2**, p. 1577-82, 1996.
- GAO, X.; CHEN, Y.Q.; WU, N.; GRIGNON, D.J.; SAKR, W.; PORTER, A.T.; HONN, K.V. Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. **Oncogene**, v. **11**, p. 1395-98, 1995.
- GARTEL, A.L.; TYNER, A.L. Transcriptional regulation of the p21^(WAF/CIP1) gene. **Exp.Cell. Res.**, v. **246**, p. 280-89, 1999.
- GENG, Y.; EATON, E.N.; PICON, M.; ROBERTS, J.M.; LUNDBERG, A.S.; GIFFORD, A.; SARDET, C.; WEINBERG, R.A. Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. **Oncogene**, v. **12**, p. 1173-80, 1996.
- GIRLING, R.; PARTRIDGE, J.F.; BANDARA, L.R.; BURDEN, N.; TOTTY, N.F.; HSUAN, J.J.; LA THANGUE, N.B. A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. **Nature**, v. **362**, p. 83-87, 1993.
- GLOTZER, M.; MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. **Nature**, v. **349**, p. 132-38, 1991.
- GOODRICH, L.V.; JONHSON, R.L.; MILENKOVIC, L.; MCMAHON, J.Á.; SCOOT, M.P. Conservation of the hedgehog/patched signaling from flies to mice: induction of a mouse patched gene by hedgehog. **Genes Dev.**, v. **10**, p. 301-12, 1996.
- GOODRICH, L.V.; MILENKOVIC, L.; HIGGINS, K.M.; SCOTT, M.P. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. **Science**, v. **277**, p. 1109-12, 1997.
- GOODRICH, L.V.; SCOTT, M.P. Hedgehog and patched in neural development and disease. **Neuron**, v. **21**, p.1243-1257, 1998.
-



- GORLIN, R.J. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Dermatol. Clin.**, v. **13**, p. 113-25, 1995.
- GOUBIN, F.; DUCOMMUN, B. Identification of binding domains on the p21^{Cip1} cyclin-dependent kinase. **Oncogene**, v. **10**, p. 2281-87, 1995.
- 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.
- GROMPE, M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. **Nat. Genet.**, v. **5**, p. 111-7, 1993.
- GROSSMAN, D.; LEFFELT, D.J. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer. **Arch. Dermatol.**, v. **133**, p. 1263-70, 1997.
- GU, Y.; TURCK, C.W.; MORGAN, D.O. Inhibition of cdk2 activity in vivo by an associated 20k regulatory subunit. **Nature**, v. **366**, p. 707-10, 1993.
- GUJULUVA, C.N.; BAEK, J.H.; SKIN, K.H.; CHERRICK, H.M.; PARK, N.H. Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. **Oncogene**, v. **9**, p. 1819-27, 1994.
- GULBIS, J.M.; KELMN, Z.; HURWITZ, J.J.; O'DONNELL, M.; KURIYAN, J. Structure of the C-terminal region of p21^{WAF1/CIP1} complexed with human PCNA. **Cell**, v. **87**, p. 297-306, 1996.
- GURLEY, K.E.; VO, K.; KEMP, C.J. DNA double-strand breaks, p53, and apoptosis during lymphomagenesis in *scid/scid* mice. **Cancer Res.**, v. **58**, p. 3111-15, 1998.
- HACHIYA, T.; KURIAKI, Y.; UEOKA, Y.; NISHIDA, J.; KATO, K.; WAKE, N. WAF1 genotype and endometrial cancer susceptibility. **Gynecol. Oncol.**, v. **72**, p. 187-92, 1999.
- HAHN, H.; WICKING, C.; ZAPHIROPOULOS, P.G.; GAILANI, M.R.; SHANLEY, S.; CHINDAMBARAM, A.; VORECHOVSKY, I.; HOLMBERG, E.; UNDEN, A.B.; GILLIES, S.; NEGUS, K.; SMYTH, I.; PRESSMAN, C.; LEFFELL, D.J.; GERRARD, B.; GOLDSTEIN, A.M.;

- DEAN, M.; TOFTGARD, A.R.; CHENEVIX-TRENCH, G.; WAINWRIGHT, B.; BALE, A.E. Mutations of human homolog of *Drosophila patched* in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**, v. **85**, p. 841-51, 1996a.
- HAHN, H.; CHRISTINANSEN, J.; WICKING, C.; ZAPHIROPOULOS, P.G.; CHIDAMBARAM, A.; GERRARD, B.; VORECHOVSKY, I.; BALE, A.E.; TOFTGARD, R.; WAINWRIGHTS, B. A mammalian *patched* homolog is expressed in target tissues of *sonic hedgehog* and maps to a region associated with developmental abnormalities. **J. Biol. Chem.**, v. **271**, p. 12125-28, 1996b.
- HAHN, A.S.; SCHUTTE, M.; SHAMSUL, A.T.M.; HOQUE, S.; MOSKALUK, C.A.; COSTA, L.T.; ROZENBLUN, E.; WEINSTEIN, C.L.; FISCHER, A.; YEO, C.J.; HRUBAN, R.H.; KERN, S.E. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18p21.1. **Science**, v. **271**, p. 350-3, 1996c.
- HANNON, G.J.; BEACH, D. P15^{Ink4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. **Nature**, v. **371**, p. 257-61, 1994.
- HARPER, J.W.; ADAMI, G.R.; WEI, N.; KEYOMARSI, K.; ELLEDGE, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, v. **75**, p. 805-16, 1993.
- HARRIS, C.C.; HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **N. Engl. J. Med.**, v. **329**, p. 1318-27, 1993.
- HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. **266**, p. 1821-28, 1994.
- HARTWELL, L.H.; WEINERT, T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. **246**, p. 629-34, 1989.
- HE, T.C.; SPARKS, A.B.; RAGO, C.; HERMINKING, H.; ZAWEL, L.; COSTA, L.T.; MORIN, P.J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Identification of *c-Myc* as a target of the APC Pathway. **Science**, v. **281**, p. 1509-12, 1998.



- HEPKER, J.; WANG, Q-T.; MOTZNY, CK.; HOLMGREN, R.; ORENIC, T.V. *Drosophila cubitus interruptus* forms a negative feedback loop with *patched* and regulates expression of hedgehog targets genes. **Development**, v. 124, p. 549-58, 1997.
- HEICHMAN, K.A.; ROBERTS, J.M. Rules to replicate by. **Cell**, v. 79, p. 557-62, 1994.
- HITOMI, H.; SHU, J.; AGARWAL, M.; AGARWAL, A.; STACEY, D.W. p21^{WAF1} inhibits the activity of cyclin dependent Kinase 2 by preventing its activating phosphorylation. **Oncogene**, v. 17, p. 959-69, 1998.
- HOLMGREN, L.; JACKSON, G.; ARBISER, J. p53 induces angiogenesis-restricted dormancy in a mouse fibrosarcoma. **Oncogene**, v. 17, p. 819-24, 1998.
- HOOPER, J.E.; SCOTT, M.P. The *Drosophila patched* gene encodes a putative mebrane protein required for segmental patterning. **Cell**, v. 59, p. 751-65, 1989.
- HUI, C.C.; SLUSARSKI, D.; PLATT, K.A.; HOLMGREN, R.; JOYNER, A.L. Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. **Dev. Biol.**, v. 162, p. 402-13, 1994.
- HYNES, M.; PORTER, J.Á.; CHIANG, C.; CHANG, D.; TESSIER-LAVIGNE, M.; BEACHY, P.A.; ROSENTHAL, A. Induction of midbraian dopaminergic neurons by Sonic Hedgehog. **Neuron**, v. 15, p. 35-44, 1995.
- Inca, Ministério da Saúde, 2000. <http://www.inca.org.br>.
- INGHAM, P.W.; TAYLOR, A.M.; NAKANO, Y. Role of the *Drosophila patched* gene in positional signalling. **Nature**, v. 353, p. 184-7, 1991.
- INGHAM, P.W.; HIDALGO, A. Regulation of wingless transcription in the *Drosophila* embryo. **Develompment**, v. 117, p. 283-91, 1993.
- INGHAN, P.W. Hedgehog points the way. **Curr. Biol.**, v. 4, p. 347-50, 1994.



- INGHAM, P.W. Transducing hedgehog: the story so far. **EMBO J.**, v. 17, p. 3505-11, 1998.
- JACKS, T.; FAZELI, A.; SCHMITT, E.M.; BRONSON, R.T.; GOODELL, M.A.; WEINBERG, R.A. Effects of an Rb mutation in the mouse. **Nature**, v. 359, p. 295-300, 1992.
- JENSEN, A.M.; WALLACE, V.A. Expression of *Sonic hedgehog* and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. **Development**, v. 124, p. 363-71, 1997.
- JIANG, H.; LIN, J.; SU, Z.; COLLART, F.R.; HUBERMAN, E.; FISHER, P.B. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. **Oncogene**, v. 9, p. 3397-06, 1994.
- JIANG, J.; STRUHL, G. Protein kinase A and hedgehog signaling in *Drosophila* limb development. **Cell**, v. 80, p. 563-72, 1995.
- JOHNSON, D.G. Regulation of *E2F-1* gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity. **Oncogene**, v. 11, p. 1685-92, 1995.
- JOHNSON, R.L.; TABIN, C. The long and short of *hedgehog* signaling. **Cell**, v. 81, p. 313-16, 1995.
- JOHNSON, R.L.; ROTHMAN, A.L.; XIE, J.; GOODRICH, L.V.; BARE, J.W.; BONIFAS, J.M.; QUINN, A.G.; MYERS, R.M.; COX, D.R.; EPSTEIN JUNIOR, E.H.; SCOTT, M.P. Human Homolog of *patched*, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. **Science**, v. 272, p. 1668-71, 1996.
- KAFFMAN, A.; HERSKOWITZ, I.; TJAN, R.; O'SHEA, E.K. Phosphorilation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK Complex, PHO80-PHO85. **Science**, v. 263, p. 1153-56, 1994.
- KASTAN, M.B.; ZHAN, Q.; EI-DEIR, Y.W.S.; CARRIER, F.; JACKS, T.; WALSH, W.V.; PLUNKETT, B.S.; VOGELSTEIN, B.; FORNACE JUNIOR, A.J. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. **Cell**, v. 71, p. 587-97, 1994.

- KEARSEY, J.M.; COATES, P.J.; PRESCOTT, A.R.; WARBRICK, E.; HALL, P.A. Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21^{Cip1}. **Oncogene**, v. 11, p. 1675-1683, 1995.
- KEYS, D.N.; LEWIS, D.L.; SELEGUE, J.E.; PEARSON, B.J.; GOODRICH, L.V.; JOHNSON, R.L.; GATES, J.; SCOTT, M.P.; CARROLL, S.B. Recruitment of a *hedgehog* regulatory circuit in butterfly eyespot evolution. **Science**, v. 283, p. 532-34, 1999.
- KIMONIS, V.E.; GOLDSTEIN, A.M.; PASTAKIA, B.; YANG, M.L.; KASE, R.; DIGIOVANNA, J.J.; BALE, A.E.; BALE, S.J. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Am. J. Med. Genet.**; v. 69, p. 299-308, 1997.
- KINTNER, C. Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. **Cell**, v. 69, p. 225-36, 1992.
- KINZLER, K.W.; BIGNER, S.H.; BIGNER, D.D.; TRENT, J.M.; LAW, M.L.; O'BRIEN, S.J.; WONG, A.J. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. **Science**, v. 236, p. 70-3, 1987.
- KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. The *GLI* gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. **Mol. Cell Biol.**, v. 10, p. 634-42, 1990.
- KLEIN-SZANTO, A.J.P. Pathology of human and experimental skin tumors. In: CONTI, C.J. *et al.* **Skin Tumors: Experimental and Clinical Aspects**. New York, Raven Press, p. 19-53, 1989.
- KOBAYASHI, H.; STEWART, E.; POON, R.; ADAMCZEWSKI, J.P.; GANNON, J.; HUNT, T. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. **Mol. Cel. Biol.**, v. 3, p. 1279-94, 1992.
- KOOPMAN, J.; MAINTZ, D.; SHILD, S.; SHARAMM, J.; LOUIS, D.N.; WIESTLER, O.D.; DEIMLING, A. Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumours. **Br. J. Cancer**, v. 72, p. 1230-33, 1995.

- KORINEK, V.; BARKER, N.; MOERER, P.; Van DONSELAAR, E.; HULS, G.; PETERS, P.J.; CLEVERS, H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. **Nat. Genet.**, v. **19**, p. 379-83, 1998.
- KREIDBERG, J.Á.; SARIOLA, H.; LORING, J.M.; MAEDA, M.; PELLETIER, J.; HOUSMAN, D.; JAENISCH, R. WT-1 is required for early kidney development. **Cell.**, v. **74**, p. 679-91, 1993.
- 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. 482-88, 1995a.
- KRICKER, A.; ARMSTRONG, B.K.; ENGLISH, D.R.; HEENAN, P.J. Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? A case-control study in western Australia. **Int. J. Cancer**, v. **60**, p. 489-94, 1995b.
- KUBO, Y.; URANO, Y.; YOSHIMOTO, K.; IWAHANA, H.; FUKUHARA, K.; ARASE, S.; ITAKURA, M. p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. **J. Inv. Dermatol.**, v. **102**, p. 440-4, 1994.
- LAFOREST, L.; BROWN, C.W.; POLEO, G.; GÉRAUDIE, J.; TADA, M.; EKKER, M.; AKIMENKO, M-A. Involvement of the *Sonic hedgehog*, *patched1* and *bmp2* genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays. **Development**, v. **125**, p. 4175-84, 1998.
- LAUFER, E.; NELSON, C.E.; JOHNSON, R.L.; MORGAN, B.A.; TABIN, C. *Sonic Hedgehog* and *Fgf-4* act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. **Cell**, v. **79**, p. 993-1003, 1994.
- LAW, J.C.; DEKA, A. Identification of a PstI polymorphism in the ^{p21Cip1/Waf1} cyclin-dependent kinase gene. **Hum. Genet.**, v. **95**, p. 459-60, 1995.
- LEE, C.W.; SORENSEN, T.S.; SHIKAMA, N.; La THANGUE, N.B. Functional interplay between p 53 and E2F through co-activator p300. **Oncogene**, v. **16**, p.2695-2710, 1998.

- LEE, E.Y-P.P.; CHANG, C-Y.; HU, N.; WANG, Y-C.; LAI, C-C.; HERRUP, K.; LEE, W-H.; BRADLEY, A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. **Nature**, v. **359**, p.288-94, 1992.
- LEE, J.J.; EKKER, S.C.; Von KESSLER, D.P.; PORTE, J.Á.; SUN, B.I.; BEACHY, P.A. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. **Science**, v. **266**, p. 1528-37, 1994.
- LEE, M-H.; REYNISDÓTTIR, I.; MASSAGUÉ, J. Cloning of p57^{KIP2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. **Genes Dev.**, v. **9**, p. 639-49, 1995.
- LEES, E.M.; HARLOW, E. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 Kinase. **Mol. Cell. Biol.**, v. **13**, p. 1194-1201, 1993.
- LENCH, N.J; TELFORD, E.A; HIGH, AS.; MARKHAM, AF.; WICKING, C.; WAINWRIGHT, B.J. Characterisation of human patched germ line mutations in naevoid basal cell carcinoma syndrome. **Hum. Genet.**, v. **100**, p. 497-502, 1997.
- LEVINE, A.J.; PERRY, M.E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v. **69**, p. 409-16, 1994.
- LEW, J.; HUANG, Q-Q.; QI, Z.; WINKFEIN, R.J.; AEBERSOLD, R.; HUNT, T.; WANG, J.H. A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. **Nature**, v. **371**, p. 423-6, 1994.
- LEWIN, B. **GENES VI**. Oxford: Oxford University Press, p. 1260, 1998:
- LI, R.; SUTPHIN, P.D.; SCHWARTZ, D.; MATAS, D.; ALMOG, N.; WOLKOWICZ, N.; GOLDFINGER, N.; PEI, H.; PROKOCIMER, M.; ROTTER, V. Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. **Oncogene** , v. **16**, p. 3269-77, 1998.



- LI, Y.J.; PUIG, P.L.; SALMON, R.J.; THOMAS, G.; HAMELIN, R. Polymorphisms and probable lack of mutation in the *WAF1-CIP1* gene in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 10, p. 599-601, 1995.
- LIU, M.; PELLING, J.C. UV-B/A irradiation of mouse keratinocytes results in p53-mediated *WAF1/CIP1* expression. **Oncogene**, v. 10, p. 1955-60, 1998.
- LITINGTUNG, Y.; LEI, L.; WESTPHAL, H.; CHIANG, C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. **Nat. Genet.**, v. 20, p. 58-61, 1998.
- LOUGHRAN, O.; MALLIRI, A.; OWENS, D.; GALLIMORE, P.H.; STANLEY, M.A.; OZANNE, B.; FRAME, M.C.; PARKINSON, E.K. Association of *CDKN2A/p16^{INK4A}* with human head and neck keratinocyte replicative senescence: relationship of dysfunction to immortality and neoplasia. **Oncogene**, v. 13, p. 561-68, 1996.
- LU, Y.; YAMAGISHI, N.; YAGI, T.; TAKEBE, H. Mutated *p21^{WAF1/CIP1/SDI1}* lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. **Oncogene**, v. 16, p. 705-12, 1998.
- LUKAS, J.; GROSHEN, S.; SAFFARI, B.; NIU, N.; RELES, A.; WEN, W.H.; FELIX, J.; JONES, L.A.; HALL, F.L.; PRESS, M.F. *WAF1/CIP1* gene polymorphism and expression in carcinomas of the breast, ovary and endometrium. **Am. J. Pathol.**, v. 150, p. 167-75, 1997.
- LUO, Y.; HURWITZ, J.; MASSAGUE, J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in *p21^{CIP1}*. **Nature**, v. 375, p. 159-161, 1995.
- LUTSENKO, E.; BHAGWAT, A.S. Principal causes of hot spot for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells A model, its experimental support and implications. **Mutat. Res.**, v. 437, p. 11-20, 1999.
- MAESAWA, C.; TAMURA, G.; IWAYA, T.; OGASAWARA, S.; ISHIDA, K.; SATO, N.; NISHIZUKA, S.; SUZUKI, Y.; IKEDA, K.; AOKI, K.; SAITO, K.; SATODATE, R. Mutations in the human homologue of the

- Drosophila patched* gene in esophageal squamous cell carcinoma. **Genes Chrom. Cancer**, v. 21, p. 276-9, 1998.
- MALKOWICZ, S.B.; TOMASZEWSKI, J.E.; LINNENBACH, A.J.; CANGIANO, T.A.; MARUTA, Y.; MCGARVEY, T.W. Novel p21^{WAF1/CIP1} mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas. **Oncogene**, v. 13, p. 1831-37, 1996.
- MARIGO, V.; TABIN, C.J. Regulation of *Patched* by Sonic hedgehog in the developing neural tube. **Proc. Natl. Acad. Sci.**; v. 93, p. 9346-51, 1996.
- MARTÍ, E.; BUMCROT, D.A.; TAKADA, R.; McMAHON, A.P. Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. **Nature**, v. 375, p. 322-4, 1995.
- MARTINEZ, J.D.; CRAVEN, M.T.; PENNINGTON, M.E. Selective binding of different p53 response elements by p53 containing complexes. **Oncogene**, v. 16, p. 453-458, 1998.
- 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. 778-80, 1996.
- MATSUOKA, S.; EDWARDS, M.C.; BAI, C.; PARKER, S.; ZHANG, P.; BALDINI, A.; HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J. P57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1} Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. **Genes Dev.**, v. 9, p. 650-62, 1995.
- MCGARVEY, T.W.; MARUTA, Y.; TOMASZEWSKI, J.E.; LINNENBACH, A.J.; MALKOWICZ, S.B. *PTCH* gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. **Oncogene**; v. 17, p. 1167-72, 1998.
- McKENZIE, K.E.; SIVA, A.; MAIER, S.; RUNNEBAUM, I.B.; SESHADRI, R.; SUKUMAR, S. Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutation. **Clin. Cancer Res.**, v. 3, p. 1669-73, 1997.



- MILLER, S.J.; SUN, T-T.; LAVKER, R.M. Hair follicles, stem cells, and skin cancer. **J. Invest. Dermatol.**, v. **100**, p. 288s-94s, 1993.
- MILNER, B.J.; HOSKING, L.; SUN, S.; HAITES, N.E.; FOULKES, W.D. Polymorphisms in P21^{CIP1/WAF1} are not correlated with TP53 status in sporadic ovarium tumours. **Eur. J. Cancer**, v. **32**, p. 2360-63, 1996.
- MISSERO, C.; CALAUTTI, E.; ECKNER, R.; CHIN, J.; TSAI, L.H.; LINVINGSTON, D.M.; DOTTO, G.P. Involvement of the cell-cycle inhibitor *Cip1/WAF1* and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **92**, p. 5451-55, 1995.
- MOLES, J.P.; MOYRET, C.; GUILLOT, B.; JEANTEUR, P.; GUILHOU, J.J.; THEILLET, C.; BASSET-SÈGUIN, N. p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. **Oncogene**, v. **8**, p. 583-88, 1993.
- MORGAN, D.O. Principles of CDK regulation. **Nature**, v. **374**, p. 131-4, 1995.
- MOTOYAMA, J.; TAKABATAKE, T.; TAKESHIMA, K.M.; HUI, C. *Ptch2*, a second mouse *Patched* gene is co-expressed with *Sonic hedgehog*. **Nat. Genet.**, v. **18**, p. 104-6, 1998a.
- MOTOYAMA, J.; LIU, J.; MO, R.; DING, Q.; POST, M.; HUI, C-C. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and aesophagus. **Nat. Genet.**, v. **20**, p. 54-7, 1998b.
- MOTOYAMA, J.; HENG, H.; CRACKOWER, MA.; TAKABATAKE, T.; TAKESHIMA, K.; TSIU, L-C.; HUI, C-C. Overlapping and non-overlapping *Ptch2* expression with *Shh* during mouse embryogenesis. **Mech. Dev.**; v. **78**, p. 81-4, 1998c.
- MOUSSES, S.; ÖZÇELİK, H.; LEE, P.D.; MALKIN, D.; BULL, S.B.; ANDRULIS, IL. Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are ssociated with human cancer, **Hum. Mol. Genet.**, v. **4**, p. 1089-92, 1995.
- MOUSTAKAS, A.; KARDASSIS, D. Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions



- between Sp1 and Smad family members. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **95**, p. 6733-38, 1998.
- MURPHY, G.F.; KWAN, TH.; MIHN JUNIOR, M.C. Pele. In: ROBBINS, S.L. *et al.*, (Ed.). **Patologia Estrutural e Funcional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1027-1250, 1986.
- NAKANO, Y.; GUERRERO, I.; HIDALGO, A.; TAYLOR, A.; WHITTLE, J.R.S.; INGHAM, PW. A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene *patched*. **Nature**, v. **341**, p. 508-13, 1989.
- NEVINS, J.R. E2F: A link between the Rb Tumor suppressor protein and viral oncoproteins. **Science**, v. **258**, p. 424-29, 1992
- NODA, A.; NING, Y.; VENABLE, S.F.; SMITH, O.M.P.; SMITH, J.R. Cloning of Senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using a expression screen. **Cell Res.**, v. **211**, p. 90-8, 1994.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting number and polarity in *Drosophila*. **Nature**, v. **287**, p. 795-801, 1980.
- NUSSE, R. WNT targets-repression and activation. **TIG**, v. **15**, p. 1-3, 1999.
- NUSSE, R, VARMUS, H.E. Wnt genes. **Cell**, v. **69**, p. 1073-87, 1992.
- OHTSUBO, M.; GAMOU, S.; SHIMIZU, N. Antisense oligonucleotide of WAF1 gene prevents EGF-induced cell-cycle arrest in A431 cells. **Oncogene**, v. **16**, p. 797-802, 1998.
- ORENIC, T.V.; SLUSARSKI, D.C.; KROLL, K.L.; HOLMGREN, R.A. Cloning and characterization of the segment polarity gene *cubitus interruptus* dominant of *Drosophila*. **Genes Dev.**, v. **4**, p. 1053-67, 1990.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **86**, p. 2766-70, 1989.

- ORO, A.E.; HIGGINS, K.M.; HU, Z.; BONIFAS, J.M.; EPSTEIN JUNIOR, E.H.; SCOTT M.P. Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. **Science**, v. **276**, p. 817-20, 1997.
- ORSULIC, S.; PEIFER, M. Cell-cell signalling: Wingless lands at last. **Curr. Biol.**, v. **6**, p. 1363-7, 1996.
- OZAWA, M.; RINGWALD, M.; KEMLER, R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **87**, p. 4246-50, 1990.
- PAPANDREOU, C.N.; BOGENRIEDER, T.; LOGANZO, F.; ALBINO, A.P.; NANUS, D.M. Expression and sequence analysis of the p21 (WAF1/CIP1) gene in renal cancers. **Urology**, v. **49**, p. 481-86, 1997.
- PARDEE, A.B. G1 events and regulation of cell proliferation. **Science**, v. **246**, p. 603-08, 1989.
- PARISI, M.J.; LIN, H. The role of the *hedgehog/patched* signaling pathway in epithelial stem cell proliferation: from fly to human. **Cell Res.**, v. **8**, p. 15-21, 1998.
- PEIFER, M. Regulating cell proliferation: As easy as APC. **Science**, v. **272**, p. 974-5, 1996.
- PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M.; GONTIJO, N.F.; MEDEIROS, A.M.; RIBEIRO, J.C.C. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. **12**, p. 146-152, 1991.
- PEPICELLI, C.V.; LEWIS, P.M.; McMAHON, A.P. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. **Curr. Biol.**, v. **8**, p. 1083-6, 1998.
- PERRIMON, N. The genetic basis of patterned baldness in *Drosophila*. **Cell**, v. **76**, p. 781-4, 1994.
- PETROCELLI, T.; POON, R.; DUCKER, D.J.; SLINGERLAND, J.M.; ROSEN, C.F. UVB radiation induces p21^{Cip1/WAF1} and mediates G1 and S phase checkpoints. **Oncogene**, v. **12**, p. 1387-96, 1996.



- PHILLIPS, R.G.; ROBERTS, I.J.; INGHAM, P.W.; WHITTLE, J.R. The *Drosophila* segment polarity gene *patched* is involved in a position-signalling mechanism in imaginal discs. **Development**, v. **110**, p. 105-14, 1990.
- PIETSCH, T.; WAHA, A.; KOCH, A.; KRAUS, J.; ALBRECHT, S.; TONN, J.; SÖRENSEN, N.; BERTHOLD, F.; HENK, B.; SCHMANDT, N.; WOLF, H.K.; Von DEIMLING, A.; WAINWRIGHT, B.; CHENEVIX-TRENCH, G.; WIESTLER, O.D.; WICKING, C. Meduloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila patched*. **Cancer Res.**, v. **57**, p. 2085-8, 1997.
- PITKÄNEN, K.; HAAPAJÄRVI, T.; LAIHO, M. U.V.C-Induction of p53 activation and accumulations is dependent on cell cycle and pathways involving protein synthesis and phosphorylation. **Oncogene**, v. **16**, p. 459-69, 1998.
- POLYAK, K.; LEE, M-H.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; KOFF, A.; ROBERTS, J.M.; TEMPST, P.; MASSAGUÉ, J. Cloning of p27^{kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. **Cell**, v. **78**, p. 59-66, 1994.
- POON, R.Y.C.; HUNTER, T. Expression of a novel form of p21^{Cip1/Waf1} in UV-irradiate and transformed cells. **Oncogene**, v. **16**, p. 1333-43, 1998.
- PORTER, J.A.; YOUNG, K.E.; BEACHY, P.A. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. **Science**, v. **274**, p. 255-9, 1996.
- PRÉAT, T.; THÉRON, P.; LIMBOURG-BOUCHON, B.; PHAM, A.; TRICOIRE, H.; BUSSON, D.; LAMOUR-ISNARD, C. Segmental polarity in *Drosophila melanogaster*. Genetic dissection of *fused* in a *Suppressor of fused* background reveals interaction with *costal-2*. **Genetics**, v. **135**, p. 1047-62, 1993.

- RAFFEL, C.; JENKINS, R.B.; FREDERICK, L.; HEBRINK, D.; ALDERETE, B.; FULTS, D.W.; JAMES, C.D. Sporadic meduloblastomas contain *PTCH* mutations. **Cancer Res.**, v. **57**, p. 842-5, 1997.
- RADY, P.; SCINICARIELLO, F.; WAGNER, R.F.; TYRING, SK. p53 mutations in basal cell carcinomas. **Cancer Res.**, v. **52**, p. 3804-06, 1992.
- RALHAN, R.; AGARWAL, S.; MATHUR, M.; WASYLYK, B.; SRIVASTAVA, A. Association between Polyophism In *p21Waf1/Cip1* cyclin-dependent kinase inhibitor gene and human oral cancer. **Clin. Cancer Res**, v. **6**, p. 2440-47, 2000.
- REED, M.F.; LIU, V.F.; LADHA, M.H.; ANDO, K.; GRIFFIN, J.D.; WEAVER, D.T.; EWEN, M.E. Enforced CDK4 expression in a hematopoietic cell line confers resistance to the G1 arrest induced by ionizing radiation. **Oncogene**, v. **17**, p. 2961-71, 1998.
- REZNIKOFF, C.A.; YEAGER, T.R.; BELAIR, C.D.; SAVELIEVA, E.; PUTHENVEETIL, J.A.; STADLER, W.M. Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. **Cancer Res.**, v. **56**, p. 2886-90, 1996.
- RIDDLE, R.D.; RANDY, L.; JOHNSON, R.L.; LAUFER, E.; TABIN, C. *Sonic hedgehog* mediates the polarizing activity of the ZPA. **Cell**, v. **75**, p. 1401-16, 1993.
- ROBERTS, W.M.; DOUGLASS, E.C.; PEIPER, S.C.; HOUGHTON, P.J.; LOOK, A.T. Amplification of the *gli* gene in childhood sarcomas. **Cancer Res.**, v. **49**, p. 5407-13, 1989.
- ROBLES, S.J.; ADAMI, G.R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16^{INK4a} enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. **Oncogene**, v. **16**, p. 1113-23, 1998.
- ROELINK, H.; PORTER, J.A.; CHIANG, C.; TANABE, Y.; CHANG, D.T.; BEACHY, P.A.; JESSELL, T.M. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage

- product of Sonic hedgehog autoproteolysis. **Cell**, v. **81**, p. 445-55, 1995.
- ROESSLER, E.; BELLONI, E.; GAUDENZ, K.; JAY, P.; BERTA, P.; SCHERER, S.W.; TSUI, L.C.; MUENKE, M. Mutations in the human *Sonic Hedgehog* gene cause holoprosencephaly. **Nat. Genet.**, v. **14**, p 357-60, 1996.
- RUBINFELD, B.; SOUZA, B.; ALBERT, I.; MÜLLER, O.; CHAMBERLAIN, S.H.; MASIARZ, F.R.; MUNEMITSU, S.; POLAKIS, P. Association of the *APC* gene product with β -catenin. **Science**, v. **262**, p. 1731-7, 1993.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUSHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. **239**, p. 487-491, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
- SARDET, C.; VIDAL, M.; COBRINIK, D.; GENG, Y.; ONUFRYK, C.; CHEN, A.; WEINBERG, R.A. E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. **Proc.Natl.Acad.Sci**, v. **92**, p. 2430-07, 1995.
- SCNEIDER, K.R.; SMITH, R.L.; O'SHEA, E.K. Phosphatase-regulates inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. **Science**, v. **266**, p. 122-6, 1994.
- SCHWARTZ, C.; LOCKE, J.; NISHIDA, C.; KORNBERG, T.B. Analysis of *cubitus interruptus* regulation in *Drosophila* embryos and imaginal discs. **Development**, **121**, p. 1625-35, 1995.
- SEKIGUCHI, T.; HUNTER, T. Induction of growth arrest and cell death by overexpression of the cyclin-Cdk inhibitor p21 in hamster BHK21 cells. **Oncogene**, v. **16**, p. 369-380, 1998.
- SERRA, R.; MOSES, H.L. Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway. **Nat. Med.**, v. **2**, p. 390-1, 1996.

- SHANLEY, S.; RATCLIFFE, J.; HOCKEY, A.; HAAN, E.; OLEY, C.; RAVINE, D.; MARTIN, N.; WICKING, C.; CHENEVIX-TRENCH, G. Nevroid basal cell carcinoma syndrome: review of 118 affected individuals. **Am J Med Genet.**, v. 15, p. 282-90, 1994.
- SHERR, C.J. Mamalian G₁ cyclin. **Cell**, v. 73, p. 1059-65, 1993.
- SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, p. 1672-77, 1996.
- SHI, Y.; ZOU, M.; FARID, N.R.; AL-SEDAIRY, S.T. Evidence of gene deletion of p21 (WAF1/CIP1), a cyclin-dependent protein kinase inhibitor, In thyroid carcinomas. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. 1336-41, 1996.
- SHIMIZU, T.; MIWA, W.; NAKAMORI, S.; ISHIKAWA, O.; KONISHI, Y. Absence of a mutation of the *p21/WAF1* gene In human lung and pancreatic cancers. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 87, p. 275-78.
- SHIMKESTS, R.; GAILANI, M.R.; SIU, V.M.; YANG-FENG, T.; PRESSMAN, C.L.; LEVANAT, S.; GOLDSTEIN, A.; DEAN, M.; BALE, A.E. Molecular analysis of chromosome 9q in two Gorlin syndrome patients. **Am J Hum Genet.**, v. 59, p. 417-22, 1996.
- SHIOHARA, M.; EL-DEIRY, W.S.; WADA, M.; NAKAMAKI, T.; TAKEUCHI, S.; YANG, R.; CHEN D-L.; VOGELSTEIN, B.; KOEFFLER H.P. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. **Blood**, v. 84, p. 3781-84, 1994.
- SHIRODKAR, S.; EWEN, M.; DECAPRIO, J.A.; MORGAN, J.; LIVINGSTON, D.M.; CHITTENDEN, T. **Cell**, v. 68, p. 157-66, 1992.
- SJALANDER, A; BIRGANDER, R.; RANNUG, A; ALEXANDRIE, AK.; TORNLING, G.; BECKMAN, G. Assotiation between the p21 codon 31 A1 (arg) allele and lung cancer. **Hum. Hered.**, v. 46, p. 221-5, 1996.
- SMITH, M.L.; CHEN, I-T.; ZHAN, Q.; BAE, I.; CHEN, C-Y.; GILMER, T.M.; KASTAN, M.B.; O'CONNOR, P.M.; FORNACE JUNIOR, A.J. Interaction of the p53-regulated protein gadd45 with proliferating cell nuclear antigen.. **Science**, v. 266, p. 1376-80, 1994.



- SOMASUNDARAM, K.; ZHANG, H.; ZENG, Y-X.; HOUVRAS, Y.; PENG, Y.; ZHANG, H.; WU, G.S.; LICHT, J.D.; WEBER, BL.; EL-DEIRY, W.S. Arrest of the cell cycle by the tumour-supressor BRCA 1 requires the CDK-inhibitor. **Nature**, v. **389**, p. 187-90, 1997.
- STEINMAN, R.A.; HOFFMAN, B.; IRO, A.; GUUILLOUF, C.; LIEBERMANN, D.A.; EL-HOUSEINI, M.E. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. **Oncogene**, v. **9**, p. 3389-96, 1994.
- STONE, D.M.; HYNES, M.; ARMANINI, M.; SWANSON, T.A.; GU, Q.; JOHNSON, R.L.; SCOTT, M.P.; PENNICA, D.; GODDARD, A.; PHILLIPS, H.; NOLL, M.; HOOPER, J.E.; SAUVAGE, F.; ROSENTHAL, A. The tumor-suppressor gene *patched* encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. **Nature**, v. **384**, p. 129-34, 1996.
- STUCKI, M.; PASCUCCI, B.; PARLANTI, E.; FORTINI, P.; WILSON, S.H.; HÜBSCHER, U.; DOGLIOTTI, E. Mamalian base excision repair by DNA polymerase δ e ϵ . **Oncogene**, v. **17**, p. 835-43, 1998.
- STRAUSS, E. One-eyed animals implicate cholesterol in development. **Science**, v. **280**, p. 1528-9, 1998.
- SUMMERSGILL, B.; GOKER, H.; WEBER-HALL, S.; HUDDART, R.; HORWICH, A.; SHIPLEY, J. Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change. **Br J Cancer**, v. **77**, p. 305-13, 1998.
- SUZUKI, A.; TSUTOMI, Y.; AKAHANE, K.; ARAKI, T.; MIURA, M. Resistance to Fas-mediate apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21^{WAF1} and IAP gene family ILP. **Oncogene**, v. **17**, p.931-939, 1998.
- TABATA, T.; KORNBERG, T.B. Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. **Cell**, v. **76**, p. 89-102, 1994.
- TAGUCHI, M.; WATANABE, S.; YAMASHIMA, K.; MURAKAMI, Y.; SEKIYA, T.; IKEDA, S. Aberration of the tumor supressor p53 gene



- and p53 protein in solar keratosis In human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. **103**, p. 500-3, 1994.
- TAKEUCHI, S.; NAKATSU, Y.; NAKANE, H.; MURAI, H.; HIROTA, S.; KITAMURA, Y.; OKUYAMA, A.; TANAKA, K. Strand specificity and absence of hot spot for p53 mutations in ultraviolet B-induced skin tumors of XPA-deficient mice. **Cancer Res.**, v. **58**, p. 641-46, 1998.
- TENAN, M.; CARRARA, F.; DINONATO, S.; FINOCCHIARO, G. Absence of mutations and identification of two polymorphisms in the SSCP and sequence analysis of p21CDK gene in malignant gliomas. **Int. J. Cancer**, v. **62**, p. 115-17, 1995.
- TERRY, L.A.; BOYD, J.; ALCORTA, D.; LYON, T.; SOLOMON, G.; HANNON, G.; BERCHUCK, A.; BEACH, D.; BARRET, J.C. Mutational analysis of the p21^{WAF1/CIP1/SDI1} coding region in human tumor cell lines. **Mol. Carcinog.**, v. **16**, p. 221-8, 1996.
- TOYOSHIMA, H.; HUNTER, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity is related to p21. **Cell**, v. **78**, p. 67-74, 1994.
- TRAIFFORT, E.; CHARYTONIUK, D.A.; FAURE, H.; RUAT, M. Regional distribution of sonic hedgehog, patched, and smoothnec mRNA in the adult rat brain. **J. Neurochem.**, v. **70**, p. 1327-30. 1998.
- TSAI, L-H.; DELALLE, I.; CAVINESS JUNIOR, V.S.; CHAE, T.; HARLOW, E. p35 is a neural -specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. **Nature**, v. **371**, p. 419-22, 1994.
- TSURIMOTO, T.; STILLMAN, B. Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cell and bacteriophage T4. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **87**, p. 1023-27, 1990.
- UNDEN, A.B.; HOLMBERG, E.; LUNDH-ROZELL, B.; STAHL-BÄCKDAHL, M.; ZAPHIROPOULOS, P.G.; TOFTGARD, R.; VORECHOVSKY, I. Mutations in the human homologue of *Drosophila patched* (*PTCH*) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome:

- Different *in vivo* mechanisms of *PTCH* inactivation. **Cancer Res**, v. **56**, p. 4562-5, 1996.
- VINSON, C.R.; CONOVER, S.; ADLER, P.N. A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. **Nature**, v. **338**, p. 263-4, 1989.
- Von OHLEN, T.; LESSING, D.; NUSSE, R.; HOOPER, J. Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. **Proc Natl Acad Sci.**, v. **94**, p. 2404-9. 1997.
- VORECHOVSKY, I.; TINGBY, O.; HARTMAN, M.; STRÖMBERG, B.; NISTER, M.; COLLINS, V.P.; TOFTGARD, R. Somatic mutations in human homologue of *Drosophila patched* in primitive neuroectodermal tumors. **Oncogene**, v. **15**, p. 361-6, 1997a.
- VORECHOVSKY, I.; UNDÉN, A.B.; SANDSTEDT, B.; TOFTGARD, R.; STHLE-BÄCKDAHL, M. Trichoepitheliomas contain somatic mutations in overexpressed *PTCH* gene: Support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis. **Cancer Res.**, v. **57**, p. 4677-81, 1997b.
- VORTKAMP, A.; LEE, K.; LANSKE, B.; SEGRE, G.V.; KRONENBERG, H.M.; TABIN, C.J. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. **Science**, v. **273**, p. 613-22, 1996.
- XIE, J.; JOHNSON, R.L.; ZHANG, X.; BARE, J.W.; WALDMAN, F.M.; COGEN, P.H.; MENON, A.G.; WARREN, R.S.; CHEN, L-C.; SCOTT, M.P.; EPSTEIN JUNIOR, E.H. Mutations of the *PATCHED* gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. **Cancer Res.**, v. **57**, p. 2369-72, 1997.
- XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. D type cyclins associated with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell**, v. **71**, p. 505-14, 1992.
-

- 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. 701-4, 1993.
- WAGA, S.; HANNON, G.J.; BEACH, D.; STILLMAN, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. **Nature**, v. **369**, p. 574-8, 1994.
- WAN, M.; COFER, K.F.; DUBEAU, L. *WAF1/CIP1* structural abnormalities do not contribute to cell cycle deregulation in ovarian cancer. **Br. J. Cancer**, v. **73**, p. 1398-1400, 1996.
- WATANABE, H.; FUKUCHI, K.; TAKAGI, Y.; TOMOYASU, S.; TSURUOKA, N.; GOMI, K. Molecular analysis of the *Cip1/Waf1* (p21) gene in diverse types of human tumors. **Bioch. Bioph. Acta**, v. **1263**, p. 275-80, 1995.
- WECHSLER-REYA, R.J.; SCOTT, M.P. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic hedgehog. **Neuron**, v. **22**, p. 103-14, 1999.
- WEED, M.; MUNDLOS, S.; OLSEN, B.R. The role of sonic hedgehog in vertebrate development. **Matrix Biol.**, v. **16**, p. 53-8, 1997.
- WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. **81**, p. 323-30, 1995.
- WICKING, C.; GILLIES, S.; SMYTH, I.; SHANLEY, S.; FOWLES, L.; RATCLIFFE, J.; WAINWRIGHT, B.; CHENEVIX-TRENCH, G. De novo mutations of the *patched* gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome help to define the clinical phenotype. **Am. J. Med. Genet.**, v. **73**, p. 304-7, 1997.
- WINTERS, Z.E.; ONGKEKO, W.M.; HARRIS, AL.; NORBURY, C.J. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. **Oncogene**, v. **17**, p. 673-84, 1998.
- WOLTER, M.; REIFENBERGER, J.; SOMMER, C.; RUZICKA, T.; REIFENBERGER, G. Mutations in the human homologue of the



- Drosophila* segment polarity gene *patched* (*PTCH*) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of central nervous system. **Cancer Res.**, v. **57**, p. 2581-5, 1997.
- YAIR, D.; BEMBARUCH, G.; CHETRIT, A.; FRIEDMAN, T.; HIRSH YECHEZKEL, G.; GOTLIEB, W.H.; FISHMAN, A.; BELLER U.; BAR, A.M, A.; FRIEDMAN, E. p53 and WAF1 polymorphisms In Jewish-Israeli women with epithelial ovarian cancer and its association with BRCA mutations. **BJOG**, v. **107**, p. 849-54.
- ZAKUT, R.; GIVOL, D. The tumor suppression function of p21^{Waf} is contained In its N-terminal half ('half-WAF'). **Oncogene**, v. **11**, p. 393-5, 1995.
- ZENG, Y-X.; EL-DEIRY, W.S. Regulation of p21^{WAF1/CIP1} expression by p53-independent pathways. **Oncogene**, v. **12**, p. 1557-64, 1996.
- ZHANG, H.; KOBAYASHI, R.; GALAKTIONOV, K.; BEACH, D. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. **Cell**. v. **82**, p. 915-25, 1995.
- ZIEGLER, A., LEFFEL, D.J., KUNALA, S., SHARMA, H., GAILANI, M., SIMON, J.A., HALPERIN, A.J., BADEN, H.P., SHAPIRO, P.E., BALE, A.E., BRASH, D.E. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. **90**, p. 4216-20, 1993.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 14 de Dezembro de 2000.

Rosa Sayoko Kawasaki Oyama



