

Rosane Gomes de Paula Queiroz

Detecção de Mutações no Gene TP53 em
Lesões Cutâneas Abordagem Imunohistoquímica



**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE TP53 EM LESÕES CUTÂNEAS
ABORDAGEM IMUNOHISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", UNESP.



712/96

São José do Rio Preto - SP
1995



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências,
Unesp - Campus de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", com apoio financeiro da CAPES/CNPq/Fundunesp.

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva



Aos meus pais, Milton e Theresza.

"Os polímeros da arte e a sua estrutura de célula
formam, de modo idêntico, a natureza da consciência"

J. B. B. B.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e C. Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com apoio financeiro da CAPES/CNPq/Fundunesp.



Quero registrar aqui o meu profundo agradecimento à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Em especial:

A minha orientadora, Prof. Dra. Elorza Tazari, pela sua disponibilidade e dedicação, amizade e pelas valiosas sugestões, imprescindíveis para a sua realização.

A Prof. Dra. Sônia M. Oiani, pela colaboração na parte experimental, pela atenciosa leitura da pró-forma e por suas observações, principalmente quanto à terminologia histológica e apresentação das fotomicrografias.

A Prof. Dra. Casilda Casarilli, pela atenciosa leitura da pró-forma e as sugestões de correções do texto.

A Prof. Dra. Marileila Varella-Garcia e ao Prof. Dr. Wladimir João Tádai, pela simpatia e disposição com que sempre me atenderam na posição de coordenador(a) do curso de pós-graduação.

Aos demais professores do curso de pós-graduação, pela colaboração na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Luis I. Pepparo, pelo fornecimento das amostras e ao Dr. Jorge A. Thieud, por sua orientação na análise das lâminas, principalmente quanto ao diagnóstico histopatológico.

A Prof. Dra. Luiza **Aos meus pais, Milton e Thereza.** Instituto Ludwig, onde eu pude aprender a técnica imunohistoquímica e por suas valiosas observações.

A Prof. Katia H.L.V. Pennae, pela paciência e dedicação em me ensinar todos os detalhes da técnica.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por todo seu apoio e por me receber no Laboratório de Patologia (HC/Ribeirão Preto), onde eu pude dar continuidade à parte experimental.

A direção do IBILCE, pelas condições materiais e de funcionamento do campus.

Aos técnicos Jorge Rodrigues dos Santos, pela ajuda e pelas dicas no laboratório, e à Rosana Silvano, pela valiosa ajuda na montagem dos cortes histológicos, nas agradáveis manhãs que passamos juntas no laboratório.

Aos técnicos de laboratório de Patologia do HC/Ribeirão Preto, em especial à Ana M.A. Abreu, sempre solícita e cordial, pelo auxílio na montagem dos cortes e na orientação da técnica imunohistoquímica. Também ao Sr. José Luis Souza por toda a ajuda que me deu.

A amiga Andréa R.B. Rosati, pela amizade sincera, pelo apoio nas horas difíceis e pelos bons momentos que compartilhamos.

A amiga Érika C. Pavarina, pelo desapego e pelos inúmeros favores prestados, sempre gentil e atenciosa.

A amiga Silmara, sempre **"Os pormenores da arte e a fina estrutura da ciência formam, de modo idêntico, a natureza da consciência".**

Aos colegas de "Genética Humana", pelos gostosos bote-papo **J. Bronowski** e pelo apoio durante o curso de pós-graduação, pelo ambiente agradável e pela solidariedade em todos os momentos.

As secretárias do Departamento, Olga e Simone; da seção de pós-graduação, Fátima e Ondina; aos funcionários da biblioteca, do polo computacional e aos demais funcionários do IBILCE, pela solícita prestação com que sempre me atenderam.

A Clécia C. Cardoso e Joaquim Tome L. Elias, pela ajuda na digitação e na impressão da dissertação.

Aos professores e "filas" das minhas filhas, Suzi, Rosana, Luciana, Cleide, Solange, Merga, Lécia, Zenilde e Edilene pela preciosa ajuda nas dúvidas e na educação de meus filhos.

Quero registrar aqui o meu profundo agradecimento a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Em especial:

À minha orientadora, Prof. Dra. Eloiza Tajara, pela sua disponibilidade e dedicação, amizade e pelas valiosas sugestões, imprescindíveis para a sua realização

À Prof. Dra. Sônia M. Oliani, pela colaboração na parte experimental, pela atenciosa leitura da pró-forma e por suas observações, principalmente quanto à terminologia histológica e apresentação das fotomicrografias.

À Prof. Dra. Cacilda Casartelli, pela atenciosa leitura da pró-forma e às sugestões de correções do texto.

À Prof. Dra. Marileila Varella-Garcia e ao Prof. Dr. Wladimir João Tadei, pela simpatia e disposição com que sempre me atenderam na posição de coordenadores do curso de pós-graduação.

Aos demais professores do curso de pós-graduação, pela colaboração na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Luís I. Papparo, pelo fornecimento das amostras e ao Dr. Jorge A. Thomé, por sua orientação na análise das lâminas, principalmente quanto ao diagnóstico histopatológico.

À Prof. Dra. Luísa Lina Villa, por ter me recebido no Instituto Ludwig, onde eu pude aprender a técnica imunohistoquímica e por suas valiosas observações.

À Prof. Katia B.L.V. Perrone, pela paciência e dedicação em me ensinar todos os detalhes da técnica.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por todo seu apoio e por me receber no Laboratório de Patologia (HC/Ribeirão Preto), onde eu pude dar continuidade à parte experimental.

À direção do IBILCE, pelas condições materiais e de funcionamento do campus.

Aos técnicos Josué Rodrigues dos Santos, pela ajuda e pelas dicas no laboratório, e à Rosana Silistino, pela valiosa ajuda na montagem dos cortes histológicos, nas agradáveis manhãs que passamos juntas no laboratório.

Aos técnicos do laboratório de Patologia do HC/Ribeirão Preto, em especial à Ana M.A. Abreu, sempre solícita e cordial, pelo auxílio na montagem dos cortes e na orientação da técnica imunohistoquímica. Também ao Sr. José Luís Souza por toda a ajuda que me deu.

À amiga Andréa R.B. Rossit, pela amizade sincera, pelo apoio nas horas difíceis e pelos bons momentos que compartilhamos.

À amiga Érika C. Pavarino, pelo companheirismo e pelos inúmeros favores prestados, sempre gentil e atenciosa.

À amiga Silmara, sempre disposta a ajudar, pela amizade e pelo imenso apoio junto às minhas filhas.

Às colegas da "Genética Humana", pelos gostosos bate-papos e aos demais colegas do curso de pós-graduação, pelo ambiente agradável e pela solidariedade em todos os momentos.

Às secretárias do Departamento, Olga e Simone; da seção de pós-graduação, Nanci e Onilda; aos funcionários da biblioteca, do pólo computacional e aos demais funcionários do IBILCE, pela solícita presteza com que sempre me atenderam.

À Clélia C. Cardoso e Joaquim Tomé L. Elias, pela ajuda na digitação e na impressão da dissertação.

Às professoras e "tias" dos meus filhos, Sueli, Rosane, Luciana, Cleide, Solange, Márcia, Lúcia, Zenaide e Edilene pela preciosa ajuda nos cuidados e na educação de meus filhos.

Aos meus pais Milton e Thereza, pelo carinho e amor, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e, principalmente, por terem dado tudo de si para a minha formação pessoal e profissional.

Aos meus filhos, Patrícia, Luciana e Fernando, que me alegram e motivam a ir sempre em frente.

Aos meus familiares, especialmente à minha irmã, Mariângela, pelo grande apoio e incentivo que sempre me deu.

Ao meu marido, José Antônio, pelo apoio e incentivo e pelos momentos bons que vivemos juntos.

A Deus por tudo.

I.1. Tumores de pele - Aspectos biológicos e histológicos	1
I.2. Tumores de pele - Aspectos biológicos e histológicos	3
I.3. Tumores de pele - Alguns dados epidemiológicos	7
I.4. Tumores de pele - Aspectos etiológicos	8
I.5. Tumores de pele - Aspectos genéticos	13
I.6. O gene TP53 e seu produto	19
I.6.1. Mecanismos de ação da proteína p53	23
I.6.2. A proteína p53- Aspectos imunobiológicos	27
I.6.3. O gene TP53 e os tumores de pele	28
I.7. Objetivos	30
II. MATERIAL E MÉTODOS	32
II.1. Material	32
II.2. Métodos	32
II.2.1. Protocolo experimental	36
II.2.2. Análise microscópica	37
III. RESULTADOS	39
III.1. Ceratose solar	44
III.2. Carcinoma espinocelular	45
III.3. Carcinoma basocelular	54
III.4. Lesões múltiplas	54
IV. DISCUSSÃO	61
V. RESUMO	75
VI. SUMMARY	76
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Pele - Aspectos histológicos	1
I.2. Tumores de pele - Aspectos biológicos e histológicos	3
I.3. Tumores de pele - Alguns dados epidemiológicos	7
I.4. Tumores de pele - Aspectos etiológicos	8
I.5. Tumores de pele - Aspectos genéticos	13
* I.6. O gene TP53 e seu produto	19
* I.6.1. Mecanismos de ação da proteína p53	23
* I.6.2. A proteína p53- Aspectos imunohistoquímicos	27
I.6.3. O gene TP53 e os tumores de pele	28
* I.7. Objetivos	30
II. MATERIAL E MÉTODOS	32
II.1. Material	32
II.2. Métodos	32
II.2.a. Protocolo experimental	36
II.2.b. Análise microscópica	37
III. RESULTADOS	39
III.1. Ceratose solar	44
III.2. Carcinoma espinocelular	45
III.3. Carcinoma basocelular	54
III.4. Lesões múltiplas	54
IV. DISCUSSÃO	61
V. RESUMO	75
VI. SUMMARY	76
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

I. INTRODUÇÃO

I.1. Pele - Aspectos histológicos

A pele recobre a superfície do corpo e representa uma importante barreira contra agentes nocivos do ambiente, como os raios ultravioleta e os antígenos bacterianos, e protege o organismo da dessecação e de injúrias mecânicas graças à sua camada córnea mais externa. Além disso, participa do processo de regulação térmica, da percepção sensorial, bem como da síntese, do armazenamento e da excreção de diferentes substâncias (Junqueira & Carneiro, 1990; Murphy *et al.*, 1991). Suas características variam com os locais considerados, como o escalpo, a pele da face, do tronco e das extremidades, que podem exibir desde diferenças detectáveis apenas no nível microscópico até aquelas visíveis a olho nu (Pinkus, 1976).

Histologicamente, a pele é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme ou tecido subcutâneo, que serve de suporte aos órgãos subjacentes (Junqueira & Carneiro, 1990). Na pele observam-se várias estruturas conhecidas como apêndices cutâneos, que compreendem os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas e sebáceas. O número, a composição e a espessura de cada um desses componentes apresentam variações determinadas pelas diferentes características topográficas e fisiológicas. Variação adicional é atribuída à idade, ao sexo, ao estado hormonal e à constituição genética (Klein-Szanto, 1989; Pinkus & Merhregan, 1991).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado de renovação contínua. O tipo celular mais abundante é representado pelos queratinócitos, que sintetizam os principais componentes estruturais da barreira epidérmica através de um processo de diferenciação. Originam-se na camada basal, a mais interna da epiderme e, após divisões celulares sucessivas, alguns permanecem no local como células pluripotentes, enquanto outros migram para estratos epidérmicos superiores (Eckert & Rorke, 1989).

Durante a migração em direção à superfície, as células epidérmicas alteram-se dramaticamente, tanto bioquímica quanto morfologicamente. Nesse processo de diferenciação, realizam a síntese de importantes proteínas estruturais e catalíticas como involucrina, queratina, filagrina e transglutaminase. São essas proteínas que conferem o aspecto característico do tecido. A camada basal, por exemplo, é constituída de células



prismáticas ou cubóides, que estão separadas da derme por uma nítida membrana basal. Esta camada também é denominada germinativa por apresentar intensa atividade mitótica responsável pela constante renovação da epiderme. A camada imediatamente superior é denominada espinhosa, ou de Malpighi, apresenta células poligonais, com núcleo central, numerosas junções intercelulares (desmossomos) e muitas fibrilas de citoqueratina que conferem importante função na manutenção da coesão das células da epiderme e, conseqüentemente, na sua resistência ao atrito. Com a contínua migração para a superfície, as células espinhosas tornam-se achatadas, com núcleos menores e condensados, citoplasma rico em grânulos de queratohialina, constituindo a camada granulosa, que tem função auxiliar na barreira fisiológica. A porção mais externa da epiderme compreende a camada córnea, representada pelos queratinócitos diferenciados, sem núcleo e com citoplasma repleto de queratina. Em algumas regiões do corpo, de maior complexidade da epiderme, pode estar presente uma quinta camada abaixo do estrato córneo, denominada lúcida, que representa a zona de transição entre células vivas e mortas (Pinkus, 1976; Klein-Szanto, 1989; Hashimoto & Mehregan, 1990).

Além dos queratinócitos, a epiderme contém outros dois tipos celulares: as células dendríticas (melanócitos e células de Langerhans) e as células de Merckel. Os melanócitos originam-se de células da crista neural embrionária e migram para a epiderme em desenvolvimento. Esse tipo celular apresenta diversos tamanhos e formas, de acordo com a localização e o estado funcional. Ultraestruturalmente mostram complexo de Golgi muito desenvolvido e prolongamentos que estabelecem contatos citoplasmáticos e especialização de membrana entre as células das camadas basal e espinhosa. A melanogênese, ou seja, a síntese do pigmento melanina, ocorre em estruturas membranosas complexas dos melanócitos, os melanossomos. Nessas organelas, a tirosina é convertida em DOPA (diidroxifenilalanina) que, por sua vez, é oxidada e polarizada para originar a melanina, posteriormente transferida para os queratinócitos mais superficiais através dos prolongamentos citoplasmáticos. O escurecimento da pele por exposição à luz solar ocorre inicialmente por fenômenos biofísicos da melanina pré-existente nos queratinócitos e, após esse evento, em virtude da aceleração do processo de biossíntese do pigmento (Hashimoto & Mehregan, 1990; Junqueira & Carneiro, 1990; Della Porta, 1992).

As células de Langerhans são originadas na medula óssea e migram para a epiderme por volta da 17ª semana de vida intra-uterina. Segundo Hashimoto e Mehregan (1990), existem dúvidas se, no indivíduo adulto, são provenientes da medula ou de mitoses



intra-epidérmicas que ocorrem ao longo da vida. Esse tipo celular faz parte do sistema imunológico, realizando captação e processamento de sinais antigênicos e posterior transferência dessas informações para os linfócitos (Murphy *et al.*, 1991). Apresentam também função de macrófagos e migram através do parênquima em muitos tumores derivados da epiderme e de seus apêndices, como ceratose seborréica e cilindroma dermal (Hashimoto & Mehregan, 1990).

O terceiro componente celular epidérmico consiste nas células de Merkel, frequentemente encontradas na pele das extremidades do corpo e relacionadas com a percepção sensorial. Os tumores epidérmicos raramente as contém, talvez pela sua baixa frequência mesmo em tecidos normais, onde são vistas ligadas aos queratinócitos através de desmossomos. Apresentam origem controversa e seus mecanismos de propagação são desconhecidos, pois não são encontrados relatos de mitoses nesse tipo celular (Hashimoto & Mehregan, 1990).

A derme é o tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. Sua espessura é variável e apresenta, basicamente, muitas fibras colágenas e elásticas, numerosos nervos e vasos sanguíneos e linfáticos, além de estruturas derivadas da epiderme como pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas e unhas (Klein-Szanto, 1989). Possui duas camadas de limites pouco distintos, a papilar, mais superficial e constituída por tecido conjuntivo frouxo, e a reticular, mais espessa e profunda e formada por tecido conjuntivo denso (Junqueira & Carneiro, 1990).

1.2. Tumores de Pele - Aspectos biológicos e histológicos

A proliferação das células da pele, bem como de outros órgãos, é um processo meticulosamente controlado, que responde às necessidades específicas do organismo. Ocasionalmente esse controle é rompido e um processo desordenado de divisões mitóticas pode resultar em uma massa de células alteradas denominada tumor (Darnell *et al.*, 1986). Os tumores podem ser classificados com base em suas células de origem ou de acordo com o seu comportamento. Sampaio *et al.* (1987), por exemplo, classificam as neoplasias cutâneas em dois grupos de acordo com sua origem embrionária. As ectodérmicas incluem aquelas que atingem a epiderme e seus anexos, enquanto as mesodérmicas compreendem os tumores da derme e do tecido subcutâneo. As neoplasias benignas caracterizam-se pelo crescimento



lento e expansivo, que desloca gradativamente o tecido normal, não apresentam mitoses atípicas, anaplasias celulares e metástases. As malignas, por sua vez, são anaplásicas, infiltrantes e destroem o tecido adjacente. Crescem rapidamente e apresentam mitoses anômalas e capacidade de metastatizar (Sampaio *et al.*, 1987; Lever & Lever, 1990). A pele também apresenta lesões pré-malignas ou carcinomas *in situ* que, embora citologicamente malignas, não manifestam comportamento agressivo. Entre elas podem ser citadas a ceratose solar e a doença de Bowen e, entre as malignas, o melanoma e os carcinomas baso e espinocelular. Finalmente, entre as lesões benignas, estão os nevos, o acantoma, a ceratose seborréica, os cistos e o ceratoacantoma (Sampaio *et al.*, 1987; Lever & Lever, 1990). Os exemplos citados são de tumores epidérmicos, mas existem também tumores dérmicos bem conhecidos. Os mais importantes são os lipomas, os fibromas, os lipossarcomas e os fibrossarcomas (Klein-Szanto, 1989). Alguns tumores epidérmicos, pela importância clínica e pela frequência, serão detalhados a seguir.

A ceratose solar, ceratose senil ou actínica é uma lesão pré-maligna bastante comum que ocorre em áreas do organismo expostas ao sol de indivíduos idosos e de pele clara (Hashimoto & Mehregan, 1990). Surge preferencialmente na face e no dorso das mãos e, em geral, possui diâmetro inferior a 1 cm, superfície áspera e cor que varia de amarelo a castanho escuro. Devido ao excesso de queratina acumulada nas suas células, pode apresentar escamas que, ao serem destacadas, ocasionam pequenas hemorragias. O curso da patologia é crônico e pode ocorrer malignização em aproximadamente 25% dos casos, resultando em carcinomas baso e espinocelulares (Klein-Szanto, 1989). Segundo Sampaio *et al.* (1987) e Murphy *et al.* (1991), a exposição à radiação ionizante, hidrocarbonetos e substâncias arsenicais induzem, muitas vezes, lesões semelhantes.

Do ponto de vista histopatológico, as ceratoses são carcinomas espinocelulares *in situ* porque exibem a presença de células anaplásicas mas, biologicamente, são lesões benignas que, mesmo quando invadem a derme, ficam limitadas às camadas mais superficiais. Podem ser reconhecidas cinco classes de ceratoses: a hipertrófica, a atrófica, a bowenóide, a acantolítica e a pigmentada, com transições e combinações frequentes entre elas. O tipo hipertrófico apresenta epiderme espessa e proliferação irregular em direção às camadas mais internas, o que não representa invasão da derme. Uma porção variável de queratinócitos na camada de Malpighi apresenta perda de polaridade e, em consequência, encontra-se arranjada desordenadamente. Muitas dessas células exibem pleomorfismo e atipia de seus núcleos, que são grandes, irregulares e hipercromáticos, e outras mostram,



ainda, queratinização precoce. No tipo atrófico, a epiderme é fina e as células atípicas estão concentradas na camada basal, têm grandes núcleos hipercromáticos e agrupados. O tipo bowenóide é histologicamente indistinguível da doença de Bowen e a epiderme apresenta arranjo desordenado das células e de seus núcleos. No tipo acantolítico, ocorrem fendas ou lacunas imediatamente acima das células da camada basal. Essas fendas são formadas em decorrência de alterações anaplásicas da epiderme adjacente e resultam em perda das pontes intercelulares. Finalmente, o tipo pigmentado caracteriza-se por quantidades excessivas de melanina, especialmente na camada basal. Em muitos casos, os queratinócitos atípicos estão repletos de melanina. Em outros, quase toda a melanina está retida em corpos celulares e dendritos dos melanócitos, indicando bloqueio na transferência do pigmento. Em todos os tipos de ceratose solar, a porção mais superficial da derme apresenta um infiltrado denso, crônico e inflamatório, composto predominantemente de células linfóides e plasmáticas (Lever & Lever, 1990).

Em relação às lesões cutâneas malignas, o carcinoma espinocelular ou epidermóide é o segundo tipo de câncer mais frequente e ocorre geralmente em indivíduos com mais de 50 anos de idade (Sampaio *et al.*, 1987; Hashimoto & Mehregan, 1990). Entre seus fatores etiológicos, a luz solar é, sem dúvida, o mais importante. São apontados também os carcinógenos industriais (alcatrões e óleo), os compostos arsenicais e a radiação (Klein-Szanto, 1989; Murphy *et al.*, 1991). Além disso, pode se desenvolver a partir de lesões pré-existentes, como a ceratose solar, as cicatrizes e as inflamações crônicas (Marks *et al.*, 1988; Molès *et al.*, 1993a), e se caracteriza pela proliferação atípica de células espinhosas, que adquirem caráter invasivo e muitas vezes originam metástases (Sampaio *et al.*, 1987). Em relação a esse aspecto, carcinomas com origem em áreas do corpo queimadas pelo sol têm uma probabilidade menor de metástase, cerca de 0,5%, quando comparados ao grupo como um todo, que tem risco de 2 a 3%. Por outro lado, lesões situadas no lábio inferior, mesmo aquelas induzidas pela luz solar, têm uma incidência de metástase muito maior, cerca de 16%, do mesmo modo que aquelas que se desenvolvem durante processos inflamatórios ou degenerativos em doenças osteomielíticas (30%), por radiação ionizante (20%) e decorrentes de cicatrizes de queimaduras (18%). Clinicamente, consiste de uma úlcera não profunda, rodeada por um bordo largo e elevado, em geral coberta por uma crosta que oculta uma base granular vermelha. Em alguns casos, ocorrem lesões verrucosas fungóides sem ulcerações (Lever & Lever, 1990).

Do ponto de vista histológico, é um carcinoma verdadeiro e invasivo, formado por massas irregulares de células epidérmicas que proliferam para dentro da derme. Essas massas são compostas de proporções variáveis de células escamosas normais e atípicas, essas últimas em números elevados nos casos mais agressivos. Tais células caracterizam-se pela grande variedade de tamanhos e formatos, por hiperplasia e hipertonia dos núcleos, ausência de pontes intercelulares, queratinização e figuras mitóticas anômalas. O grau de diferenciação da patologia está relacionado com o grau de queratinização, avaliado pela formação de pérolas córneas, que são estruturas muito peculiares compostas de camadas concêntricas de células escamosas queratinizadas (Lever & Lever, 1990; Murphy *et al.*, 1991).

Um outro carcinoma de pele mais frequente e menos maligno que o espinocelular é o epitelioma basocelular. Esse tumor atinge preferencialmente regiões da pele que apresentam pêlos, especialmente a face. Macroscopicamente, apresenta-se como pápulas brilhantes e lisas que podem ulcerar com a sua progressão. É observado muitas vezes como lesão isolada, mas a ocorrência de várias lesões, tanto simultâneas como subsequentes, é relativamente comum. Cerca de 40% dos pacientes que já tiveram um desses tumores desenvolvem, no mínimo, mais uma lesão semelhante em um período de 10 anos (Sampaio *et al.*, 1987; Hashimoto & Mehregan, 1990).

Os carcinomas basocelulares parecem surgir sem um agente etiológico aparente, embora existam vários fatores de predisposição conhecidos. O mais comum entre eles é a pele clara em associação com prolongada exposição à luz solar. Uma vez que sua ocorrência no dorso das mãos e dos dedos é rara, tem sido sugerido que apenas a ação do sol não é suficiente para produzir as lesões. Fatores adicionais parecem estar implicados na sua gênese, como a radiação ionizante e as cicatrizes de queimaduras. De modo geral, o epitelioma basocelular não metastatiza, entretanto existem exceções. A incidência de metástase oscila dependendo do tipo de averiguação realizada, por exemplo, atinge 0,01% em espécimes enviados a laboratórios de histopatologia, 0,028% em pacientes de clínicas dermatológicas e 0,1% em pacientes de centros cirúrgicos (Hashimoto & Mehregan, 1990; Lever & Lever, 1990).

Do ponto de vista histológico, essa neoplasia é constituída por células que se assemelham àquelas da camada basal e são originadas da epiderme ou epitélio folicular mas nunca de superfícies mucosas (Hashimoto & Mehregan, 1990; Sampaio *et al.*, 1987). Dois padrões podem ser reconhecidos: o de crescimento multifocal, mais superficial e com origem

na epiderme, e o de lesões nodulares, com crescimento descendente. Esse último penetra profundamente na derme sob a forma de cordões e ilhotas de células basofílicas, mostrando núcleos hipercromáticos e arranjos periféricos em paliçada (Murphy *et al.*, 1991).

Além desses dois padrões, existem epiteliomas basocelulares que não apresentam diferenciação e são, então, denominados sólidos. Nesse caso, as células exibem núcleos grandes, ovais ou alongados, e relativamente pouco citoplasma. O citoplasma em geral é pouco definido, de forma que os núcleos parecem mergulhados numa massa simplásmica. O estroma de tecido conjuntivo prolifera com o tumor e está arranjado em pacotes que envolvem as massas tumorais (Lever & Lever, 1990).

Os basoteliomas, embora de comportamento pouco agressivo, são localmente destrutivos e caracterizados pela associação de um infiltrado linfocítico que, muitas vezes, contém células plasmáticas (Lever & Lever, 1990).

I.3. Tumores de Pele - Alguns dados epidemiológicos

O câncer cutâneo não melanocítico é a neoplasia mais comum em muitos países. Embora seja curável e apresente riscos relativamente baixos de metástases, ele poderá vir a afetar uma de cada quatro pessoas num futuro próximo e aumentar, assim, de forma consistente a morbidade e os custos de saúde em muitas populações humanas (Armstrong, 1994). De acordo com o estudo epidemiológico de Weinstock (1993), realizado entre 1969 e 1988, aproximadamente 1200 mortes por ano podem ser atribuídas a esse tipo de câncer nos Estados Unidos. Curiosamente, essas taxas de mortalidade apresentaram diminuição de 20 a 30% durante o período estudado, embora a incidência tenha aumentado anualmente. Segundo Reizner *et al.* (1993), estimativas realizadas também nos EUA apontam para o surgimento de 700.000 novos casos de carcinomas baso e espinocelulares por ano. Esse número representa 1/3 de todos os cânceres registrados no mesmo período. Por outro lado, Diffey (1992) relata que na Inglaterra são registrados 300.000 novos casos por ano mas sugere que, devido a falhas no sistema de registro, esse número pode ser até três vezes maior.

Os coeficientes da incidência descritos para o Brasil variam de 18,2 (Porto Alegre, sexo feminino) a 111,4 (Goiânia, sexo feminino) por 100.000 homens ou mulheres (Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, 1991). Esses dados foram obtidos a

partir dos registros hospitalares de cinco capitais (Belém, Fortaleza, Goiânia, Porto Alegre, Recife e São Paulo). Em outro levantamento, realizado pela Fundação Oncocentro de São Paulo (1991) em 18 cidades do interior do estado de São Paulo, foi constatada uma taxa de 88,44 por 100.000 habitantes. É necessário ressaltar que esses últimos dados são preliminares e é possível que estejam super estimados.

I. 4. Tumores de Pele - Aspectos etiológicos

A carcinogênese em um organismo multicelular pode ser o resultado da ação de um ou, mais provavelmente, de diferentes agentes químicos, físicos e biológicos no genoma de uma célula precursora normal (Darnell *et al.*, 1986; Cotran *et al.*, 1991; Pitot, 1993). No caso dos tumores de pele, a luz ultravioleta (UV) é reconhecidamente um dos seus mais importantes fatores etiológicos, apesar de representar uma pequena parcela dos raios solares que incidem sobre a superfície da Terra. Por exemplo, apenas 0,3% deles são raios UVB (280-320 nm), 5,1% são raios UVA (320-400 nm), enquanto 62,7% consistem de luz visível e 31,9% de infravermelho. Os raios UVC (190-280 nm) são completamente bloqueados pela camada de ozônio estratosférica (Sage, 1993) e, portanto, apenas os raios UVA e UVB podem estar diretamente relacionados a efeitos mutagênicos. Entretanto, devido à depleção da camada de ozônio, tem ocorrido uma alteração no tipo e na quantidade de raios solares filtrados, o que deve ser responsável pelo aumento na incidência de câncer de pele a cada ano (Diffey, 1987; Brash *et al.*, 1991). Estima-se que, para cada 1% de diminuição na camada de ozônio, os raios UVB que atingem a superfície da Terra aumentem em aproximadamente 2% (Scott & Straf, 1977).

A exposição à luz solar conduz a várias respostas cutâneas que incluem efeitos imediatos, como eritema, queratinização e aumento de pigmentação, e efeitos tardios exemplificados pelo envelhecimento e pela fotocarcinogênese. A magnitude desses fenômenos é modulada pela dose incidente e pelo comprimento de onda da luz, bem como pelo fototipo cutâneo (Gaboriau *et al.*, 1993).

No que se refere à queratinização, esse efeito da luz UV sobre a epiderme já foi amplamente verificado por estudos com microscopia de luz (Gilchrest *et al.*, 1981) e eletrônica de transmissão (Wilgram *et al.*, 1970) e métodos histoquímicos (Danno *et al.*, 1980) em queratinócitos de seres humanos e de animais. A expressão da queratina foi



avaliada por Horio *et al.* (1993) através de análise imunohistoquímica com diversos anticorpos, em pele de cobaias submetidas à irradiação UVB, psoralen e UVA. Os resultados encontrados pelo grupo revelaram que a expressão da queratina é alterada após irradiação UV e que essa alteração provavelmente é reflexo de um estado hiperproliferativo da epiderme induzido por síntese elevada de DNA.

Em relação ao aumento de pigmentação, um outro grupo de pesquisadores analisou os efeitos dos raios UVA, UVB e irradiação solar simulada em queratinócitos e melanócitos humanos cultivados *in vitro*. Foi observado que a atividade da tirosinase foi duas vezes maior que os níveis normais, 24 horas após o tratamento com UVA e UVB, quatro a seis vezes após UVA apenas, e duas vezes após irradiação solar simulada. O conteúdo de melanina também mostrou elevação (Dissanayake *et al.*, 1993). Tais alterações devem ocorrer presumivelmente para proteger a pele, do mesmo modo que o aumento da espessura, citado anteriormente (Horio *et al.*, 1993).

Do ponto de vista molecular, os efeitos da luz UV sobre o DNA estão relativamente bem estabelecidos. Por exemplo, Setlow (1968) detectou que comprimentos de onda mais curtos produzem dímeros de pirimidina (anéis de ciclobutano). Esses dímeros levam a substituições C→T e CC→TT, específicas da radiação UV (Basset-Séguin *et al.*, 1994), que podem ser observadas após irradiação em bactérias (Wood *et al.*, 1984), leveduras (Armstrong & Kunz, 1990), células de roedores (Ruven *et al.*, 1993) e de primatas (Protic-Sabljic *et al.*, 1986).

As fotolesões produzidas no DNA podem ocorrer por absorção direta ou através de moléculas fotossensíveis, que são ativadas após a irradiação e agem isoladamente ou por mecanismos dependentes de espécies ativas de oxigênio (Sage, 1993; Cerutti, 1994). Reid & Loeb (1993), através de ensaios de reversão, puderam observar que tratamentos que produzem espécies ativas de oxigênio podem também induzir mutações duplas CC→TT. Os radicais livres de oxigênio, que são resultantes do metabolismo celular normal, de processos inflamatórios, isquemia e metabolismo xenobiótico, têm sido relacionados com um grande número de doenças degenerativas, incluindo envelhecimento e câncer. Além disso, já é bem conhecido o fato de que causam alterações estruturais permanentes no DNA, como mutações, deleções, inserções e amplificações, ativam mecanismos citoplasmáticos e nucleares de transdução de sinais e modulam genes e proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação e morte celular (Cerutti, 1994). É interessante citar que a ação citotóxica dos raios UVA e UVB em bactérias e células de mamíferos em cultura depende da presença de

oxigênio (Sage, 1993), e que tanto os raios UVA como as espécies ativas de oxigênio participam da peroxidação lipídica (Morlière *et al.*, 1991), um processo que induz inativação enzimática e modificação das propriedades físicas da membrana celular, incluindo transporte de íons e fluidez (Gaboriau *et al.*, 1993).

Além dos dímeros de ciclobutano acima citados, existem evidências de um outro tipo de fotodano no DNA, a formação do fotoproduto pirimidina (6-4) pirimidona ou (6-4) fotoproduto que, em *Escherichia coli*, parece estar relacionada com eventos primários pré-mutagênicos (Mitchell & Nairn, 1989). Estudos adicionais referem que o (6-4) fotoproduto é formado com uma taxa correspondente a 30% daquela dos dímeros de ciclobutano no DNA genômico total de mamíferos, apresentando também velocidade de reparo aumentada (Mitchell *et al.*, 1990). A fotoisomerização do (6-4) fotoproduto conduz a um composto denominado Dewar pirimidona, recentemente descrito como um importante determinante molecular que é responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos fisiológicos observados após irradiação UVB (Mitchell & Nairn, 1989).

Embora os danos na molécula de DNA sejam produtos imediatos da ação da luz UV, as consequências tardias são, sem dúvida, mais relevantes. Nishigori *et al.* (1992), observaram que determinadas condições de exposição a esse agente podem não só induzir como acelerar o aparecimento de tumores cutâneos. Utilizando vários protocolos com diferentes intervalos de tempo e doses, de modo a não causar queimaduras ou processos necróticos, esses autores obtiveram lesões que puderam ser histologicamente caracterizadas e cultivadas para experimentos de transplante. Os resultados revelaram que 100% dos camundongos testados apresentavam tumores nas áreas expostas e que a maior parte desses era maligna e representada por sarcomas. Foi também verificado que as células neoplásicas, submetidas *in vitro* a agentes alquilantes, exibiam grande diferença na capacidade de reparo do DNA quando comparadas às células normais, embora não apresentassem tal diferença em relação à sensibilidade aos raios UV, sugerindo que o desenvolvimento desses tumores não poderia ser explicado apenas pela diferença na capacidade de reparo entre as células tumorais e normais.

Uma das explicações para esses achados pode ser dada pelo fato dos raios UVB danificarem as células de Langerhans da epiderme, aparentemente resultando na supressão da hipersensibilidade local ou sistêmica, dependendo da dose de radiação (Streilein *et al.*, 1994). Já foi referido que a UVB induz a produção de um inibidor da interleucina 1 (IL1) pelos queratinócitos irradiados. Dado que a IL1 atua como um ativador



de células T, o inibidor poderia suprimir a imunidade e conduzir a uma falha no reconhecimento de queratinócitos anormais na epiderme (Hashimoto & Mehregan, 1990). A favor dessa hipótese, está o fato de que pacientes submetidos a transplante renal e, em consequência, à imunossupressão, exibem aumento na incidência de câncer de pele (Arlett *et al.*, 1993).

Um outro mecanismo envolvido na fotocarcinogênese se processa, sem dúvida, através dos efeitos genotóxicos da luz UV citados anteriormente. É importante ressaltar que os dímeros ou quebras formados na molécula são normalmente reparados por enzimas celulares específicas. Entretanto, qualquer alteração no funcionamento dessas proteínas pode levar à propagação de genomas lesados (Taylor, 1994). Evidências da importância desse sistema na carcinogênese provêm de estudos de uma doença genética rara, o "xeroderma pigmentosum" (XP), que tem herança autossômica recessiva e se caracteriza por aumento de 2000 vezes na frequência de câncer de pele (Cox *et al.*, 1993). Tal predisposição à malignização cutânea deve-se à hipersensibilidade celular e clínica à luz UV, associada à deficiência no sistema de reparo do DNA (Venema *et al.*, 1990; Kraemer *et al.*, 1994). A identificação de 8 grupos de complementação nessa doença revela uma considerável heterogeneidade genética. Variações de sensibilidade à luz UV nos diversos grupos correlacionam-se, na maioria dos casos, com a extensão do defeito no sistema de reparo. Uma notável exceção foi encontrada nas células do grupo C (XP-C), que são relativamente resistentes aos efeitos letais da luz UV. Diferentes abordagens bioquímicas têm revelado que o reparo por excisão residual em células XP-C está restrito a domínios que compreendem 10% do genoma e que são ativos transcricionalmente (Venema *et al.*, 1990).

A síndrome de Cockayne (CS) é também uma doença autossômica recessiva rara que se caracteriza por sensibilidade aumentada à luz solar. No entanto, ao contrário dos pacientes XP, os pacientes CS exibem a formação de dímeros de pirimidina, porém sem aumento na frequência de câncer cutâneo. Essa diferença deve-se, em parte, ao fato das células CS apresentarem aparente remoção normal dos fotoprodutos do genoma embora, quando comparadas às células normais, mostrem redução no reparo de dímeros de pirimidina em genes ativos (Parris & Kraemer, 1993).

Fibroblastos em cultura de portadores heterozigotos do gene de XP, clinicamente assintomáticos, também exibem uma sensibilidade aumentada aos efeitos genotóxicos induzidos pela luz UV. Tais efeitos podem ser visualizados por trocas entre cromátides irmãs (TCI) e formação de micronúcleos (MN) (Bielfeld *et al.*, 1989). Roser *et*

al. (1989) observaram os mesmos resultados em fibroblastos de pacientes com melanoma maligno, submetidos *in vitro* à irradiação UV. As alterações mostraram-se mais pronunciadas em casos familiares, indicando que a predisposição genética realmente contribui para o desenvolvimento dessa neoplasia e pode ser decorrência da sensibilidade aumentada a esse agente. É interessante que fibroblastos de indivíduos jovens com outros tumores de pele típicos de idade avançada, como o carcinoma basocelular, não revelam o mesmo comportamento (Rümmelein *et al.*, 1992).

A susceptibilidade a neoplasmas cutâneos com ocorrência múltipla de carcinomas pode ser observada em pessoas que manifestam tendência a queimaduras solares e dificuldade em bronzear-se. Os riscos de repetição são maiores entre caucasianos, particularmente entre aqueles com olhos azuis e cabelos loiros ou vermelhos, e entre os que sofreram exposições importantes ao sol antes dos 40 anos de idade (Karagas, 1994). Uma outra causa parece consistir em capacidade diminuída de reparo de DNA, que é independente da idade do portador (Wei *et al.*, 1994).

Além da radiação solar, a radiação ionizante também deve ser incluída na etiologia de tumores cutâneos, pois já foi relatada uma incidência aumentada de carcinoma espinocelular em trabalhadores expostos ocupacionalmente aos raios X (Burns *et al.*, 1989). Em experimentos com linhagens celulares de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, Cowan *et al.* (1993) obtiveram resultados citogenéticos que demonstram a ocorrência de alterações cromossômicas após a irradiação. Existem duas teorias para explicar as mutações originadas nesse caso, uma delas seria a ionização da própria molécula de DNA e a outra a ionização de moléculas do meio intracelular, como a água e o oxigênio, produzindo radicais livres altamente reativos com o ácido nucléico (Cotran *et al.*, 1991).

Finalmente, muitos agentes químicos podem também ser apontados como indutores de algumas lesões de pele. Os hidrocarbonetos orgânicos, como o alcatrão de hulha, e os sais inorgânicos de arsênico têm sido referidos como causa relacionada à exposição ocupacional (Elwood *et al.*, 1989). De qualquer modo, é necessário ressaltar a dificuldade no esclarecimento dos mecanismos envolvidos, que são múltiplos e interrelacionados e podem compreender desde alterações no gene que é afetado pelo carcinógeno, no produto formado e em todos os padrões bioquímicos relacionados.



I. 5. Tumores de Pele - Aspectos genéticos

A carcinogênese na pele, assim como em outros órgãos, é sabidamente um processo de múltiplas etapas no qual foram reconhecidos três estádios: iniciação, promoção e progressão ou, em certos casos apenas os dois primeiros. Um aspecto importante nesse modelo é a evidência de que mecanismos genéticos e epigenéticos estão presentes (Naito *et al.*, 1989; Slaga, 1989). Historicamente, os primeiros modelos experimentais da carcinogênese epidérmica são registrados por volta de 1930, com a aplicação de hulhas de alcatrão na pele de camundongos e a consequente formação de tumores. Em 1941, estudos da atividade carcinogênica da resina de cróton conduziram Berenblum a sugerir a existência de três fases no processo: a primeira seria latente e pré-cancerígena, a segunda caracterizada pelo desenvolvimento de papilomas benignos e a última fase, na qual ocorreria conversão à malignidade. No início dos anos 50, foi observado que era necessária a contínua exposição dos papilomas ao carcinógeno para indução de tumores malignos. Finalmente, em 1983, foi desenvolvido um protocolo experimental para demonstração das três fases (Hennings *et al.*, 1993). Embora as etapas citadas estejam relacionadas fundamentalmente à carcinogênese química, o conhecimento dos seus mecanismos auxilia a compreensão da ação de outros tipos de agentes sobre a transformação de uma célula normal em maligna (Darnell *et al.*, 1986; Cotran *et al.*, 1991).

O primeiro estágio da carcinogênese, a iniciação, resulta de uma alteração irreversível, muito provavelmente através de uma ou mais mutações em ponto, transversões, transições ou pequenas deleções na molécula de DNA, em decorrência da ação de dois ou mais fatores. Na pele, os queratinócitos iniciados expressam mudanças sutis no fenótipo, não detectáveis na epiderme intacta (Yuspa *et al.*, 1994).

O segundo estágio, a promoção, é reversível e, em geral, não envolve mutações. Causa a expansão clonal de células iniciadas levando à formação de papilomas. Ao contrário da iniciação e da progressão, o estágio de promoção requer contínuo tratamento com os agentes promotores (Pitot, 1993). Na tumorigênese cutânea, esses agentes compreendem principalmente os ésteres de forbol, os alcalóides indóis, os poliacetatos, além dos peróxidos geradores de radicais livres e hidrocarbonetos policíclicos (Naito *et al.*, 1989).

Finalmente, a progressão é o estágio irreversível que se caracteriza pela conversão à malignidade e por frequência aumentada de mutações. É possível a visualização

clínica da neoplasia e, histologicamente, a detecção do crescimento de células anômalas, a invasividade dos tecidos e a capacidade metastática. Embora o estágio envolva múltiplas alterações, é provável que a modificação molecular básica consista de um mecanismo que gera instabilidade genômica (Pitot, 1993).

É relativamente bem estabelecida a relação entre substâncias químicas genotóxicas e o processo descrito acima. Entretanto, outras substâncias não genotóxicas, mesmo na ausência daquelas, podem também induzir o câncer quando presentes em altas concentrações, possivelmente pelo seu efeito epigenético na proliferação celular. Agentes que podem conduzir a um aumento da taxa de divisões celulares e eventual transformação neoplásica estão agrupados em fatores físicos, químicos e infecciosos, além de traumatismos e inflamações crônicas. São exemplos os contraceptivos orais, o vírus da hepatite B, os traumas e as queimaduras de pele (Preston-Martin *et al.*, 1990).

Apesar de existirem exemplos de carcinogênese iniciada ou promovida exclusivamente por mecanismos epigenéticos, a grande maioria dos tumores até hoje analisados revela algum tipo de alteração genotípica. Muitos estudos citogenéticos, por exemplo, demonstraram, ao longo das últimas décadas, a existência de rearranjos estruturais e numéricos em neoplasias humanas, como aqueles envolvendo os cromossomos 1, 6, 7, 9 e 10, observados em tumores melanocíticos (Parmiter & Nowell, 1993). Também já são relativamente bem conhecidas as modificações em nível molecular do material genético, que ocorrem durante o processo carcinogênico e envolvem três classes principais de genes. No primeiro grupo estão os oncogenes, que podem induzir diretamente o crescimento neoplásico em animais experimentais ou a transformação maligna em cultura de células. O segundo grupo é formado pelos genes supressores de tumor ou antioncogenes, que apresentam a característica de inibir a proliferação celular. Os recentemente descritos "mutators genes", que constituem o terceiro grupo, codificam fatores de reparo ou de duplicação do DNA e têm sido associados à etiologia de alguns tumores (Peltomaki *et al.*, 1993; Nagar, 1995), mas não de outros, como os cutâneos (Quinn *et al.*, 1995). Sua mutação leva a alterações em sequências repetidas "in tandem" amplamente distribuídas pelo genoma, conhecidas como microssatélites. Os microssatélites são altamente polimórficos e, embora localizados em regiões não codificadoras, são encontrados próximos ou dentro de sequências gênicas importantes.

Os oncogenes foram definidos a partir de duas linhas diferentes de investigação. A primeira delas envolveu o estudo dos retrovírus, alguns dos quais com



capacidade de causar câncer em diversos animais através da inserção de parte do seu genoma no genoma da célula hospedeira. Entre esses está o vírus do sarcoma de Rous (RSV), que induz a formação de neoplasia em galinhas e é portador de um gene transformante, o v-SRC. Curiosamente, cópias desse gene estão também presentes em todas as células normais de animais já estudados. Em outra categoria de vírus oncogênicos estão incluídos o Epstein-Barr (EBV) e o papilomavírus (HPV), que levam ao desenvolvimento do linfoma de Burkitt e de tumores anogenitais, respectivamente, sem a incorporação de parte do seu genoma. As alterações provocadas podem ser análogas aos agentes promotores, que estimulam a duplicação celular sem alterar diretamente a estrutura da molécula de DNA (Pitot, 1993).

A segunda linha de pesquisa relacionada com os oncogenes compreendeu a investigação dessas sequências em neoplasias humanas e animais não causadas por vírus, e foi baseada em experimentos que utilizaram sondas moleculares obtidas dos tumores e transfectadas para células em cultura para posterior seleção de focos transformados (Heim *et al.*, 1987; Cotran *et al.*, 1991).

Atualmente, considera-se que certos genes celulares normais (protoncogenes) podem tornar-se oncogênicos por transdução retroviral ou por outros fatores que alterem seu comportamento no hospedeiro natural (Cotran *et al.*, 1991). Desde a sua descoberta, já foram identificados mais de 100 protoncogenes e muitos deles estão mapeados no genoma humano (Lewin, 1994), sem a contraparte viral (Pitot, 1993). Seus produtos incluem fatores de crescimento, receptores de membrana, proteínas moduladoras e proteínas nucleares (Goddard, 1993; Schmandt *et al.*, 1993).

Os fatores de crescimento emitem sinais que levam à estimulação do crescimento de células normais. O sinal é recebido inicialmente por um receptor de membrana e é transferido para o citoplasma e posteriormente para o núcleo. Foi constatado que os protoncogenes estão relacionados com cada uma das etapas desse processo (Cotran *et al.*, 1991), o que explica o fato de serem altamente conservados durante a evolução (Darnell *et al.*, 1991).

Em virtude desses genes ocorrerem normalmente nas células, parece claro que eles precisam ser alterados para poderem exercer seu papel oncogênico. Tal ativação ocorre através de vários mecanismos, entre eles mutações (transições, transversões e deleções), translocações, inserções ou transposições (Pitot, 1993), que serão brevemente descritos a seguir. Os da família RAS, por exemplo, são ativados por uma mutação em ponto, que provoca a substituição de um único aminoácido na proteína p21^{ras} (Rossit, 1995). As

translocações cromossômicas também fornecem a base para a ativação de oncogenes. O cromossomo Philadelphia (Ph), característico da leucemia mielóide crônica, constitui um dos mais clássicos exemplos. Nessa translocação, ocorre a fusão de dois genes, o protooncogene c-ABL, no cromossomo 9, com o BCR no cromossomo 22. A proteína normal codificada pelo ABL tem atividade de tirosina quinase e é sintetizada em quantidades muito pequenas. Entretanto, a proteína quimérica (p210) resultante da translocação possui várias características que poderiam explicar o mecanismo pelo qual a translocação induz a transformação maligna. Sabe-se, por exemplo, que diferentes regiões da molécula exibem propriedades distintas e relacionadas, como a regulação da atividade transcricional das células transformadas (Tanzer, 1993).

Um terceiro mecanismo de ativação de protooncogenes é o da amplificação gênica. Esse evento pode ser identificado através de estudos moleculares ou, citogeneticamente, pela presença de "*double minutes*" e de regiões cromossômicas de coloração homogênea (HSR) (Sandberg, 1990; Cotran *et al.*, 1991) e tem como consequência a expressão elevada dos produtos gênicos correspondentes. Como exemplo pode ser citada a amplificação dos genes da família ERB-B em vários adenocarcinomas e carcinomas espinocelulares e do NMYC em neuroblastomas (Yamamoto, 1993).

Como os protooncogenes foram altamente conservados durante a evolução, acredita-se que seus produtos sejam elementos importantes para o desenvolvimento e manutenção dos organismos (Yamamoto, 1993). Assim, a proliferação de células normais parece ser mantida pelos protooncogenes mas deve ser regulada de alguma forma. Acredita-se que essa regulação seja realizada pelos genes supressores de tumor que, se inativados, levam ao crescimento não controlado das células. Evidências recentes sugerem que esses dois eventos não são exclusivos e que a progressão de muitos tumores envolve os dois tipos de alterações no genoma celular (Lehman *et al.*, 1991; Weinberg, 1991).

A principal dificuldade inicial no estudo dos genes supressores de tumor consistiu no fato de que a sua ausência, e não a presença, resultava em alteração no comportamento da célula. Porém, com o desenvolvimento de técnicas de isolamento gênico e o conhecimento adquirido sobre oncogenes, um grande progresso foi obtido, tendo em vista o pouco tempo de pesquisas realizadas (Weinberg, 1991). Uma fonte importante na aquisição desse conhecimento proveio de experimentos de genética de células somáticas. A partir da fusão de uma célula normal com uma neoplásica, foi observada a manutenção das propriedades da célula tumoral, mas não da capacidade de indução de tumores em animais.



Tais resultados foram obtidos com neoplasias etiologicamente diversas e também de várias origens teciduais. Foi observado, ainda, que uma linhagem híbrida ocasionalmente induzia tumores e esse comportamento estava associado à perda de um ou mais cromossomos do lote normal. Tais experimentos sugeriram a existência de genes que contribuíam para a inibição da capacidade de induzir tumores (Levine, 1993).

A genética humana clássica forneceu outras evidências sobre a presença de supressores, decorrentes principalmente das observações de Knudson há 20 anos atrás (Knudson, 1971). Ele postulou que o retinoblastoma, um raro tumor infantil de retina, é desencadeado por duas sucessivas lesões no genoma e propôs duas formas distintas da doença: a familiar e a esporádica. Na variante esporádica, as mutações gênicas na linhagem de células da retina surgiriam como eventos somáticos. Por outro lado, a familiar apresentaria uma das mutações adquirida hereditariamente ou originada durante a gametogênese e, portanto, presente em todas as células do organismo. Somente em 1983 foi compreendido que os dois eventos mutacionais propostos envolviam a inativação das duas cópias de um mesmo gene, o gene supressor de tumor RB1, localizado no cromossomo 13. Tornou-se claro, além disso, que a inativação dos alelos RB é recessiva, ou seja, é necessário que ocorra em dose dupla para que resulte no desenvolvimento tumoral (Weinberg, 1991; Levine, 1993). A hipótese de que o gene RB1 atua como um supressor de tumor foi reforçada recentemente pela demonstração de que a introdução da proteína normal em linhagens celulares de retinoblastoma suprime o crescimento tumorigênico (Evans *et al.*, 1992).

Uma outra evidência da presença de genes supressores de tumor foi sugerida pelos mecanismos genéticos envolvendo células neoplásicas que perdem as cópias do gene normal. A primeira cópia pode ser inativada por deleção e a segunda pode ser substituída pelo segmento homólogo do cromossomo mutante. Tais mecanismos, que conduzem à homozigosidade do alelo supressor, afetam também as regiões cromossômicas adjacentes. Assim, marcadores de DNA localizados na proximidade desses sítios cromossômicos, heterozigotos antes da progressão do tumor, convergem igualmente para a condição homozigota. Por exemplo, uma região do cromossomo 18q, que apresenta um DNA marcador altamente polimórfico e portanto heterozigoto na maior parte dos genomas, é encontrada em estado homozigoto em 70% dos carcinomas de cólon (Weinberg, 1991).

Funcionalmente, os genes supressores de tumor atuam em condições normais como barreiras fisiológicas contra a expansão clonal de células transformadas, transduzindo

sinais regulatórios de inibição de crescimento de modo a controlar o delicado balanço entre proliferação celular, diferenciação e morte (Goddard *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1993).

A compreensão dos mecanismos pelos quais os genes supressores de tumor exercem sua ação tem sido objeto de vários estudos nos últimos 10 anos (Weinberg, 1991; Lee & Bernstein, 1993; Levine, 1993). Alguns possuem atividade em determinadas células e consequentemente estão envolvidos na etiologia de relativamente poucos tumores. Outros são de fundamental importância para o crescimento e manutenção de vários tipos celulares e já foram relacionados com diferentes neoplasias, algumas delas hereditárias (Knudson, 1993). Um exemplo é o já citado gene RB1, responsável pelo desenvolvimento do retinoblastoma e do osteossarcoma. Existem evidências experimentais de que a proteína pRb interage e inativa o fator de transcrição E2F na fase G1 do ciclo celular. Durante a passagem para a fase seguinte, a fase S, um complexo formado por ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDK) adiciona grupos fosfatos à pRb. Nesse estado hiperfosforilado, a pRb libera o E2F, que torna-se ativo na transcrição e promove a continuação do ciclo (Hinds & Weinberg, 1991). Outros dois genes que também estão relacionados com a transcrição são o gene TP53, cujas mutações já foram detectadas numa ampla gama de tumores, e o WT1, mapeado no cromossomo 11 e implicado na gênese do tumor de Wilms. Podem ser citados ainda, o NF1 no cromossomo 17, que é encontrado alterado em um tipo de neurofibromatose, e o DCC, no cromossomo 18, que exibe mutações somáticas em células neoplásicas de cólon (Levine *et al.*, 1991; Levine, 1993; Chang *et al.*, 1995).

O entendimento dos mecanismos moleculares pelos quais os oncogenes e genes supressores atuam tem obtido grande avanço a partir do advento da tecnologia de introdução de genes clonados na linhagem germinativa ou em células embrionárias de animais, possibilitando o estudo das suas funções *in vivo*. O oncogene HRAS, por exemplo, tem sido avaliado usando transgenes com sequências reguladoras de genes para queratina, que aumentam sua expressão na epiderme (Fowles *et al.*, 1993). Bailleul *et al.* (1990), com esse tipo de experimentação, registraram hiperqueratose da pele e subsequentemente formação de papilomas em camundongos transgênicos que expressam o oncogene HRAS mutante humano. O gene TP53 também tem sido estudado com sucesso em animais nos quais foram eliminadas as duas cópias desse gene ou, ao contrário, apresentam múltiplas cópias. No primeiro caso, os animais são conhecidos como nulizigotos e não revelam qualquer atividade relativa ao loco em questão. Apesar de mostrarem desenvolvimento normal, manifestam

numerosos linfomas e sarcomas nos primeiros meses de vida (Donehower *et al.*, 1992; Fowles *et al.*, 1993; Hooper, 1994; Lee *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995).

I. 6. O gene TP53 e seu produto

O gene TP53 possui aproximadamente 20 kb e está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) do genoma humano (Isobe *et al.*, 1986; Mc Bride *et al.*, 1986). Contém 11 exons, mas o primeiro não é transcrito. O RNAm possui de 1,8 a 3,0 Kb, dependendo da espécie, e é expresso em todas as células do organismo. O produto desse gene é uma fosfoproteína nuclear de 53 kd composta por 393 aminoácidos, cuja estrutura primária apresenta três domínios distintos relacionados com suas funções. Da porção aminoterminal até o aminoácido 75 possui conformação alfa helicoidal e composição acídica, estando envolvida com a promoção de transcrição. A próxima região, entre os aminoácidos 120 e 290, é capaz de ligar-se a sequências específicas do DNA. A porção terminal da carboxila, dos aminoácidos 290 a 393, contém um sítio para fosforilação por quinase dependente de ciclina e uma região que promove a formação de oligômeros (Donehower *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1994) (Fig. 1).

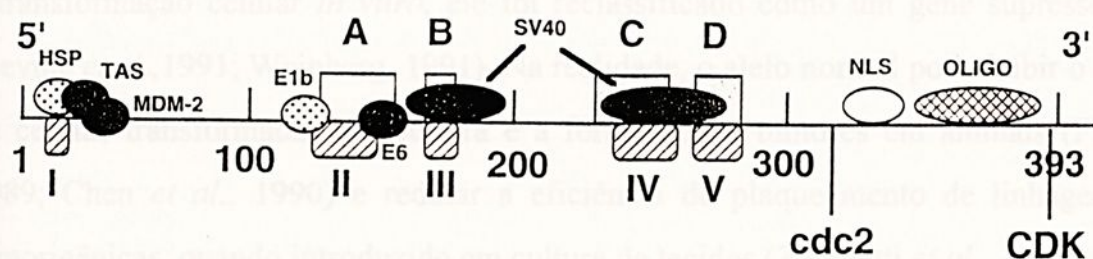


Figura 1. Aspectos estruturais do gene TP53. Os sítios de ativação da transcrição (TAS), de ligação às proteínas de choque térmico (HSP), de ligação ao antígeno T do SV40 (SV40), adenovírus (E1b) e papilomavírus E6, mdm 2 celular, sinal de localização nuclear (NLS), domínio de oligomerização (OLIGO), e sítios de fosforilação (cdc2 e CDK) representam regiões identificadas pelo potencial funcional. Os cinco domínios conservados durante a evolução (HCD I-V) correspondem, mais frequentemente, a regiões preferencialmente alteradas em cânceres esporádicos (*hot spot regions*, HSR A-D) (Malkin, 1994).

O gene TP53 parece estar restrito aos vertebrados, uma vez que as tentativas de indentificá-lo em ouriço do mar, *Drosophila* ou levedura não têm obtido sucesso (Soussi *et al.*, 1990). Porém, é possível que o gene TP53 ou outros com função semelhante estejam presentes nos invertebrados pois o gene humano, quando introduzido em levedura, mostra-se funcionalmente ativo e seu produto exibe características de fator de transcrição e regulador negativo de crescimento (Donehower *et al.*, 1993). A sequência total de aminoácidos da proteína p53, de *Xenopus* até o homem, apresenta razoável homologia (56%). Entretanto, algumas regiões possuem identidade ainda maior, de 90 a 100%. A importância dessa homologia é reforçada pelo fato de que a maior parte das mutações em ponto observadas em cânceres humanos (80 a 90% dos casos) é encontrada nas regiões altamente conservadas (Soussi *et al.*, 1990; Hollstein *et al.*, 1991; Levine, 1993).

A proteína p53 foi descoberta em 1979, em extratos de células de tumores induzidos pelo vírus SV40, onde formava, com um dos produtos virais, um complexo necessário para a manutenção do fenótipo transformado (Lane & Crawford, 1979). Foi, por isso, considerada primeiramente como um antígeno de tumor. A partir daí, foi detectada em uma variedade de células derivadas de tumores e alguns relatos iniciais sugeriram que poderia imortalizar células em cultura de roedores adultos (Jenkins *et al.*, 1984) e cooperar com os oncogenes RAS ativados para transformar fibroblastos embrionários de roedores (Eliyahu *et al.*, 1984; Parada, 1984). Em virtude desses achados, o gene TP53 foi inicialmente considerado um oncogene. Entretanto, após a constatação de que sua propriedade transformante era decorrente da forma mutante e que a proteína normal suprimia a transformação celular *in vitro*, ele foi reclassificado como um gene supressor de tumor (Levine *et al.*, 1991; Weinberg, 1991). Na realidade, o alelo normal pode inibir o crescimento de células transformadas em cultura e a formação de tumores em animais (Finlay *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990) e reduzir a eficiência de plaqueamento de linhagens celulares tumorigênicas, quando introduzido em cultura de tecidos (Zambetti *et al.*, 1993).

Uma característica marcante da proteína mutante é a de que possui meia vida muito superior àquela da correspondente normal, o que resulta no seu acúmulo em grandes quantidades nas células transformadas e de tumores (Levine *et al.*, 1991; Lipponen, 1993). Além disso, a sua conformação é anormal e dependente dos aminoácidos afetados, como indicado por estudos com anticorpos monoclonais. Os vários alelos parecem ter propriedades biológicas e bioquímicas diversas e, possivelmente, pacientes com câncer que apresentam mutações distintas podem também manifestar diferentes prognósticos (Levine *et al.*, 1991).

A primeira evidência genética de alterações no gene TP53 em tumores humanos provem de um estudo realizado por Masuda *et al.* (1987), no qual foram detectados rearranjos no gene em três de seis osteossarcomas analisados. Igualmente sugestivas foram as mutações reveladas pelos estudos de Vogelstein *et al.* (1988) e Yokota *et al.* (1987), que demonstraram perda alélica no cromossomo 17p em carcinomas de cólon e em outros tipos de neoplasias. No entanto, a primeira indicação real de que alterações em ambos os alelos do gene TP53 exerciam um papel fundamental na origem do câncer derivou dos experimentos de Mowat *et al.* (1985), com a infecção de camundongos com o vírus da leucemia Friend. Os autores chegaram à conclusão de que modificações nesse gene, juntamente com outras em oncogenes, contribuíam para o surgimento da eritroleucemia (Levine, 1993).

Hoje sabe-se que mutações no gene TP53 constituem a alteração genética mais comum observada em cânceres humanos (Nigro *et al.*, 1989; Bårtek *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991; Levine, 1993). Estudos retrospectivos revelam que mais de 75% dos carcinomas de cólon apresentam perda de material cromossômico no 17p e que 86% deles têm um rearranjo no alelo remanescente. As mutações são relativamente raras em estádios iniciais (adenomas) desses tumores e estão associadas com a transição do caráter benigno para maligno da neoplasia (carcinomas). Dessa forma, os dados são realmente consistentes com a suposição de que o gene TP53 normal é um supressor de tumor que inibe o crescimento anormal de células e que a sua perda pode ser um evento genético fundamental que conduz à malignização desses tumores (Fearon *et al.*, 1990; Donehower & Bradley, 1993).

Na verdade, existem muitos dados sobre alterações no gene TP53. Por exemplo, carcinomas como os de ovário e endométrio exibem expressão elevada da proteína em aproximadamente 10 a 15% das lesões iniciais e em 40 a 50% daquelas em estádios mais avançados e apresentam mutações nas regiões conservadas do gene (Berchuck *et al.*, 1994). São igualmente observadas mutações frequentes em câncer de laringe (Zhang *et al.*, 1994), de esôfago e gástrico (Stemmermann *et al.*, 1994), de próstata (Bookstein, 1994), e de mama (Elledge & Allred, 1994; Lemoine, 1994), e em astrocitomas (Debiec-Richter & Liberski, 1994; Louis, 1994; Pomeroy, 1994).

A natureza e o tipo de mutação observada depende, sobretudo, do tecido de origem. Assim por exemplo, em carcinomas, as mutações com troca de aminoácidos correspondem a mais de 80% do total observado. Em sarcomas, as deleções, inserções e outros rearranjos são mais comuns, sendo as mutações em ponto muito raras (Nigro *et al.*, 1989; Levine, 1993). Além da natureza do tecido envolvido, existem indícios de que o tipo



de mutação esteja relacionado com os agentes mutagênicos ambientais. Exemplos disso são as transversões (G→T) no códon 249 do gene, em tumores de fígado de indivíduos chineses e africanos expostos à aflatoxina B1, que é um contaminante alimentar comum nessas populações e potente carcinógeno (Hsu *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1993; Donehower *et al.*, 1993). Reforçando essa associação, estão os achados de alteração idêntica em hepatócitos humanos submetidos *in vitro* a essa substância (Cerutti *et al.*, 1994). Outros exemplos têm sido sugeridos em tumores de laringe, que mostram transições e transversões associadas com tabagismo (Zhang *et al.*, 1994), em carcinomas colorretais com substituições C→T e G→A em ilhas CpG, possivelmente desencadeadas por oxi-radicais como o óxido nítrico (Cerutti, 1994) e em lesões de pele com transições C→T causadas pela luz UV (Greenblatt *et al.*, 1994). Assim, a frequência e o tipo de mutações no TP53 podem ser usados como dosímetro molecular de exposição a carcinógenos e, dessa forma, fornecer informações acerca da epidemiologia molecular do risco de câncer humano (Harris, 1993).

Além das mutações no gene TP53 causadas por agentes ambientais, vários estudos recentes têm demonstrado mutações herdadas em diferentes pacientes de alto risco para o desenvolvimento de processos malignos. Um desses grupos é afetado pela síndrome de Li-Fraumeni (SLF), que tem herança autossômica dominante com penetrância alta e é caracterizada pela aumentada susceptibilidade a uma variedade de tumores. Os mais frequentes são os carcinomas de mama, os sarcomas de tecidos moles, os tumores cerebrais, os osteossarcomas e as leucemias (Leblanc & Soussi, 1994). Portadores do gene têm probabilidade de 50% de desenvolver câncer até os 30 anos, enquanto essa probabilidade é de 1% na população geral (Malkin, 1994). Todas as mutações inicialmente encontradas nessa síndrome foram pontuais e restritas aos éxons 7, entre os códons 242 e 258 (Eng *et al.*, 1993). No entanto, análises recentes têm demonstrado mutações germinativas envolvendo também os éxons 4 a 9 (Donehower *et al.*, 1993).

Outras formas de suscetibilidade ao câncer relacionadas com o gene TP53 podem ocorrer. Uma delas, descrita por Barnes *et al.* (1992), caracteriza-se por acúmulo de altos níveis da proteína não mutante, tanto em células normais quanto nas tumorais, e neoplasias múltiplas em idade precoce. Existem indicações de que esses pacientes herdam uma mutação em outro gene que não o TP53, que de alguma forma atua na estabilização da proteína p53 normal.

I.6.1. Mecanismos de ação da proteína p53

O estudo do mecanismo de ação da proteína p53 normal foi inicialmente realizado em células transformadas pelo vírus SV40 e sugeriu seu envolvimento com o processo de iniciação da duplicação do DNA. Posteriormente, análises topográficas da molécula revelaram seu papel como regulador da transcrição gênica, em especial pelo fato de ter um domínio com capacidade de ligação ao DNA (Levine *et al.*, 1991; Lane, 1992). A sequência de DNA humano capaz de ligar-se ao produto p53 normal, mas não a formas aberrantes, foi identificada por Kern *et al.* (1991) e compreende um segmento de 33 pares de bases.

Os primeiros experimentos de transfecção do gene TP53 mutante demonstraram que sua proteína é capaz de imortalizar condrócitos de ratos. Estudos mais recentes sugerem que nem todos os mutantes apresentam o mesmo tipo de atividade transformante e podem ser divididos em duas classes: aqueles que perdem a habilidade em suprimir a transformação e que são apenas fracamente transformantes, e os mutantes oncogênicos dominantes que, adicionalmente à sua perda de função supressora, participam ativamente na transformação celular (Donehower *et al.*, 1993).

Correlacionada com o potencial de transformação, está a característica da molécula p53 em formar complexos com proteínas heterólogas, tais como o antígeno T do vírus SV40 e a proteína de 55kDa do adenovírus E1B. Em células que exibem tais complexos, não ocorre a ativação de genes dependentes da p53, o que parece ser crítico para a transformação celular (Sarnow, 1982; Malkin, 1994). Ao contrário, na presença de mutantes E1B, cujas proteínas são incapazes de formar complexos, foi demonstrada a atividade normal da p53 e a redução severa do potencial transformante do adenovírus. Uma outra classe de oncoproteínas virais que apresenta a mesma característica de ligar-se à p53 é a proteína E6 do papilomavírus humano dos grupos HPV-16 e HPV-18, sabidamente associados com tumores anogenitais (Werness *et al.*, 1990; Berchuck *et al.*, 1994).

Além da habilidade de ligação a moléculas heterólogas, a proteína p53 é capaz de agrupar-se formando oligômeros. Experimentos que utilizaram células de teratocarcinoma ou estudos *in vitro* de tradução em lisados de reticulócitos sugeriram a formação de dímeros ou tetrâmeros de p53. As proteínas mutantes, de conformação alterada, também podem conjugar-se com a forma selvagem, levando essa última a adquirir uma conformação anômala (Milner *et al.*, 1991). Tal ação, aparentemente dominante negativa sobre a molécula



normal, tem implicações óbvias no mecanismo pelo qual as mutantes podem abolir a função da p53 em uma célula com os dois tipos de alelos (Donehower *et al.*, 1993).

Algumas mutações, que alteram o terminal carboxila, afetam a capacidade de oligomerização da proteína (Milner *et al.*, 1991). Já foi detectada uma p53 monomérica, que perde sua capacidade de ligação ao DNA, porém exibe função ativadora de transcrição aumentada (Tarumina *et al.*, 1993). Por outro lado, tem sido relatado que a superprodução de p53 normal pode conduzir à oligomerização e perda de atividade, indicando uma correlação entre estabilidade aumentada de p53 e transformação celular (Kraiss *et al.*, 1991).

Maxwell & Roth (1994) sugerem que proteínas celulares atuam na estrutura terciária da p53, o que resulta em moléculas com conformações diversas que interagem diferentemente com os complexos de iniciação nos promotores e nas regiões do DNA iniciadoras da duplicação. Assim, diferentes formas da p53 teriam efeitos biológicos distintos, desde a supressão até a promoção da proliferação. Segundo essa hipótese, cada célula e tecido pode expressar quantidades e tipos específicos dessas proteínas ligantes, que determinam o controle do crescimento do tecido em questão. Alguns exemplos de proteínas celulares capazes de se ligar à p53 são a proteína 70 do choque térmico (HSP70), que se associa a formas mutantes, e a proteína celular de 90 kDa, observada em associação com a p53 após imunoprecipitação com anticorpos monoclonais específicos (Hinds *et al.*, 1994). A sequência de aminoácidos dessa última é essencialmente idêntica ao produto gênico detectado em roedores, o mdm-2, que parece consistir de um regulador de transcrição. O gene MDM-2 (*murine double minute 2 gene*) já foi observado amplificado em linhagens celulares (Donehower *et al.*, 1993) e em uma fração significativa de sarcomas (Oliner *et al.*, 1992). Tal amplificação, que parece estar restrita a um limitado subgrupo de tumores humanos (Waber *et al.*, 1993), provavelmente interfere na atividade da proteína p53 (Malkin, 1994). Sua introdução em linhagens celulares de camundongo aumenta o potencial tumorigênico dessas células e, quando transfectado juntamente com o TP53, resulta em redução na ativação gênica realizada por esse último. Parece evidente, portanto, que a mdm-2 atua inibindo a ação da p53 normal e remove seus efeitos regulatórios de forma análoga às proteínas virais (Finlay, 1993). É interessante que a p53 também atua sobre o MDM-2, induzindo sua síntese e, aparentemente, as atividades dos dois genes são antagônicas e devem fazer parte de um processo de auto-regulação gênica (Barak *et al.*, 1993).

Em relação ao papel da proteína p53 de ativador da transcrição, deve ser referido que essa função está relacionada com o caráter ácido do domínio aminoterminal,



similar àquele observado em muitos fatores de transcrição. Como já foi citado, a p53 pode ligar-se a sequências específicas do DNA (Kern *et al.*, 1991; Zambetti *et al.*, 1992). A primeira evidência funcional dessa atividade resulta dos experimentos de Fields & Jang (1990) e Raycroft *et al.* (1991). Esses pesquisadores demonstraram que a fusão da região aminoterminal da p53 ao domínio ligante de DNA do GAL 4 (galactokinase) de levedura, gera uma proteína quimérica que ativa a transcrição do promotor GAL 4. Estudos subsequentes localizaram o domínio de transativação entre os códons 20-42 e observaram que várias proteínas p53 aberrantes também apresentam propriedades de fatores de transcrição (Raycroft *et al.*, 1991).

É interessante notar que diferentes mutantes encontrados em cânceres humanos variam na sua habilidade em inibir a ativação transcricional e na sua atividade de ligação específica ao DNA em relação à p53 normal. Além disso, proteínas com deleção da porção aminoterminal, incapazes de ativar a transcrição mas com capacidade de se ligar ao DNA, ainda apresentam alguma atividade supressora *in vitro*, sugerindo que funções adicionais da p53 podem contribuir para a supressão da transformação (Unger *et al.*, 1993).

Os experimentos realizados em 1984 por Maltzman e colaboradores mostraram que o tratamento de linhagens de fibroblastos de camundongos com luz UV ou drogas de efeito semelhante à UV resulta em rápido aumento nos níveis da proteína p53, em parte pelo aumento da estabilidade da molécula. Esses dados foram corroborados por análises de irradiação UV em pele humana intacta (Hall *et al.*, 1993; Healy *et al.*, 1994), que indicaram um papel potencial para a p53 no controle do ciclo celular após lesão do DNA. Outros estudos sobre a produção elevada de p53 normal em células tumorais sugeriram três padrões de atividade biológica normal: a supressão da proliferação celular, a indução de morte celular programada ou apoptose (Weinberg, 1991; Show *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1994) e a indução de diferenciação (Mercer *et al.*, 1991; Rotter *et al.*, 1994). Nos modelos propostos por Kastan *et al.* (1992) e Lane (1992), o papel da p53 é atuar como uma espécie de guardião molecular da integridade genômica. Se o DNA é danificado, a p53 é induzida, estabilizada ou ativada e bloqueia a célula na fase G₁ do ciclo celular para que a lesão seja reparada. Se a injúria não puder ser retirada, a p53 inicia um processo de morte celular programada e, nas células em que a função p53 é perdida, desenvolve-se um estado de instabilidade genética que pode culminar em amplificações gênicas, aneuploidia e outras aberrações cromossômicas, responsáveis pela evolução e progressão tumoral (Smith & Fornace, 1995). Esse modelo, em concordância com o conhecimento presente sobre o

produto do gene TP53, está sujeito a modificações na medida em que outras informações forem acumuladas, embora não reste dúvidas que ele exerce importante papel na regulação do ciclo celular.

Uma questão relevante a ser levantada nesse ponto se refere aos genes que são ativados ou reprimidos pela proteína p53. Deffie *et al.* (1993) sugerem que a p53 normal ativa seu próprio promotor, enquanto a proteína mutante perde essa propriedade. A proteína p53 também leva à expressão de genes tais como o MDM-2, o GADD45 (*growth arrest and DNA damage gene*) e o WAF1/CIP1 (Mr 21.000 protein/potent inhibitor of cyclin dependent kinases) e à regulação negativa do BCL2, que aparece alterado com frequência em linfomas da célula B. A proteína mdm2, como já foi citado, inativa a função promotora de transcrição da p53 e, conseqüentemente, remove os seus efeitos negativos sobre o ciclo celular (Donehower & Bradley, 1993; El-Deiry *et al.*, 1993, 1994; Hoffman & Liebermann, 1994; Levine *et al.*, 1994; Sidransky, 1995). O produto do gene GADD45 é sintetizado em resposta a agentes genotóxicos e pode associar-se com o PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Tal interação parece estimular o reparo do DNA por excisão realizado por esse antígeno ou, então, deslocar o PCNA de complexos de duplicação, o que poderia auxiliar na inibição da proliferação (Smith *et al.*, 1994). A proteína bcl2, por sua vez, protege a célula da morte programada e confere resistência a muitos agentes biológicos e quimioterápicos, tendo sido detectada em níveis elevados em carcinomas cutâneos (Hockenbery, 1994). Um gene relacionado com o BCL2, o BAX, também é regulado pela p53 mas, ao contrário, acelera a apoptose e, aparentemente, é o equilíbrio bcl2/bax que determina a sobrevivência ou a morte celular (Hoffman & Liebermann, 1994).

O produto do gene WAF1/CIP1 inibe a atividade de quinases dependentes de ciclinas e provavelmente controla dessa forma a divisão celular. Alguns autores têm observado variantes polimórficas no gene WAF1/CIP1 (Li *et al.*, 1995) que, em certos casos, são mais frequentes nas amostras provenientes de tumores sem mutação do TP53 que em amostras de tumores com mutantes p53 (Mousses *et al.*, 1995). Tais achados sugerem que esses polimorfismos não são benignos e podem mesmo levar a um risco maior de neoplasias.

A p21 é estimulada pela forma normal, mas não mutante, da p53 durante a resposta a lesões provocadas no DNA, resposta essa que resulta em supressão de crescimento e apoptose. Além de interagir com quinases dependentes de ciclinas, liga-se também ao PCNA, participando assim do bloqueio do ciclo celular e do controle da duplicação do DNA (El-Deiry *et al.*, 1993, 1994; Mousses *et al.*, 1995). Alguns dados recentes mostram que,



após doses biologicamente significativas de UV, ela é induzida em queratinócitos diretamente pela p53 (Mousses *et al.*, 1995).

1.6.2. A proteína p53 - Aspectos imunohistoquímicos

Desde as primeiras evidências da correlação entre alterações da proteína p53 e neoplasias (Crawford *et al.*, 1982), muitos estudos vêm sendo desenvolvidos e anormalidades do gene TP53 podem ser detectadas por várias abordagens experimentais. Por exemplo, alterações cromossômicas da banda 17p13 podem ser observadas diretamente por hibridação *in situ* e mutações gênicas podem ser aferidas indiretamente por análise de polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), por polimorfismos de conformação de fita simples (SSCP) ou, diretamente, por sequenciamento dos éxons (Baker *et al.*, 1989; Nigro *et al.*, 1989; Hall & Lane, 1994). Finalmente, anormalidades da proteína p53 podem ser investigadas por métodos imunoquímicos, incluindo os imunohistoquímicos (IHQ). O uso de anticorpos por esses métodos é dependente de quantidade suficiente de p53 preservada e retida nos tecidos que, por sua vez, está relacionada com a meia vida da proteína. De maneira geral, a meia vida da p53 normal é tão pequena (cerca de 15 minutos) que não permite detecção por métodos imunohistoquímicos. Nos casos em que é observada imunorreatividade, o resultado deve refletir mutação, produção elevada ou estabilização e acúmulo da proteína. A confirmação de uma dessas situações pode ser realizada por métodos moleculares mas uma correlação entre mutação e expressão elevada nem sempre tem sido observada (Campbell *et al.*, 1993b; Kubo *et al.*, 1994; Mc Nutt *et al.*, 1994).

Os anticorpos desenvolvidos para a detecção da p53 são monoclonais ou policlonais. O PAb 1801 é um anticorpo monoclonal de camundongo que se liga aos aminoácidos 32 a 79 das formas mutante e normal, embora não as discrimine (Banks *et al.*, 1986). Os anticorpos DO1 e DO7 têm propriedades semelhantes e ligam-se a epítomos de uma região altamente conservada, próxima ao aminoterminal, mas distante da área geralmente afetada por mutações (Cristofolini *et al.*, 1993). O anticorpo PAb 240 reage apenas com a forma mutante, em virtude de sua ligação com epítomos conformacionais decorrentes das mutações mais comuns (Helander *et al.*, 1993). Outros anticorpos compreendem o BP53-12 e o BP53-24, que se conjugam a epítomos desconhecidos das duas formas da p53, e o PAb 421 que reage somente com a forma normal, entre os aminoácidos 370-378 (Harlow *et al.*, 1981; Helander *et al.*, 1993). Entre os anticorpos policlonais para a

proteína p53, devem ser ressaltados o CM-1, que reconhece ambas as formas da molécula e tem sido bastante utilizado nos últimos anos, e o JG8, produzido a partir de coelhos imunizados e que também reconhece ambas as formas da proteína p53 (Gusterson *et al.*, 1991; Midgley *et al.*, 1992).

A análise imunohistoquímica de p53 em tumores apresenta resultados controversos em muitos casos. Assim, Porter *et al.* (1992) relatam a presença de marcação positiva em 39% das diferentes amostras estudadas, enquanto Bártek *et al.* (1991) registram valores de 76%. Quando são consideradas neoplasias específicas, a variação também é grande, embora deva ser ressaltado que anticorpos distintos são usados por diferentes estudos. Por exemplo, entre os cânceres colorretais, a marcação positiva varia de 5% (Scott *et al.*, 1993) até 55% (Monden *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1992). O mesmo é válido para os tumores de mama e ovário com valores de 22 a 92% (Davidoff *et al.*, 1991; Porter *et al.*, 1992) e de colo de útero com valores de 26 a 87% (Oka *et al.*, 1993; Lambkin *et al.*, 1994).

Para ser utilizada na prática clínica, a avaliação imunohistoquímica da p53 precisa fornecer informações relevantes, particularmente relacionadas a diagnóstico ou prognóstico. Alguns autores sugerem, em seus estudos, a associação entre acúmulo de p53 e expectativa de vida (Martin *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1992; Sarkis *et al.*, 1993). Renedo & Trainer (1994) também referem a utilidade desse método na detecção de células malignas em neoplasia da célula germinativa intratubular e teratoma. Outros estudos descrevem formas mutantes em estádios pré-malignos que precedem o carcinoma gástrico (Correa & Shiao, 1994) e em carcinoma inicial e epitélio atípico de vesícula biliar (Yabar & Watanabe, 1994), o que pode ser importante no diagnóstico desses tumores. É igualmente citada a frequência maior de expressão elevada da p53 em carcinomas de laringe que em displasia do mesmo órgão (Gorgoulis *et al.*, 1994). Apesar desses resultados, outros trabalhos, como os de Oka *et al.* (1993) e Lipponen (1993), não encontraram uma correlação consistente para uso prognóstico ou diagnóstico entre o acúmulo de p53 e o estado neoplásico. Apenas a análise molecular conjunta poderá estabelecer, então, o valor do processo imunohistoquímico na sensibilidade e especificidade da detecção de mutações (McNutt *et al.*, 1994).

1.6.3. O gene TP53 e os tumores de pele

Nos últimos anos, diferentes estudos têm revelado mutações no gene TP53 em tumores cutâneos, tais como carcinomas baso e espinocelulares, ceratoses solares e



melanoma. É interessante que muitas dessas mutações são transições C→T em sítios de dipirimidinas além de substituições CC→TT, que são sabidamente específicas da radiação UV (Brash *et al.*, 1991; Rady *et al.*, 1992; Mòles *et al.*, 1993a; McNutt *et al.*, 1994). Em lesões de pele de pacientes com XP, 100% das mutações são em sequências de pirimidina-pirimidina, a maioria delas do tipo CC→TT, ao contrário das neoplasias internas que raramente apresentam tais transições (Sato *et al.*, 1993; Dumaz *et al.*, 1994). Kanjilal *et al.* (1993) também revelaram a existência de mutações no gene TP53, predominantemente transições C→T, em tumores de pele de roedores induzidos por radiação UV. Esses achados sugerem que tais mutações podem ser um dosímetro biologicamente relevante de exposição à UV e um possível indicador do risco de desenvolvimento do câncer de pele (Nakazawa *et al.*, 1994). Embora ainda limitados, favorecem a hipótese de que essas mutações participam de um dos passos da progressão tumoral, conectando diretamente um carcinógeno com o gene envolvido (Brash *et al.*, 1991; Mòles *et al.*, 1993a; Nagano *et al.*, 1993; Tornaletti *et al.*, 1993).

A detecção imunohistoquímica da proteína p53 mutante tem sido referida em modelos animais durante a transformação epidérmica e na progressão para o estágio maligno da neoplasia (Han *et al.*, 1992). Na espécie humana, diferentes estudos têm observado em carcinomas baso e espinocelulares imunorreatividade para a p53, que varia entre 42 a 92% dos casos (Barbareschi *et al.*, 1992; Mc Gregor *et al.*, 1992; Shea *et al.*, 1992; Slater *et al.*, 1992; Stephenson *et al.*, 1992; Burns *et al.*, 1993; Helander *et al.*, 1993; Nagano *et al.*, 1993; Ro *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993; Oram *et al.*, 1994). Em melanomas, a controvérsia dos resultados é muito grande. Ro *et al.* (1993) obtiveram resultados negativos para acúmulo de p53 e Castresana *et al.* (1993), utilizando técnicas moleculares, concluíram que o gene TP53 não está envolvido no desenvolvimento desses tumores. Ao contrário, vários autores (Stretch *et al.*, 1991; Akslen & Morke, 1992; Cristofolini *et al.*, 1993; Mc Gregor *et al.*, 1993; Yamamoto e Takahashi, 1993; Weiss *et al.*, 1993) observaram células positivas em 30 a 97% dos casos analisados. No estudo de Florenes *et al.* (1994), foi detectado que, nessa neoplasia, os níveis elevados da proteína p53 estão aparentemente associados ao retardamento na manifestação de metástases mas não à tumorigênese. Por outro lado, outros trabalhos têm concluído que o acúmulo da proteína é um evento tardio na progressão do melanoma (Lassan *et al.*, 1993) e está correlacionado com a agressividade da doença (Yamamoto & Takahashi, 1993; Basset-Séguin, 1994).



Em ceratose actínica vários autores têm encontrado grupos de queratinócitos, aparentemente normais, imunorreativos para a proteína p53. A marcação parece restrita às células da camada basal, enquanto que as suas derivadas das camadas superiores mostram-se negativas, o que leva à interpretação de que a positividade não se deve à mutação mas possivelmente a uma elevação transitória do conteúdo protéico (McGregor *et al.*, 1992; Sim *et al.*, 1992; Mc Nutt *et al.*, 1994; Taguchi *et al.*, 1994). Em doença de Bowen, a presença da proteína p53 também foi observada, tanto nas células do tumor como naquelas de áreas de epiderme normal adjacente (Szekeres & Giacomoni, 1994).

Estudos realizados com ceratoacantoma (McGregor *et al.*, 1992; Stephenson *et al.*, 1992; Kerchmann *et al.*, 1994) e com poroqueratose (Magee *et al.*, 1994) têm relatado a presença de parcela significativa de casos positivos e, curiosamente nessa última, a marcação está concentrada nas camadas mais profundas da epiderme, de forma semelhante à ceratose solar.

Embora os dados sejam algumas vezes controversos é possível concluir que, de maneira geral, as mutações no gene TP53 são relativamente comuns em cânceres da pele, bem como a detecção de acúmulo da sua proteína nas células epidérmicas neoplásicas. As diferenças entre os resultados dos diversos grupos podem ser explicadas, em parte, por etiologias distintas, diferenças entre as amostras analisadas, quanto à exposição a carcinógenos, ou ainda por divergências técnicas, principalmente relacionadas com a metodologia imunohistoquímica.

I.7. Objetivos

Pelo exposto, fica evidente que a detecção da proteína p53 mutante é possível devido ao seu acúmulo na célula, uma vez que apresenta sobrevida muito maior em relação à correspondente normal. Além disso, os estudos imunohistoquímicos constituem um método válido no rastreamento de alterações do gene TP53 e já foram detectados mutantes na maior parte dos tumores humanos, incluindo melanomas, carcinomas espinocelulares da pele e carcinomas basocelulares. Um aspecto importante é que a técnica pode revelar pequenas áreas ou focos de células alteradas, o que não é possível através das técnicas existentes.



Em vista disso, e pela importância dos tumores de pele como material de estudo para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese, é proposto o presente trabalho que tem como objetivos:

1. Detectar a presença e a localização intracelular de quantidades alteradas da proteína p53 em lesões pré-malignas e malignas da pele, através do método imunohistoquímico.
2. Comparar os achados observados nos dois grupos de lesões entre si e com os dados da literatura.
3. Comparar os achados observados nas lesões expostas e não expostas à radiação solar.
4. Fornecer subsídios para posteriores investigações moleculares de mutações no gene TP53 ou em genes efetores do TP53.

11.2. Métodos

O material utilizado no presente estudo, segundo informações do laboratório de patologia, foi fixado em solução de formol 37% por um período de 12 a 24 horas e incluído em parafina, segundo procedimentos usuais de desidratação, diátese e impregnação.

Para a detecção imunohistoquímica da proteína p53 foi empregado o método de avidina-biotina-peroxidase, com revelação pelo composto diaminobenzidina (DAB), utilizando o anticorpo monoclonal Pab 1801 (IgG1 de camundongo anti-P53, Oncogene Science, p53 Ab-2). Esse anticorpo reconhece, mas não discrimina, formas normais e mutantes da proteína humana p53 em cortes histológicos de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina (McNutt et al., 1994).

O procedimento experimental imunohistoquímico foi realizado em duas etapas, em três laboratórios distintos, com pequenas diferenças metodológicas entre eles. A primeira etapa foi efetuada no Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer (SP) e no Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP (São José do Rio Preto). A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Ribeirão Preto).

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Material

No presente trabalho, foram analisadas 30 amostras de ceratose solar, 31 de carcinoma espinocelular e 31 de epiteloma basocelular. As amostras compreenderam material de exérese dermatológica, embocado em parafina e cedido pelo Laboratório de Patologia do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto. O diagnóstico histopatológico foi fornecido pelo mesmo serviço.

A seleção dos casos obedeceu à ordem cronológica dos registros do referido laboratório e teve início nos espécimes datados de outubro de 1992. As lâminas do diagnóstico histopatológico foram igualmente examinadas como critério para seleção, de forma a evitar preparações muito pequenas ou pouco informativas. Casos que apresentavam análise citogenética prévia foram também incluídos no estudo.

A caracterização da amostra, no que se refere a dados dos pacientes, como idade, sexo, localização e ocorrência isolada ou múltipla da lesão foi feita nas tabelas 1, 2 e 3.

II.2. Métodos

O material utilizado no presente estudo, segundo informações do laboratório de patologia, foi fixado em solução de formol 37% por um período de 12 a 24 horas e incluído em parafina, seguindo processos usuais de desidratação, diafanização e impregnação.

Para a detecção imunohistoquímica da proteína p53 foi empregado o método da avidina-biotina peroxidase, com revelação pelo composto diaminobenzidina (DAB), utilizando o anticorpo monoclonal Pab 1801 (IgG1 de camundongo anti-P53, Oncogene Science, p53 Ab-2). Esse anticorpo reconhece, mas não discrimina, formas normais e mutantes da proteína humana p53 em cortes histológicos de amostras fixadas em formalina e embocadas em parafina (McNutt et al., 1994).

O procedimento experimental imunohistoquímico foi realizado em duas etapas, em três laboratórios distintos, com pequenas diferenças metodológicas entre elas. A primeira etapa foi efetuada no Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer (SP) e no Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP (São José do Rio Preto). A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Ribeirão Preto).



Tabela 1. Caracterização das amostras de ceratose solar estudadas quanto ao sexo (M: masculino, F: feminino), idade (em anos), ocorrência isolada (I) ou múltipla (Mt) e região afetada (Fa: face, Me: membros, T: tórax, P: pescoço) de seus portadores. (D: desconhecido).

Amostra	Sexo	Idade	Ocorrência	Região Afetada
B89 807	F	55	Mt	Fa
B89 1006	M	69	Mt	Me
B92 6449 A	M	63	Mt	Fa
B93 1744	F	66	Mt	Me
B93 1829	F	45	I	T
B93 2005	F	70	I	Fa
B93 2084	M	75	I	P
B93 2089	M	68	I	Me
B93 2293	M	44	I	Fa
B93 2322 A	F	78	Mt	Me
B93 2359 B	F	52	Mt	Me
B93 2410	F	17	I	Fa
B93 2660	M	67	I	T
B93 3493 B	M	68	Mt	Fa
B93 3504 C	M	64	Mt	Me
B93 3560	F	45	I	Fa
B93 3669	F	60	Mt	Me
B93 3897	F	54	Mt	Fa
B93 4062	M	75	I	T
B93 4071	F	90	Mt	Fa
B93 4698	F	50	I	Fa
B93 4889 A	F	76	Mt	Fa
B93 4974	F	79	D	D
B93 5006	F	69	Mt	Fa
B93 5160 C	M	78	Mt	Fa
B93 5171	F	45	I	Fa
B93 5510	F	50	D	D
B93 5588	F	63	I	Fa
B93 5601	M	56	I	Fa
B93 5605	F	69	Mt	T



Tabela 2. Caracterização das amostras de carcinoma espinocelular estudadas quanto ao sexo (M: masculino, F: feminino), idade (em anos), ocorrência isolada (I) ou múltipla (Mt) e região afetada (Fa: face, Me: membros, T: tórax, P: pescoço) de seus portadores. (D: desconhecido).

Amostra	Sexo	Idade	Ocorrência	Região Afetada
B89 629	M	69	Mt	Me
B89 1807 A	M	58	Mt	Fa
B89 1904 A ^a	F	78	Mt	Fa
B91 1186 ^a	F	80	Mt	T
B92 6321	M	54	I	Fa
B92 6392	F	78	Mt	Me
B93 165	F	76	Mt	Fa
B93 179	F	81	I	Me
B93 221	F	76	Mt	T
B93 234 A ^b	M	63	Mt	Fa
B93 234 B ^b	M	63	Mt	Fa
B93 277 A	M	71	Mt	Fa
B93 287	F	87	Mt	Fa
B93 1830 ^c	F	62	Mt	Me
B93 2322 B	F	78	Mt	Me
B93 2329 A	M	50	Mt	Fa
B93 2337	F	63	I	Fa
B93 2662 ^c	F	62	Mt	Fa
B93 2849 B	M	76	Mt	Fa
B93 2871	F	61	I	Fa
B93 2916	F	61	I	Fa
B93 3014 B	M	67	Mt	Fa
B93 3096	F	47	Mt	T
B93 3107	F	21	I	D
B93 3271	F	63	Mt	Fa
B93 3377	M	74	I	Fa
B93 3498	M	68	Mt	Fa
B93 3504 B	M	64	Mt	Me
B93 3640 ^c	F	62	Mt	Fa
B93 3723	M	51	Mt	Me
B93 3849	M	45	I	Fa

a,b,c = amostras dos pacientes 17, 3 e 23 respectivamente (Tab. 8)

Tabela 3. Caracterização das amostras de carcinoma basocelular estudadas quanto ao sexo (M: masculino, F: feminino), idade (em anos), ocorrência isolada (I) ou múltipla (Mt) e região afetada (Fa: face, Me: membros, T: tórax, P: pescoço) de seus portadores.

Amostra	Sexo	Idade	Ocorrência	Região Afetada
B89 1030 ^a	M	70	M	Fa
B89 1449 ^a	M	70	M	Fa
B89 1561	F	56	I	Fa
B89 1843 B	F	76	M	Fa
B89 2327	M	63	I	P
B89 2764 B	M	74	M	Fa
B89 2812 A ^b	F	77	M	Fa
B89 2812 B ^b	F	77	M	Fa
B89 3161	M	49	I	Fa
B89 3855	M	58	M	Fa
B91 430 A ^c	F	55	M	Fa
B91 489	F	68	I	Fa
B91 1531 ^c	F	55	M	Fa
B91 1655 ^a	M	72	M	Fa
B91 2266 ^c	F	55	M	Fa
B91 4002 A ^c	F	55	M	Fa
B91 5457 B ^a	M	72	M	P
B92 601	F	33	I	Fa
B92 6370	M	62	I	P
B92 6450 B	M	71	M	Fa
B93 53 A	M	64	M	T
B93 265	F	88	M	Fa
B93 314 B	F	85	M	Fa
B93 1718 A	F	53	M	Fa
B93 2322 C	F	78	M	Me
B93 2359 A	F	52	M	Me
B93 2761	F	67	M	Fa
B93 2849 C	M	76	M	Fa
B93 3493 A	M	68	M	Fa
B93 4889 B	F	76	M	Fa
B93 5160 B	M	78	M	Fa

a, b, c = amostras dos pacientes 30,32 e 33 respectivamente (Tab.8)

II.2.a. Protocolo Experimental

Cortes histológicos de 6 μm de espessura foram montados em lâminas revestidas com organosilano (na primeira etapa) e com cola comum, tipo tenaz, diluída em água (na segunda fase). Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em série de etanol (100, 95 e 70). A seguir, lavados em água destilada e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos. Esse procedimento foi realizado com água oxigenada 30 volumes em solução de metanol 30% (na primeira etapa) ou em água destilada (segunda etapa), por 30 minutos. A seguir, os cortes foram lavados em PBS para posterior tratamento com soro de cavalo (Kit ABC, Vectastain, Vector), diluído 20 vezes em PBS, por 30 minutos, com a finalidade de bloquear os sítios de ligação inespecífica de IgG. Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo PAb 1801 diluído 500 vezes em PBS, à temperatura ambiente.

Após um período de incubação de aproximadamente 18 horas, os cortes foram lavados em PBS e foi aplicado o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo, biotilado (Kit ABC, Vector), diluído 200 vezes em PBS por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS para posterior incubação com o complexo ABC (avidina-biotina peroxidase, Kit Vector), por 30 minutos. Ao final desse tempo, os cortes foram lavados em PBS e as reações reveladas com o substrato da peroxidase, ou seja, com água oxigenada 1%, na presença do cromógeno diaminobenzidina (5mg DAB/10ml PBS). Finalmente, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados em etanol e diafanizados em xilol para montagem permanente com Entelan (Merck). A imunorreação, como critério de positividade, foi visualizada pela presença de pequenos grânulos de cor castanha distribuídos de forma relativamente uniforme nas células.

Foram utilizados dois controles, o positivo e o negativo. Como positivo foi empregada uma amostra, gentilmente fornecida pelo Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, de um carcinoma espinocelular de pênis, com expressão elevada da proteína p53 e mutação no gene correspondente, essa última confirmada por PCR-SSCP (*polimerase-chain reaction, single strand conformation polymorfism*). Como controle negativo foi utilizada a mesma amostra, porém foi omitida a incubação com o anticorpo primário.



II.2.b. Análise microscópica

A análise foi realizada em microscópio de luz, baseada na proposta de Jiko *et al.* (1993) e Kerschmann *et al.* (1994), com modificações. Assim, os cortes foram submetidos a rastreamento total em menor aumento (100x) e para cada um foi lançado um valor global de positividade. Quando os cortes não apresentavam qualquer sinal de imunorreação, foram consideradas negativas. Por outro lado, foram consideradas portadoras de positividade focal quando exibiam pequenos grupos de células positivas que representavam, sem deixar dúvida, menos de 5% do total de células. Nos casos em que a marcação era nitidamente maior que 5%, foram atribuídos níveis de expressão da proteína p53, correspondentes à porcentagem de núcleos imunocorados na área total do corte histológico. São eles:

5 a 25 % - nível 1

26 a 50 % - nível 2

51 a 75 % - nível 3

mais de 75 % - nível 4

Após essa primeira análise, os cortes de amostras com marcação nuclear positiva foram avaliadas quanto à densidade de marcação, através da porcentagem de células imunocoradas observadas em campos microscópicos de maior aumento (400x). Foram contadas de 500 a 600 células em regiões com grande marcação, cuja intensidade foi classificada qualitativamente em fraca (f), média (M) e forte (F).

Os três parâmetros considerados na análise microscópica foram: os níveis de expressão da proteína, a densidade e a intensidade de marcação.

Em virtude de referências a formas mutantes da proteína p53 que estão presentes no citoplasma (Moll *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1993), foi investigada também a presença de marcação citoplasmática. Os resultados foram considerados positivos quando 5% ou mais células exibiam a imunorreação, focais quando o nível obtido era inferior a 5% e negativos quando nenhum sinal era visível nas células analisadas. Nos cortes com positividade citoplasmática, não foi atribuída a porcentagem de células coradas em relação à área total da lesão, pois a imunorreação ocorreu apenas nos elementos da camada basal, com relativamente poucas células das outras camadas epidérmicas sendo marcadas.

Os espécimes foram fotografados com filme colorido Ektar 25 (Kodak) e preto e branco Ilford 50. O fotomicroscópio utilizado foi da marca Zeiss (West Germany). A



revelação dos filmes em preto e branco foi efetuada no laboratório fotográfico do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e as cópias foram feitas em papel fotográfico Kodabrome Print RC F3. Os filmes coloridos foram revelados e copiados em laboratório comercial.

Fig. 2, caso B93 232/ A). No micró, a distribuição e a extensão da reação foram sempre semelhantes ao nível de expressão de citocinas. Assim, em alguns casos, uma marcação forte foi observada em nível 1 enquanto em outros 1 nível em nível 4 de expressão (Fig. 3, caso B93 165 e B93 284/ B). De mesmo modo, a extensão da reação variou sempre entre uma extensão mínima e uma extensão máxima.

As marcações positivas foram observadas em 35,3% dos carcinomas epidermóides, em 51,6% dos basocarcinomas e em 16,1% dos adenocarcinomas. Enquanto as marcações positivas foram observadas em 3,3%, 16,1% e 13,3% dos carcinomas de próstata, respectivamente. As reações foram citocináticas. As reações citocináticas foram observadas em 35,3% dos carcinomas epidermóides, em 51,6% dos basocarcinomas e em 16,1% dos adenocarcinomas. As reações citocináticas foram observadas em 3,3%, 16,1% e 13,3% dos carcinomas de próstata, respectivamente.

Os controles positivos e negativos constituídos de um carcinoma epidermóide e de um carcinoma de próstata foram empregados para a avaliação da reação. O positivo, sem exceções, resultou em forte imunoreação nuclear em mais de 90% das células do tumor (Fig. 4A), sem qualquer sinal de positividade citocinática. Por outro lado, o controle negativo (Fig. 4B), constituído de mesmo material, porém sem a incubação com o anticorpo primário, apresentou resultados negativos em todas as reações efetuadas.

Os resultados obtidos em cada um dos 135 casos patológicos analisados serão detalhados a seguir.



III. RESULTADOS

A imunorreação da proteína p53 foi observada pela presença de pequenos grânulos de cor castanha no núcleo (30 casos), no citoplasma (8 casos), ou em ambos os locais (2 casos) de células das 92 lesões de pele estudadas. A marcação no citoplasma consistiu de pequenos grânulos uniformemente espalhados e, de modo geral, teve intensidade fraca (Fig. 2, caso B93 2322 A). No núcleo, a intensidade da reação nem sempre acompanhou o nível de expressão da proteína pelas células. Assim, em alguns casos, uma marcação forte foi observada em nível 1 enquanto imunorreatividade mediana pôde ser detectada em nível 4 de expressão (Fig. 3, casos B93 165 e B93 2849 B). Do mesmo modo, a intensidade e a densidade não tiveram sempre uma relação positiva. As exceções mais evidentes foram os carcinomas B93 2849 B e B89 1843 B.

As marcações nucleares positivas foram observadas em 35,5% dos carcinomas espinocelulares, em 51,6% dos basocelulares e em 16,6% das ceratoses, enquanto as marcações citoplasmáticas positivas foram detectadas em 3,2%, 16,1% e 13,3% dessas lesões, respectivamente. As reações focais citoplasmáticas foram visualizadas com maior frequência nos dois grupos de carcinomas (Tabela 4). De maneira geral, os núcleos positivos em regiões com grande marcação nos diferentes tumores variaram de 5 a 88%.

Os controles, positivos e negativos, constituídos de um carcinoma espinocelular de pênis, foram empregados todas as vezes em que as reações foram efetuadas. O positivo, sem exceções, resultou em forte imunorreação nuclear em mais de 80% das células do corte (Fig. 4A), sem qualquer sinal de positividade citoplasmática. Por outro lado, o controle negativo (Fig. 4B), contituído do mesmo material, porém sem a incubação com o anticorpo primário, apresentou resultados negativos em todas as reações efetuadas.

Os resultados obtidos em cada um dos três tipos patológicos analisados serão detalhados a seguir.



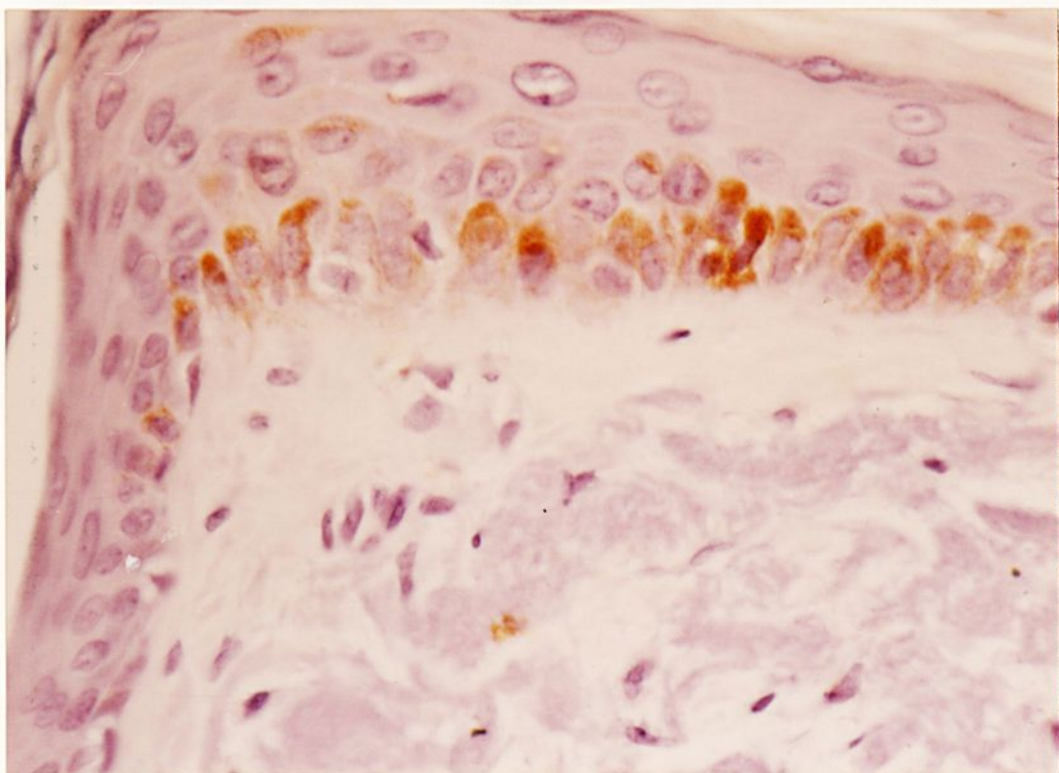


Figura 2. Ceratose solar (caso B93 2322 A) mostrando imunorreação citoplasmática positiva, principalmente nas células da camada basal. Núcleos negativos. 400x.

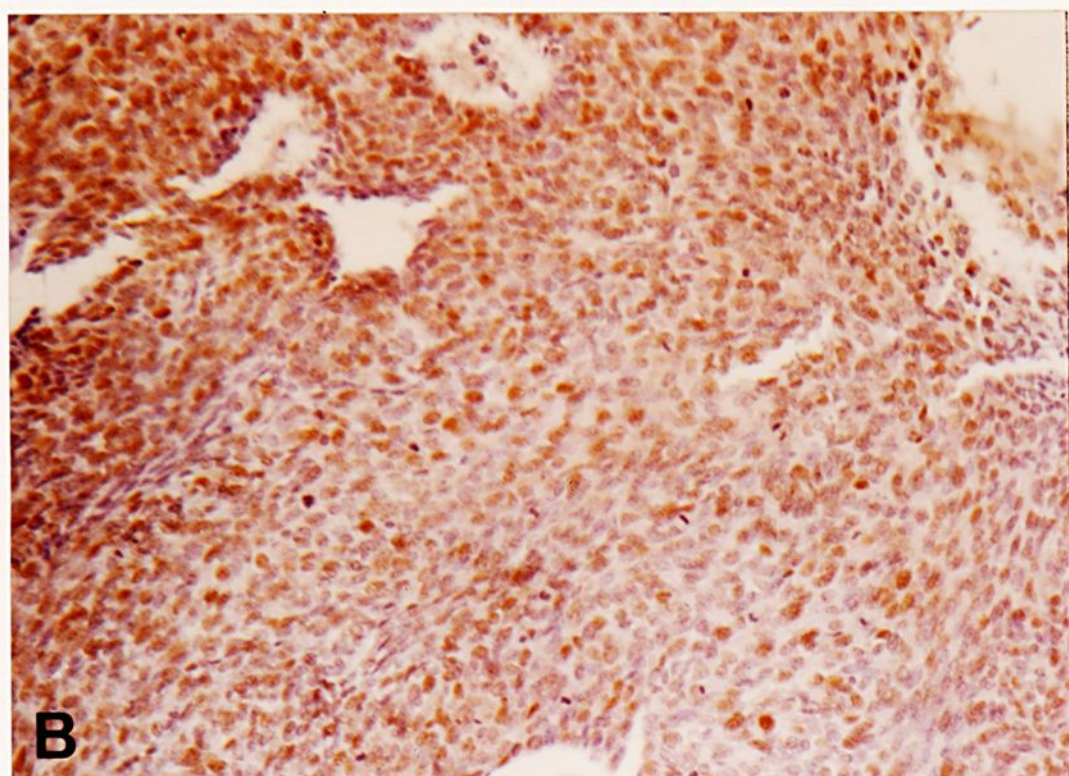
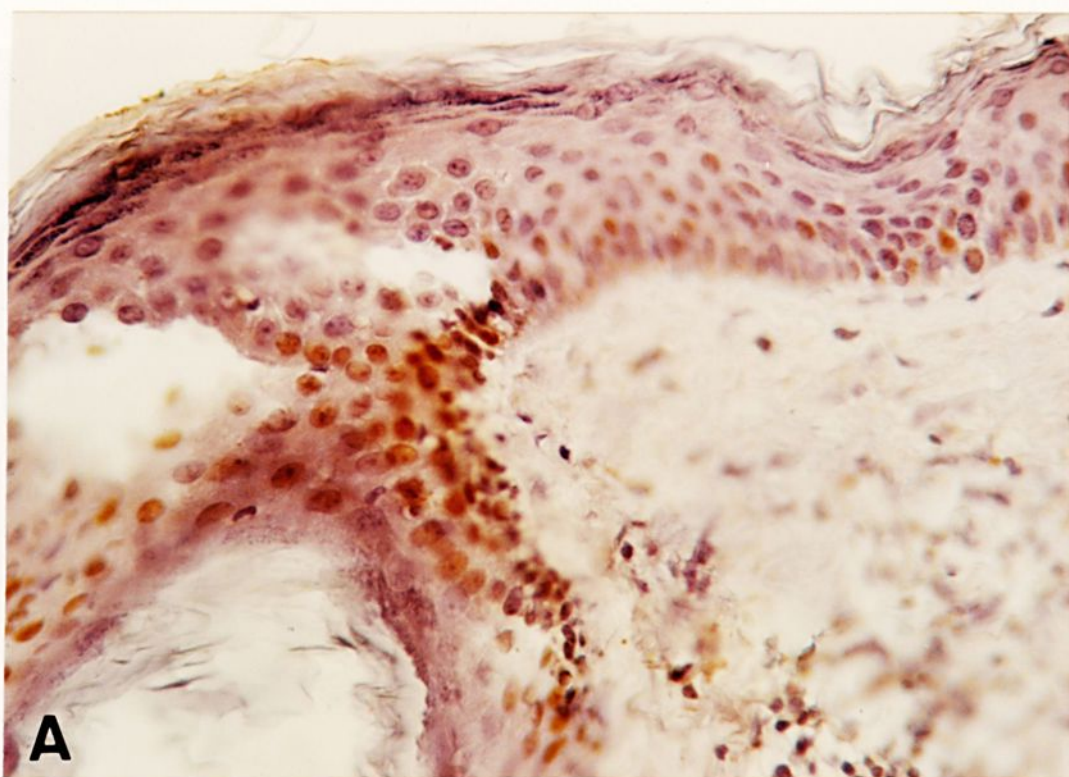


Figura 3. Carcinomas espinocelulares mostrando: (A) imunorreação nuclear forte e nível de expressão 1 (caso B93 165). 400x. e (B) imunorreatividade mediana e nível de expressão 4 (caso B93 2849B). 250x.

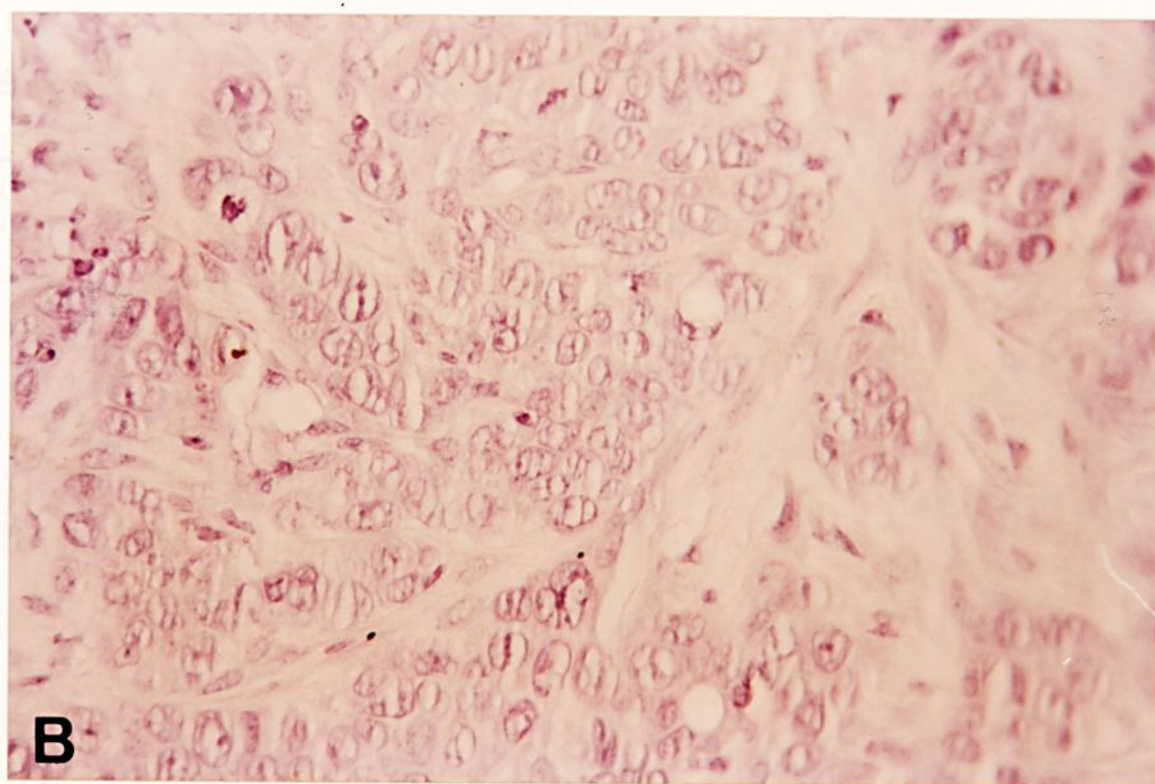
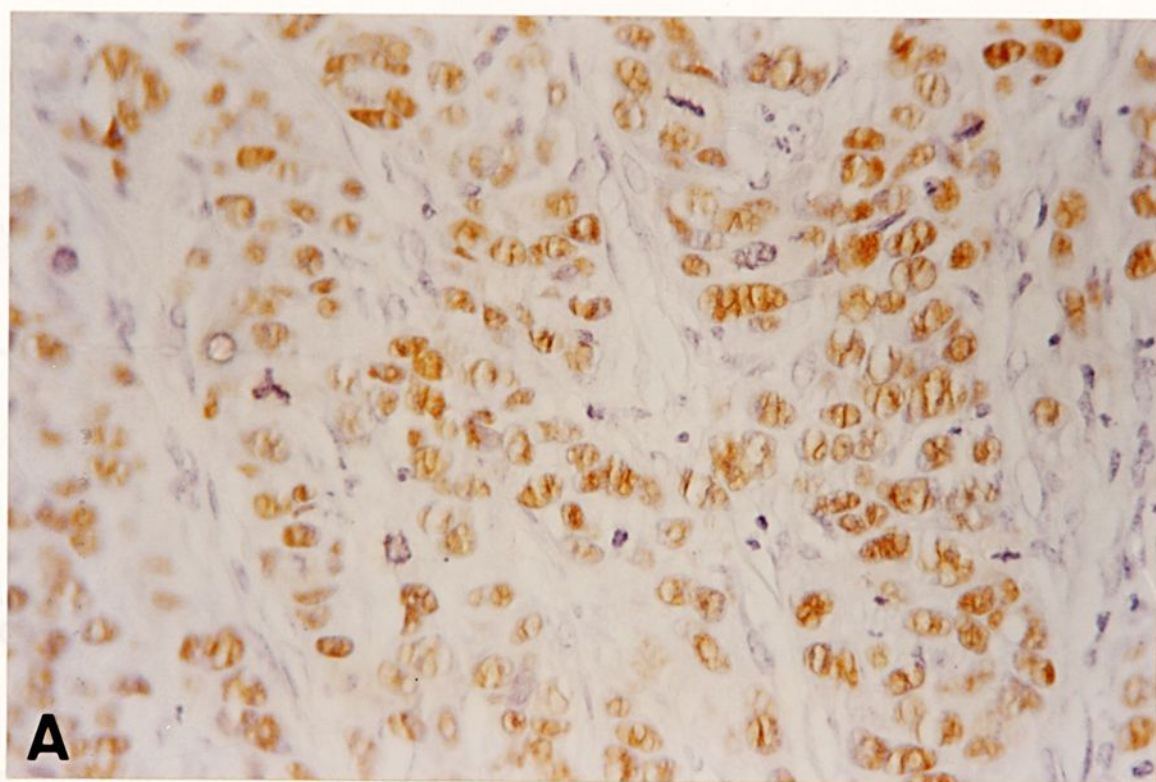


Figura 4. Carcinoma espinocelular de pênis utilizado como controle: (A) positivo e (B) negativo. 400x.

Foram realizadas imunohistoquímicas em 30 lesões de ceratose solar, por exame dermatológico de 30 pacientes. Destes, 19 eram do sexo feminino e 11 do sexo masculino. A idade variou de 17 a 90 anos e a maioria dos pacientes encontrava-se na faixa dos 60-70 anos. A maior parte das amostras era proveniente de áreas de crânio expostas ao sol, sendo 24 (80%) localizadas na cabeça ou membros, enquanto que apenas 6 (20%) estavam em outras regiões.

Tabela 4. Frequência da imunorreação da proteína p53 detectada pelo anticorpo PAb 1801 em 92 lesões de pele. (CA: carcinoma, n: número).

Tipo de lesão	Imunorreação					
	nuclear			citoplasmática		
	+	-	focal	+	-	focal
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Ceratose solar	5(16,6%)	22(73,3%)	3(10,0%)	4(13,3%)	23(76,6%)	3(10,0%)
CA espinocelular	11(35,5%)	14(45,2%)	6(19,3%)	1(3,2%)	23(74,2%)	7(22,6%)
CA basocelular	16(51,6%)	12(38,7%)	3(9,7%)	5(16,1%)	17(54,8%)	9(29,0%)
Total	32(34,7%)	48(52,2%)	12(13,0%)	10(10,9%)	63(68,5%)	19(20,6%)

ponto médio, exceto a lesão B93 3601, que mostrou sinal forte nas regiões de maior invasão da derme (Fig. 3A).

Quatro casos mostraram imunoreatividade positiva somente no citoplasma, em dois deles (B93 1429 e B93 2084) compreendidos mais de 50% da área total do corte. Duas amostras, que foram positivas no núcleo, revelaram resultados fracos: quando no citoplasma e uma fibrosa. B93 3605 apresentou marcação focal nuclear e citoplasmática. É interessante ressaltar que o grupo de células com núcleos positivos nesse último caso estava restrito à camada papilar da derme, sendo a marcação citoplasmática localizada na camada basal epidérmica, como nos demais casos (Fig. 7, caso 3605).

III.1. Ceratose solar

Foram realizados testes imunohistoquímicos em 30 lesões de ceratose retiradas por exérese dermatológica de 30 pacientes. Desses, 19 eram do sexo feminino e 11 do sexo masculino. A idade variou de 17 a 90 anos e a maioria dos pacientes encontrava-se na faixa dos 60-70 anos. A maior parte das amostras era proveniente de áreas do corpo expostas ao sol, sendo 24 (80%) localizados na cabeça ou membros, enquanto que apenas 4 (13,3%) representavam lesões do tórax.

Os resultados da análise imunohistoquímica dessa patologia estão apresentados na tabela 5 e revelam que cinco casos (16,6%) exibiram imunorreação nuclear positiva, que não foi observada em células da camada basal, mas na área da ceratose e de maior invasividade (Fig. 5, caso B93 5601). Três outras amostras apresentaram apenas algumas células com coloração nuclear, que era de intensidade fraca e restrita à área da lesão (Figura 6, caso B93 5605).

Entre os cinco casos com marcação nuclear positiva, um deles (B93 5601) mostrou mais de 75% das células do corte imunocoradas e 70% de densidade de marcação. Os quatro restantes, entretanto, apresentaram tais valores iguais ou abaixo de 25%. A intensidade de marcação nuclear apresentou pequenas variações entre as lâminas e em diferentes regiões do mesmo corte. No entanto, todas puderam ser enquadradas dentro de um padrão médio, exceto a lâmina B93 5601, que mostrou sinal forte nas regiões de maior invasão da derme (fig. 5A).

Quatro casos mostraram imunorreatividade positiva somente no citoplasma que, em dois deles (B93 1829 e B93 2084), compreendeu mais de 50% da área total do corte. Duas amostras, que foram positivas no núcleo, revelaram resultados focais quanto ao citoplasma e uma lâmina, B93 5605, apresentou marcação focal nuclear e citoplasmática. É interessante ressaltar que o grupo de células com núcleos positivos nesse último caso estava restrito à camada papilar da derme, sendo a marcação citoplasmática localizada na camada basal epidérmica, como nos demais casos (Fig. 7, caso 5605).



III.2. Carcinoma espinocelular

Tabela 5. Imunorreação da proteína p53 detectada pelo anticorpo PAb 1801

A reação imunohistoquímica da proteína p53 foi investigada em 31 amostras de carcinomas espinocelulares provenientes de 27 pacientes. Desses, 14 eram do sexo feminino e 13 do sexo masculino. A idade variou de 21 a 87 anos, com média superior a 60 anos. A maior parte das lesões surgiu em áreas do corpo expostas ao sol, predominantemente na face ou membros (87%), e apenas três amostras eram originadas do tórax, uma delas da área do decote V (B93 3096), que é considerada região exposta.

Os resultados estão listados na tabela 6 e revelam que seis casos (19,3%) exibiram apenas alguns núcleos corados com intensidade homogênea e fraca, enquanto onze (35,5%) mostraram muitas células com nítida marcação nuclear. Desses, oito apresentaram intensidade da reação média ou forte, a maioria com densidade inferior a 50%. Em dois carcinomas, B93 2662 e B93 2849 B, mais de 75% das células do corte exibiram positividade nuclear. No primeiro deles, as células revelaram dois padrões de imunorreação, sendo mais fraca a intensidade nas áreas periféricas à lesão e forte no centro da mesma (Fig. 8, caso 2662).

A única imunorreação citoplasmática positiva esteve restrita à camada basal, na região da neoplasia (Fig. 9, caso B93 179). Outras sete amostras possuíam apenas focos de células imunocoradas no citoplasma (Fig. 10, caso B93 2662).

B93 2359 A	+	10%	focal
B93 2359 B	+	10%	focal
B93 2359 C	+	10%	focal
B93 3096	+	10%	focal
Tórax			
B93 1839 *	+	10%	focal
B93 2662*	++	75%	focal
B93 4062*	+	10%	focal
B93 3095*	+	10%	focal
Pepeço			
B93 2084	+	10%	focal
Desconhecido			
B93 4974	+	10%	focal
B93 5510	+	10%	focal

* lesão não exposta ao sol

Tabela 5. Imunorreação da proteína p53 detectada pelo anticorpo PAb 1801 em 30 amostras de ceratose solar.

Amostra	Imunorreação			citoplasmática
	tipo	nuclear	densidade (%)	
		nível de expressão		
Face				
B89 807	+	1	7%	-
B92 6449 A	-			-
B93 2005	-			-
B93 2293	-			-
B93 2410	-			-
B93 3493 B	-			-
B93 3560	-			-
B93 3897	focal			-
B93 4071	-			-
B93 4698	-			-
B93 4889 A	-			-
B93 5006	-			-
B93 5160 C	-			-
B93 5171	-			-
B93 5588	-			-
B93 5601	+	4	70%	-
Membros				
B89 1006*	-			+
B93 1744	+	1	24%	focal
B93 2089	-			-
B93 2322 A	-			+
B93 2359 B	+	1	25%	focal
B93 3504 C	-			-
B93 3669	-			-
Tórax				
B93 1829 *	-			+
B93 2660*	focal			-
B93 4062*	-			-
B93 5605*	focal			focal
Pescoço				
B93 2084	-			+
Desconhecido				
B93 4974	-			-
B93 5510	+	1	16%	focal

* lesão não exposta ao sol

Figura 3. Ceratose solar (amostra B93 5601): (A) imunorreação nuclear positiva nas células da camada superficial e da camada intermediária; (B) negativa nas células da camada basal. 250x.

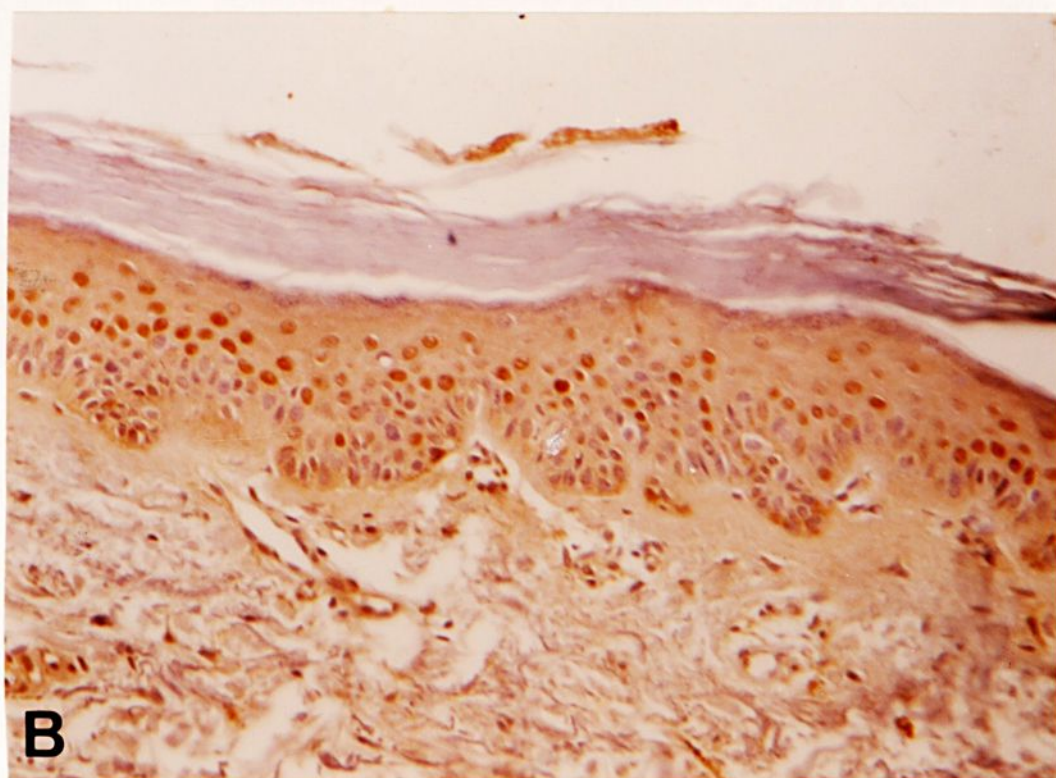
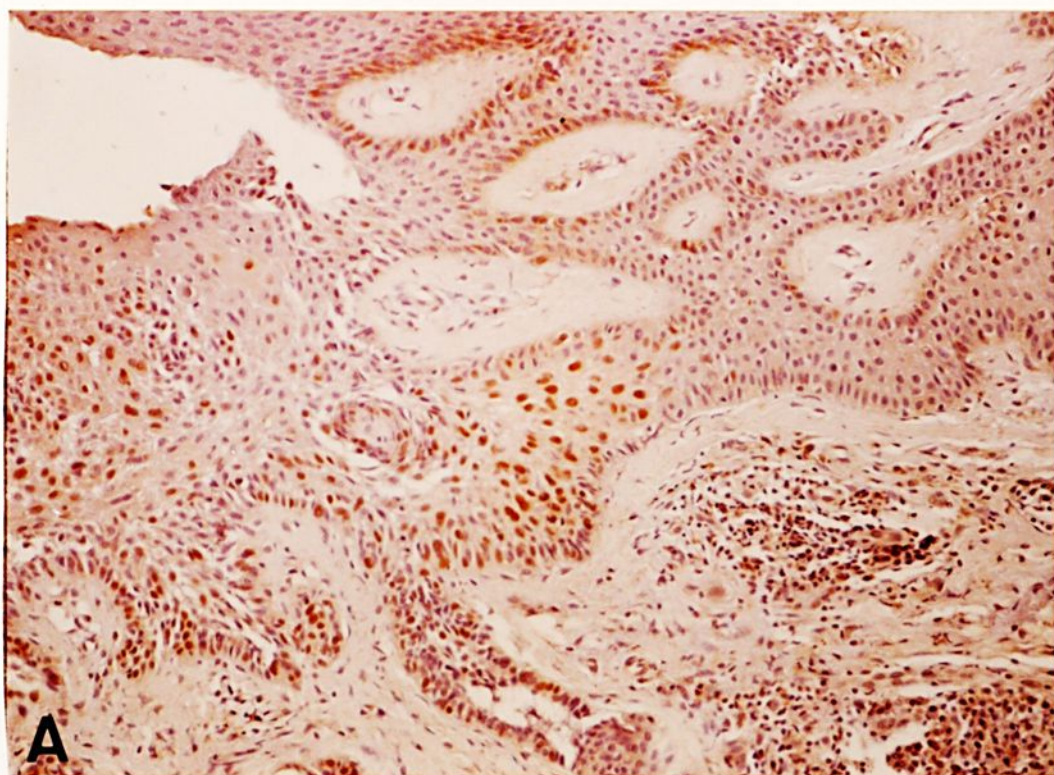


Figura 5. Ceratose solar (caso B93 5601). (A) imunorreação nuclear positiva nas células da região neoplásica e de maior invasividade, (B) negativa nas células da camada basal. 250x.

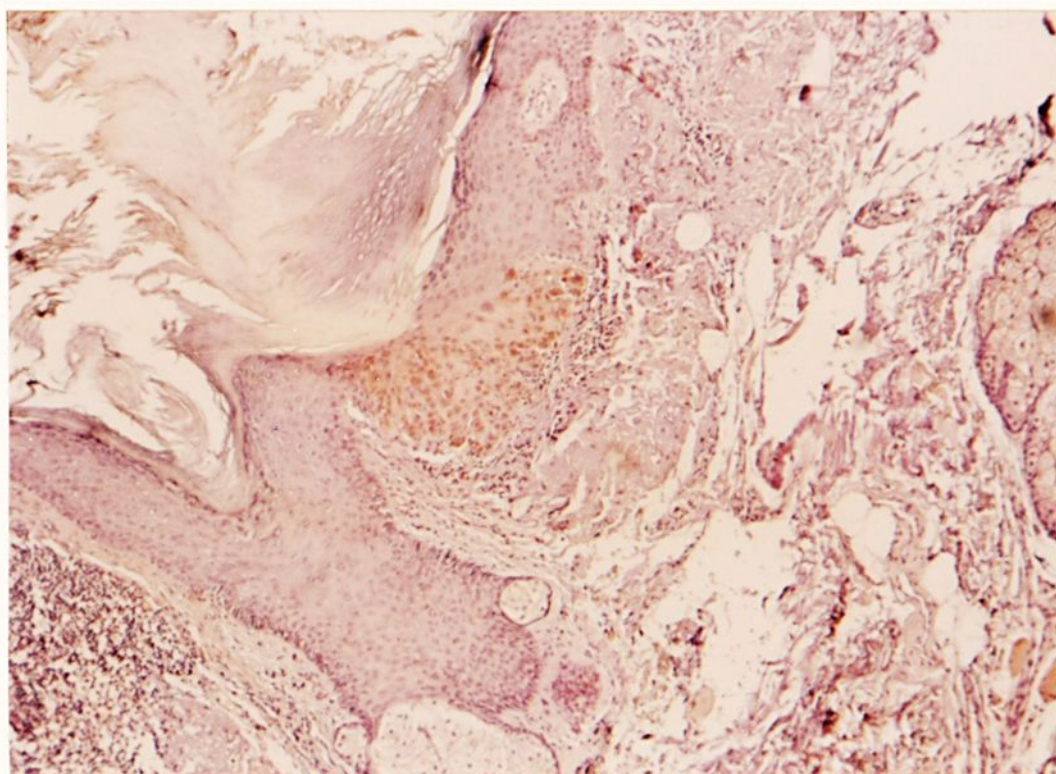


Figura 6. Ceratose solar (caso B93 5605) apresentando reação nuclear focal, restrita à área da lesão. 250x.

Tabela 6: Imunoreação da proteína p53 detectada pelo anticorpo PAb 1801 em 31 amostras de carcinoma espinocelular. (F: forte, M: média, L: fraca).

Amostra	Imunoreação		
	tipo	nuclear nível de expressão	citoplasmática intensidade (%)
Face			
B93 1207 B	+	2	56%
B93 1904 A	+	2	49%
B93 2632 I	-	-	-
B93 163	+	1	32%
B93 234 A			
B93 234 B	focal		focal

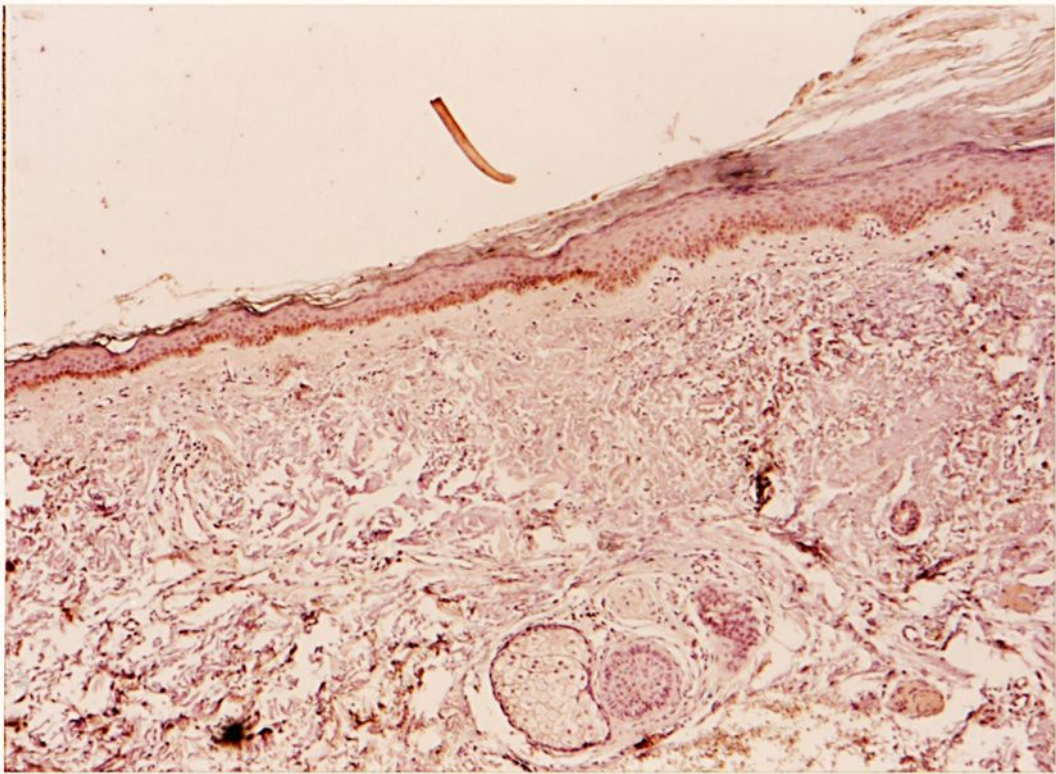


Figura 7. Ceratose solar (caso B93 5605) mostrando reação citoplasmática focal na camada basal.100x.



Tabela 6: Imunorreação da proteína p53 detectada pelo anticorpo PAb 1801 em 31 amostras de carcinoma espinocelular. (F: forte, M: média, f: fraca).

Amostra	Imunorreação			citoplasmática
	tipo	nuclear nível de expressão	densidade (%)	
Face				
B89 1807 B	+(F)	2	56%	-
B89 1904 A	+(F)	2	49%	-
B92 6321	-			-
B93 165	+(F)	1	32%	-
B93 234 A	-			-
B93 234 B	focal			focal
B93 277 A	-			-
B93 287	+(F)	2	36%	-
B93 2329 A	-			-
B93 2337	focal			-
B93 2662	+(F)	4	62%	focal
B93 2849 B	+(M)	4	42%	-
B93 2871	-			focal
B93 2916	-			-
B93 3014 B	+(f)	1	16%	-
B93 3271	focal			-
B93 3377	+(f)	1	16%	-
B93 3498	+(f)	1	9%	-
B93 3640	+(F)	3	46%	-
B93 3849	-			-
Membros				
B89 629	-			focal
B92 6392	focal			-
B93 179*	-			+
B93 1830	focal			focal
B93 2322 B	-			-
B93 3504 B	-			-
B93 3723	-			focal
Tórax				
B91 1186*	-			-
B93 221*	-			focal
B93 3096	+(M)	1	21%	-
Desconhecido				
B93 3107	focal			-

* lesão não exposta ao sol



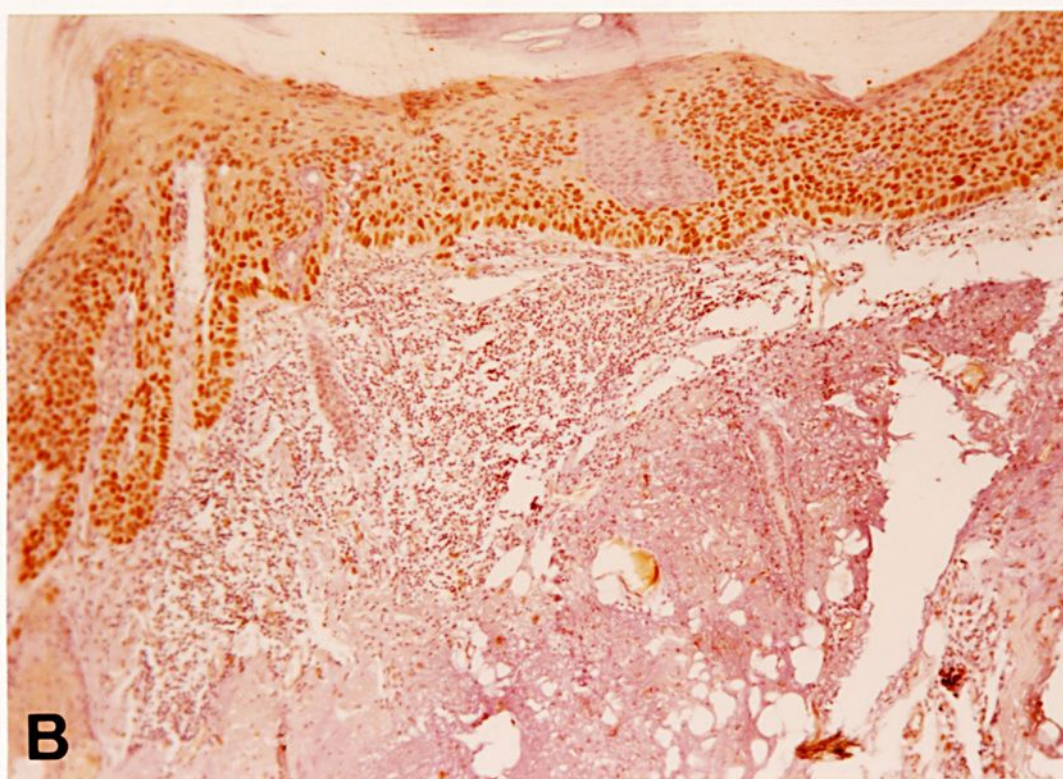
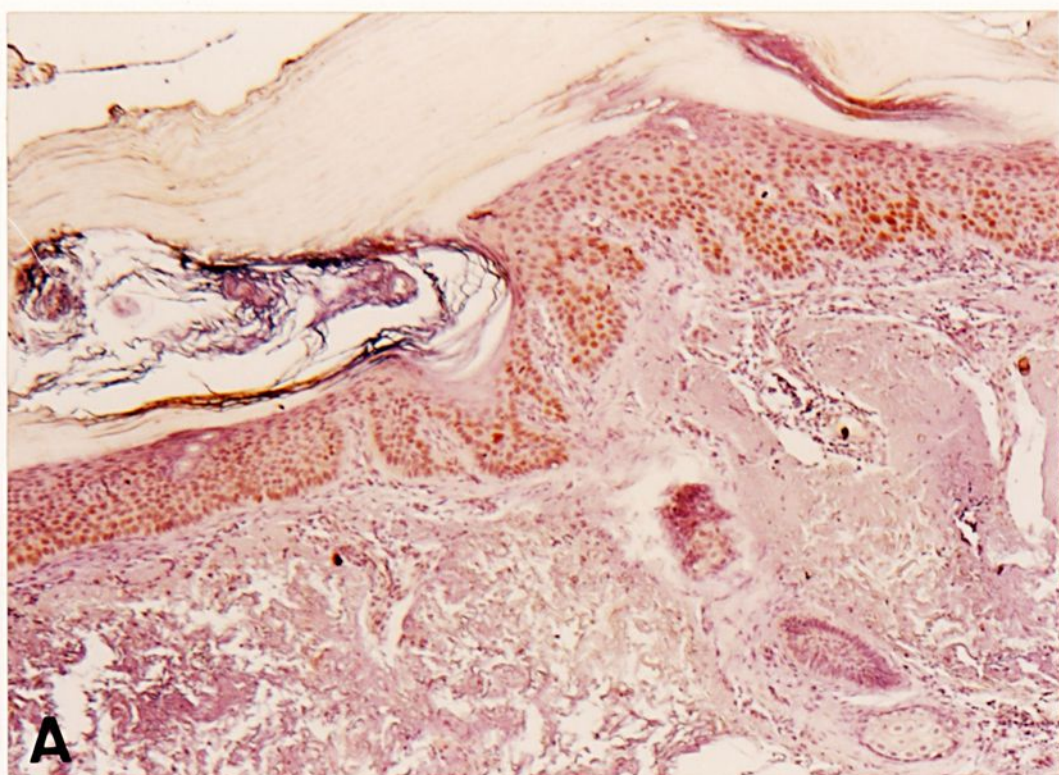


Figura 8. Carcinoma espinocelular (caso B93 2662). (A) imunorreação nuclear de intensidade mediana nas células mais periféricas à lesão e (B) forte na região de maior invasividade. 250x.

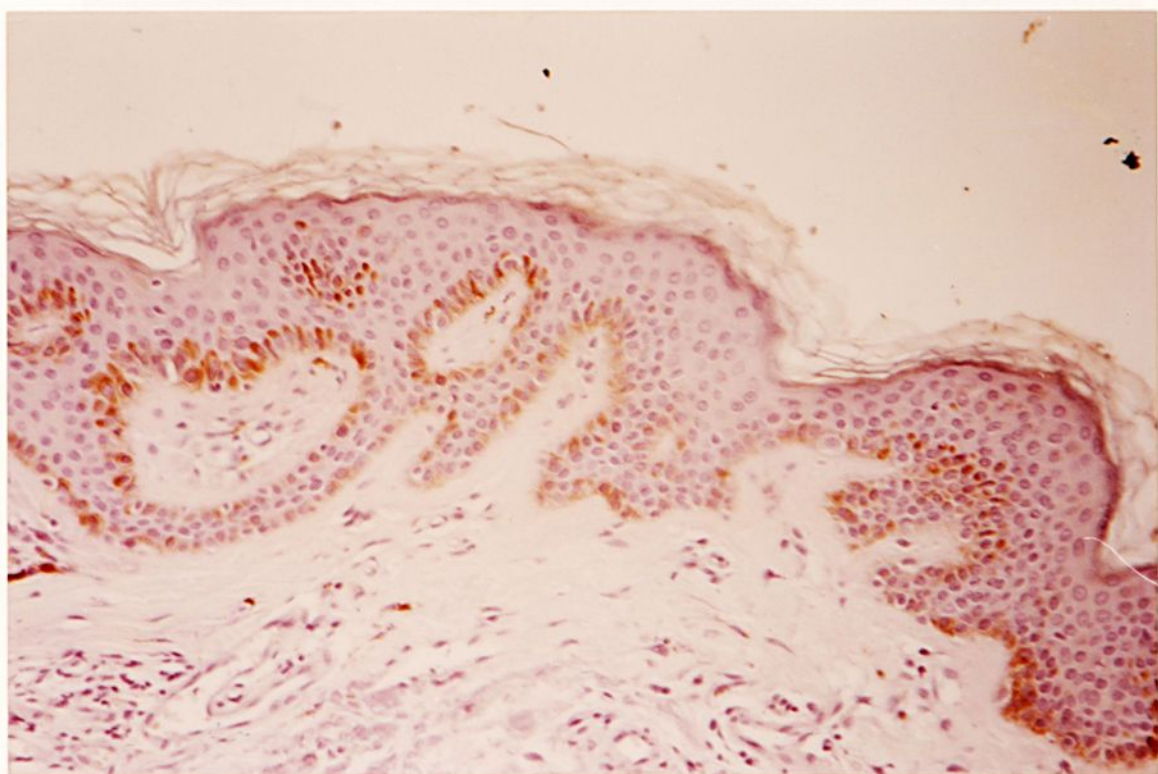


Figura 9. Carcinoma espinocelular (caso B93 179) mostrando imunorreação citoplasmática restrita à camada basal, na região da neoplasia. 250x.

III.3. Carcinoma basocelular

Os testes imunohistoquímicos foram realizados em 31 amostras de carcinomas basocelulares oriundas de 24 pacientes, sendo 13 do sexo feminino e 11 do sexo masculino. A idade variou de 33 a 88 anos e a maioria apresentou mais de 70 anos à época da cirurgia. O local preferencialmente atingido pelas lesões, assim como nos dois tipos patológicos anteriores, foi a face (80%).

Os resultados da leitura das lâminas estão apresentados na tabela 7. Dos casos de carcinomas basocelulares (51,6%) foram positivamente marcados para p53, dos quais

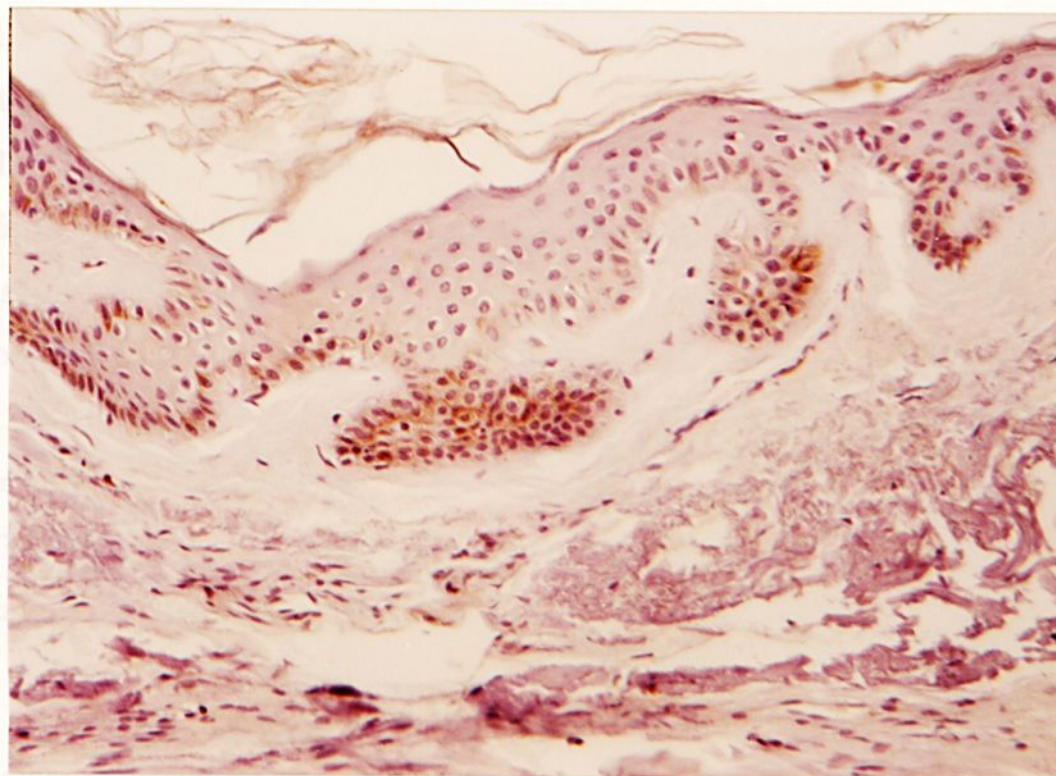


Figura 10. Carcinoma espinocelular (caso B93 2662) mostrando imunorreação citoplasmática focal. 250x.

os quais 15 eram verrucosas, 22 eram carcinomas espinocelulares e 22 eram epiteliomas. No total, haviam 36 pacientes que manifestavam 117 diferentes tumores de pele (tabela 8). 59 amostras e 55 não analisadas.

Entre as lesões múltiplas observadas, podem ser distinguidas aquelas compostas de tipos diferentes de tumores, presentes na mesma região do organismo, e aquelas compostas de tipos diferentes de tumores, presentes em regiões diferentes do corpo do paciente e, finalmente, de mesmo tipo, embora localizadas em regiões diferentes.

A detecção imunohistoquímica de proteína p53 nos casos mostrou resultados negativos para p53 em 11 e 21 amostras de tumores de pele. Nos casos de carcinomas basocelulares, os resultados foram negativos para p53 em 11 e 21 amostras.

III.3. Carcinoma basocelular

Os testes imunohistoquímicos foram realizados em 31 amostras de carcinomas basocelulares oriundas de 24 pacientes, sendo 13 do sexo feminino e 11 do sexo masculino. A idade variou de 33 a 88 anos e a maioria apresentava mais de 70 anos à época da exérese. O local preferencialmente atingido pelas lesões, assim como nos dois tipos patológicos anteriores, foi a face (80%).

Os resultados da leitura das lâminas estão apresentados na tabela 7. Dezesesseis carcinomas basocelulares (51,6%) foram nitidamente positivos no núcleo, doze dos quais com marcação média ou forte e um com a maior densidade detectada no presente estudo (88%). Entretanto, o nível de expressão não foi alto no grupo, com somente dois casos, B89 3855 e B89 2327 (Fig.11), atingindo o valor máximo. Apenas quatro amostras apresentaram reação fraca com menos de 25% das células do corte coradas e três exibiram focos de células positivas. Um espécime (B91 4002 A) revelou núcleos nas margens cirúrgicas também marcados e outro (B89 2327) tinha algumas células da epiderme coradas (Fig.12).

Imunorreação positiva no citoplasma foi vista em cinco casos (16,1%) e outros nove apresentaram essa marcação em pequenos grupos de células. Em dois deles, B89 2812 B e B93 265, o sinal ocorreu em mais de 50% das células da camada basal e apresentou intensidade forte (Figura 13, caso B93 265).

III.4. Lesões múltiplas

Dentre os casos examinados, 59 foram referidos como lesões múltiplas, dos quais 15 eram ceratoses, 22 eram carcinomas espinocelulares e 22 eram epiteliomas. No total, haviam 36 pacientes que manifestavam 117 diferentes tumores de pele (tabela 8), 59 analisados e 58 não analisados.

Entre as lesões múltiplas analisadas, puderam ser distinguidas aquelas constituídas de tipos patológicos diferentes, presentes na mesma região do organismo, de tipos e regiões do corpo distintos e, finalmente, de mesmo tipo, embora localizadas em regiões diferentes.

A detecção imunohistoquímica da proteína p53 nesses casos mostrou resultados completamente negativos nas amostras dos pacientes de número 8 e 21. Nos demais, como pode ser observado na tabela 8, os dados foram encontrados em várias



combinações. Assim, puderam ser observadas, em lesões distintas, marcações concordantes quanto ao tipo, se positiva (pacientes 16, 23, 30 e 32) ou negativa (paciente 3, 8 e 21), e quanto à localização (paciente 2, 16, 23, 30, 32 e 33). Foram igualmente detectadas discordâncias em relação aos mesmos parâmetros (pacientes 3, 5, 6, 7, 12, 14, 16, 17, 23, 25, 30 e 33). Os tumores de tipos patológicos idênticos no mesmo paciente não revelaram qualquer tendência à similaridade de imunorreações (pacientes 3, 17, 23, 30 e 33) e, do mesmo modo, condições histologicamente diversas quase sempre exibiram resultados diferentes (pacientes 3, 5, 6, 7, 12, 14, e 25).

		Focal		Focal	
		Focal		Focal	
B89 1843 B	+(N)	1	44%		
B89 2764 B	+(F)	1	10%		
B89 2812 A	+(N)	1	39%		
B89 2812 B	+(N)	3	39%		
B89 3161	+(F)	3	33%		
B91 430 A	-				
B91 489	+(N)	2	8%		
B91 1331	-				
B91 1655	-				
B91 2266	-				
B91 4082 A	+(M)	1	8%		
B92 601	+(F)	1	3%		
B91 6459 B	-				
B93 245	+(F)	3	48%		
B93 314 B	focal				
B93 1718 A	-				
B93 2761	-				
B93 2849 C	-				
B93 3893 A	+(N)	3	36%		
B89 3855	+(F)	4	54%		
B93 4889 B	focal				
B93 5160 B	+(F)	1	26%		
Membros					
B91 2322 C	+(N)	1	26%		
B93 2339 A	-				
Tórax					
B93 53 A*	-				
Pescado					
B89 2137	+(F)	4	58%		
B91 5457 B	+(N)	1	10%		
B92 6370	-				

* Lesão não exposta ao sol



Tabela 7. Imunorreação da proteína p53 detectada pelo anticorpo PAb 1801 em 31 carcinomas basocelulares. (F: forte, M: média, f: fraca).

Amostra	Imunorreação			citoplasmática
	tipo	nuclear	densidade (%)	
		nível de expressão		
Face				
B89 1030	+(f)	1	7%	focal
B89 1449	focal			focal
B89 1561	-			focal
B89 1843 B	+(M)	1	44%	-
B89 2764 B	+(f)	1	19%	-
B89 2812 A	+(M)	1	39%	-
B89 2812 B	+(M)	2	39%	+
B89 3161	+(F)	3	88%	-
B91 430 A	-			-
B91 489	+(M)	2	8%	-
B91 1531	-			focal
B91 1655	-			-
B91 2266	-			-
B91 4002 A	+(M)	1	8%	-
B92 601	+(f)	1	5%	-
B92 6450 B	-			-
B93 265	+(F)	2	48%	+
B93 314 B	focal			focal
B93 1718 A	-			+
B93 2761	-			focal
B93 2849 C	-			-
B93 3493 A	+(M)	2	56%	-
B89 3855	+(F)	4	54%	-
B93 4889 B	focal			-
B93 5160 B	+(F)	1	26%	focal
Membros				
B93 2322C	+(f)	1	26%	focal
B93 2359 A	-			+
Tórax				
B93 53 A*	-			focal
Pescoço				
B89 2327	+(F)	4	58%	-
B91 5457 B	+(M)	1	10%	-
B92 6370	-			+

* lesão não exposta ao sol

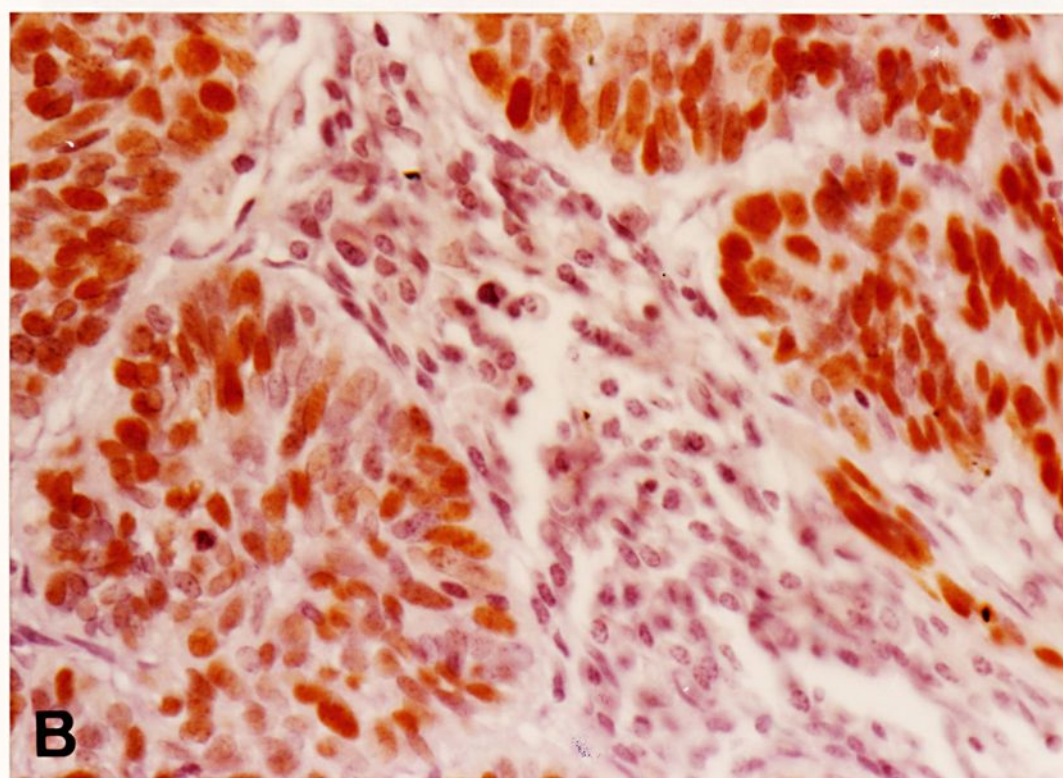
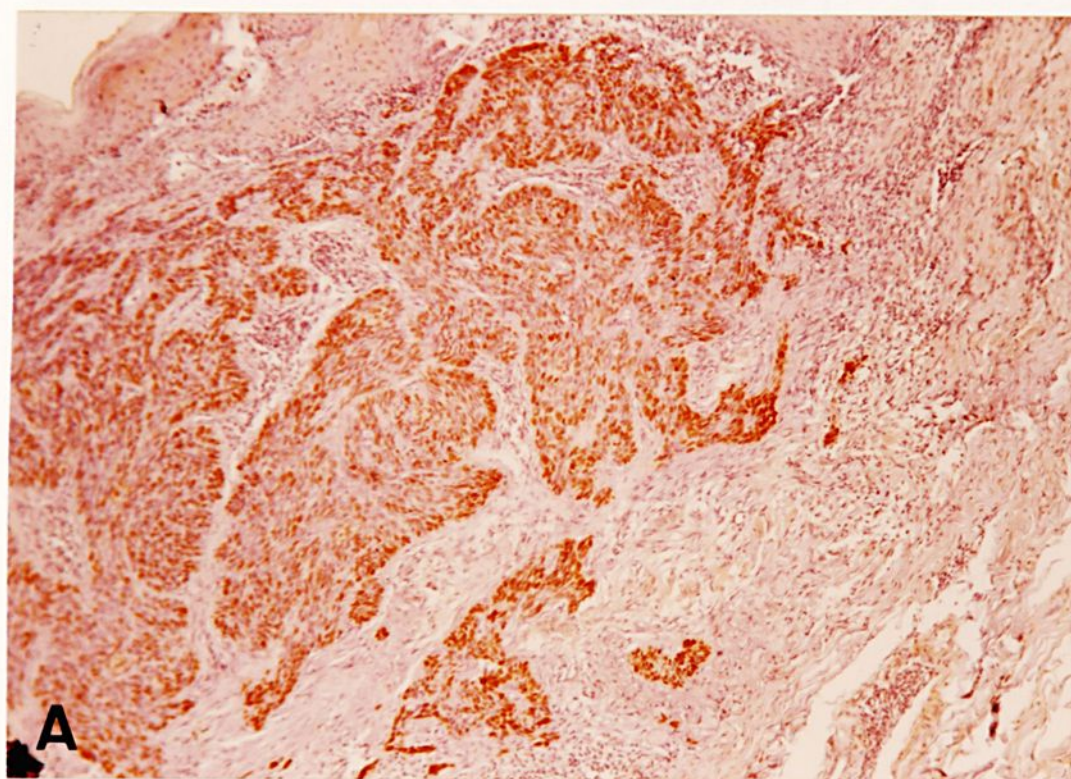


Figura 11. Carcinoma basocelular (caso B89 3855). (A) mostrando forte imunorreação nuclear e nível de expressão 4. 100x. (B) detalhe da marcação nuclear. 400x.

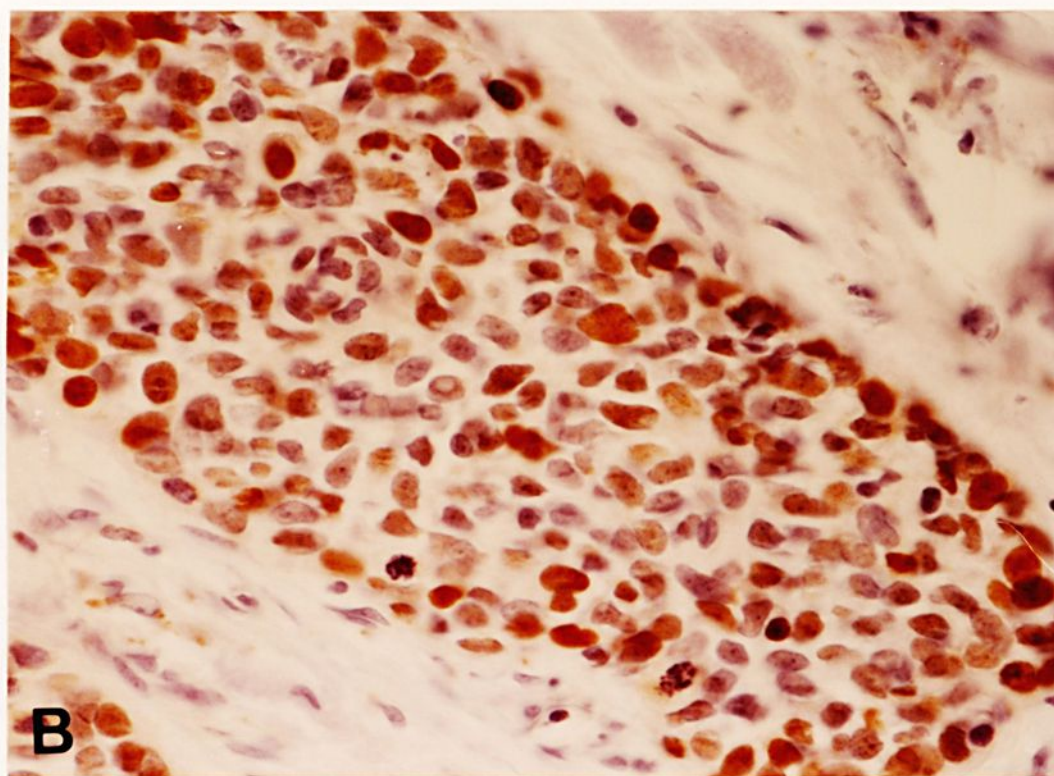
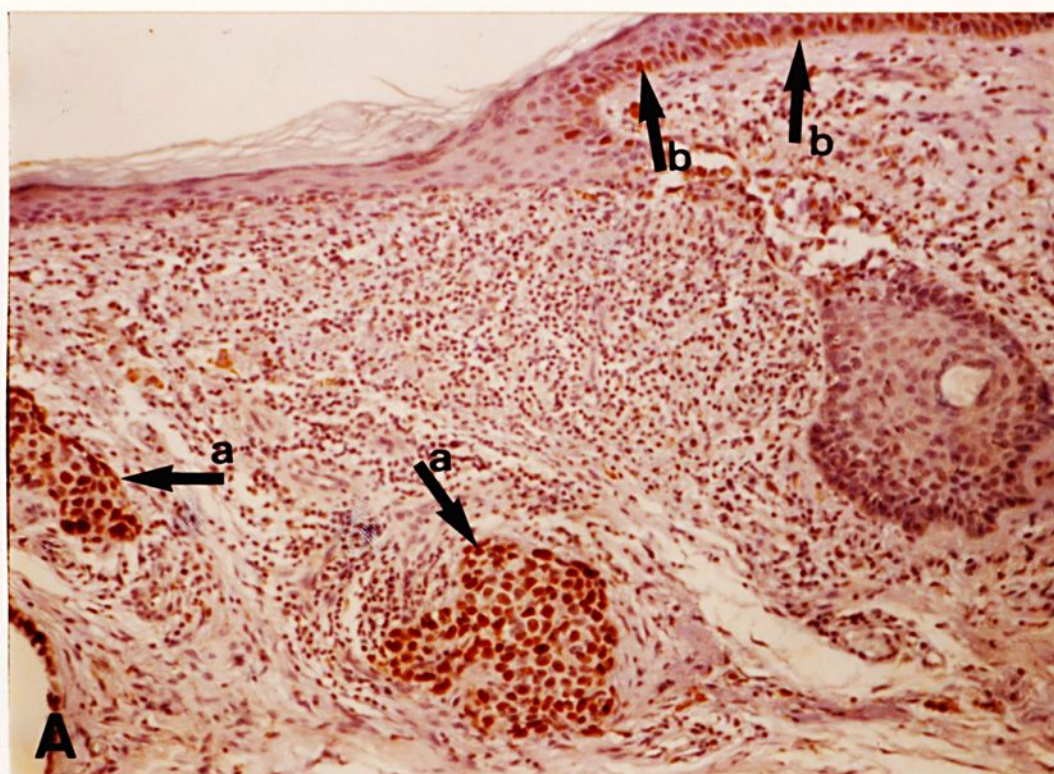


Figura 12. Carcinoma basocelular (caso B89 2327) mostrando: (A) forte imunorreação nuclear nas áreas afetadas pela neoplasia (setas a), bem como em algumas células da epiderme (setas b). 250x. e (B) detalhe da região neoplásica. 400x.

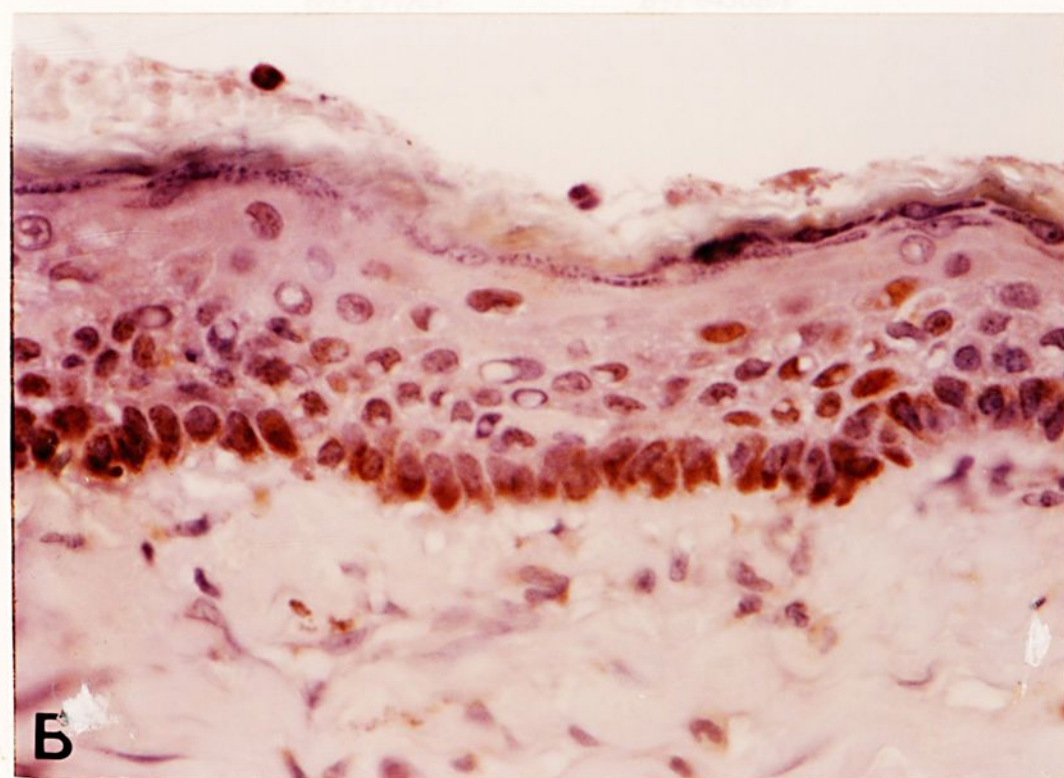
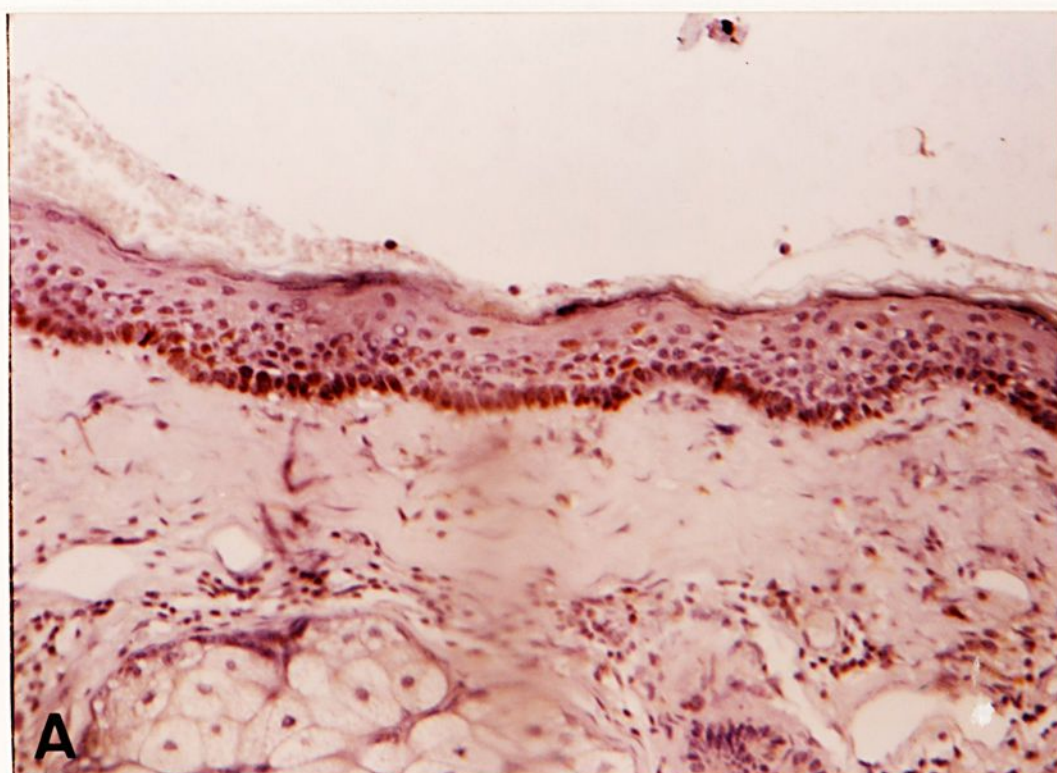


Figura 13. Carcinoma basocelular (caso B93 265) exibindo: (A) forte reação citoplasmática em mais de 50% das células da camada basal. 250x. e (B) detalhe da marcação no citoplasma. 400x.

Tabela 8. Lesões múltiplas nos pacientes estudados e detecção imunohistoquímica da proteína p53 (F: face, M: membros, T: tórax, P: pescoço, D: desconhecido). (n: núcleo, c: citoplasma, fo: focal).

Paciente	Ceratose solar/local/p53	Carcinoma espinocelular/local/p53	Carcinoma basocelular/local/p53	Lesões de pele não analisadas (nº)
1	B89 807/F/n			1
2	B89 1006/M/c	B89 629/M/fo ^c		
3	B92 6449A/F	B93 234 A/F B93 234 B/F/fo ^{c,n}		
4	B93 2089/D			
5	B93 2322A/M/c	B93 2322B/M	B93 2322C/M/n	2
6	B93 2359B/M/n		B93 2359 A/M	
7	B93 3493B/F		B93 3493A/F/n	
8	B93 3504C/M	B93 3504B/M		
9	B93 3669/M			1
10	B93 3897/F/fo ⁿ			1
11	B93 4071/F			2
12	B93 4889A/F		B93 4889B/F/fo ⁿ	1
13	B93 5006/F			1
14	B93 5160C/F		B93 5160B/F/n	2
15	B93 5605/T/fo ⁿ			3
16		B89 1807B/F/n	B89 3855/T/n	
17		B89 1904A/F/n B91 1186/T		
18		B92 6392/M/fo ⁿ		1
19		B93 165/F/n		3
20		B93 221/Tfo ^c		2
21		B93 277A/F	B92 6450B/F	
22		B93 287/F/n		1
23		B93 1830/M/fo ^{n,c} B93 2662/F/n B93 3640/F/n		10
24		B93 2329A/F		4
25		B93 2849B/F/n	B93 2849C/F	
26		B93 3014B/F/n		3
27		B93 3271/F/fo ⁿ		10
28		B93 3498/F/n		3
29		B93 3723/fo ^c		1
30			B89 1030/F/n B89 1449/F/fo ^{n,c} B91 1655/F B91 5457B/P/n	
31			B89 2764B/F/n	1
32			B89 2812A/F/n B89 2812B/F/n,c	
33			B91 430A/F B91 1531/F/fo ^c B91 2266/F B91 4002A/F/n	
34			B93 53 A/T/fo ^c	2
35			B93 265/F/n,c	1
36			B93 314B/F/fo ^{n,c}	1

IV. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi investigada, através de métodos imunohistoquímicos, a expressão do gene TP53 em 30 amostras de ceratose solar, 31 de carcinoma espinocelular e 31 de carcinoma basocelular.

Todos os pacientes eram caucasóides, com exceção do caso B93 2005, que apresentava pele de cor parda. Tal achado está de acordo com a proposição bem conhecida de que o pigmento melanina tem efeito protetor contra a ação dos raios ultravioleta do sol (Kobayashi *et al.*, 1993), principalmente em indivíduos que exercem atividades sem qualquer tipo de cuidado em relação à radiação solar. Não surpreende, portanto, o fato de que a maioria das neoplasias analisadas proveio de regiões desprotegidas do organismo, em especial da face e dos membros. Apenas nove amostras eram representadas por lesões em áreas do corpo não expostas ao sol. Além disso, já está estabelecido que os indivíduos de pele branca, principalmente aqueles com olhos azuis e cabelos loiros ou vermelhos, apresentam risco maior de desenvolvimento de neoplasias cutâneas (Karagas, 1994; Hashimoto & Mehregan, 1991).

Foram analisadas amostras de 35 homens e 46 mulheres e, portanto, o sexo masculino apresentou menor frequência, quando comparado com o sexo feminino. Da mesma forma, considerando apenas os tumores, foram estudadas 53 lesões procedentes de indivíduos do sexo feminino e 39 do sexo masculino. Embora essa diferença não seja aparentemente significativa, contradiz os dados de Karagas (1994), que mostram os tumores não melanocíticos como mais frequentes em homens. É necessário ressaltar que a preocupação do presente estudo não foi avaliar a incidência dos tumores de pele e, portanto, a obtenção da amostra não seguiu critérios completamente aleatórios. Além disso, o seu pequeno tamanho pode também ter contribuído para tal divergência.

O tipo mais frequente de câncer na população humana é representado pelos tumores de pele estudados. Embora raramente fatais, alguns deles são responsáveis por alta morbidade e, se não tratados, por desfiguramento sério e, em alguns casos, por metástase e morte. Portanto, torna-se necessária a avaliação criteriosa da população para a detecção desses portadores, principalmente em localidades com alta incidência solar. Relativamente poucos estudos epidemiológicos têm sido realizados com esses tipos de lesões, mas sabe-se que os pacientes de neoplasias cutâneas apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de outras lesões, principalmente do mesmo tipo histológico e em pessoas claras que sofreram



exposições importantes ao sol (Karagas, 1994). De fato, no presente trabalho, 68% das amostras analisadas eram constituídas por processos múltiplos, ou seja recorrentes.

Independentemente do tipo de lesão, a idade da maioria dos pacientes estava acima dos 60 anos. Esse dado é compatível com a exposição aos raios ultravioleta do sol, por vários anos, podendo resultar no acúmulo de lesões no DNA das células cutâneas e, assim, desencadear o processo neoplásico (MacKie, 1993; Sage, 1993). É importante ressaltar também a dificuldade em identificar outros agentes, além dos raios UV, genotóxicos ou não, a que os indivíduos idosos foram expostos ao longo de suas vidas. Alguns deles podem ter contribuído para o surgimento dessas lesões, uma vez que a pele é o órgão mais exposto ao ambiente externo. Outro fator importante a ser considerado em idosos é a deficiência da capacidade de reparo do DNA, o que aumentaria a probabilidade de manutenção das lesões causadas pela luz UV (Wei *et al.*, 1993). Entretanto, uma relação direta entre idade avançada e mecanismos de reparo alterados não pode ser feita, pois resultados de pesquisas sobre o assunto são contraditórios (Warner & Price, 1989). Independente do fator idade, alguns indivíduos podem ser portadores de alterações desse tipo. Hashimoto & Mehregan (1991) levantam a possibilidade de populações que viveram em ambientes pouco ensolarados terem sido submetidas a um relaxamento da seleção natural e, então, de seus descendentes revelarem predisposição ao câncer de pele. A favor dessa idéia, está o fato de que pacientes jovens com carcinoma basocelular, que é típico da idade avançada, apresentam algumas vezes deficiência de reparo de DNA (Wei *et al.*, 1993). Seria interessante testar essa hipótese com os três indivíduos portadores de lesões cutâneas estudados que têm idade inferior a 35 anos (B93 2410, B93 3107, B92 601).

Como já discutido anteriormente, as lesões produzidas pela luz UV no DNA correspondem, principalmente, aos dímeros de pirimidina e ao (6-4) fotoproducto, há muito observados em bactérias (Wood *et al.*, 1984) e em células de primatas (Protic-Sabljii *et al.*, 1986) após irradiação. Mais recentemente, essas lesões foram detectadas em genes envolvidos com a carcinogênese cutânea. Por exemplo, fotoproductos já foram mapeados em ambas as cadeias dos exons 5-9 do gene TP53 em células humanas irradiadas (Tornaletti *et al.*, 1993), bem como as conseqüentes transições CC→TT, consideradas marcadores do agente mutagênico em questão (Nakazawa *et al.*, 1994). O mesmo foi observado em tumores cutâneos induzidos por UV em roedores (Kanjilal *et al.*, 1993). Aparentemente essas lesões ocorrem com maior frequência em certos pontos do genoma. Em neoplasias humanas, algumas regiões do gene TP53 (exons 5-8) são preferencialmente mutadas pela ação da luz

solar, sendo que a grande maioria das alterações são representadas por transições C→T (Brash *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993; Rady *et al.*, 1992; Molès *et al.*, 1993a; McNutt *et al.*, 1994). Mutações semelhantes são relatadas também nos oncogenes RAS, especialmente nos códons 12, 13 e 61 do HRAS e KRAS, embora os dados existentes sejam divergentes, tanto em relação aos genes da família RAS, como aos códons envolvidos e às frequências de mutações observadas (Rossit, 1995). É conveniente citar que os dímeros de pirimidina nesses casos parecem ser seletivamente removidos de genes transcricionalmente ativos (Ruven *et al.*, 1993), o que pode ser responsável pela presença de fotodanos e ativação de certos oncogenes silenciosos (Venema *et al.*, 1990).

O principal objetivo do presente trabalho foi a avaliação da expressão do gene TP53 em lesões de pele, através de técnicas imunohistoquímicas. O gene TP53 vem sendo intensamente estudado nos últimos anos em virtude da sua importância no controle do ciclo celular normal e da frequente ocorrência de formas mutantes e de acúmulo do seu produto em quase todos os tipos de neoplasias até hoje investigados (Nigro *et al.*, 1989; Bårtek *et al.*, 1990, 1991, 1993; Hollstein *et al.*, 1991; Donehower & Bradley, 1993). Como a proteína p53 está normalmente presente nas células em baixas concentrações e tem vida média muito curta, seu acúmulo reflete alteração conformacional e possivelmente mutação gênica ou estabilização por uma das vias do metabolismo celular (Lane & Benchimol, 1990).

Existem muitas variantes técnicas em imunohistoquímica que podem ser utilizadas no estudo da p53. Essas alternativas vão desde a disponibilidade comercial de diversos anticorpos até os métodos de detecção e a revelação da reação. Entre os métodos de detecção, o mais utilizado é o da peroxidase-antiperoxidase (PAP) e do complexo avidina-biotina (ABC). Outras enzimas como a fosfatase alcalina e a oxidase da glucose são também úteis em circunstâncias especiais e para reações múltiplas. Como revelador, o cromógeno diaminobenzidina é o mais empregado pois, embora carcinogênico, é o que apresenta melhor resolução, lenta degradação da cor pelo tempo e adequação para montagem de rotina. Podem ainda ser utilizados como cromógenos auxiliares do DAB, o clorito de cobalto ou o cloreto de níquel e o tetróxido de ósmio (Batifora, 1992).

É importante ressaltar que a sensibilidade do método depende de vários fatores. Os mais importantes são a concentração e a avidéz do anticorpo, tempo de incubação com o anticorpo primário, a qualidade de preservação dos antígenos e sua distribuição na amostra, e a sensibilidade do sistema de detecção. Tendo em vista a complexidade, a eficiência de detecção deve, portanto, ser ajustada de modo a otimizar cada um desses fatores. A



concentração do anticorpo deve ser adequada, por exemplo, para permitir um nível compatível com alta marcação e baixo *background* (McNutt *et al.*, 1994). Além disso existem algumas técnicas adicionais que visam aumentar a sensibilidade através da recuperação dos antígenos. A mais difundida é o tratamento com proteases (tripsina ou pepsina) anterior à incubação com o anticorpo primário. Recentemente foi descrita a técnica que utiliza o tampão citrato e choque térmico, com microondas, antes do tratamento com o anticorpo primário. Além disso, é citada a sua utilização em associação com as proteases (Shi *et al.*, 1991; Campani *et al.*, 1993).

É possível reconhecer dois padrões de marcação imunohistoquímica em amostras de pele, um apresenta coloração homogênea dos núcleos dos queratinócitos por toda a epiderme, sugerindo mutações. O outro padrão, ao contrário, pode apresentar reações em grupos isolados de células que, muito provavelmente, não refletem mutação e sim representam formas estabilizadas da proteína normal, em células sob condições fisiológicas alteradas (Mc Gregor *et al.*, 1993). Entretanto, a maioria dos trabalhos não cita essas diferenças e, em geral, o que se encontra na literatura são apenas referências de marcações positivas para a p53 nas amostras em que ocorre imunorreação. Os dados resumidos na tabela 9 variam de 0 a 74% em ceratoses (Gusterson *et al.*, 1991; Sim *et al.*, 1992), de 0 a 80% em carcinomas espinocelulares (Molès *et al.*, 1993b; Nagano *et al.*, 1993) e de 0 a 92% em epiteliomas (Gusterson *et al.*, 1991; Ziegler *et al.*, 1993). Os resultados ora obtidos revelaram imunorreação positiva em 32 amostras estudadas (35%), contra apenas 12 casos (13%) apresentando reações nucleares focais, o que sugere a ocorrência de mutações no gene TP53 no primeiro grupo. Realmente, o grau de correlação entre expressão aumentada e mutações tem sido alto em vários estudos (Iggo *et al.*, 1990; Davidoff *et al.*, 1991; Hollstein *et al.*, 1991) mas baixo em outros (Mercer *et al.*, 1985; Kastan *et al.*, 1991; Stretch *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993). No entanto, como ressalta o editorial de Wynford-Thomas publicado em 1992 e Greenblatt *et al.* (1994), vários aspectos precisam ser considerados na análise dos dados imunohistoquímicos, não sendo a relação entre a detecção da proteína e a ocorrência de uma mutação tão direta ou simples.

Resultados imunohistoquímicos negativos, por exemplo, podem ocorrer em diferentes situações, tais como:

a) ambos os genes TP53 não estão presentes no genoma, ou seja, a proteína não é sintetizada.

b) a proteína apresenta-se na forma estabilizada, mas em concentrações tão baixas que impossibilitam sua detecção através dos métodos empregados.

c) a configuração da proteína p53, sintetizada a partir de um gene mutado, é de tal forma aberrante que não permite seu reconhecimento pelo anticorpo.

Resultados positivos igualmente falsos podem ocorrer se a proteína normal é de alguma maneira acumulada nas células em concentrações mais elevadas que o normal (Ro *et al.*, 1993). O mecanismo para tal estabilização é ainda desconhecido mas talvez resulte da interrupção do processo de degradação normal da proteína (Wynford-Thomas, 1992). Nesse aspecto, é importante ressaltar que a identificação da proteína p53 foi uma consequência direta da sua associação com o antígeno T do vírus SV40 (Lane & Benchimol, 1990; Levine *et al.*, 1991). O genoma desse tipo de vírus, bem como de alguns outros, codifica proteínas que se ligam à p53, inativando-a. Muitas vezes, tal ligação conduz à estabilização direta da proteína normal. Em outros casos, a proteína viral pode agir sobre a p53 promovendo sua degradação mais rápida, como no caso do HPV (Scheffner *et al.*, 1990).

Uma vez que as proteínas virais são capazes de interagir com a p53 e estabilizá-la, é provável que existam várias proteínas celulares com funções semelhantes. O produto do gene MDM-2, por exemplo, interage diretamente com a proteína p53, também inativando-a funcionalmente e participando das suas vias autorregulatórias. Em sarcomas, a expressão elevada desse gene é acompanhada da inativação da proteína p53 normal. Isso significa que o seu produto, ligado à p53, pode estabilizá-la, embora evidências para esse fenômeno ainda não existam (Hall & Lane, 1994).

Alterações em outros genes além do MDM-2 também devem estar envolvidas no processo. Um deles, o WAF1/CIP1, atua em etapas posteriores ao TP53 nas vias de controle do ciclo celular e é regulado por ele. Não seria surpresa que na ausência da atividade normal desse efector, o TP53 teria sua expressão elevada e a proteína correspondente poderia se acumular (Greenblatt *et al.*, 1994).

Outra possível explicação para a presença de p53 em concentrações elevadas, sem mutação do gene, foi referida por Moll *et al.* (1992) em um estudo de câncer de mama. Os autores descreveram que 37% dos tumores analisados exibiam intensa coloração citoplasmática quando avaliados imunohistoquimicamente, indicando, portanto, exclusão nuclear da proteína. O sequenciamento do gene em sete desses tumores revelou que seis não apresentavam qualquer tipo de mutação. Os autores sugeriram que, em alguns casos, o produto gênico, embora sem alteração estrutural, pode estar inativado funcionalmente porque

permaneceu no citoplasma e, dessa forma, não atingiu seu sítio de ação no núcleo celular. Os mecanismos pelos quais isso ocorre não foram estabelecidos mas foi proposto que a proteína mdm 2 pode estar envolvida no processo.

Nas ceratoses solares analisadas foi detectada a presença nuclear da proteína em 16,6% das amostras, que exibiram de 5 a 75% das células da lesão com marcação. Os dados da literatura sobre ceratose solar (Tabela 9) relatam desde 0% dos casos positivos após a utilização de cinco anticorpos diferentes até 73,3% deles exibindo imunorreação com o anticorpo CM1 (Gusterson *et al.*, 1991; Mc Gregor *et al.*, 1992; Sim *et al.*, 1992; Ro *et al.*, 1993; Nagano *et al.*, 1993; Taguchi *et al.*, 1994). É provável que essa diferença resulte das diversas metodologias e anticorpos empregados pelos vários autores, além das diferenças entre as próprias amostras.

Embora o número de casos de ceratose solar examinados seja limitado, os dados indicam que a p53 está envolvida em um dos passos iniciais da carcinogênese cutânea, provavelmente através de mutação gênica e consequente perda de atividade. De acordo com essa idéia estão os resultados de Taguchi *et al.* (1993), que relatam a presença de marcação imunohistoquímica positiva em espécimens com mutações confirmadas através da análise dos polimorfismos conformacionais de fita simples aplicada sobre os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR-SSCP). É evidente que os dados do presente estudo necessitam dessa confirmação por SSCP e posteriormente por sequenciamento de DNA, porém constituem um forte indício de modificação da proteína. É importante ressaltar o caráter pré-maligno da ceratose solar, predisponente a carcinomas espinocelulares, e da possibilidade de malignização incipiente em alguns dos casos.

Em relação aos carcinomas espinocelulares estudados, foram encontradas marcações nucleares em 35,5% das amostras, com densidades variando de 9 a 56%. Como pode ser visto na Tabela 9, também nesse tipo patológico existe pouca concordância entre os dados dos diversos pesquisadores. A literatura registra desde 0% (Molès *et al.*, 1993b) até 60% (Kerschmann *et al.*, 1994) ou 80% (Nagano *et al.*, 1993) de casos positivos. Essa grande diferença deve-se, do mesmo modo que entre as ceratoses, à utilização de diferentes anticorpos, de diferentes padronizações da técnica e, principalmente, de diversos critérios de avaliação das lâminas. Outro aspecto deve ser a qualidade das amostras, consequente de seu processamento inicial, como a fixação do tecido, e que leva, muitas vezes, a resultados divergentes. Além disso, em alguns casos, o teste imunohistoquímico é realizado em preparações frescas que também pode ter implicações no resultado final da análise



(Barbareschi *et al.*, 1992; Shea *et al.*, 1992; Helander *et al.*, 1993). No presente estudo, entretanto, o acúmulo nuclear da proteína p53 parece realmente relacionado com o caráter maligno da lesão, uma vez que foi muito mais frequente que nas ceratoses solares, que é o processo benigno correspondente. Essa proposição está de acordo com os dados de Ro *et al.* (1993) que sugerem que as mutações do gene TP53 podem estar envolvidas na progressão das lesões malignas da pele. Em seu trabalho, os autores relatam uma proporção significativa de lesões displásticas com positividade intermediária entre aquelas obtidas em lesões benignas e malignas. A observação de marcação em apenas 3% dos melanomas sugere que, embora a detecção da proteína p53 seja um evento frequente em lesões malignas, não está diretamente relacionada com o fenótipo maligno ou potencial metastático. Ao contrário, outros pesquisadores ressaltam que as mutações do gene TP53 não representam necessariamente um evento tardio na carcinogênese e que não estão restritas às lesões malignas invasivas. A literatura registra positividade de até 80% em ceratoacantoma (Kerschmann *et al.*, 1994) e 94% em poroqueratose (Magee *et al.*, 1994). No entanto, entre os melanomas analisados, apenas um autor registra baixa frequência de marcação positiva (Ro *et al.*, 1993), enquanto que a maioria dos autores consideram-na um evento tardio na carcinogênese. Também Baas *et al.* (1994), verificaram que as mutações no gene TP53 são raras em adenomas colorretais quando comparadas com a alta ocorrência desse evento nos carcinomas. Por outro lado, Nagano *et al.* (1993) sugerem que, na tumorigênese cutânea, pode ser um dos passos iniciais, visto que foi observada uma alta porcentagem nas ceratoses analisadas.

No último grupo analisado, dos epiteliomas basocelulares, a positividade nuclear encontrada compreendeu 51,6% dos casos estudados. Esse resultado está muito próximo dos obtidos por alguns autores, que relatam valores de 45% (Campbell *et al.*, 1993b), 46% (McGregor *et al.*, 1992) e 48% (Barbareschi *et al.*, 1992). No entanto, na Tabela 9, pode ser observado que os resultados de maneira geral são bastante heterogêneos, variando de 0% (Gusterson *et al.*, 1991; Molès *et al.*, 1993b; Helander *et al.*, 1993) até 83% (Shea *et al.*, 1992). É importante ressaltar que, nesse grupo patológico, a porcentagem da área total do corte bem como a densidade de marcação mostraram os valores mais elevados do presente estudo, entre os quais os do caso B89 3161, em que foram registrados 88% de células positivas nas regiões de intensa reação. Novamente, a diferença vista em relação às lesões benignas sustenta a hipótese do acúmulo da proteína p53 estar relacionado com o processo tumorigênico e provavelmente refletir uma mutação gênica.



Tabela 9. Dados imunohistoquímicos da proteína p53 em amostras de ceratose solar e de carcinomas (CA) baso e espinocelulares.(NR: não-referido).

Tipo patológico	Anticorpos	Resultados +/total(%)	Crítérios de positividade	Localização intracelular	Autores
Ceratose solar	JG8, CM-1, 1801	0/12 (0%)	NR	-	Gusterson <i>et al.</i> , 1991
	CM-1	5/9 (55%)	fraca ou forte	nuclear	McGregor <i>et al.</i> , 1992
	CM-1	28/31 (74%)	NR	nuclear	Sim <i>et al.</i> , 1992
	DO7	3/14 (21%)	NR	nuclear	Ro <i>et al.</i> , 1993
	CM-1	11/23 (48%)	>5%	nuclear	Nagano <i>et al.</i> , 1993
	1801, DO7	6/27 (22%)	NR	nuclear	Taguchi <i>et al.</i> , 1994
CA espinocelular	1801	5/30 (17%)	>5%	nuclear	Presente trabalho
		4/30 (13%)	>5%	citopl.	
	JG8, CM-1, 1801	3/20 (15%)	NR	nuclear	Gusterson <i>et al.</i> , 1991
	CM-1	11/22 (50%)	fraca ou forte	nuclear	McGregor <i>et al.</i> , 1992
	1801	30/59 (51%)	NR	nuclear	Stephenson <i>et al.</i> , 1992
		2/59 (3%)		nuclear e citopl.	
	CM-1	6/23 (26%)	NR	nuclear	Slater <i>et al.</i> , 1992
	DO7	15/27 (55%)	>5%	nuclear	Ro <i>et al.</i> , 1993
	421	7/16 (44%)	fraca ou forte	nuclear e citopl.	Helander <i>et al.</i> , 1993
	1801	7/16 (44%)	fraca ou forte	nuclear	Helander <i>et al.</i> , 1993
	CM-1	7/16 (44%)	fraca ou forte	nuclear e citopl.	Helander <i>et al.</i> , 1993
	CM-1	0/10 (0%)	NR	-	Molès <i>et al.</i> , 1993a
	DO7	0/10 (0%)	NR	-	Molès <i>et al.</i> , 1993a
	1801	1/10 (10%)	NR	nuclear	Molès <i>et al.</i> , 1993a
	CM-1	4/5 (80%)*	NR	nuclear	Nagano <i>et al.</i> , 1993
		15/47 (32%)	NR	nuclear	Nagano <i>et al.</i> , 1993
	1801	12/20 (60%)	>2%	nuclear	Kerschmann <i>et al.</i> , 1994
	BP53-12-1	16/26 (61%)	<25 a >75%	nuclear	Oram <i>et al.</i> , 1994
	1801	11/31 (35%)	>5%	nuclear	Presente trabalho
		1/31 (3%)	>5%	citopl.	
CA basocelular	JG8, CM1, 1801	0/10 (0%)	NR	-	Gusterson <i>et al.</i> , 1991
	1801, DO7	13/27 (48%)	<10% a >50%	nuclear	Barbareschi <i>et al.</i> , 1992
	CM-1	14/24 (46%)	fraca ou forte	nuclear	McGregor <i>et al.</i> , 1992
	1801	30/36 (83%)	>1%	nuclear	Shea <i>et al.</i> , 1992
	240	21/36 (58%)	>1%	nuclear	Shea <i>et al.</i> , 1992
	DO7	9/20 (45%)	NR	nuclear	Campbell <i>et al.</i> , 1993b
	DO7	11/26 (42%)	>5%	nuclear	Ro <i>et al.</i> , 1993
	421	1/7 (14%)	fraca ou forte	citopl.	Helander <i>et al.</i> , 1993
	1801	0/7 (0%)	fraca ou forte	-	Helander <i>et al.</i> , 1993
	CM1	1/7 (14%)	fraca ou forte	citopl.	Helander <i>et al.</i> , 1993
	CM1	23/25 (92%)	>80%	nuclear	Ziegler <i>et al.</i> , 1993
	CM1	2/14 (14%)	NR	nuclear	Molès <i>et al.</i> , 1993a
	DO7	2/14 (14%)	NR	nuclear	Molès <i>et al.</i> , 1993a
	1801	0/14 (0%)	NR	-	Molès <i>et al.</i> , 1993a
	1801	16/31 (52%)	>5%	nuclear	Presente trabalho
		5/31 (16%)	>5%	citopl.	

*paciente XP

No presente estudo foram analisadas 39 lesões múltiplas provenientes de 16 pacientes. Foi constatada a variedade de combinações nesse grupo de tumores, tanto em relação ao tipo patológico quanto à localização das neoplasias no corpo. Foram observadas reações positivas e concordância de tipos em apenas três pacientes, enquanto que resultado negativo no mesmo tipo de lesão só foi obtido em um paciente. Quanto à localização dos tumores, como era esperado, houve maior concordância, sendo que nove pacientes apresentaram essa característica. Realmente, a grande maioria dos tumores estava localizada na face e, portanto, não surpreende o fato da localização apresentar maior grau de concordância. Por outro lado, as discordâncias entre os mesmos parâmetros foram constatadas em 12 pacientes. Assim, não pode ser sugerida nenhuma correlação entre imunorreações, positivas ou negativas, e o caráter múltiplo dessas lesões. O paciente 25, por exemplo, apresentou tipos patológicos distintos (B93 2849 B e C), ambos localizados na face e, portanto, expostos aos mesmos fatores etiológicos externos, que apresentaram resultados imunohistoquímicos diferentes, ao passo que a paciente 32 (casos B89 2812 A e B), sob condições idênticas mostrou resultados semelhantes. Mais divergente ainda foram os resultados do paciente 30, do qual foram analisadas quatro amostras de mesmo tipo patológico, sendo três oriundas da face, e apenas duas mostraram resultados positivos.

Dos catorze casos com análise citogenética prévia incluídos na amostra, apenas cinco carcinomas basocelulares (B89 1561, B89 1843 B, B91 489, B89 2812 B e B91 430 A) eram portadores de algum tipo de alteração envolvendo o cromossomo 17, alterações essas não clonais e observadas em apenas algumas das células analisadas. Os três primeiros exibiam monossomia desse cromossomo e os outros dois mostraram as translocações $t(11;17)(p11-12;p12-13)$ e $t(16;17)(q24-q11)$, respectivamente (Oyama, 1991; Pavarino, 1993). Três desses cinco casos (B89 1843 B, B89 2812 B e B91 489) apresentaram imunopositividade nuclear para a proteína p53 e nos demais não foi observada qualquer alteração imunohistoquímica. Visto que o gene TP53 encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 17 (Isobe *et al.*, 1986), seria esperado que, nas amostras em que foi citada a perda desse cromossomo, o resultado fosse negativo, pois somente um gene do par estaria presente no genoma e a expressão seria insuficiente para detecção imunohistoquímica. Curiosamente, dois desses casos apresentaram acúmulo da proteína. Já nas amostras com translocação, desde que o braço curto sofresse rearranjo (caso B89 2812 B), não surpreenderia um resultado positivo. Entretanto, como o quadro citogenético não revelou um clone celular com alteração do cromossomo 17 e, mais provavelmente, fosse decorrente de



instabilidade genética com aberrações presentes em apenas uma célula, não é inesperada a ausência de relações entre os achados cariotípicos e imunohistoquímicos.

Uma questão importante que deve ser ressaltada refere-se à heterogeneidade dos tumores, ou seja, a existência de diferentes populações celulares em uma única lesão. Desde que os tumores primários podem exibir clones que apresentam propriedades biológicas diferentes, tais como cariótipo, taxa de crescimento e capacidade metastática (Kanjilal *et al.*, 1993), a expressão da proteína p53 também deve constituir um fator de diferenciação desses clones. Como ressaltam Hall & Lane (1994), o ambiente celular pode ser determinante da estabilidade da proteína p53 e seu acúmulo refletir mais as condições da célula tumoral do que a estrutura intrínseca da proteína ou mutações gênicas. Outra explicação seria que a p53 adquire diferentes conformações durante o processo de diferenciação de queratinócitos normais (Spandau, 1994), e que os tecidos que apresentam intensa proliferação celular exibem simplesmente o acúmulo da proteína p53 normal, detectável através de técnicas imunohistoquímicas (Gorgoulis *et al.*, 1994).

O número de células com expressão aumentada de p53 é outro aspecto importante a ser considerado em um estudo imunohistoquímico. Vários padrões distintos de expressão têm sido definidos, independentemente do órgão afetado ou do tipo patológico. Assim, em muitos tumores, a maioria das células apresenta acúmulo de proteína e é frequente a concomitante coloração intensa nesses casos. Ao contrário, outros tumores apresentam níveis variáveis de expressão e, algumas vezes, somente pequenos grupos de células coradas. Alguns autores acreditam que esses fenótipos contrastantes podem refletir bases biológicas diferentes (Hall & Lane, 1994). Por exemplo, a ocorrência de pequenos grupos de células intensamente positivas não parece estar relacionada com anormalidades moleculares do gene TP53. Pode representar, mais provavelmente, a ação do "sistema p53", no qual a proteína normal acumula-se em resposta a erros genéticos que ocorrem em maior frequência no tumor, em comparação ao tecido circundante normal. Ao contrário, a presença de forte coloração na maioria das células está geralmente associada a mutações (Baas *et al.*, 1994). Nos carcinomas baso e espinocelulares, presentemente estudados, com padrões distintos de intensidade de imunorreação, nenhum dos onze casos (seis espinocelulares e cinco basocelulares) com forte marcação apresentou densidade de células coradas menor que 26%, sendo aquelas com reação de intensidade fraca, portadoras de, no máximo, 5 a 26% das células da lesão.

Nesse ponto convém citar que alguns fatores podem levar ao aumento transitório de expressão da p53. Pelo menos um deles é bem conhecido e presente em condições fisiológicas normais, a luz UV. Realmente, experimentos com pele normal irradiada *in vivo*, realizados por Campbell *et al.* (1993a) e Hall *et al.* (1993), demonstraram, com técnicas imunohistoquímicas, aumento da expressão do gene TP53 resultante da ação dos raios UV. Resultados semelhantes foram observados em células tumorais, onde foi observada a produção elevada da p53 normal, que indicariam a apoptose, a supressão da proliferação celular e a indução da diferenciação, como alguns dos padrões da atividade normal da proteína nessas células. Outros autores detectaram, ainda, níveis aumentados da proteína em resposta a aplicações tópicas de agentes irritantes da pele, como dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido retinóico e propileno glicol (Healy *et al.*, 1994).

No presente estudo, foram analisadas 81 lesões expostas e apenas 9 não expostas e todos os casos com imunorreação nuclear positiva estavam localizados em áreas do corpo expostas ao sol. Esse resultado já era esperado, pois os raios UV constituem um dos fatores etiológicos mais importantes no desenvolvimento dessas neoplasias (Diffey, 1987; Brash *et al.*, 1991). Já foram localizados no gene TP53 seus produtos mais frequentes, os dímeros de pirimidina, com correspondente detecção imunohistoquímica da respectiva proteína (Campbell *et al.*, 1993b; Hall *et al.*, 1993). É possível que a detecção imunohistoquímica da p53, observada no presente trabalho, esteja relacionada a mutações induzidas por raios UV, como é referido em alguns artigos já citados (Oram *et al.*, 1994; Nagano *et al.*, 1993; Taguchi *et al.*, 1993).

Dentre os casos de ceratoses estudados, foram observadas quatro amostras com imunorreação citoplasmática da proteína p53, sendo que em nenhuma delas foi detectada reação nuclear. Dessas, duas eram provenientes de áreas do corpo não expostas à luz solar (casos B89 1006 e B93 1829), uma localizada na região cervical e outra na perna. Exemplo semelhante foi observado nas amostras de carcinomas espinocelulares, com apenas um caso de imunorreação citoplasmática e origem em área do corpo não exposta (B93 179), ao contrário dos epiteliomas com cinco casos de marcação citoplasmática, todos provenientes de áreas do corpo expostas. Seria importante a realização de estudos adicionais nesses casos para avaliação da presença de mutações gênicas ou ainda a realização de testes imunohistoquímicos com outros anticorpos para investigação de proteínas que poderiam estar complexadas à p53.

De maneira geral, poucos autores citam com relevância a imunorreação citoplasmática em seus trabalhos. Por exemplo, Rodrigues *et al.* (1990) e Martin *et al.* (1992), em estudos com tumores do trato digestivo, apenas referem a ocorrência dessa marcação mas não a considera na análise final. O mesmo pode ser observado no trabalho de Casey *et al.* (1993), que investigaram células pancreáticas em neoplasias e em inflamações do órgão em relação à existência de mutações no gene TP53. Esses autores citam o aparecimento de coloração citoplasmática fraca em vários casos, que também não foi considerada a menos que estivesse presente a marcação nuclear. Em um estudo com tumores de fígado, foram observadas aproximadamente 50% das amostras com positividade citoplasmática, tanto nas células neoplásicas como em alguns hepatócitos normais. Nesse caso, a interpretação sugerida foi a possível ligação entre a proteína p53 mutante e uma das proteínas da família hsp 70 (Choi *et al.*, 1993). Finalmente, Holm *et al.* (1993) e Ye *et al.* (1993) apenas citam a ocorrência esporádica de marcação citoplasmática em câncer de cérvix uterino e de bexiga, respectivamente, sem dar relevância ao fato.

Sun *et al.* (1992), por outro lado, avaliaram o significado prognóstico da proteína p53 citoplasmática e nuclear em 293 amostras de adenocarcinomas coloretais, investigadas por técnicas imunohistoquímicas. Os autores chegaram à conclusão de que a expressão citoplasmática da p53 pode ser um indicador biológico útil para o prognóstico nesse tipo de lesão. O grupo encontrou 10% dos casos positivos apenas para o acúmulo citoplasmático e considerou esse achado como uma possível evidência da malignidade da lesão. Porter *et al.* (1992) e Brambilla *et al.* (1993), os primeiros estudando vários tipos de neoplasias e os últimos analisando apenas tumores de pulmão, também teceram importantes considerações acerca da positividade citoplasmática. Em primeiro lugar, sugeriram que a presença da proteína no citoplasma pode indicar apenas a forma funcionalmente anormal, enquanto no núcleo pode representar, teoricamente, também a forma normal. Salientaram ainda que a baixa porcentagem de casos apresentando marcação citoplasmática poderia ser explicada pela diminuição de epítomos disponíveis quando a p53 encontra-se complexada com outras proteínas citoplasmáticas. Baas *et al.* (1994) também levantam a possibilidade de representar mutações no domínio responsável pela ligação ao DNA.

Em relação especificamente aos tumores de pele, Cristofolini *et al.* (1993), analisando nevos e melanomas, citam marcação citoplasmática em apenas um dos nevos investigados e assinalam a possibilidade de ser artefato de técnica ou alteração de transporte nuclear. Os autores ressaltam que essa é uma questão controversa e que são necessários



estudos adicionais para elucidar seu significado. Da mesma forma, Shea *et al.* (1992) constataram um padrão citoplasmático de imunorreatividade em carcinomas basocelulares que, entretanto, não foi considerado no trabalho, embora pudesse ser biologicamente relevante. Finalmente, Stephenson *et al.* (1992) também citaram a ocorrência esporádica de fraca coloração citoplasmática em carcinoma espinocelular da pele.

A localização nuclear da proteína p53 é essencial para a bioatividade e é mediada por um sinal de localização nuclear inerente à estrutura primária da molécula, ou seja, da sequência de aminoácidos. A deleção de tal sequência anula completamente o efeito supressor de crescimento celular da proteína normal. A localização citoplasmática, preferencialmente na camada basal da epiderme, pode representar acúmulo de p53 que é excluído do núcleo e portanto funcionalmente inativo ou ser decorrente de processos de fixação e coloração. Já é conhecido que, com o emprego de soluções fixadoras com mais de 30% de água, a localização citoplasmática é vista predominantemente (Gusterson *et al.*, 1991).

É importante ressaltar que, no presente estudo, as células apresentando imunorreação citoplasmática estavam localizadas quase que exclusivamente na camada basal, independentemente do tipo patológico ou da região da lesão. Os carcinomas basocelulares B93 265 e B93 2359 A, por exemplo, apresentavam a marcação nas células da camada basal epidérmica de regiões não afetadas pela neoplasia. Esses dados estão de acordo com Spandau (1994), que revela em seu artigo a detecção de imunorreação para a p53 predominantemente citoplasmática na camada basal epidérmica da pele de doadores normais. No presente trabalho, as reações citoplasmáticas compreenderam 39 % de todas as amostras analisadas, o que pode indicar a participação desse tipo de alteração no processo de tumorigênese nesses casos, decorrente de exclusão nuclear, associação a proteínas citoplasmáticas ou, ainda, estabilização da própria proteína na forma de oligomerização, como já referido anteriormente.

Em conclusão, o presente estudo sugere que alterações na expressão do gene TP53 participaram do desenvolvimento e progressão das lesões de pele analisadas. Além disso, o fato das amostras positivas ocorrerem exclusivamente em regiões do corpo expostas à luz solar reforça a hipótese de existirem mutações gênicas, principalmente aquelas induzidas pelos raios UV. Os resultados obtidos fornecem fortes indicações de anomalias no comportamento da proteína p53 e servem de base para futuras investigações moleculares que permitirão avaliar a correlação entre mutação e acúmulo da proteína. Na realidade, esses

resultados já estão sendo utilizados na escolha de amostras a serem analisadas para polimorfismos conformacionais de fita simples do gene TP53 e seu efector WAF1/CIP1.

A pele oferece um excelente modelo para estudo da carcinogênese humana, pois apresenta uma grande variedade de lesões acessíveis à biópsia, que compreendem desde pequenos tumores benignos até processos malignos com grande potencial metastático, incluindo cânceres cutâneos induzidos por agentes ambientais.

Dados epidemiológicos e experimentais indicam, por exemplo, que a luz UV constitui um fator importante para o desenvolvimento dessas lesões. Esse agente induz a formação de fotoproductos no DNA, que podem levar a mutações específicas em genes envolvidos com a função supressora de tumor, tais como o gene supressor de tumor TP53, que manifesta alterações específicas em sua sequência relacionada à radiação UV.

A proteína p53 tem uma ação crítica e participa do controle do ciclo celular. Seu acúmulo no núcleo celular pode ser detectado por métodos imunohistoquímicos e está fortemente correlacionado com mutações no gene correspondente.

No presente estudo, foi investigado o acúmulo da proteína p53 em 92 tumores de pele de três tipos patológicos (30 ceratose actínica, 31 carcinomas espinocelulares e 31 carcinomas basocelulares), empregando o anticorpo monoclonal PAb 1801 e o método de detecção através do complexo avidina-biotina.

A imunoreação foi observada no citoplasma, principalmente de queratinócitos da camada basal de queratos (12,3%) e de áreas de invasão de carcinomas basocelulares (16,6%). Este resultado pode indicar que a proteína p53 acumulada no citoplasma está relacionada com a expressão de oncogenes e pode ser responsável por alterações de processos celulares, como a proliferação e a apoptose.

A imunoreação positiva foi observada também em 5 (16,6%) ceratose, 11 (35,5%) carcinomas espinocelulares e em 16 (51,6%) carcinomas basocelulares, todos provenientes de áreas do corpo expostas ao sol. Esses achados sugerem que mutações no referido gene podem estar envolvidas na progressão de algumas dessas lesões e relacionadas à radiação UV.

V. RESUMO

A pele oferece um excelente modelo para estudo da carcinogênese humana, pois apresenta uma grande variedade de lesões acessíveis à biópsia, que compreendem desde pequenos tumores benignos até processos malignos com grande potencial metastático, muitos deles sabidamente desencadeados por agentes ambientais.

Dados epidemiológicos e experimentais indicam, por exemplo, que a luz UV constitui um fator importante para o desenvolvimento dessas lesões. Esse agente induz a formação de fotoprodutos no DNA, que podem levar a mutações específicas em genes envolvidos com a tumorigênese cutânea. É provável que um desses genes corresponda ao gene supressor de tumor TP53, que manifesta alterações específicas em sua sequência relacionadas com a exposição à radiação UV.

A proteína p53 tem vida média curta e participa do controle do ciclo celular. Seu acúmulo no núcleo celular pode ser detectado por métodos imunohistoquímicos e está fortemente correlacionado com mutações no gene correspondente.

No presente estudo, foi investigado o acúmulo da proteína p53 em 92 tumores de pele de três tipos patológicos (30 ceratoses solares, 31 carcinomas espinocelulares e 31 carcinomas basocelulares), empregando o anticorpo monoclonal PAb 1801 e o método de detecção através do complexo avidina-biotina.

A imunorreação foi observada no citoplasma, principalmente de queratinócitos da camada basal de quatro (13,3%) ceratoses e de cinco (16,1%) carcinomas basocelulares. Esse resultado pode indicar que a proteína p53 excluída do núcleo é funcionalmente inativa mas também pode ter pequeno significado e ser simplesmente decorrente de processos técnicos, como aqueles relacionados com fixação e coloração do tecido.

As imunorreações nucleares positivas foram observadas em 5(16,6%) ceratoses, 11(35,5%) carcinomas espinocelulares e em 16(51,6%) carcinomas basocelulares, todos provenientes de áreas do corpo expostas ao sol. Esses achados sugerem que mutações do referido gene podem estar envolvidas na progressão de algumas dessas lesões e relacionadas à radiação UV.



VI. SUMMARY

The skin affords an excellent model of human carcinogenesis because a variety of lesions from benign tumours to invasive malignancy, with or without metastatic potential, are commonly found, and are accessible to biopsy.

Epidemiological and experimental data strongly implicate UV light as an important factor in the development of such lesions. This agent induces the formation of photoproducts which can lead to specific mutations in genes involved in cutaneous carcinogenesis. Recent studies suggest that these mutations can occur in the TP53 supressor gene as a result of UV radiation and may be an important event in this process.

The p53 protein is normally present in minute amounts in cells but mutant forms can accumulate to high levels and be detected immunohistochemically.

In this study, we investigated the aberrant accumulation of p53 protein in three types of skin tumours (30 cases of keratosis, 31 of squamous cell and 31 of basal cell carcinomas), using the monoclonal antibody PAb 1801 and the avidin-biotin complex method.

Cytoplasmatic reactivity localized to basal keratinocytes was observed in four (13,3%) samples of keratosis and five (16,1%) samples of basal cell carcinomas. The citoplasmic localization within the basal cell compartment of epidermis may represent accumulation of p53 which was excluded from the nucleus and is therefore functionally inactive. On the other side, it can merely be the result from procedures performed during fixation and staining of the sample.

Nuclear positivity was detected in 5 (16,6%) keratosis, in 11 (35,5%) squamous cell carcinomas and in 16 (51,6%) basal cell carcinomas. None of biopsies from non-sun-exposed sites presented similar results. These findings suggest that p53 mutations may be involved in the progression towards malignancy in human skin tumours and related to UV radiation.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSLEN L.A. & MORKVE O. Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. **Int. J. Cancer**, v.52, p.13-16, 1992.
- ARLETT C.F., LOWE J.E., HARCOURT S.A., WAUGH A.P.W., COLE J., ROZA L., DIFFEY B.L., MORI T., NIKAIDO O. e GREEN M.H.L. Hypersensitivity of Human Lymphocytes to UV-B and Solar Irradiation. **Cancer Res.**, v.53, p.609-614, 1993.
- ARMSTRONG J.D. & KUNZ B.A. Site and strand specificity of UVB mutagenesis in the SUP4-o gene of yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 9005-9009, 1990.
- ARMSTRONG B.K. Stratospheric Ozone and Health. **Int. J. Epidemiology**, v.23, p.873-885, 1994.
- BAAS I.O., MULDER J-W.R., OFFERHAUS G.J.A., VOGELSTEIN B., HAMILTON S.R. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. **J. Pathol.**, v.172, p.5-12, 1994.
- BAILLEUL B., SURANI M.A., WHITE S. Skin hiperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a *ras* oncogene from suprabasal keratin promoter. **Cell**, v.62, p.697-708, 1990.
- BAKER S.J., FEARON E.R., NIGRO J.M., HAMILTON S.R., PREISINGER A.C., JESSUP J.M., van TUINEN P., LEDBETTER D.H., BARKER D.F., NAKAMURA Y., WHITE R., VOGELSTEIN B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. **Science**, v.244, p.217-221, 1989.
- BANKS L., MATLASHEWSKI G, CRAWFORD L. Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. **Eur. J. Biochem**, v.159, p.529-534, 1986.
- BARAK Y., JUVEN T., HAFFNER R., OREN M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. **The EMBO J.**, v.12, p.461-468, 1993.
- BARBARESCHI M., GIRLANDO S., CRISTOFOLINI P., CRISTOFOLINI M., TOGNI R., BOI S. P53 protein expression in basal cell carcinomas. **Histopathology**, v.21, p.579-581, 1992.
- BARNES D.M., HANBY A.M., GILLET C.E., MOHAMMED E., HODGSON S., BOBROW L.G., LEIGH I.M., PURKIS T., MACGEOCH C., SPURR N.K., BARTEK J., VOJTESEK B., PICKSLEY S.M., LANE D.P. Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. **Lancet**, v.340, p.259-263, 1992.
- BÁRTEK J., BÁRTKOVÁ J., LUKÁS J., STASKOVA Z., VOJTESEK B., LANE D.P. Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein on paraffin sections using a series of novel monoclonal antibodies. **J. Pathol.**, v. 169, n.1, p.27-34, 1993.
- BÁRTEK J., BÁRTKOVÁ J., VOJTESEK B., STASKOVÁ Z, LUKÁS J, KEJTHAR A, KOVARIK J, MIDGLEY C.A., GANNON J.V. e LANE D.P. Aberrant expression of p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. **Oncogene**, v.6, p.1699-1703, 1991.
- BÁRTEK J., IGGO R., GANNON J., LANE D.P., Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. **Oncogene**, v.5, p.893-899,1990.
- BASSET-SÉGUIN N., MOLÈS J.P., MILS V., DEREURE O., GUILHOU J.J. TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis. **J. Invest. Dermatol. (5 Suppl.)**, v.103, p.1025-1065, 1994.
- BATIFORA H. Immunohistochemistry in tumor diagnosis. **Short Course #2**, Atlanta, 1992. 62 p.



- BERCHUCK A., KOHLER M.F., MARKS J.R., WISEMAN R., BOYD J., BAST R.C. Jr. The p53 tumor supressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.170, p.246-252, 1994.
- BIELFELD V., WEICHENTHAL M., ROSER M., BREITBART E.W., BERGER J., SEEMANOVA E., RÜDIGER H.W. Ultraviolet-induced chromosomal instability in cultured fibroblasts of heterozygote carriers for xeroderma pigmentosum. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.43, p.219-226, 1989.
- BOOKSTEIN R. Tumor supressor genes in prostatic oncogenesis. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, v.19, p.217-223, 1994.
- BRAMBILLA E., GAZZEIN S., MORO D., DEFROMENTEL C.C., GOUYER V., JAUOT M., BRAMBILLA C. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. **Am. J. Pathol.**, v.143, p.199-210, 1993.
- BRASH D.E., RUDOLPH J.A., SINON J. A., LIN A., McKENNA G.J., BADEN H.P., HALPERIN A. J., PONTÉM J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.10124-10128, 1991.
- BURNS F.J., ALBERT R.E., GARTLE S.J. Radiation-induced cancer in rat skin. In: Conti, C.J. *et al.* (Ed.). **Skin tumors: Experimental and Clinical Aspects**. New York, Raven Press, 1989. p. 321-335.
- BURNS J.E., BAIRD M.C., CLARK L.J., BURNS P.A., EDINGTON K., CHAPMAN C., MITCHELL R., ROBERTSON G, SOUTAR D, PARKINSON E.K. Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. **Br. J. Cancer**. v.67, p. 1274-1284, 1993.
- CAMPANI D., CECCHETTI D., BEVILACQUA G. Immunocytochemical p53 detection by microwave oven heating of routinely formalin-fixed paraffin sections. **J. Pathol.**, v.171, p.151-152, 1993.
- CAMPBELL C., QUINN A.G., ANGUS B., FARR P.M., REES J.L. Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. **Cancer Res.**, v.53, p.2697-2699, 1993a.
- CAMPBELL C., QUINN A.G., ANGUS B., REES J.L. The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. **Br. J. Dermatol.**, v.129, p.235-241, 1993b.
- CASEY G., YAMANAKA Y., FRIESS H., KOBRIN M.S., LOPEZ M.E., BUCHER M., BEGER H.G., KORC M. p53 mutations are common in pancreatic cancer and are absent in chronic pancreatitis. **Cancer Let.**, v.69, p.151-160, 1993.
- CASTRESANA J.S., RUBIO M.-P, VÁZQUEZ J.J., IDOATE M., SOBER A.J., SEIZINGER B.R., BARNHILL R.L.. Lack of allelic deletion and point mutation as mechanisms of p53 activation in human malignant melanoma. **Int. J. Cancer**, v.55, p.562-565, 1993.
- CERUTTI P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v.344, p.862-863, 1994.
- CERUTTI P., HUSSAIN P., POURZAND C., AGUILAR F. Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the p53 tumor supressor gene. **Cancer Res.**, v.54 (7 Suppl.), p.1934s-1938s, 1994.
- CHANG F., SYZJANEN S., SYRJANEN K. Implications of the p53 tumor-supressor gene in clinical oncology. **J. Clin. Oncol.**, v.13, p.1009-1022, 1995.
- CHEN P-L, CHEN Y., BOOKSTEIN R., LEE W-H. Genetic mechanisms of tumor supression by the human p53 gene. **Science**, v.250, p.1576-1580, 1990.

- CHOI S.W., HYTIROGLOU P., GELLER S.A., KIM S.M., CHUNG K.W., PARK D.H., THEISE N.D., THUNG S.W. The expression of p53 antigen in primary malignant epithelial tumors of the liver-An Immunohistochemical study. **Liver**, v.13, p.172-176, 1993.
- CORREA P. & SHIAO Y.H. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.54 (7 Suppl.), p.1941s-1943s, 1994.
- COTRAN R.S., KUMAR U., ROBBINS S.L. **Patologia estrutural e funcional** (4 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197-253, 1991.
- COX S.E., ROBERTS L.J., BERESTRESSER P.R. Prevention of skin cancer in *Xeroderma pigmentosum*. The physician as advocate. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.29, p.1945-1946, 1993.
- COWAN J.M., BECKETT M.A., WEICHSELBAUM R.R. Chromosome changes characterizing in vitro response to radiation in human squamous cell carcinoma lines. **Cancer Res.**, v.53, p.5542-5547, 1993.
- CRAWFORD L.V., PIM D.C., BULBROOK R.D. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. **Int. J. Cancer**, v.30, p.403-408, 1982.
- CRISTOFOLINI M., BOI S., GIRLANDO S., ZUMIANI G., CRISTOFOLINI P., PALMA P.D., DOGLIONI C., BARBARESCHI M. P53 protein expression in nevi and melanomas. **Arch. Dermatol.**, v.129, p.739-743, 1993.
- DANNO K. & HORIO T. Histochemical staining of sunburn cells for sulphhydryl and disulphide groups: a time course study. **Br. J. Dermatol.**, v.102, p. 535-539, 1980.
- DARNELL J.E., LODISH H.F., BALTIMORE D. **Molecular cell biology**. New York: Scientific American Books, 1986. 1192 p.
- DAVIDOFF A. M., HUMPHREY P. A., IGLEHART J.D., MARKS J.R.. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p. 5006 -5010, 1991.
- DEBIEC-RYCHTER M. & LIBERSKI P.P. Molecular changes involved in the carcinogenesis of brain tumors. **Folia Neuropathol.**, v.32, p.199-203, 1994.
- DEFFIE A., WU H., REINKE V., LOZANO G. The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. **Mol. and Cel. Biol.** , v.13, p.3415-3423, 1993.
- DELLA PORTA G.. Cellular and molecular biology of melanoma. **Semin. Surg. Oncol.** v.8, p.353-357, 1992.
- DIFFEY B.L. Analysis of the risk of skin cancer from solaria in subjects living in Northern Europe. **Photodermatology**, v. 4, p. 118-126, 1987.
- DIFFEY B.L. Stratospheric ozone depletion and the risk of non-melanoma skin cancer in a British population. **Phys. Med. Biol.**, v.37, p.2267-2279, 1992.
- DISSANAYAKE N.S., GREENOAK G.E., MASON R.S. Effects of ultraviolet irradiation on human skin-derived epidermal cells in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v.157, p.119-127, 1993.
- DONEHOWER L.A. & BRADLEY A.. The tumor supressor p53. **Biochim. et Biophy. Acta.**, v.1155, p.181-205, 1993.
- DONEHOWER L.A., HARVEY M., SLAGLE B.L., McARTHUR M.J., MONTGOMERY C.A.Jr., BUTEL J.S., BRADLEY A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, v.356, p.215-221, 1992.
- DUMAZ N., STARY A., SOUSSI T., DAYA-GROSJEAN L., SARASIN A. Can we predict solar ultraviolet radiation as causal event in human tumours by analysing the mutational spectra of the p53 gene? **Mut. Res.**, v.307, p.375-378, 1994.
- ECKERT R.L. & RORKE, E.A. Molecular Biology of Keratinocyte Differentiation. **Environ. Health Persp.** v. 80, p.109-116, 1989.



- EL-DEIRY W.S., TOKINO T., VELCULESCU V.E., LEVY D.B., PARSONS R., TRENT J.M., LIN D., MERCER W.E., KINZLER K.W., VOGELSTEIN B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v.75, p.817-825, 1993.
- EL-DEIRY W.S., HARPER J.W., O'CONNOR P.M., VELCULESCU V.E., CANMAN C.E., JACKMAN J., PIETENPOL J.A., BURREL 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 p-53 mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res.**, v.54, p.1169-1174, 1994.
- ELIYAHU D., ROZ A., GRUSS P., GIVOL D., OREN M. Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. **Nature**, v.312, p.646-649, 1984.
- ELLEDGE R.M. & ALLRED D.C. The p53 tumor supressor gene in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.32, p.39-47, 1994.
- ELWOOD J.M., WHITEHEAD S.M., GALLAGHER R.P. Epidemiology of human malignant skin tumors with special reference to natural and artificial ultraviolet radiation exposures. In: Conti, C.J. *et al.* (Ed.). **Skin tumors: Experimental and Clinical Aspects**. New York, Raven Press, 1989. p. 55-84.
- ENG C. & PONDER B.A.J. The role of gene mutations in the genesis of familial cancers. **Faseb J.**, v.7, p.910-919, 1993.
- EVANS H.J. & PROSSER J. Tumor-Suppressor genes-cardinal factors in inherited predisposition to human cancers. **Environ. Health Perspective**, v.98, p.25-37, 1992.
- FEARON E.R. & VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, p. 759-767, 1990.
- FIELDS S. & JANG S.K.. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. **Science**, v.249, p.1046-1051, 1990.
- FINLAY C.A., The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 supression of transformed cell growth. **Mol. Cell. Biol.**, v.13, p.301-306, 1993.
- FINLAY C.A., HINDS P.W., LEVINE A.J. The p53 Proto-oncogene can at as a suppressor of transformation. **Cell**, v.57, p.1083-1093, 1989.
- FLORENES V.A., OYJORD T., HOLM R., SKREDE M., BORRESEN A.-L., NESLAND J.M., FODSTAD O. TP53 allele loss, mutations and expression in malignant melanoma. **Br. J. Cancer**, v.69, p.253-259, 1994.
- FOWLIS D.J. & BALMAIN A. Oncogenes and tumour suppressor genes in transgenic mouse models of neoplasia. **Eur. J. of Cancer**, v.29A, p.638-645, 1993.
- FUNDAÇÃO ONCOCENTRO. Incidência de Câncer de Pele em 18 cidades do interior do Estado de São Paulo. Unidade de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública-USP/IBGE, 1991. Dados preliminares.
- GABORIAU F., MORLIÈRE P., MARQUIS I., MOYSAN A., GÈZE M., DUBERTRET L. Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. **Photochem. and Photobiol.**, v.58, p.515-520, 1993.
- GILCHREST B.A., SOTER N.A., STOFF J.S., MIHN M.C.Jr., The human sunburn reaction: histologic and biochemical studies. **J. Amer. Acad. Dermatol.**, v. 5, p.411-22, 1981.
- GODDARD A.D. & SOLOMON E. Genetic aspects of cancer. In: **Advances in Human genetics**, Harris H. & Hirschhorn (Ed.). Plenum Press-New York-London, 1993. p.321-376.
- GORGOLIS V., RASSIDAKIS G., KARAMERIS A., GIATROMANOLAKI A., BARBATIS C., KITTAS C. Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia:



- possible correlation with human papillomavirus infection and clinicopathological findings. **Virchows Archiv.**, v.425, p.481-489, 1994.
- GREENBLATT M.S., BENNETT W.P., HOLLSTEIN M., HARRIS C.C. Mutations in the p53 tumor supressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p.4855-4878, 1994.
- GURSTERSON B.A., ANBAZHAGAN R., WARREN W., MIDGLEY C., LANE D.P., O'HARE M., STAMPS A., CARTER R., JAYATILAKE H. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. **Oncogene**, v.6, n.10, p.1785-1789, 1991.
- HALL P.A. & LANE D.P. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?- revisited!. **J. Pathol.**, v.172, p.1-4, 1994.
- HALL P.A., McKEE P.H., MENAGE H dP., DOVER R.e LANE D.P. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. **Oncogene** , v.8, p203-207, 1993.
- HAN K-A. & KULESZ-MARTIN M.F. Altered expression of wild-type p53 tumor suppressor gene during murine epithelial cell transformation. **Cancer Res.**, v.52, p.749-753, 1992.
- HARLOW E., CRAWFORD L.V., PIM D.C., WILLIAMSON N.M. Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumour antigen. **J. Virol.**, v.39, p.861-869, 1981.
- HARRINGTON E.A., FANIDI A., EVAN G.I. Oncogenes and cell death. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.4, p.120-129, 1994.
- HARRIS C.C. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. **Science**, v. 262, p.1980-1981, 1993.
- HARRIS C.C. & HOLLSTEIN M. Clinical implications of the p53 tumour-supressor gene. **The New England J. Med.**, v.329, p.1318-1327, 1993.
- HASHIMOTO K., MEHREGAN A.H. **Tumors of the epidermis: practical dermatopathology series.** Boston: Butterworths, 1990. 270p.
- HEALY E., REYNOLDS N.J., SMITH M.D., CAMPBELL C., FARR P.M., REES J.L. Dissociation of erythema and p53 protein expression in human skin following UVB irradiation, and induction of p53 protein and mRNA following application of skin irritants. **J. Invest. Dermatol.**, v.103, p.493-499, 1994.
- HEIM S. & MITELMAN F. **Cancer cytogenetics.** New York, Alan, R. Lins. Inc., 1987. 309 p.
- HELANDER S.D., PETERS M.S., PITTELKOW M.R. Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathologic conditions. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.29, p.741-748, 1993.
- HENNINGS H., GLICK A. B., GNEENHALGH D. A., MORGAN D.L., STRICKLAND J. E., TENNENBAUM T., YUSPA S.H. Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. **Proc. Soc. Experim. Biol. and Med.**, v.202, p.1-18, 1993.
- HINDS P.W. & WEINBERG R.A. Tumor supressor genes. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.4, p.135-141, 1994.
- HOCKENBERY A.M. BCL-2 in cancer, development and apoptosis. **J. Cell Science**, v.18, p.51-55, 1994.
- HOFFMAN B. & LIEBERMANN D.A. Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive & negative modulators. **Oncogene**, v.9, p.1807-1812, 1994.
- HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., HARRIS C.C. p53 mutations in human cancers. **Science**, v.253, p.49-53, 1991.



- HOLM R., SKOMEDAL H., HELLAND A., KRISTENSEN G., BORRESEN A-L., NESLAND J.M. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant and malignant tissues of the cervix uteri. **J. of pathol.**, v.169, p.21-26,1993.
- HOOPER M.L. The role of the p53 and Rb-1 genes in cancer, development and apoptosis. **J. Cell Sci. (Suppl)**, v.18, p.13-17, 1994.
- HORIO T., MIYAUCHI H., SINDHVANANDA J, SOH H., KUROKAWA I., ASADA Y.. The effect of ultraviolet (UVB and PUVA) radiation on the expression of epidermal keratins. **Br. J. Dermatol.**, v. 128, p.10-15, 1993.
- HSU I.C., METCALF R.A., SUN T., WELSH J.A., WANG N.J., HARRIS C.C. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **Nature**, v.350, p.427-428, 1991.
- IGGO R., GATTER K., BÁRTEK J., LANE D., HARRIS A.L. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. **Lancet**, v.335, p. 675-679, 1990.
- ISOBE M., EMANUEL B.S., GIVOL D., OREN M., CROCE C.M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature**, v.320, p.84-85, 1986.
- JENKINS J.R., RUDGE K., CURRIE G.A. Cellular immortalization by cDNA clone encoding transformation-associated phosphoprotein p53. **Nature**, v.312, p.651-654, 1984.
- JIKO K., SASANO H., ITO K., OZAWAN, SATO S., YAJIMA A. Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of p53 in human endometrial carcinoma of the uterus. **Anticancer Res.**, v.13, p.305-310, 1993.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 7a. ed., Rio de Janeiro, Edit. Guanabara, 1990. 512 p.
- KANJILAL S., PIERCEALL W.E., CUMMINGS K.K., KRIPKE M.L., ANANTHASWAMY H.N. High frequency of p53 mutations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: evidence for strand bias and tumor heterogeneity. **Cancer Res.**, v.53, p.2961-2964, 1993.
- KARAGAS M.R. Ocurrence of cutaneous basal cell and squamous cell malignancies among those with a prior history of skin cancer. **J. Invest. Dermatol.**, v.102, p.10S-13S, 1994.
- KASTAN M.B., ZHAN Q., EL-DEIRY W.S., CARRIER F., JACKS T., WALSH W.V., PLUNKETT B.S., VOGELSTEIN B., FORNACE A.J. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia. **Cell**, v.71, p.587-597, 1992.
- KASTAN M.B., ONYEKWERE O., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., CRAIG R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res.**, v.51, p. 6304-6311, 1991.
- KERN S.E., KINZLER K.W., BRUSKIN A., JAROSZ D., FRIEDMAN P., PRIVES C., VOGELSTEIN B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. **Science**, v.252, p.1708-1711, 1991.
- KERSCHMANN R.L., Mc CALMONT T.H., LEBOIT P.E. p53 Oncoprotein Expression and proliferation index in Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. **Arch. Dermatol.**, v.130. p.181-186,1994.
- KLEIN-SZANTO, A.J.P. Pathology of human and experimental skin tumors. In CONTI C.J. *et al.* (Ed.). **Skin tumors: experimental and clinical aspects**. New York: Raven Press, 1989. p.19-53.
- KNUDSON A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.68, p.820-823, 1971.



- KNUDSON A.G. Antioncogenes and human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.10914-10921, 1993.
- KOBAYASHI N., MURAMATSU T., YAMASHIMA Y., SHIRAI T., OHNISHI T., MORI T. Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. **J. Invest. Dermatol.**, v.101, p.685-689, 1993.
- KRAEMER K.H., LEE M-M., ANDREWS A.D., LAMBERT W.C. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. **Arch. Dermatol.**, v.130, p.1018-1021, 1994.
- KRAISS S., SPIESS S., REIHS AUS E., MONTENARH M. Correlation of metabolic stability and altered quaternary structure of oncoprotein p53 with cell transformation. **Exp. Cell. Res.**, v.192, p.157-164, 1991.
- KUBO Y., URANO Y., YOSHIMOTO K., IWAHANA H., FUKUHUARA K., ARASE S., ITAKURA M. p53 gene mutation in human skin cancers and precancerous lesions: Comparison with immunohistochemical analysis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, p.440-444, 1994.
- LAMBKIN H.A., MOTHERSILL C.M., KELEHAN P. Variations in immunohistochemical detection of p53 protein overexpression in cervical carcinomas with different antibodies and methods of detection. **J. Pathol.**, v.172, p.13-18, 1994.
- LANE D.P. p53, guardian of the genome. **Nature**, v.358, p.15-16, 1992.
- LANE D.P. & BENCHIMOL S. p53: Oncogene or anti-oncogene. **Genes Dev.**, v.4, p.1-8, 1990.
- LANE D.P. & CRAWFORD L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v.278, p.261-263, 1979.
- LASSAN N.J., FROM L., KAHN H.J. Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma. **Cancer Res.**, v.53, p.2235-2238, 1993.
- LEBLANC T. & SOUSSI T. Syndrome de Li-Fraumeni et mutations germinales du gene p53. **Arch. Pediatr.**, v.1, p.61-70, 1994.
- LEE J.M., ABRAHAMSON J.L., BERNSTEIN A. DNA damage, oncogenesis and the p53 tumour-supressor gene. **Mutat. Res.**, v.307, p.573-581, 1994.
- LEE J.M. & BERNSTEIN A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.5742-5746, 1993.
- LEHMAN T.A., BENNETT W.P., METCALF R.A., WELSH J.A., ECKER J., MODALI R.V., ULLRICH S., ROMANO J.W., APPELLA E., TESTA J.R., GERWIN B.I., HARRIS C.C. p53 mutations, ras mutations, and p53-heat-shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. **Cancer Res.**, v.51, p.4090-4096, 1991.
- LEMOINE N.R. Molecular biology of breast cancer. **Ann. Oncol. (5 Suppl.)**, v.4, p.31-37, 1994.
- LEVER W.F. & SCHAUMBURG-LEVER G. **Histopathology of the skin**. 7.ed. Philadelphia: J.B.Lippincott Company, 1990. p. 523-634.
- LEVINE A.J. The tumor suppressor genes. **Annual Review of Biochemistry**, v.62, p.623-651, 1993.
- LEVINE A.J., MOMAND J., FINLAY C.A. The p53 tumor supressor gene. **Nature**, v.351, p.453-456, 1991.
- LEVINE A.J., PERRY M.E., CHANG A., SILVER A., DITTMER D., WU M., WELSH D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-supressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v.69, p.409-416, 1994.
- LEWIN B. **Genes V**. 5 ed. Oxford: Oxford University Press. 1994.
- LI G., HO V., BEREAN K., TRON V.A. Ultraviolet radiation induction of squamous cell carcinomas in p53 transgenic mice. **Cancer Res.**, v.55, p.2070-2074, 1995.



- LIPPONEN P.K. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. **Intern. J. Cancer**, v.53, p.365-370, 1993.
- LOUIS D.N. The p53 gene and protein in human brain tumors. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.53, p.11-21, 1994.
- MACKIE R.M., Sun and skin damage. **J. Inter. Med.**, v.234, p.111-113, 1993.
- MAGEE J.W., Mc CALMONT T.H., LEBOIT P.E. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in Porokeratosis. **Arch. Dermatol.** v.130, p.187-190, 1994.
- MALKIN D. Germ line p53 mutations and heritable cancer. **Annu. Rev. Genet.**, v.28, p.443-465, 1994.
- MALTZMAN W., CZYSYK L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumour antigen in nontransformed mouse cells. **Mol. Cell. Biol.**, v.4, p.1689-1694, 1984.
- MARKS R., RENNIE G., SELWOOD T. The Relationship of Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas to solar keratoses. **Arch. Dermatol.**, v.124, p.1039-1042, 1988.
- MARTIN H.M., FILIPE M.I., MORRIS R.W., LANE D.P., SILVESTRE F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.50, p.859-862, 1992.
- MASUDA H., MILLER C., KOEFFLER H.P., BATTIFORA H., KLINE M.J. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.7716-7719, 1987.
- MAXWELL S.A. & ROTH J.A. Postranslational regulation of p53 tumor supressor protein function. **Crit. Rev. Oncog.**, v.5, p.23-57, 1994.
- Mc BRIDE O.W., MERRY D., GIVOL D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p.130-134, 1986.
- Mc GREGOR J.M., YU C.C., DUBLIN E.A., LEVISON D.A., Mac DONALD D.M. Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer. **Br. J. Dermatol.**, v.127, n.5, p.463-469, 1992.
- Mc GREGOR J.M., YU C.C.W., DUBLIN E.A., BARNES D.M., LEVISON D.A., Mc DONALD D.M. p53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. **Br. J. Dermatol.**, v.128, p.606-611, 1993.
- Mc NUTT N.S., SAENZ-SANTAMARIA C., VOLKENANDT M., SHEA C.R. ALBINO A.P. Abnormalities of p53 protein expression in cutaneous disorders. **Arch. Dermatol.**, v.130, p.225-232, 1994.
- MERCER W.E., BASERGA R. Expression of the p53 protein during the cell cycle of human peripheral blood lymphocytes. **Exp. Cell Res.**, v.160, p.31-46, 1985.
- MERCER W.E., SHIELDS M.T., LIN D., APPELLA E., ULRICH S.J. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.1958-1962, 1991.
- MIDGLEY C.A., FISHER C.J., BÁRTEK J., VOJTESEK B., LANE D and BARNES D.M. Analysis of p53 expression in human tumors: an antibody raised against human p53 expressed in E. coli. **J. Cell Sci.**, v.101, p.183-189, 1992.
- MILNER JO & MEDCALF E.A. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. **Cell**, v.65, p.765-774, 1991.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Instituto Nacional de Câncer (INCa). Câncer no Brasil. Dados dos Registros de Base Populacional. Rio de Janeiro, 1991. p. 36.
- MITCHELL D.L., BRASH D.E., NAIRN R.S. Rapid repair kinetic of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts in human cell are due to excision rather than conformational change. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.963-971, 1990.



- MITCHELL D.L. & NAIRN R.S. The biology of the (6,4) photoproduct. **Photochem. photobiol.**, v.49, p.805-819, 1989.
- MOLES J.P., MOYRET C., GUILLOT B., JEANTEUR P., GUILHOU J.J., THEILLET C., BASSET-SÈGUIN W. p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. **Oncogene**, v.8, p.583-588, 1993a.
- MOLES J.P., THEILLET C., BASSET-SÈGUIN W., GUILHOU J.J.. Mutation of the tumor suppressor gene - TP53 is not detected in psoriatic skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.101, p.100-102, 1993b.
- MOLL U.M., RIOU G., LEVINE A.J. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. **Proc. Acad. Sci. USA**, v.89, p.7262-7266, 1992.
- MONDEN T., MORIMOTO H., NAKANISHI H., FUKUNAGA M., SHIMANO T., MORI T. A comparative immunohistochemical study of p53 and heat shock protein expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal tumors. **Acta Histochem. Cytochem.**, v.25, p.583-590, 1992.
- MORLIÈRE P., MOYSAN A., SANTUS R., HÜPPE G., MAZIÈRE J.C., DUBERTRET L. UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. **Biochim. Biophys. acta**, v.1084, p.261-268, 1991.
- MOUSSES S., OZÇLIK H., LEE P.D., MALKIN D., BULL S.B., ANDRULIS I.L. Two variants of CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. **Hum. Molec. Genet.**, v.4, p.1089-1092, 1995.
- MOWAT M., CHENG A., KICUMCA N., BERNSTEIN A., BENCHIMOL S. The arrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. **Nature**, v.314, p.633-636, 1985.
- MURPHY, G. F., KWAN, T. H., MIHN JUNIOR, M. C. A pele. In: Cotran, R. S. et al. (Ed.).  **Patologia Estrutural e Funcional**. 4a. ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, p. 1056-1986, 1991.
- NAGANO T., UEDA M., ICHIHASHI M. Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet light-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. **Arch. Dermatol.**, v.129, p.1157-1161, 1993.
- NAGAR A.K.E. Molecular alteration in head and neck squamous carcinoma. In: **I Fórum Internacional de pesquisa básica e clínica da cirurgia de cabeça e pescoço**, 1995, S.P., Hospital Heliópolis, p.14 
- NAITO M. & GIOVANNI J. Genetic background and development of skin tumors. In: Conti, C.J. et al. (Ed.). **Skin tumors: Experimental and Clinical Aspects**. New York, Raven Press, 1989. p. 19-53.
- NAKAZAWA H., ENGLISH D., RANDELL P.L., NAKAZAWA K., MARTEL N., ARMSTRONG B.K., YAMASAKI H. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.360-364, 1994.
- NIGRO J.M., BAKER S.J., PREISINGER A.C., JESSUP J.M., HOSTETTER R., CLEARY K., BIGNER S.H., DAVIDSON N., BAYLIN S., DEVILEE P., GLOVER T., COLLINS F.S., WESTON A., MODALI R., HARRIS C.C., VOGELSTEIN B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v.342, p. 705-708, 1989.
- NISHIGORI C., TANAKA M., MORIWAKI S-i., IMAMURA S., TAKEBE H. Accelerated appearance of skin tumors in hairless mice by repeated UV irradiation with initial intense exposure and characterization of the tumors. **Jpn. J. Cancer Res.** v.83, p.1172-1178, 1992.



- OKA K., NAKANO T., ARAI T. p53CM1 expression is not associated with prognosis in uterine cervical carcinoma. **Cancer**, v.72, p.160-164, 1993.
- OLINER J.D., KINZLER K.W., MELTZER P.S., GEORGE D.L., VOGELSTEIN B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. **Nature**, v.358, p.80-83, 1992.
- ORAM Y., ORENGO I., BAER S.C., OCAL T. p53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-exposed sites. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.31, p.417-422, 1994.
- OYAMA R.S.K. **Estudo citogenético em tumores de pele**. Dissertação de Mestrado, IBILCE/UNESP- S.J. Rio Preto, 1991.104 p.
- PARADA L.F., LAND H., WEINBERG R.A., WOLF D., ROTTER V. Cooperation between gene encoding p53 and ras in cellular transformation. **Nature**, v.312, p.649-651, 1984.
- PARMITER A.H. & NOWELL P.C. Cytogenetics of melanocytic tumors. **J Invest. Dermatol.** (3 Suppl.), v.100, p.254-258, 1993.
- PARRIS C.N. & KRAEMER K.H. Ultraviolet-induced mutations in Cockayne syndrome cells are primarily caused by cyclobutane dimer photoproducts while repair of other photoproducts is normal. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.7260-7264, 1993.
- PAVARINO E.C. **Estudo citogenético de células normais e tumorais de indivíduos com neoplasias cutâneas**. Dissertação de Mestrado, IBILCE/UNESP-S.J.Rio Preto, 1993. 89 p.
- PELTOMAKI P., LOBHE R.A., AALTONEN L.A., PYLKKÄNEN L., NYSTRÖN-LATHI M., SERUCA R., DAVID L., HOLM R., RYBERG D., HAUGEN A., BROGER A., BORRESEN A.L., CHAPELLE A. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. **Cancer Res.**, v.53, p.5853-5855, 1993.
- PINKUS H. Anatomy and Embriology of the Skin. In: Andrade R., Gumport S.L. Popkin G.L., Rees T.D. (Ed.). **Cancer of the Skin**. 1.ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1976. p. 16-89.
- PINKUS H., MEHREGAN A.H. In: **A Guide to Dermatohistopathology**. 3.ed., Appleton Century-Crofts, New York, 1981. p.
- PITOT H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer (Suppl)**, v.72, p.962-970, 1993.
- POMEROY S.L. The p53 tumor supressor gene and pediatric brain tumors., **Curr. Opin. Pediatr.** v.6, p.632-635, 1994.
- PORTER P.L., GOWN A.M., KRAMP S.G., COLTRERA M.D. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors-an immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. **Am. J. Pathol.**, v.140, p.145-153, 1992.
- PRESTON-MARTIN S., PIKE M.C., ROSS R.K., JONES P.A., HENDERSON B.E. Increased cell division as a cause of human cancer. **Cancer Res.**, v.50, p.7415-7421, 1990.
- PROTIC-SABLJIC M., TUTEJA N, MUNSON P.J, HAUSER J., KRAEMER K.H., DIXON K. UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.**, v.6, p.3349-3356, 1986.
- QUINN A.G., HEALY E., REHMAN I., SIKKINK S., REES J.L. Microsatellite instability in human non-melanoma skin cancer. **J. Invest. Dermatol.**, v. 104, p.309-312, 1995.
- RADY P., SCINICARIELLO F., WAGNER Jr R.F., TYRING S.K. P53 mutations in basal cell carcinomas. **Cancer Research**, v.52, p.3804-3806, 1992.
- RAYCROFT L., SCHMIDT J.R., YOAS K., HAO M., LOZANO G. Analysis of p53 mutants for transcriptional activity. **Mol. and Cell. Biol.**, v.11, p. 6067-6074, 1991.
- REID T.M. & LOEB L.A. Tandem double CC→TT mutations are produced by reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.3904-3907, 1993.



- REIZNER G.T., CHUANG T-Y., ELPERN D.J., STONE J.L., FARMER E.R. Basal cell carcinoma in Kauai, Hawaii: The highest documented incidence in the United States. **J. Amer. Acad. of Dermatology**, v. 29, p.184-189, 1993.
- RENEDO D.E. & TRAINER T.D. Intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) with p53 and PCNA expression and adjacent mature teratoma in an infant testis. An immunohistochemical and morphologic study with a review of the literature. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.18, p.947-952, 1994.
- RO Y.S., COOPER P.N., LEE J.A., QUINN A.G., HARRISON D., LANE D., HORNE C.H., REES J.L., ANGUS B. p53 protein expression in benign and malignant skin tumours. **Br. J. Dermatol.**, v.128, p.237-241, 1993.
- RODRIGUES N.R., ROWAN A., SMITH M.E.F., KERN I.B., BODMER W.F., GANNON J.V., LANE D.P. p53 mutations in colorectal cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.7555-7559, 1990.
- ROSER M., BÖHM A., OLDIGS M., WEICHENTHAL M., REIMERS U., SCHMIDT-PREUSS U., BREITBART E.W., RÜDIGER H.W. Ultraviolet-induced formation of micronuclei and sister chromatid exchange in cultured fibroblasts of patients with cutaneous malignant melanoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.41, p.129-137, 1989.
- ROSSIT A.R.B. **Análise molecular do oncogene KRAS em lesões cutâneas**. Dissertação de Mestrado IBILCE/UNESP S.J.Rio Preto, 1995. 82 p.
- ROTTER V., ALONI-GRINSTEIN R., SCHWARTZ D., ELKIND N.B., SIMON A., WOLKOWICZ R., LAVIGNE M., BESERMAN P., KAPON A., GOLDFINGER N. Does wild-type p53 play a role in normal cell differentiation? **Semin. Cancer Biol.**, v.5, p.229-236, 1994.
- RÜMMELEIN B., ELOO U., BIELFELD V., EHLERT U., WEICHENTHAL M., BREITBART E.W., RÜDIGER H.W. Fibroblast cultures of patients with basal cell epithelioma exhibit a normal sensitivity to the genotoxic effect of ultraviolet irradiation. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.61, p.74-76, 1992.
- RUVEN H.J.T., BERG R.J.W., SEELEN M.J., DEKKERS J.A.J.M., LOHMAN P.H.M., MULLENDERS L.H.F., and van ZEELAND A.A. Ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers are selectively removed from transcriptionally active genes in the epidermis of the hairless mouse. **Cancer Res.**, v.53, p.1642-1645, 1993.
- SAGE E. Distribution and repair of photolesions in DNA-genetic consequences and the role of sequence context. **Photoch. and Photobiol.**, v.57, p. 163-174, 1993.
- SAMPAIO S.A.P., CASTRO R.M., RIVITTI E.A. **Dermatologia Básica**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1987. 645 p.
- SANDBERG P.C. **The chromosomes in human cancer and leukemia**. 2 ed., New York, Elsevier, 1990. 1315 p.
- SARKIS A.S., DALBAGNI G., CORDON-CARDO C., ZHANG Z.F., SHEINFELD J., FAIR W.R., HERR H.W., REUTER U.E. Nuclear Overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.85, n.1, p.53-59, 1993.
- SARNOW P., HO Y.S., WILLIAMS J., LEVINE A.J. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. **Cell**, v.28, p.387-394, 1982.
- SATO M., NISHIGORI C., ZGHAL M., YAGI T., TAKEBE H. Ultraviolet specific mutations in p53 gene in skin tumors in Xeroderma pigmentosum patients. **Cancer Res.**, v.53, p.2944-2946, 1993.



- SCHEFFNER M., WERNESS B.A., HUIBREGTSE J.M., LEVINE A.J., HOWLEY P.M., The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus 16 or 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v.63, p.1129-1136, 1990.
- SCHMANDT R. & MILLS G.B. Genomic components of carcinogenesis. **Clin. Chem.**, v.39, p.2375-2385, 1993.
- SCOTT E.L. & STRAF M.L. Ultraviolet radiation as a cause of cancer. In Hiatt H.H., Watson J.D., Winsten J.A. (Eds.). **Origins of Human Cancer, Book A: Incidence of Cancer in Humans**. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 529-546, 1977.
- SCOTT N., BELL S.M., SAGAR P., BLAIR G.E., DIXON M.F., QUIKE P. p53 expression and K-ras mutation in colorectal adenomas. **Gut**, v.34, p.621-624, 1993.
- SETLOW R.B. Photoproducts in DNA irradiated in vivo. **Photochem. and Photobiol.**, v. 7, p. 643-649, 1968.
- SHEA C.R., Mc NUTT N.S., VOLKENANDT M., LUGO J., PRIOLEAU P.G., ALBINO A.P. Overexpression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. **Am. J. Pathol.**, v.141, p.25-29, 1992.
- SHI S-R., KEY M.E., KABRA K.L. Antigen retrieval in formalin - fixed, paraffin - embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.39, n.6, p.741-748, 1991.
- SHOW P., BOVEY R., TARDY S., SAHLI R., SORDAT B., COSTA J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.4495-4499, 1992.
- SIDRANSKI D. Molecular markers in cancer: can we make better predictions? **Int. J. Cancer**, v.64, p.1-2, 1995.
- SIM C.S., SLATER S., Mc KEE P.H. Mutant p53 expression in solar keratosis: an immunohistochemical study. **J. Cutan. Pathol.**, v.19, p.302-308, 1992.
- SLAGA T.J. Cellular and molecular mechanisms involved in multistage skin carcinogenesis. In: Conti, C.J. *et al.* (Ed.). **Skin tumors: Experimental and Clinical Aspects**. New York, Raven Press, 1989.
- SLATER S.D., McGRATH J.A., HOBBS C., EADY R.A., McKEE P.H. Expression of mutant p53 gene in squamous carcinoma arising in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Histopathology**, v.20, n.3, p.237-241, 1992.
- SMITH M.L. & FORNACE A.J.Jr. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. **Curr. Opin. Oncol.**, v.7, p.69-75, 1995.
- SMITH M.L., CHEN I.-T., ZHAN Q., BAE I., CHEN C.-Y., GILMER T.M., KASTAN M.B., O'CONNOR P.M., FORNACE Jr A.J. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. **Science**, v.266, p.1376-1380, 1994.
- SOINI Y., KAMEL D., PÄÄKKÖ P., LEHTO V.-P., OIKARINEN A., VÄHÄKANGAS K. Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. **Br. J. Dermatol.**, v.131, p.514-520, 1994.
- SOUSSI T., CARON DE FROMENTEL C., MAY P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene**, v.5, p.945-952, 1990.
- SPANDAU D.F. Distinct conformations of p53 are observed at different stages of keratinocytes differentiation. **Oncogene**, v.9, p.1861-1868, 1994.



- STEMMERMAN G., HEFFELFINGER S.C., NOFFSINGER A., HUI Y.Z., MILLER M.A., FENOGLIO-PREISER C.M. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor supressor genes, and growth factors. **Hum. Pathol.**, v.25, p.968-981, 1994.
- STEPHENSON T.J., ROYDS J., SILCOCKS P.B., BLEEHEN S.S. Mutant p53 oncogene expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. **Br. J. Dermatol.**, v.127, p.566-570, 1992.
- STREILEIN J.W., TAYLOR J.R., VINCEK V., KURIMOTO I., RICHARDSON J., TIE C., MEDEMA J-P., GOLOMB C. Relationship between ultraviolet radiation induced immunosuppression and carcinogenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v.103, p.1075-1115, 1994.
- STRETCH J.R., GATTER K.C., RALFKIER E., LANE D.P., HARRIS A.L. Expression of mutant p53 in melanoma. **Cancer Res.**, v.51, p.5976-5979, 1991.
- SUN X-F, CARSTENSEN J.M., ZHANG H., STAL O., WINGREN S., HATSCHEK T., NORDENSKJÖLD B. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. **The Lancet**, v.340. p.1369-1373, 1992.
- SZEKERES G. & GIACOMONI P. Ki-67 and p53 expression in cutaneous Bowen's Disease: an immunohistochemical study of fixed-embedded tissue sections. **Acta Derm. Venereol. (Stockh.)**, v.79, p.95-97, 1994.
- TAGUCHI M., WATANABE S., SATO Y., KAMEYA T., MUNAKATA N., ISHIHARA K., NAKANE P.K., HISATOME H., IKEDA S. Immunohistochemical examination of tumor-suppressor gene p53 product and pyrimidine dimer in solar keratosis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.119, p.260-262, 1993.
- TAGUCHI M., WATANABE S., YASHIMA K., MURAKAMI Y., SEKIYA T., IKEDA S. Aberrations of the tumor supressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.103, p.500-503, 1994.
- TANZER J. Leucémie myéloïde chronique (LMC)-Biologie moléculaire. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, v.35, p.155-160, 1993.
- TARUMINA M. & JENKINS J. Human p53 binds DNA as a protein homodimer but monomeric variants retain full transcription transactivation activity. **Oncogene**, v.8, p.3165-3173, 1993.
- TAYLOR J.S. Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer. **Acc. Chem. Res.**, v.27, p.76-82, 1994.
- TORNALETTI S., ROZEK D., PFEIFER G.P. The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. **Oncogene**, v.8, p.2051-2057, 1993.
- UNGER T., MIETZ J., SCHEFFNER M., YEE C.L., HOWLEY P.M. Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. **Mol. Cell. Biol.**, v.13, p.5186-5194, 1993.
- VENEMA J., van HOFFEN A., NATARAJAN A.T., van ZEELAND A.A., MULLENDERS H.F. The residual repair capacity of Xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly spcific for transcriptionally active DNA. **Nucl. Ac. Res.**, v.18, p.443-448, 1990.
- VOGELSTEIN B., FEARON E.R., KERN S.E., HAMILTON S.R., PREISINGER A.C., KERN S.E., PREISINGER A.C., LEPPERT M., NAKAMURA Y., WHITE R., SMITS A.M.M., BOS J.L. Genetic alterations during colorectal tumor development **N. Engl. J. Med.**, v.319, p.525-532, 1988.



- WABER P.G., CHEN J., NISEN P.D. Infrequency of MDM2 gene amplification in pediatric solid tumors and lack of association with p53 mutations in adult squamous cell carcinomas. **Cancer Res.**, v.53, p.6028-6030, 1993.
- WARNER H.R. & PRICE A.R. Involvement of DNA repair in cancer and aging. **J. Gerontol.**, v.44, p.45-54, 1989.
- WEI Q., MATANOSKI G.M., FARMER E.R., HEDAYATI M.A., GROSSMAN L. DNA repair and aging in basal cell carcinoma. A molecular epidemiology study. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.1614-1618, 1993.
- WEI Q., MATANOSKI G.M., FARMER E.R., HEDAYATI M.A., GROSSMAN L. DNA repair related to multiple skin cancers and drug use. **Cancer Research**, v.54, p.437-440, 1994.
- WEINBERG R.A. Tumor Suppressor genes. **Science**, v.254, p.1138-1146, 1991.
- WEINSTOCK M.A. Nonmelanoma Skin Cancer Mortality in the United States, 1969 Through 1988. **Arch. Dermatol.**, v. 129, p. 1286-1290, 1993.
- WEISS J., SCHWECHHEIMER K., CAVENEE W.K., HERLYN M., ARDEN K.C. Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines. **Int. J. Cancer**, v.54, p.693-699, 1993.
- WERNES B.A., LEVINE A.J., HOWLEY P.M. The E6 proteins encoded by human papillomavirus types 16 and 18 can complex p53 in vitro. **Science**, v.248, p.76-79, 1990.
- WILGRAM G.F., KIDD R.L., KRAWCZYK W.S., COLE P.L. Sunburn effect on keratinosomes. **Arch. Dermatol.**, v. 101, p.505-519, 1970.
- WOOD R.D., SKOPEK T.R., HUTCHINSON F. Changes in DNA base sequence induced by targeted mutagenesis of lambda phage by ultraviolet light. **J. Mol. Biol.**, v. 173, p. 273-291, 1984.
- WYNFORD-THOMAS D. p53 in tumour pathology: Can we trust immunocytochemistry? **J. Pathol.**, v.166, p.329-330, 1992.
- YABAR H.A. & WATANABE H. Carcinoma temprano con epitelio atipico de vesicula biliar. **Rev. Gastroenterol. Peru**, v.14, p.65-68, 1994.
- YAMAMOTO T. Molecular Basis of Cancer: Oncogenes and tumor suppressor genes. **Microb. Immunol.**, v.37, p.11-22, 1993.
- YAMAMOTO M. & TAKAHASHI H. Immunohistochemical detection of the p53 oncoprotein in tumours of melanocytic origin. **Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.**, v.422, p.127-132, 1993.
- YE D-W., ZHENG J-F., QIAN S-X., MA Y-J. Expression of p53 product in Chinese human bladder carcinoma. **Urol. Res.**, v.21, p.223-226, 1993.
- YOKOTA J., WADA M., SHIMOSATO Y., TERADA M., SUGIMURA T. Loss of heterozygosity chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell-carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, v.84, p.9252-9256, 1987.
- YUSPA S.H., DLUGOSZ A.A., CHENG C.K., DENNING M.F., TENNENBAUM T., GLICK A.B., WEINBERG W.C. Role of oncogenes and tumor supressor genes in multistage carcinogenesis. **J Invest. Dermatol.**, v.103, p.90S-95S, 1994.
- ZAMBETTI G.P. & LEVINE A.J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. **The FASEB J.**, v.7, p.855-865, 1993.
- ZHANG L.F., HEMMINKI K., SZYFTER K., SZYFTER W., SODERKVIST P. p53 mutations in larynx cancer. **Carcinogenesis**, v.15, p.2949-2951, 1994.
- ZIEGLER A., LEFFELL D.J., KUNALA S., SHARMA H.W., GAILANI M., SIMON J.A., HALPERIN A.J., BADEN H.P., SHAPIRO P.E., BALE A.E., BRASH D.E. Mutation hot spots



due to sunlight in the p53 gene of non-melanoma skin cancers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**,
v.90, p.4216-4220, 1993.

371 000 7 00 22 1

