

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Expressão da proteína p53 em diferentes níveis de fotoenvelhecimento da pele

Inês Alencar de Castro

Orientador: Prof. Dr. Lucio Bakos
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas como
requisito para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, novembro 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

B355e Castro, Inês Alencar de

Expressão da proteína p53 em diferentes níveis de fotoenvelhecimento da pele / Inês Alencar de Castro ; orient. Lucio Bakos. – 2007.

75 f.; il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Envelhecimento da pele 2. Proteína supressora de tumor p53 I. Bakos, Lucio II. Título.

NLM: WR 102

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Agradecimentos

Ao nosso País, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ao Serviço de Dermatologia, à Faculdade de Medicina, à Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, agradeço ao ensino e formação de excelente qualidade recebidos gratuitamente.

Ao meu orientador, Professor Dr Lucio Bakos, quem eu muito admiro desde a graduação, por todos os ensinamentos, os de antes e os deste trabalho.

À Prof. Dra Luíse Meurer, pela amável, solícita, trabalhosa e generosa co-orientação.

Ao meu grande amigo, Prof Dr Edison Capp, pelo estímulo, acompanhamento, “orientação” domiciliar, paciência e despreendimento.

Ao Prof. André Cartell pelo gentil e prestimoso auxílio como patologista.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas: Serviço de Dermatologia: Bernadete Hahmeyer, Evelyn Righes Krobauer, Sivônia Hartmann, Marta Maria Moreira Sombra, Claonice Pinto, Marcelo Ricardo Ferreira Ali e Eliane Judeh; do Grupo de Pesquisa do Pós-graduação, do Comitê de Ética: Marcia Raymundo e Ana Paula Boer; do Centro de Pesquisas: Flavia Giusti e aos funcionários do PPG: Ciências Médicas: Vera Susana Ribeiro, Fagner Sutel, Lucas França Garcia e Thomás Morey Pivetta, muito obrigada.

Aos amigos que fizeram uma onda azul me levando a terminar este trabalho: José Roberto Pegas, Magda Weber, Marcelo Goldani, Larissa Schutz, Nani Ruschel, Tininha Ruschel, Ane Marlise Port Rodrigues, Lala Saatkamp e Vera Lúcia Bauer Silveira. É uma honra ser amiga de vocês.

Às minhas queridas funcionárias: Cleuza Benevenuto Rios, Joseane Carvalho e Jussiléia Bauer, pela grande colaboração nos planos mais variados.

Ao meu pai, que me ensinou a gostar de trabalhar e que podemos aprender e modificar nossos rumos com qualquer idade.

À minha mãe, que me deu emoção no que faço.

À minha querida irmã Isabel, pelo apoio moral e logístico.

À minha sobrinha Elise, pela solicitude, paciência e conhecimento na realização da apresentação.

Ao meu queridíssimo filho, Artur, que tem sido o grande colaborador de casa, a quem dedico este trabalho.

Muito obrigada!

Inês

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	5
Lista de abreviaturas	7
Introdução	8
Revisão da literatura	11
1 Fotoenvelhecimento	12
2 Radiação Ultravioleta e a pele.....	13
3 Fotoenvelhecimento como precursor de câncer de pele	16
4 Marcadores moleculares do câncer da pele.....	17
4.1 Proteína p53.....	17
4.2 Outros marcadores.....	21
5 Fotoenvelhecimento e expressão de p53.....	25
Objetivos	27
Referências bibliográficas	28
Artigo em inglês.....	35
Considerações gerais.....	54
Anexos	57
Anexo 1 - Fototipos de Fitzpatrick	57
Anexo 2 - Imagens	58
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	62
Anexo 4 – Fichas de coleta de dados	64
Anexo 5 – Banco de dados	68

Resumo

Este estudo se propõe a avaliar a expressão da proteína p53 em queratinócitos de antebraços de indivíduos com níveis diferentes de fotoenvelhecimento. O fotoenvelhecimento é um processo crônico definido por alterações fisiológicas, histológicas e clínicas, induzidas pela radiação ultravioleta. A radiação solar é considerada o mais importante carcinógeno em humanos, induzindo e promovendo alteração de DNA nos queratinócitos até a conversão maligna. A expressão do p53, gene supressor de tumores, seria o grande marcador genético da tendência à malignização induzida pela radiação ultravioleta. As mutações no gene p53 precedem o câncer de pele, mas não está determinado em que momento. A importância da avaliação desta proteína no fotoenvelhecimento, seria para avaliar um indicador de mutação no gene p53 precocemente às lesões malignas, e, portanto, melhor compreender e prevenir o câncer de pele não-melanoma. Sessenta pacientes com fototipo II e fotoenvelhecimento cutâneo foram avaliados segundo dois critérios: quanto à presença de ceratoses actínicas, grupo A, e quanto à presença de atrofia cutânea associada à elastose ou ao intenso ressecamento, grupo B. Ambos os grupos, com 60 pacientes, foram divididos em dois níveis: leve e grave. Câncer de pele diagnosticado previamente foi critério de exclusão. Os dois grupos, de forma independente, foram comparados quanto à expressão da proteína p53 através do método de imunistoquímica. Biópsias foram realizadas em pele exposta ao sol de antebraço esquerdo, para avaliação histológica e pelo método de imunistoquímica. O p53 estava expresso em todas as biópsias, sendo encontrada, no grupo A, mediana de 10,8 (2,8 -23,3) no nível leve, com 43 pacientes e mediana

de 20 (9,5 -26,3) no nível grave, com 17 pacientes. No grupo B, mediana de 11.3 (3,0 -22,9) no nível leve, com 36 pacientes, e mediana de 18,8 (5,4 -26,7) no nível grave, com 24 pacientes. As diferenças entre os níveis leve e grave, segundo os dois critérios, não foram significativas estatisticamente. Nesta amostra, não se encontrou diferença estatística quanto à expressão da proteína p53 nos diferentes níveis de fotoenvelhecimento. Diversas hipóteses podem justificar o resultado, sendo possível que as alterações moleculares no fotoenvelhecimento sejam muito precoces aos cânceres de pele.

Lista de abreviaturas

p53	proteína de 53 kd expressa pelo gene TP53
DNA	ácido desoxirribonucléico
C	citosina
T	timina
UV	ultravioleta
UVR	radiação ultravioleta
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
TNF	fator de necrose tumoral
MMP	metaloproteinase da matriz
Ki-67	antígeno nuclear humano marcador de proliferação celular
p63	proteína de 63 kd expressa pelo gene TP63
hTERT	transcriptase reversa da telomerase humana
NER	sistema de reparo dos nucleotídeos
EGFR	receptor do fator de crescimento epitelial
PTCH	gene Patched <i>homolog</i> (<i>Drosophila</i>)

Introdução

As neoplasias malignas de pele representam uma grande preocupação para a saúde pública, por serem a forma mais freqüente de câncer em humanos, com aumento progressivo de incidência, conseqüente deformidade e eventual mortalidade, além dos custos elevados associados ao tratamento. Segundo a estimativa do Instituto Nacional de Câncer para o ano de 2008, no Brasil espera-se 245 novos casos de neoplasias em geral em 100.000 habitantes e 60 novos casos de cânceres de pele não-melanoma em 100.000 habitantes. Estes, por sua maior freqüência, seriam os de maior impacto na saúde pública (1, 2).

A exposição solar é o maior fator de risco para todos os tipos de câncer de pele. A radiação ultravioleta (UV) é o mais importante carcinógeno para humanos, promovendo e induzindo alteração de DNA nos queratinócitos até a conversão maligna (1-7). O risco de desenvolver cânceres de pele é associado com a história de exposição solar na vida de cada indivíduo. O carcinoma basocelular e o melanoma estão principalmente relacionados com a exposição recreacional e queimaduras solares na juventude, enquanto o carcinoma espinocelular, com a exposição cumulativa (5, 8). As evidências epidemiológicas, que sustentam essas conclusões, são a alta incidência de lesões nos indivíduos de fototipo I a III de Fitzpatrick (9) (anexo), isto é, pouca capacidade de se bronzear, e a localização dos tumores predominantemente em área de pele exposta (1).

É necessário um longo tempo de exposição solar para o surgimento de lesões malignas na pele. Dentro desse processo, que pode levar entre 20 e 30 anos, observam-se diferentes graus de fotoenvelhecimento. Esse período seria o ideal

para intervir, enquanto as mutações nos queratinócitos ainda estão em pequeno número e as mudanças fenotípicas não ocorreram (2).

Os indivíduos de pele clara, mais propícios para sofrerem queimaduras solares, são os mais propensos a desenvolver câncer de pele (8).

Buscam-se alterações moleculares e genéticas que expliquem a fotocarcinogênese. Alguns autores acreditam que a expressão do p53, gene supressor de tumores, seria o grande marcador genético da tendência a malignização induzida pela radiação ultravioleta (2, 5, 10-17).

Muitos estudos têm identificado a “assinatura da radiação ultravioleta”, que são mutações específicas nos dímeros de timidina de C (citosina) para T (timina) e de CC para TT (2, 10, 12, 18, 19).

As mutações do TP53 precedem o câncer de pele, mas ainda não se determinou em qual intervalo de tempo. Em animais experimentais e com fontes de luz artificiais, as mutações surgiram em quatro semanas após o início da exposição e o câncer de pele após vinte semanas. Baseando-se nesse estudo, teríamos um longo intervalo em humanos para medidas preventivas (2, 7, 10, 20).

Portanto, a associação entre os níveis de fotoenvelhecimento e o aumento da expressão da proteína p53 poderia constituir um indicador precoce da tendência à conversão maligna e um marcador para o controle e prevenção do câncer de pele (7, 10, 20).

O fotoenvelhecimento da pele exposta ocorre com grande frequência em nossa população e não há estudos que associem seus diferentes graus com a

expressão da proteína p53. O objetivo deste trabalho é verificar a associação entre estes fatores.

Revisão da literatura

A busca da literatura foi realizada através da seguinte estratégia:

Busca no *Pubmed* por *MesH terms*: “Skin aging”, que engloba “solar aging of skin”, com limites em 10 anos, nos idiomas inglês e espanhol. Encontradas 1635 referências das quais foram selecionadas 93 através, inicialmente, de separação manual. Por *MesH term* “tumor supressor protein p53/ radiation effects” com limites de busca em seres humanos e idiomas inglês e espanhol, sendo encontradas 119 referências e selecionadas 17. Na pesquisa por palavras: “photodamage AND p53 expression” foram encontrados 18 itens e utilizados 8. Na pesquisa “photodamage AND p53 protein” 16 itens constavam em resultados anteriores, assim como na pesquisa “photoaging AND p53 protein”. Na busca “skin carcinogenesis AND p53 protein” foram encontrados 96 itens e selecionados 30.

Busca no *Medline* por *Decs* “skin aging” com limite de 5 anos e idiomas inglês e espanhol obteve-se 678 referências das quais foram selecionadas 21. Na pesquisa por “p53 protein” foram encontrados 5 artigos, mas nenhum em pele. Na busca por palavras “skin aging AND p53 expression”, um artigo encontrado que já estava nas referências.

Após leitura das referências selecionadas e exclusão dos textos não pertinentes ao tema e dos em repetição, foram incluídos nesta revisão 99 artigos.

1 Fotoenvelhecimento

Fotoenvelhecimento é o termo utilizado para descrever os achados clínicos e histopatológicos da pele cronicamente exposta ao sol. É uma entidade distinta do envelhecimento cutâneo cronológico (8, 9, 13, 21-31). Pode ser identificado mesmo em indivíduos muito jovens, que teriam menos tempo para acumular a fotoexposição, assim como em adultos, sem uma proporcionalidade obrigatória com a idade.

O fotoenvelhecimento é relacionado com a menor capacidade de se bronzear, mais baixos fototipos de Fitzpatrick (9), e a exposição solar acumulada na vida, seja a quantidade, o tipo de luz ou comprimento de onda, bem como em que fase da vida ocorreu (8, 25, 27, 32). Tudo isso sobreposto ao envelhecimento cutâneo intrínseco (22, 33, 34), dependendo da localização anatômica (35) e da idade do indivíduo (36).

Clinicamente é caracterizado por efélides, lentigos, hipomelanoses gutatas, pigmentação irregular, atrofia cutânea, ressecamento, rugas, aspereza, flacidez, elastose solar, telangiectasias, púrpura, pseudocicatrices estreladas, lagos venosos e ceratoses actínicas (9, 22, 30, 32, 33, 37), além de elastose nodular e comedões (síndrome de Favré-Racouchot) (22, 38) e hiperplasia sebácea (9).

Histologicamente é caracterizado por atrofia epidérmica com retificação dos cones interpapilares, displasia ou atipia dos queratinócitos, alterações da pigmentação, ectasia venular, infiltrado inflamatório, diminuição do colágeno e elastose (9, 22, 23, 27).

2 Radiação Ultravioleta e a pele

Diversos mecanismos têm sido relacionados para explicar o fotoenvelhecimento (21, 39-46). A radiação ultravioleta (UV) causa na pele inflamação, queimaduras e pigmentação, além de mutações genéticas, imunossupressão e hiperpigmentação. Na pele exposta são encontrados achados histológicos de inflamação crônica como um maior infiltrado mononuclear, com aumento de mastócitos, macrófagos e células T em comparação com a pele protegida do sol. Na pele envelhecida por ação do UV, acha-se aumento de prostaglandinas e da expressão da ciclooxigenase-2 (41, 45, 46). A exposição crônica induz à desnaturação das fibras elásticas dérmicas e ao enrugamento característico (47), além de carcinogênese.

Na exposição solar crônica, a radiação ultravioleta (UVR), é o maior fator de risco para o desenvolvimento dos cânceres de pele não-melanoma. A RUV atua induzindo dano direto ao DNA, inibindo reparo e impedindo a apoptose (1, 3-7, 16, 27, 37, 48-51).

Tabela 1 - Radiação Ultravioleta: comprimentos de Onda e seus efeitos na pele humana.

RUV:comprimentos de onda	Efeitos Agudos	Efeitos crônicos
UVC 190-280 nm	Nenhum (filtrado pela camada de Ozônio)	Desconhecidos
UVB 280-320 nm	Eritema (pico após 8-24h) Edema Pigmentação Bronzeamento prolongado Afinamento da epiderma e derma Síntese de Vitamina D	Fotocarcinogênese Imunossupressão Fotoenvelhecimento
UVA 320-400 nm	Pigmentação escurecida imediata (desaparece em 2 h)	Fotoenvelhecimento Imunossupressão Fotocarcinogênese

Adaptado de Lautenschlager, S, Wulf HC, Pittelkow MR. Photoprotection. Lancet 2007;370:528-37 (47).

O ultravioleta B (UVB) é a faixa do raio ultravioleta mais ativa na pele, provocando dano fotoquímico direto ao DNA com aumento das mutações genéticas. É parcialmente filtrado pela camada de ozônio, 1-10% alcançando a superfície terrestre (7, 16, 51-54).

O ultravioleta A (UVA) tem ação menos direta no DNA, via geração de espécies de oxigênio (16, 44, 51), como oxigênio *singlet*, que induz apoptose pela lesão de membrana celular das células T e das células endoteliais dérmicas. A polimerização do colágeno e sua insolubilização através do oxigênio *singlet* são

induzidos pelo UVA, que corresponde a mais de 90% da radiação recebida (7, 44, 51-55).

O câncer de pele mais letal, que é o melanoma maligno, é mais comumente associado com queimaduras solares esporádicas precocemente na vida, sem que um comprimento de onda específico causador, tenha sido identificado com clareza. Entretanto, existem muitas indicações que além do UVB, o UVA tenha um importante papel na gênese do melanoma (47, 56, 57).

Carcinomas espinocelulares induzidos experimentalmente em animais através da ação do UVA-1 (365 nm), não apresentam predomínio de mutações no TP53 (20). São os mesmos tumores fenotipicamente, do que os induzidos por UVB, mas por diferentes caminhos oncogênicos.

Os cânceres de pele não-melanoma são induzidos principalmente pela exposição solar crônica e já foram reproduzidos após exposição experimental em animais de laboratório. O bronzeamento tardio e o eritema são induzidos pela mesma região do espectro, mas evidências sugerem que o UVA, por penetrar mais profundamente, tenha papel mais importante no fotoenvelhecimento e degeneração do colágeno e das fibras elásticas (30, 47, 51, 52, 54, 58).

O tratamento de fibroblastos *in vitro* com 8-metoxipsoraleno e UVA resultou em pausa do crescimento e alterações morfológicas e funcionais típicas da senescência (33, 56). A expressão de elafina está aumentada em fibroblastos cutâneos irradiados com UVA, que interagem com a elastina, causando o acúmulo das fibras elásticas característico da elastose actínica (30).

3 Fotoenvelhecimento como precursor de câncer de pele

O câncer de pele não-melanoma ocorre quase exclusivamente na pele fotoenvelhecida (31), sendo o fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese fenômenos relacionados (6, 13, 27, 50, 51), embora haja um grande intervalo de tempo até o fotoenvelhecimento atingir a carcinogênese. Enrugamento cutâneo e telangiectasias são associados com risco aumentado de ceratoses actínicas e câncer de pele não-melanoma. A presença de ceratoses actínicas está fortemente associada com aumento do risco de carcinoma espinocelular (32, 59, 60) e é considerada o evento chave da evolução do fotoenvelhecimento para a formação de carcinomas espinocelulares (27). Tanto as ceratoses actínicas, quanto os carcinomas espinocelulares apresentam queratinócitos atípicos com perda de polaridade, polimorfismo nuclear, maturação desordenada e aumento do número de figuras mitóticas (27, 48). Tem-se recomendado considerar as ceratoses actínicas como carcinomas espinocelulares *in situ* (60, 61), embora se saiba que nem todas evoluirão para a invasão (62, 63).

Como o câncer de pele não-melanoma e o fotoenvelhecimento compartilham da mesma etiologia (50), o estudo do fotoenvelhecimento é de relevância na compreensão da carcinogênese cutânea.

4 Marcadores moleculares do câncer da pele

4.1 Proteína p53

A proteína p53 foi descoberta há mais de 25 anos, sendo encontrado aumento de sua expressão em vários tumores (64) e em pele com radiodermite (65). Atua como fator de transcrição para induzir genes alvo envolvidos no ciclo celular, no reparo do DNA, na morte celular, no envelhecimento das células e particularmente em resposta ao dano do DNA. O gene p53 localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13), e pertence a uma família com 3 genes identificados em mamíferos (p53, p63 e p73), sendo chamado de guardião do genoma, por assegurar que as proteínas de reparo tenham oportunidade de reparar a seqüência de DNA nas células quando sob estresse (7, 64).

As mutações genéticas causadas pelo UV têm papel crítico no desenvolvimento do câncer de pele (1, 3-5, 7, 16, 26, 27, 66). O dano ao DNA e as mutações do p53 são eventos-chave no plano celular para o desenvolvimento do câncer de pele não-melanoma (2, 5, 6, 8, 10-17). O DNA absorve UVB (290-320nm), o qual induz diretamente modificações nas bases pirimidínicas adjacentes de uma linha de DNA. São gerados dímeros de ciclopirimidina, particularmente timina ou, menos comumente, fotoprodutos. O espectro de ação para essas alterações é máximo em torno de 300nm, embora o UVA (320-400 nm) também possa gerar dímeros de timina (67). As alterações do DNA são continuamente reparadas pelo sistema de reparo dos nucleotídeos (NER). Mas como o reparo é incompleto, resultam assinaturas do UV, que são mutações características da base pirimidínica citosina C para timina T ou de CC para TT (2, 6, 8, 10, 12, 18, 20, 26, 36, 67-71).

O fotodano inicialmente resulta em aumento da forma “selvagem” (wild) do p53 na pele dentro de 24h, que provoca o retardo de G1 no ciclo celular, para permitir o reparo do DNA lesado pelos nucleotídeos, mediados por p53 reparo pelos nucleotídeos do DNA lesado, mediados por p53. Se não ocorrer o reparo, existirá o mecanismo de apoptose, dependente de p53, para eliminar as células contendo os fotoprodutos. Entretanto, o acúmulo de células com DNA não-reparado, é carcinogênico, se, durante a replicação, C sofrer transição para T, ou de CC para TT no gene p53, o controle de qualidade do genoma estará perdido. Os dímeros de timidina podem chegar a 75-80% do total das lesões do DNA na epiderme exposta (36).

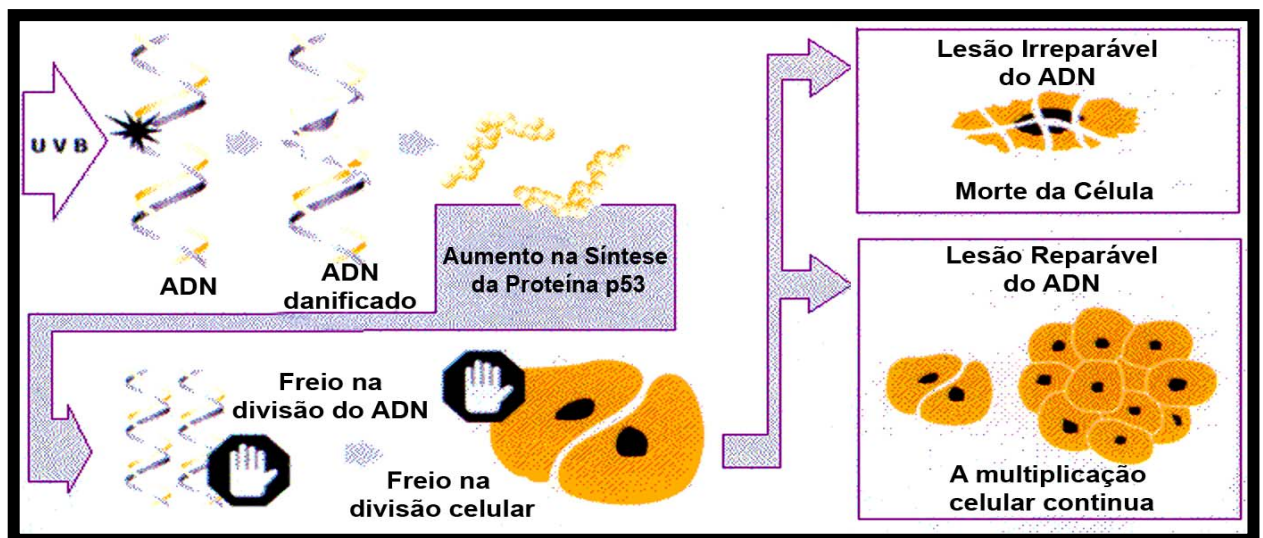


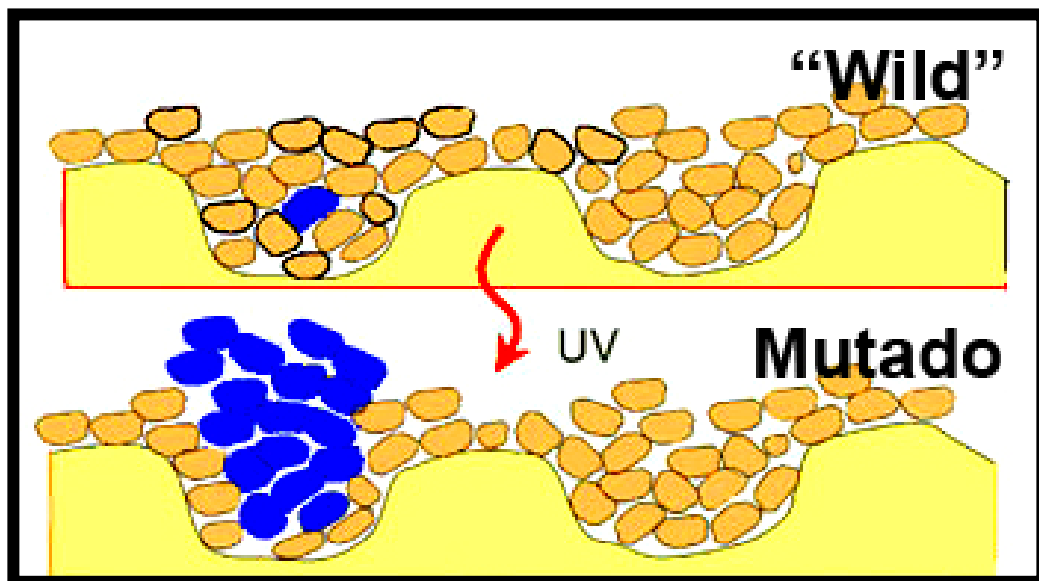
Figura 1 - Adaptado de http://www.fismed.ufrgs.br/sol_efeitos.htm

Uma dose isolada de exposição ao UV induz pausa no ciclo celular e ativação da apoptose (16). Entretanto, a exposição crônica causa indução das mutações

específicas no p53 e disfunção da apoptose, levando ao fotoenvelhecimento e ao desenvolvimento de câncer (2, 5, 8, 10-17, 26, 31, 42, 68, 72-74).

Portanto, os queratinócitos com dano na seqüência do DNA encaminham-se para apoptose, antes que sua replicação resulte em dano permanente (75, 76). Se também houver disfunção do p53, não ocorrerá a apoptose e os queratinócitos sofrerão expansão em clones, o que se manifestará clinicamente por ceratoses actínicas (8, 67). Além disso, com o aumento da idade ocorre uma redução dos mecanismos de reparo do DNA (36), sendo o sistema de reparo de nucleotídeo por excisão (NER) o mais importante contra os danos provocados pelo Ultravioleta (36, 72), do qual o gene p53 também participa. A capacidade de reparo do DNA é menor em indivíduos com fototipo II, do que nos de fototipo IV. Também é maior na pele exposta cronicamente, do que na pele protegida do sol após uma exposição isolada (6).

Focos de queratinócitos com aumento da expressão de p53 são comuns na pele fotoexposta, representando clones de queratinócitos com p53 mutado. A forma *wild* da proteína é expressa em padrão difuso, isto é, células p53 positivas entremeadas com queratinócitos não corados, segue-se à exposição solar e é mais intensa no verão, indicando ativação do gene supressor de tumores. A forma do gene mutado é expressa em clones de células de formato cônico, que proliferaram por não terem sido levadas à apoptose. Estão em maior número na pele fotoenvelhecida em torno dos carcinomas espinocelulares, em especial nos originários de pele exposta (5, 7, 19, 27, 31, 77, 78).



http://www.iqb.es/dermatologia/atlas/q_actinica/q_actinica03.htm

Nos indivíduos submetidos a transplante renal, em uso de medicações imunossupressoras, a expressão da proteína p53 é mais prevalente nas lesões de pele displásicas e malignas do que nos controles não-transplantados (79).

Na genodermatose xeroderma pigmentoso ocorre defeito nas proteínas de reconhecimento dos fotoprodutos, não sendo desencadeado o mecanismo de reparo dos nucleotídeos por excisão. Os pacientes apresentam sensibilidade anormal ao sol e conseqüente carcinogênese cutânea (27).

Nas lesões precursoras, como ceratoses actínicas, encontramos mutações no TP53, assim como em células peri-lesionais de cânceres cutâneos, que têm sido utilizadas como biomarcadoras da clonalidade da pele (27). Podem ser encontrados clones de 60 a 3000 células com mutação no TP53 (19) a partir da junção dermo-

epidérmica e de folículos pilosos de pele humana, compreendendo 4% das amostras de pele normal foto-exposta, segundo Jonason em 1996.

A expressão da proteína p53 através de imunistoquímica é identificada em 80-90% das células de carcinoma espinocelular e em aproximadamente 50-80% dos carcinomas basocelulares, doença de Bowen e em ceratoses actínicas, com a assinatura típica do UV (6, 18, 53, 68, 73, 77, 78, 80-82). Em queratinócitos originários de lesões hiperproliferativas não-tumorais, como psoríase, líquen plano, líquen simples crônico e dermatite crônica encontra-se expressão de p53 em 2 a 4% das células (81, 83).

A literatura tem demonstrado que a exposição à radiação ultravioleta e o desenvolvimento de fotoenvelhecimento e câncer cutâneo estão relacionados. Muitos estudos demonstraram que a radiação ultravioleta induz mutações características no DNA no gene supressor de tumores p53, que não são comumente provocadas por outros carcinógenos. Não existem relatos em que graus de fotoenvelhecimento devem estar presentes. Portanto, neste estudo, este marcador foi o escolhido para avaliar se o fotoenvelhecimento clinicamente mais grave apresentaria maior expressão da proteína p53.

4.2 Outros marcadores

Outros marcadores podem ser encontrados nos cânceres cutâneos ou seus precursores. Enk e colaboradores identificaram 802 genes modificados após 24h de exposição ao UVB em epiderme humana não-exposta previamente, comparada com

controles de áreas contíguas (11). Desses 336 sofreram aumento da regulação em no mínimo duas vezes, e, 466, diminuição (11).

O ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral é um membro da família dos fatores de necrose tumoral (TNF) que induz apoptose em células tumorais, mas não em células saudáveis. Está ubiquamente distribuído em todos os tecidos. Encontra-se diminuído em peles fotoexpostas de idosos e em tumores cutâneos, mas preservado nos queratinócitos dos ceratoacantomas, indicando um papel protetor na carcinogênese cutânea (84).

O gene p63, da família do TP53, é um fator de transcrição responsável pela iniciação do programa de estratificação epitelial durante o desenvolvimento. Localiza-se no cromossomo p3q27 e mantém o potencial proliferativo dos queratinócitos basais da epiderme (12, 85). A expressão aumentada de p63 é encontrada em carcinomas basocelulares, ceratoses actínicas, doença de Bowen e poroceratoses, mas é ausente nos carcinomas espinocelulares bem diferenciados (85, 86).

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose, que encontra-se expressa nas células da maioria dos tumores sólidos e hematológicos. Não é detectável em tecidos normais. A expressão de survivina é encontrada no citoplasma de células de 90% dos carcinomas espinocelulares e doença de Bowen e fracamente em 60% dos carcinomas basocelulares (85).

Alguns membros da rota dos *Hedgehog*, cuja principal função é controlar a diferenciação e a proliferação celular, foram identificados como sendo envolvidos na gênese dos carcinomas basocelulares. Em especial, o PTCH, um homólogo humano

de gene *patched* da mosca *Drosophila*, receptor que age negativamente na rota dos *sonic hedgehog*, sinalizando durante o desenvolvimento embriológico e atuando como um gene supressor de tumores. As mutações no PTCH são responsáveis pela síndrome do Nevo Basocelular, e são encontradas nos carcinomas basocelulares, mas não parecem ser relacionadas com a exposição ao ultravioleta (73).

A proteína Ki-67 é essencial para a proliferação celular e tem sido utilizada como um marcador de proliferação, tendo importância diagnóstica e prognóstica para muitas doenças malignas. Existe associação entre a positividade da proteína p53 e o número de células Ki-67 positivas, refletindo o grau de malignidade nos cânceres cutâneos e a tendência à expansão, quando presentes nas células da periferia das lesões (81).

Os telômeros estão localizados no final dos cromossomos eucarióticos e são sintetizados pela enzima telomerase. Têm como função auxiliar a manutenção da integridade do DNA. A ausência de telomerase é associada ao encurtamento do telômero e envelhecimento das células somáticas. Aumento da atividade da telomerase é encontrado precocemente na embriogênese e em 90% das células cancerígenas humanas de todos os tumores. Portanto, a diminuição da enzima com a idade é considerada uma defesa natural contra o desenvolvimento de câncer (31, 87). A atividade da telomerase é diretamente correlacionada com a expressão de seu componente catalítico ativo, Transcriptase Reversa da Telomerase humana (hTERT), controlado primariamente ao nível da transcrição. A expressão da hTERT é um indicador de replicação ilimitada sendo observada como reatividade citoplasmática em 80 % dos carcinomas basocelulares e doença de Bowen e em

100% dos casos de carcinoma espinocelular e poroceratose (85). O aumento da atividade da telomerase parece ser necessário para o contínuo crescimento dos tumores em geral (87), não sendo específico dos tumores cutâneos, nem relacionado à exposição solar (88).

A inibição do p16, gene supressor de tumores, adicionada às alterações do p53, está provavelmente envolvida na transformação de ceratoses actínicas em carcinomas espinocelulares. Nos queratinócitos das ceratoses actínicas que apresentaram coloração positiva para p16, não houve transformação maligna (27).

He e colegas demonstraram aumento da expressão de diversos genes seguindo-se a exposição de UVA. O UVA aumenta a expressão de c-Jun, Fra 1, c-myc e p33, mas diminui a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), da proteína humana inibidora de apoptose 1 e da survivina, que parece estar envolvida com apoptoses pelo UVA (89). Após a exposição de fibroblastos *in vitro* ao UVA e 8-metoxipsoraleno, a expressão da metaloproteinase 1 da matriz (MMP1) foi induzida, sem ser acompanhada da indução de seu inibidor. Desse desequilíbrio deve resultar o dano do tecido conectivo. As metaloproteínas são proteínas ricas em cisteína, que protegem a epiderme do dano pelo UVB (56, 90).

Os pacientes com epidermodisplasia verruciforme, rara genodermatose em que ocorre susceptibilidade anormal a infecções por tipos específicos de Papiloma Vírus Humano (HPV) e desenvolvimento de cânceres de pele não-melanoma, são homozigotos para Arginina no códon 72 do gene p53, quando na forma maligna. Na forma benigna, em que os pacientes são heterozigotos para arginina, ocorrem

lesões verrucosas por todo o corpo, sem transformação maligna. A homozigose para prolina no mesmo alelo parece ter efeito protetor para a carcinogênese (91).

Urschitz em 2002 descreveu uma comparação entre a pele exposta pré-auricular e a não-exposta retro-auricular quanto aos genes existentes. Encontrou que 19 seqüências estavam menos expressas na pele exposta, e o gene queratina-1 estava 7 vezes mais expresso (92).

5 Fotoenvelhecimento e expressão de p53

Níveis aumentados de proteína p53 têm sido encontrados em pele foto-exposta, comparados com pele não-exposta (5, 19, 27, 87, 93, 94).

Barnadas, em 1996, comparou pele exposta de face, antebraços e pescoço de 18 indivíduos vivos com pele de abdômen de necropsias de nove indivíduos de mesma idade, encontrando a proteína p53 expressa nos núcleos dos queratinócitos de 7 das 18 amostras de pele exposta e em 1 das 9 amostras de pele não-exposta (93).

Jonason identificou clones de queratinócitos p53 positivos em número significativamente maior em pele exposta ao sol do que em pele protegida, além do tamanho dos clones ser maior, identificando um papel promotor de expansões clônicas da luz solar (19).

Foi observado que a pele de ratos tratada com fotoprotetores irradiada posteriormente, resultou em 88-92% de redução no número de mutações do p53. Essa observação sugere ser possível utilizar as mutações do gene p53, como teste para estudos de fotoproteção (10, 14, 51) ou para avaliação de terapêuticas para o

fotoenvelhecimento, buscando prevenir a futura carcinogênese (31, 37, 57, 64, 75, 95-99).

Objetivos

Principal:

Avaliar a expressão imunistoquímica de p53 na pele de pessoas com diferentes níveis de fotoenvelhecimento.

Secundário:

Avaliar a relação entre o nível de fotoenvelhecimento e a expressão imunistoquímica de p53 em pele.

Referências bibliográficas

1. Dlugosz A, Merlino G, Yuspa SH. Progress in cutaneous cancer research. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2002 Dec;7(1):17-26.
2. Harris RB, Alberts DS. Strategies for skin cancer prevention. *Int J Dermatol.* 2004 Apr;43(4):243-51.
3. Nole G, Johnson AW. An analysis of cumulative lifetime solar ultraviolet radiation exposure and the benefits of daily sun protection. *Dermatol Ther.* 2004;17 Suppl 1:57-62.
4. Swindells K, Rhodes LE. Influence of oral antioxidants on ultraviolet radiation-induced skin damage in humans. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004 Dec;20(6):297-304.
5. Backvall H, Wolf O, Hermelin H, Weitzberg E, Ponten F. The density of epidermal p53 clones is higher adjacent to squamous cell carcinoma in comparison with basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2004 Feb;150(2):259-66.
6. Wassberg C, Backvall H, Diffey B, Ponten F, Berne B. Enhanced epidermal ultraviolet responses in chronically sun-exposed skin are dependent on previous sun exposure. *Acta Derm Venereol.* 2003;83(4):254-61.
7. Latonen L, Laiho M. Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jul 25;1755(2):71-89.
8. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2003 Jun;120(6):1087-93.
9. Yaar M, Gilchrist B. Aging of skin. In: Freedberg I, Eisen A, Wolff K, Austen KF, Goldsmith L, Katz S, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 6 ed. New York: McGraw Hill; 2003. p. 1390-8.
10. Ananthaswamy HN, Ullrich SE, Kripke ML. Inhibition of UV-induced p53 mutations and skin cancers by sunscreens: implication for skin cancer prevention. *Exp Dermatol.* 2002;11 Suppl 1:40-3.
11. Enk CD, Shahar I, Amariglio N, Rechavi G, Kaminski N, Hochberg M. Gene expression profiling of in vivo UVB-irradiated human epidermis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004 Jun;20(3):129-37.
12. Honeycutt KA, Koster MI, Roop DR. Genes involved in stem cell fate decisions and commitment to differentiation play a role in skin disease. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004 Sep;9(3):261-8.
13. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol.* 2001 Oct;26(7):573-7.

14. Seite S, Moyal D, Verdier MP, Hourseau C, Fourtanier A. Accumulated p53 protein and UVA protection level of sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2000 Feb;16(1):3-9.
15. Tjioe M, Smits T, Blokx WA, van de Kerkhof PC, Gerritsen MJ. High-dose long wave visible light induces perinuclear vacuolization in vivo but does not result in early photoageing and apoptosis. *Exp Dermatol*. 2003 Oct;12(5):610-4.
16. Beattie PE, Finlan LE, Kernohan NM, Thomson G, Hupp TR, Ibbotson SH. The effect of ultraviolet (UV) A1, UVB and solar-simulated radiation on p53 activation and p21. *Br J Dermatol*. 2005 May;152(5):1001-8.
17. Ponten F, Lindman H, Bostrom A, Berne B, Bergh J. Induction of p53 expression in skin by radiotherapy and UV radiation: a randomized study. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jan 17;93(2):128-33.
18. Brody HJ. Skin resurfacing: chemical peels. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz S, editors. *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine* 6ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2003. p. 2530.
19. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14025-9.
20. de Gruijl FR. p53 mutations as a marker of skin cancer risk: comparison of UVA and UVB effects. *Exp Dermatol*. 2002;11 Suppl 1:37-9.
21. Tsourelis-Nikita E, Watson RE, Griffiths CE. Photoageing: the darker side of the sun. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Feb;5(2):160-4.
22. Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJ, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006 Jul;55(1):1-19.
23. Fisher GJ. The pathophysiology of photoaging of the skin. *Cutis*. 2005 Feb;75(2 Suppl):5-8; discussion -9.
24. Makrantonaki E, Zouboulis CC. William J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. *Dermatology*. 2007;214(4):352-60.
25. Malvy J, Guinot C, Preziosi P, Vaillant L, Tenenhaus M, Galan P, et al. Epidemiologic determinants of skin photoaging: baseline data of the SU.VI.MAX cohort. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Jan;42(1 Pt 1):47-55.
26. Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Feb;5(2):208-14.
27. Oppel T, Korting HC. Actinic keratosis: the key event in the evolution from photoaged skin to squamous cell carcinoma. Therapy based on pathogenetic and clinical aspects. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004 Mar-Apr;17(2):67-76.
28. Eshaghian A, Vleugels RA, Canter JA, McDonald MA, Stasko T, Sligh JE. Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers. *J Invest Dermatol*. 2006 Feb;126(2):336-44.

29. Lener T, Moll PR, Rinnerthaler M, Bauer J, Aberger F, Richter K. Expression profiling of aging in the human skin. *Exp Gerontol*. 2006 Apr;41(4):387-97.
30. Muto J, Kuroda K, Wachi H, Hirose S, Tajima S. Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. *J Invest Dermatol*. 2007 Jun;127(6):1358-66.
31. Gilchrist BA. Skin aging 2003: recent advances and current concepts. *Cutis*. 2003 Sep;72(3 Suppl):5-10; discussion
32. Stern RS. Clinical practice. Treatment of photoaging. *N Engl J Med*. 2004 Apr 8;350(15):1526-34.
33. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol*. 2000 May;35(3):307-16.
34. Del Bino S, Sok J, Bessac E, Bernerd F. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res*. 2006 Dec;19(6):606-14.
35. Sandby-Moller J, Poulsen T, Wulf HC. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol*. 2003;83(6):410-3.
36. Yamada M, Udono MU, Hori M, Hirose R, Sato S, Mori T, et al. Aged human skin removes UVB-induced pyrimidine dimers from the epidermis more slowly than younger adult skin in vivo. *Arch Dermatol Res*. 2006 Jan;297(7):294-302.
37. Lysa B, Tartler U, Wolf R, Arenberger P, Benninghoff B, Ruzicka T, et al. Gene expression in actinic keratoses: pharmacological modulation by imiquimod. *Br J Dermatol*. 2004 Dec;151(6):1150-9.
38. Schafer T, Merkl J, Klemm E, Wichmann HE, Ring J. The epidemiology of nevi and signs of skin aging in the adult general population: Results of the KORA-survey 2000. *J Invest Dermatol*. 2006 Jul;126(7):1490-6.
39. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002 Nov;138(11):1462-70.
40. Rijken F, Kiekens RC, Bruijnzeel PL. Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin. *Br J Dermatol*. 2005 Feb;152(2):321-8.
41. Bosset S, Bonnet-Duquennoy M, Barre P, Chalon A, Kurfurst R, Bonte F, et al. Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. *Br J Dermatol*. 2003 Oct;149(4):826-35.
42. Frank S, Menezes S, Lebreton-De Coster C, Oster M, Dubertret L, Coulomb B. Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity. *Exp Dermatol*. 2006 Feb;15(2):130-7.
43. Rijken F, Kiekens RC, van den Worm E, Lee PL, van Weelden H, Bruijnzeel PL. Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Feb;5(2):184-9.

44. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol*. 2004 May;43(5):326-35.
45. Ishitsuka Y, Maniwa F, Koide C, Douzaki N, Kato Y, Nakamura Y, et al. Detection of modified tyrosines as an inflammation marker in a photo-aged skin model. *Photochem Photobiol*. 2007 May-Jun;83(3):698-705.
46. Seo JY, Kim EK, Lee SH, Park KC, Kim KH, Eun HC, et al. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 by UV in aged human skin in vivo. *Mech Ageing Dev*. 2003 Aug-Sep;124(8-9):903-10.
47. Lautenschlager S, Wulf HC, Pittelkow MR. Photoprotection. *Lancet*. 2007 Aug 11;370(9586):528-37.
48. de Berker D, McGregor JM, Hughes BR. Guidelines for the management of actinic keratoses. *Br J Dermatol*. 2007 Feb;156(2):222-30.
49. Rosen RH, Studniberg H. Solar keratoses: analysis in a dermatological practice in Australia. *Australas J Dermatol*. 2003 Feb;44(1):34-9.
50. Uliasz A, Spencer JM. Chemoprevention of skin cancer and photoaging. *Clin Dermatol*. 2004 May-Jun;22(3):178-82.
51. Marrot L, Belaidi JP, Lejeune F, Meunier JR, Asselineau D, Bernerd F. Photostability of sunscreen products influences the efficiency of protection with regard to UV-induced genotoxic or photoageing-related endpoints. *Br J Dermatol*. 2004 Dec;151(6):1234-44.
52. Fourtanier A, Bernerd F, Bouillon C, Marrot L, Moyal D, Seite S. Protection of skin biological targets by different types of sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2006 Feb;22(1):22-32.
53. Kullavanijaya P, Lim HW. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Jun;52(6):937-58; quiz 59-62.
54. Maier T, Korting HC. Sunscreens - which and what for? *Skin Pharmacol Physiol*. 2005 Nov-Dec;18(6):253-62.
55. Naru E, Suzuki T, Moriyama M, Inomata K, Hayashi A, Arakane K, et al. Functional changes induced by chronic UVA irradiation to cultured human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol*. 2005 Dec;153 Suppl 2:6-12.
56. Wlaschek M, Ma W, Jansen-Durr P, Scharffetter-Kochanek K. Photoaging as a consequence of natural and therapeutic ultraviolet irradiation--studies on PUVA-induced senescence-like growth arrest of human dermal fibroblasts. *Exp Gerontol*. 2003 Nov-Dec;38(11-12):1265-70.
57. Young AR, Sheehan JM, Chadwick CA, Potten CS. Protection by ultraviolet A and B sunscreens against in situ dipyrimidine photolesions in human epidermis is comparable to protection against sunburn. *J Invest Dermatol*. 2000 Jul;115(1):37-41.
58. Cesarini JP, Michel L, Maurette JM, Adhoute H, Bejot M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003 Aug;19(4):182-9.

59. McGillis ST, Fein H. Topical treatment strategies for non-melanoma skin cancer and precursor lesions. *Semin Cutan Med Surg.* 2004 Sep;23(3):174-83.
60. Lober BA, Fenske NA. Optimum treatment strategies for actinic keratosis (intraepidermal squamous cell carcinoma). *Am J Clin Dermatol.* 2004;5(6):395-401.
61. Lebwohl M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2003 Nov;149 Suppl 66:31-3.
62. Wheeland RG. The pitfalls of treating all actinic keratoses as squamous cell carcinomas. *Semin Cutan Med Surg.* 2005 Sep;24(3):152-4.
63. Spencer JM, Hazan C, Hsiung SH, Robins P. Therapeutic decision making in the therapy of actinic keratoses. *J Drugs Dermatol.* 2005 May-Jun;4(3):296-301.
64. Johnson J, Lagowski J, Sundberg A, Kulesz-Martin M. P53 family activities in development and cancer: relationship to melanocyte and keratinocyte carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2005 Nov;125(5):857-64.
65. Franchi A, Massi D, Gallo O, Santucci M, Porfirio B. Radiation-induced cutaneous carcinoma of the head and neck: is there an early role for p53 mutations? *Clin Exp Dermatol.* 2006 Nov;31(6):793-8.
66. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int.* 2007;7:2.
67. Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol.* 2003 Jan;48(1):1-19; quiz 20-2.
68. Jasim ZF, Lioe TF, McKenna KE, Robson T, Ouhtit A. The effect of ultra violet B (TL-01) phototherapy on epidermal expression of p53 protein in psoriatic plaques. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2006 Feb;22(1):12-7.
69. Kim AL, Athar M, Bickers DR, Gautier J. Ultraviolet-B-induced G1 arrest is mediated by downregulation of cyclin-dependent kinase 4 in transformed keratinocytes lacking functional p53. *J Invest Dermatol.* 2002 May;118(5):818-24.
70. Stockfleth E, Kerl H. Guidelines for the management of actinic keratoses. *Eur J Dermatol.* 2006 Nov-Dec;16(6):599-606.
71. Nindl I, Dang C, Forschner T, Kuban RJ, Meyer T, Sterry W, et al. Identification of differentially expressed genes in cutaneous squamous cell carcinoma by microarray expression profiling. *Mol Cancer.* 2006;5:30.
72. Takahashi Y, Moriwaki S, Sugiyama Y, Endo Y, Yamazaki K, Mori T, et al. Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity. *J Invest Dermatol.* 2005 Feb;124(2):435-42.
73. Kim MY, Park HJ, Baek SC, Byun DG, Houh D. Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci.* 2002 May;29(1):1-9.
74. Decraene D, Smaers K, Maes D, Matsui M, Declercq L, Garmyn M. A low UVB dose, with the potential to trigger a protective p53-dependent gene program, increases the resilience of keratinocytes against future UVB insults. *J Invest Dermatol.* 2005 Nov;125(5):1026-31.

75. El-Domyati MM, Attia SK, Esmat AM, Ahmad HM, Abdel Wahab HM, Badr BM. Effect of laser resurfacing on p53 expression in photoaged facial skin. *Dermatol Surg.* 2007 Jun;33(6):668-75.
76. Manestar-Blazic T, Batinac T, Hadzisejdic I, Brajac I. Apoptosis and immune response are responsible for the site-specific incidence of non-melanoma skin cancer. *Med Hypotheses.* 2007;68(4):853-5.
77. Barzilai A, Lyakhovitsky A, Trau H, Fogel M, Huszar M. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *J Am Acad Dermatol.* 2007 Oct;57(4):669-76.
78. Shimizu T, Oga A, Murakami T, Muto M. Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity and histological degree of malignancy in solar keratosis. *Dermatology.* 1999;199(2):113-8.
79. Ferrandiz C, Fuente MJ, Fernandez-Figueras MT, Bielsa I, Just M. p53 immunohistochemical expression in early posttransplant-associated malignant and premalignant cutaneous lesions. *Dermatol Surg.* 1999 Feb;25(2):97-101.
80. Murphy G, Young AR, Wulf HC, Kulms D, Schwarz T. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol.* 2001 Jun;10(3):155-60.
81. Batinac T, Zamolo G, Jonjic N, Gruber F, Petroveckii M. p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. *Tumori.* 2004 Jan-Feb;90(1):120-7.
82. Liang SB, Ohtsuki Y, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen BK, et al. Sun-exposure- and aging-dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumour cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch.* 1999 Mar;434(3):193-9.
83. Hussein MR, Al-Badaiwy ZH, Guirguis MN. Analysis of p53 and bcl-2 protein expression in the non-tumorigenic, pretumorigenic, and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions. *J Cutan Pathol.* 2004 Nov;31(10):643-51.
84. Stander S, Schwarz T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed in normal skin and cutaneous inflammatory diseases, but not in chronically UV-exposed skin and non-melanoma skin cancer. *Am J Dermatopathol.* 2005 Apr;27(2):116-21.
85. Park HR, Min SK, Cho HD, Kim KH, Shin HS, Park YE. Expression profiles of p63, p53, survivin, and hTERT in skin tumors. *J Cutan Pathol.* 2004 Sep;31(8):544-9.
86. Kulesz-Martin M, Lagowski J, Fei S, Pelz C, Sears R, Powell MB, et al. Melanocyte and keratinocyte carcinogenesis: p53 family protein activities and intersecting mRNA expression profiles. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2005 Nov;10(2):142-52.
87. Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres, telomerase, and telomerase inhibition: clinical implications for cancer. *J Am Geriatr Soc.* 2003 Jan;51(1):116-22.
88. Sugimoto M, Yamashita R, Ueda M. Telomere length of the skin in association with chronological aging and photoaging. *J Dermatol Sci.* 2006 Jul;43(1):43-7.

89. He YY, Huang JL, Sik RH, Liu J, Waalkes MP, Chignell CF. Expression profiling of human keratinocyte response to ultraviolet A: implications in apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2004 Feb;122(2):533-43.
90. Ablett E, Whiteman DC, Boyle GM, Green AC, Parsons PG. Induction of metallothionein in human skin by routine exposure to sunlight: evidence for a systemic response and enhanced induction at certain body sites. *J Invest Dermatol.* 2003 Feb;120(2):318-24.
91. de Oliveira WR, Rady PL, Grady J, Hughes TK, Neto CF, Rivitti EA, et al. Association of p53 arginine polymorphism with skin cancer. *Int J Dermatol.* 2004 Jul;43(7):489-93.
92. Urschitz J, Iobst S, Urban Z, Granda C, Souza KA, Lupp C, et al. A serial analysis of gene expression in sun-damaged human skin. *J Invest Dermatol.* 2002 Jul;119(1):3-13.
93. Barnadas MA, Colomo L, Curell R, De Moragas JM. Expression of the p53 protein in sun-damaged skin. *Acta Derm Venereol.* 1996 May;76(3):203-4.
94. El-Domyati MB, Attia S, Saleh F, Galaria N, Ahmad H, Gasparro FP, et al. Expression of p53 in normal sun-exposed and protected skin (type IV-V) in different decades of age. *Acta Derm Venereol.* 2003;83(2):98-104.
95. El-Domyati MM, Attia SK, Saleh FY, Ahmad HM, Gasparro FP, Uitto JJ. Effect of topical tretinoin, chemical peeling and dermabrasion on p53 expression in facial skin. *Eur J Dermatol.* 2003 Sep-Oct;13(5):433-8.
96. El-Domyati MB, Attia SK, Saleh FY, Ahmad HM, Uitto JJ. Trichloroacetic acid peeling versus dermabrasion: a histometric, immunohistochemical, and ultrastructural comparison. *Dermatol Surg.* 2004 Feb;30(2 Pt 1):179-88.
97. Orringer JS, Johnson TM, Kang S, Karimipour DJ, Hammerberg C, Hamilton T, et al. Effect of carbon dioxide laser resurfacing on epidermal p53 immunostaining in photodamaged skin. *Arch Dermatol.* 2004 Sep;140(9):1073-7.
98. Dainichi T, Amano S, Matsunaga Y, Iriyama S, Hirao T, Hariya T, et al. Chemical peeling by SA-PEG remodels photo-damaged skin: suppressing p53 expression and normalizing keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* 2006 Feb;126(2):416-21.
99. Castro IA, Schütz LC, Capp E, Bakos L. Ceratoses Actínicas. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.* 2006;26(2):66-72.

Considerações gerais

O câncer de pele não-melanoma se desenvolve nos queratinócitos epidérmicos através de uma seqüência de eventos iniciados com a exposição à radiação ultravioleta. O aumento da expressão da proteína p53 em pele fotoenvelhecida, ceratoses actínicas e carcinomas espinocelulares tem sido apresentado por muitos autores (19, 77, 93) e deve representar um passo inicial da carcinogênese cutânea (5, 27, 61, 77). Mesmo em pele normal exposta ao sol, encontra-se aumento da expressão de p53 (19, 93). Alguns estudos avaliaram pele normal adjacente a lesões cancerígenas (5, 27, 64, 73, 77, 81) ou em lesões pré-malignas (27, 78). A incidência de queratinócitos com positividade nuclear para a proteína p53 varia grandemente entre os diferentes estudos: entre 15% e 100% para carcinomas espinocelulares e entre zero e 100% para ceratoses actínicas. Essa grande variabilidade pode ser explicada pelos diferentes clones de anticorpos que foram utilizados, e pela detecção de ambas as formas, selvagem e mutada, da proteína pelos testes. Além disso, os pesquisadores utilizaram diferentes critérios de avaliação da positividade do p53. Nas ceratoses actínicas que atingem toda espessura da epiderma existe maior expressão de p53, do que nas que atingem metade da epiderma (77, 78). Com relação aos carcinomas espinocelulares, existe maior expressão nos tumores originários de áreas expostas, do que nos de pele protegida do sol (77) e mais em pele normal exposta do que em pele normal protegida do sol (93), o que é coerente com os efeitos cumulativos da radiação ultravioleta associados com a expressão do p53 (77).

A expressão da proteína p53 tem sido utilizada no fotoenvelhecimento para avaliar efetividade tanto de protetores solares, na prevenção, assim como de tratamentos (14, 17, 37, 52, 68, 75, 95-98). São estudos comparando níveis antes e após as intervenções, com diferentes intervalos de tempo e relativos bons resultados, embora com grupos pequenos. Nenhuma pesquisa determinou se a expressão do p53 é associada com diferentes níveis de fotoenvelhecimento antes de a malignização ser atingida.

O presente trabalho formou grupos de fotoenvelhecimento segundo a presença de ceratoses actínicas ou não (grupo A 1 e A 2) e os mesmos 60 pacientes foram agrupados segundo a presença de atrofia cutânea associada com elastose ou intenso ressecamento ou não (grupo B 1 e B 2), por não haver classificação de fotoenvelhecimento cutâneo específica para antebraços. Os critérios de diferenciação dos grupos se basearam nos estudos que demonstraram associação entre a expressão de p53 e a perda de maturação de queratinócitos e a elastose solar histológica (19, 27, 37, 61, 77).

Foi encontrada uma distribuição dispersa de expressão do p53 nos diferentes níveis de fotoenvelhecimento de ambos os grupos, com grande amplitude de valores, sem associação estatisticamente significativa. Não ocorreu associação estatística entre fotoenvelhecimento e a presença de positividade em queratinócitos do folículo piloso.

De acordo com o conceito de que a presença de clones epidérmicos positivos para p53 tem o mesmo fator de risco do surgimento de carcinomas espinocelulares, e representam um passo inicial na carcinogênese (5), seria esperado que no

fotoenvelhecimento ocorressem os mesmos achados. Uma primeira possibilidade é que no delineamento deste estudo, os pacientes com maior grau de fotoenvelhecimento tivessem sido excluídos por terem tido câncer de pele previamente. Portanto, a variabilidade clínica entre os pacientes diminuiu. Em segundo, sabe-se que a imunistoquímica é uma técnica que cora a expressão da proteína do gene nas formas “selvagem” (wild) e mutada, sem uma distinção possível. A forma selvagem é extremamente difícil de ser detectada pela imunistoquímica, devido a ter uma meia vida curta e por estar em concentrações baixas nos queratinócitos. Por outro lado, a forma mutada é de fácil detecção e caracteristicamente se apresenta em agrupamentos de células com positividade, aspecto que foi buscado nesta pesquisa para quantificação (“hot spots”). A imunistoquímica para a proteína p53 é uma técnica corrente, simples e econômica, embora avaliar a expressão da proteína não seja necessariamente estar quantificando a mutação genética (77). Em terceiro lugar, é possível que as alterações moleculares sejam mais precoces do que se pensava, talvez relacionadas à exposição solar na infância e, por isso, se encontrem pacientes com fotoenvelhecimento muito avançado sem a presença de alterações na expressão da proteína p53 e que talvez nunca venham a desenvolver câncer de pele, assim como marcada expressão em pacientes com pouco fotoenvelhecimento.

Mais estudos serão necessários na compreensão do fotoenvelhecimento e na sua relação com a carcinogênese cutânea.

Anexos

Anexo 1 - Fototipos de Fitzpatrick

Fototipos	Descrição	Sensibilidade ao sol	Grupos de indivíduos
	Melanocomprometidos		
I	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível	muito brancos ou ruivos, cabelos e olhos claros
II	Queima com facilidade, bronzeia pouco	Sensível	brancos, cabelos e olhos claros
III	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal	pele clara e cabelos escuros
	Melanocompetentes		
IV	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal	moreno claro como latinos
V	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível	morenos como árabes, mulatos, asiáticos e índios
VI	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível	morenos como negros

Adaptado de Fitzpatrick, TB. Soleil et peau. J Méd Esthet 2:33,1975.in Dermatology In General Medicine, 6th ed, edited by TB Fitzpatrick et alli. New York, MacGraw-Hill, 2003, p. 820. (9)

Anexo 2 - Imagens

Figura 3 - Fotoenvelhecimento

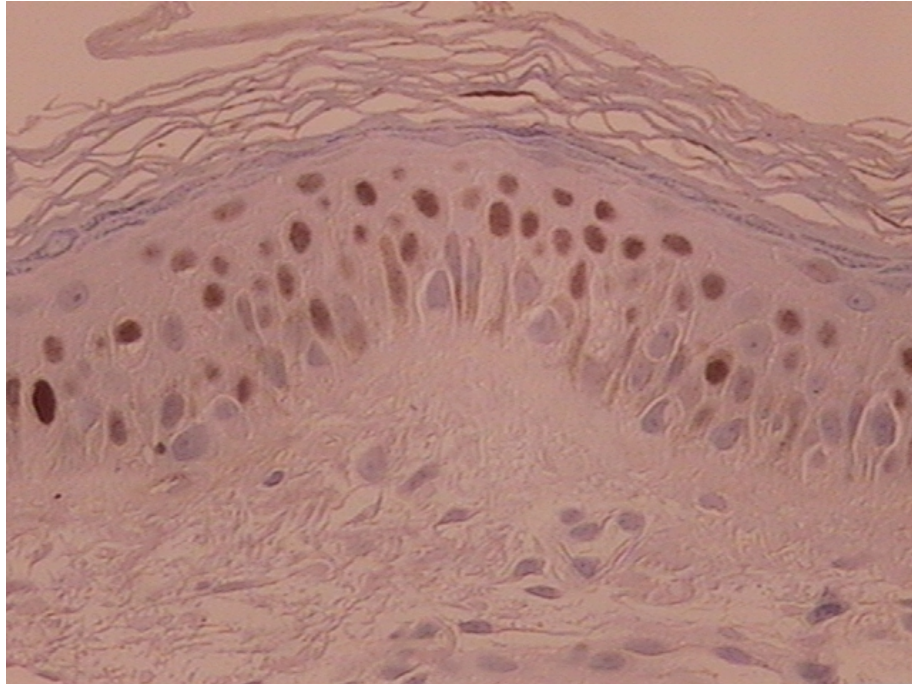


Paciente do sexo feminino, 54 anos, fotoenvelhecimento leve em grupos A e B

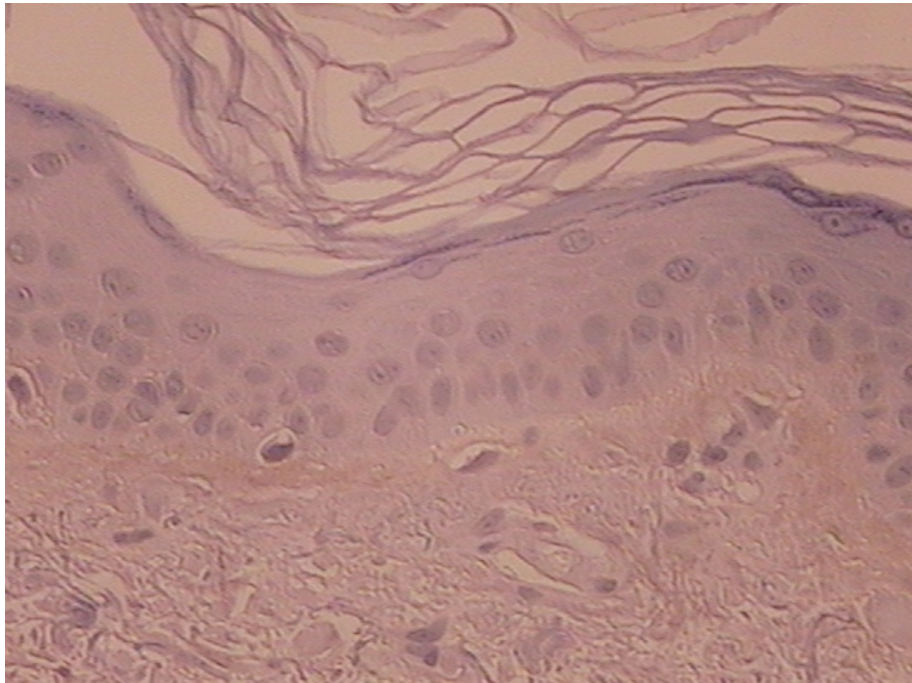


Paciente do sexo masculino, 68 anos, fotoenvelhecimento grave grupos A e B

Figura 4 – Avaliação da expressão de p53 em epiderma



Positividade nuclear para p53, podendo ser distinguida da coloração citoplasmática por melanina. Sexo masculino, 40 anos, fotoenvelhecimento grave, positividade de 25% camada superficial, 90% na média e 30% na basal.

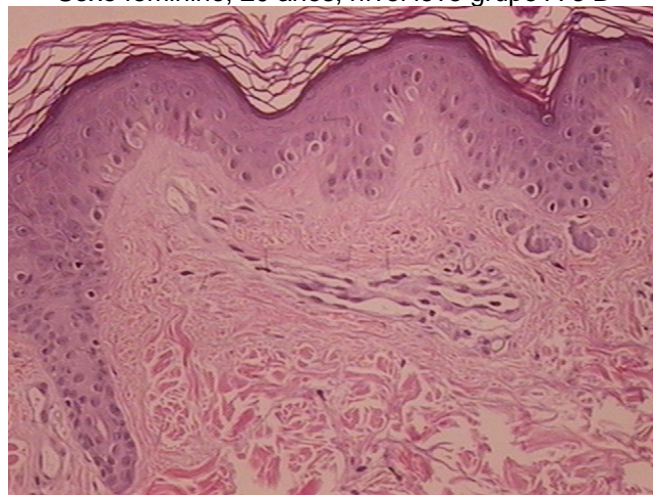


Ausência de expressão de p53 em queratinócitos (com muita expressão em queratinócitos de folículo piloso) sexo feminino, 43 anos.

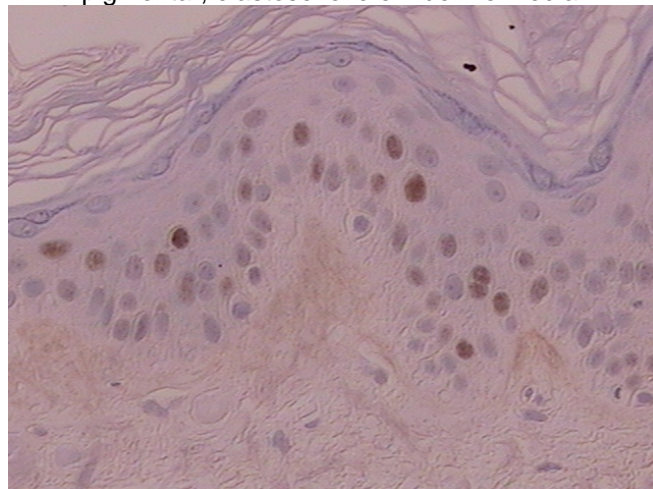
Figura 5 – Clínica, histologia e imunohistoquímica de paciente com 24 anos.



Sexo feminino, 20 anos, nível leve grupo A e B

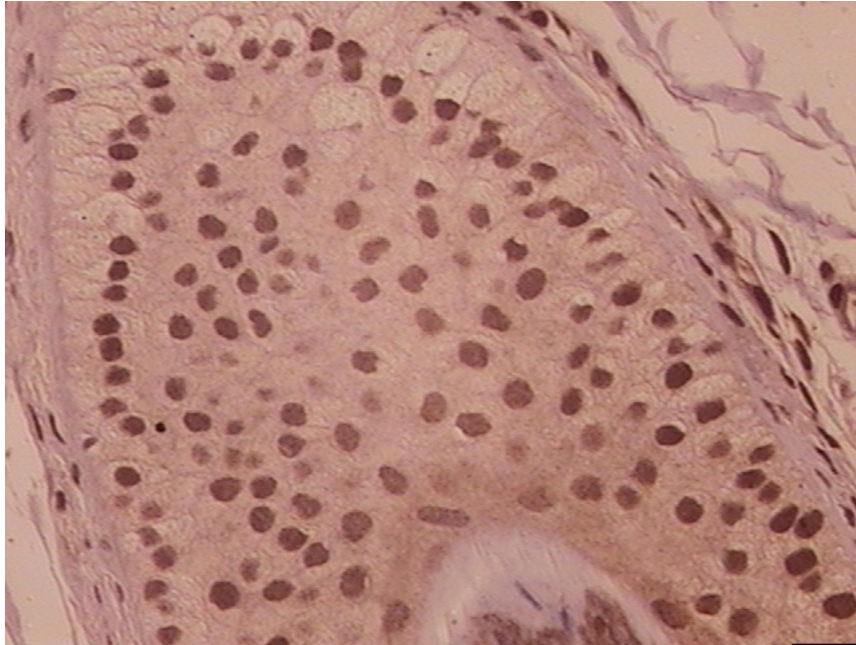


HE da paciente acima: Epitélio com 6 camadas de queratinócitos, ectasia venular, incontinência pigmentar, elastose leve em derme média.

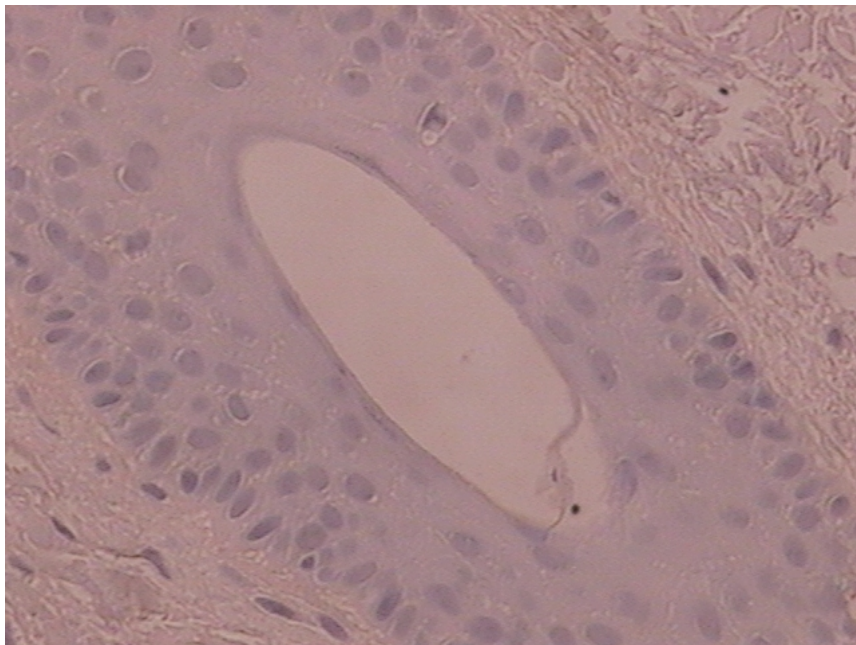


Imunohistoquímica para p53 em queratinócitos da mesma paciente: camada superficial positividade em 5%, camada média 65%, camada basal em 40% dos queratinócitos

Figura 6 - Avaliação da expressão do p53 no folículo piloso



p53 positividade nuclear em queratinócitos do folículo piloso (paciente feminina, 42 anos, fotoenvelhecimento leve no grupo A e B)



Folículo piloso: expressão de p53 negativa

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Avaliação da expressão do gene p53 através da imuno-histoquímica em biópsias de pele de antebraço com diferentes graus de fotoenvelhecimento
Projeto 06-090**

Este trabalho é de médica dermatologista dentro do Pós-Graduação de Medicina-Ciências Médicas da UFRGS para receber o título de Mestre.

Neste trabalho procuraremos ver no envelhecimento da pele provocado pelo sol, se as mudanças genéticas das células da pele já se apresentam nos quadros leves e nos graves. O gene, que vamos estudar, aparece modificado em quem tem câncer de pele, mas em que grau de envelhecimento da pele ele muda, ainda não sabemos.

Será oferecido aos pacientes do ambulatório do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com pele clara e de pouca capacidade de se bronzear, marcada pelo sol de toda sua vida em diferentes graus, mas que ainda não tenham apresentado câncer de pele. Os pacientes devem ter mais de 18 anos, serem saudáveis, não usarem medicações ou vitaminas nos últimos 3 meses. Gestantes não devem participar. Serão 60 voluntários para completar a pesquisa.

Todos os dados e o material coletado serão usados nessa pesquisa, sendo que o nome dos participantes não será divulgado, mesmo após os resultados.

Para fazer o exame será retirado um pedacinho de pele redondo (de 4 mm) com aparelho chamado punch, da região do antebraço, onde se pega muito sol. Somente assim se consegue realizar a pesquisa em todas as camadas de pele.

Para a coleta será feita anestesia local com injeção de xilocaína (mesma anestesia de dentista). O participante não pode ser alérgico ao anestésico. O pouco sangramento que se segue a coleta é estancado na hora pela pressão com o dedo. Se necessário se pode dar ponto cirúrgico. A seguir é feito curativo. O voluntário não deve trocar o curativo por 1 dia e ficará com crosta de sangue por 7 a 10 dias. O ponto cirúrgico, quando realizado, será removido em 7 dias. Como a pele estará aberta, pode infeccionar. Após ficará com cicatriz redonda no local.

A pesquisadora acompanhará a cicatrização do local e oferecerá tratamento se necessário. O voluntário poderá contactá-la para qualquer problema relacionado a pesquisa.

A participação de cada um não modificará o atendimento do paciente ou de familiares no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nem como vantagem ou como desvantagem. Também não mudará seu atendimento no Serviço de Dermatologia.

Os resultados serão informados a cada um após as conclusões e precisamos ser comunicados sobre mudança de endereço.

“Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, dos desconfortos e benefícios, assim como das alternativas às quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- da garantia de que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa.”

O Pesquisador Responsável por este projeto de pesquisa é o Professor Dr. Lucio Bakos, fone (51) 21018171, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa Instituição em 29/08/2006.

Dermatologista em Pós-Graduação- Inês Alencar de Castro CREMERS- 14674 Telefones- **(51)**
33115858 / 92616873
End- R. Independência 1125 cj.201 Bairro- Independência CEP- 90510-000
Cidade- Porto Alegre

Eu, _____, fui bem esclarecido
sobre a pesquisa e gostaria de participar.

Data de nascimento _____

CI _____

End _____

Bairro _____ Cidade _____

CEP _____

Anexo 4 – Fichas de coleta de dados

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas - UFRGS

Expressão da proteína p53 em

diferentes níveis de fotoenvelhecimento da pele

Prof.Orientador: Dr. Lucio Bakos Profª Co-orientadora: Drª Luíse Meurer

Patologista Colaborador André Cartell Mestranda: Inês Alencar de Castro

Projeto 06/090

nº	questão	variável
1	número do questionário	quest
2	número do prontuário	npront
3	data do questionário /	data
4	nome	nome
5	nome do pai	npai
6	nome da mãe	nmae
7	sexo: 1-masculino, 2-feminino	sexo
8	se feminino, gravidez: 1-sim,2-não	grav
9	profissão	prof
10	data de nascimento / /	dnasc
11	endereço:	end
12	bairro	bairro
13	cidade	cid
14	código postal	cep
15	estado	est
16	telefone:() ()	tel
17	nome de conhecido ou familiar	nconh
18	endereço de conhecido ou familiar	endconh
19	bairro do conhecido ou familiar	bairconh
20	cidade do conhecido ou familiar	cidconh
21	código postal do conhecido ou familiar	cepconh
22	estado do conhecido ou familiar	estconh
23	telefone do conhecido ou familiar:() ()	telconh
24	tabagismo: atual: 1-sim,2-não	tab
25	tabagismo:passado: 1-sim,2-não	tabp
26	número de cigarros/dia:	ncig
27	número de anos que fumou:	anfum
28	câncer de pele nos antebraços: 1-sim, 2-não	ca
29	câncer de pele em qualquer parte do corpo: 1-sim, 2-não	cacorp
30	tipo de câncer de pele: 1-carcinoma basocelular, 2-carcinoma espinocelular, 3-melanoma, 4-outro tipo, 5-desconhece	tca

31	medicações: 1-sim, 2-não	med
32	quais medicações:	qmed
33	procedimentos nos antebraços como radioterapia, fototerapia, esfoliações, LASER: 1-sim,2-não	proc
34	medicações tópicas nos antebraços: 1-sim, 2-não	medtop
35	fototipo: clínica: 1-sim, 2-não	fotcl
36	fototipo: colorimetria: 1-sim, 2-não	fotco
37	queimaduras solares com bolhas no passado: 1-sim, 2-não	quei
38	número de queimaduras	nquei
39	fotoenvelhecimento Glogau: 1-leve (ausência de ceratoses, leve enrugamento), 2-moderado(poucas ceratoses actínicas, leve coloração amarelada, enrugamento inicial como linhas paralelas ao sorriso), 3-avançado (ceratoses actínicas, descoloração amarelada evidente, enrugamento mesmo em repouso), 4-grave (ceratoses actínicas, câncer de pele, enrugamento actínico, gravitacional e dinâmico)	glogau
40	efélides: 1-sim, 2-não	efel
41	lentigos: 1-sim, 2-não	lent
42	hipomelanose gutata: 1-sim, 2-não	hgut
43	pigmentação irregular: 1-sim, 2-não	pigm
44	telangiectasias: 1-sim, 2-não	telang
45	atrofia cutânea: 1-sim, 2-não	atrcut
46	ceratoses actínicas delimitadas: 1-sim, 2-não	cerdel
47	hiperpigmentação persistente: 1-sim, 2-não	hipper
48	ressecamento: 1-sim, 2-não	ress
49	púrpura: 1-sim, 2-não	purp
50	perda de elasticidade: 1-sim, 2-não	perelas
51	intenso ressecamento: 1-sim, 2-não	intres
52	ceratoses actínicas difusas: 1-sim, 2-não	ceract
53	pseudocicatrices estreladas: 1-sim, 2-não	psestr
54	lagos venosos: 1-sim, 2-não	lago

Nome do Patologista: _____

Nome de aplicador do questionário: _____

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas - UFRGS

Expressão da proteína p53

em diferentes níveis de fotoenvelhecimento da pele

Prof.Orientador: Dr. Lucio Bakos Prof^a Co-orientadora: Dr^a Luíse Meurer

Patologista Colaborador André Cartell Mestranda: Inês Alencar de Castro

Projeto 06/090

nº	questão	variável
1	número do questionário <input type="text"/>	questpat
2	patologista: 1-Prof. Luíse 2-Prof. André <input type="text"/>	patol
3	data da avaliação do patologista / / <input type="text"/>	datapat
4	HE: atrofia epidérmica: retificação de cones interpapilares:1-sim 2-não <input type="text"/>	atr
5	HE: camadas de queratinócitos <input type="text"/>	cqu
6	HE: displasia: 1-baixo grau 2- alto grau <input type="text"/>	displg
7	HE: elastose: 1-sim 2-não <input type="text"/>	elast
8	HE: elastose: 1-leve 2-moderada 3-acentuada <input type="text"/>	elastg
9	HE: elastose: 1-superficial 2-média 3-profunda <input type="text"/>	elastc
10	HE: ectasia venular: 1-sim 2-não <input type="text"/>	ectv
11	HE: alteração de pigmentação 1-sim 2-não <input type="text"/>	pigm
12	expressão da proteína p53: epiderma interanexial 1-focal 2-difuso <input type="text"/>	p53e
13	expressão da proteína p53: epiderma % células terço superficial <input type="text"/>	p53es
14	expressão da proteína p53: epiderma % células terço médio <input type="text"/>	p53em
15	expressão da proteína P53: epiderma % células terço basal <input type="text"/>	p53eb
16	expressão da proteína p53: folículo piloso: 1-sim 2-não <input type="text"/>	p53fp

Nome do Patologista:

Anexo 5 – Banco de dados

quest	data	sexo	grav	prof	dnasc	tab	tabp	ncig	anfum
1	11/9/2006	2	2	comerciante	28/3/1954	2	1	3	19
2	18/9/2006	1		instalador hidráulico	30/11/1938	2	1	40	50
3	25/9/2006	2	2	doméstica aposentada	12/6/1955	1	1	20	25
4	25/9/2006	2	2	auxiliar de enfermagem apos.	4/6/1939	2	2		
5	25/9/2006	2	2	comerciária	5/12/1959	2	2		
6	25/9/2006	2	2	do lar	26/6/1938	2	2		
7	25/9/2006	2	2	agricultora	27/6/1950	2	2		
8	26/9/2006	1		metalúrgico aposentado	23/10/1950	2	1	20	20
9	2/10/2006	2	2	técnica de enfermagem	28/2/1984	2	2		
10	2/10/2006	1		construtor/portaria	7/11/1938	2	2		
11	2/10/2006	2	2	agricultora/faxineira/do lar	1/7/1956	2	2		
12	2/10/2006	1		marceneiro	1/5/1945	2	1	20	40
13	3/10/2006	2	2	do lar	6/5/1973	1	1	20	20
14	4/12/2006	2	2	repositora mercadoria mercado	11/2/1986	2	2		
15	9/10/2006	2	2	auxiliar administrativa HCPA	2/1/1966	2	2		
16	9/10/2006	2	2	costureira	25/10/1954	2	2		
17	16/10/2006	1		taxista	5/12/1948	1		25	44
18	16/10/2006	1		técnico agropecuário	20/8/1956	2	1	12	20
19	17/10/2006	2	2	aux.administr.depart. Pessoal	4/9/1965	2	2		
20	17/10/2006	1		serviços gerais aposent.	16/5/1948	2	2		
21	17/10/2006	1		desempregado, estud.do EJAS	10/8/1953	2	2		
22	17/10/2006	2	2	auxiliar administrativo	19/9/1983	2	2		
23	17/10/2006	1		desempregado	28/10/1956	2	2		
24	23/10/2006	2	2	programadora computador	13/4/1962	2	2		
25	24/10/2006	2	2	do lar	18/4/1932	2	2		
26	24/10/2006	2	2	indústria	13/4/1962	2	1	15	15
27	30/10/2006	2	2	indústria	13/7/1963	1		20	25
28	31/10/2006	2	2	doméstica	24/2/1975	2	2		
29	31/10/2006	2	2	do lar	10/12/1933	2	1	10	20
30	31/10/2006	2	2	comerciante	10/2/1955	1	1	15	20
31	31/10/2006	1		trab. Porto aposent.	15/7/1936	2	1	4	23
32	31/10/2006	1		agricultor	28/2/1966	2	1	10	26
33	7/11/2006	2	2	limpeza	17/12/1950	2	2		
34	7/11/2006	2	2	auxiliar de informática	12/5/1961	2	1	15	28
35	7/11/2006	1		motoboy	21/7/1984	2	2		
36	7/11/2006	2	2	auxiliar de copa de clube	9/5/1968	2	2		
37	13/11/2006	2	2	do lar	2/2/1969	2	1	7	15
38	13/11/2006	2	2	do lar	16/6/1948	2	2		
39	14/11/2006	2	2	bancária desempregada	30/1/1967	2	2		
40	18/11/2006	2	2	auxiliar de enfermagem	24/1/1930	2	2		
41	18/11/2006	2	2	escritório advocacia aposentada	1/9/1942	2	2		
42	18/11/2006	2	2	produtora executiva	15/1/1972	2	2		
43	18/11/2006	2	2	do lar	25/12/1955	2	1	5	1
44	18/11/2006	2	2	técnica de enfermagem	3/5/1964	2	1	10	10
45	18/11/2006	1		representante comercial	29/4/1941	2	1	40	10
46	18/11/2006	2	2	professora	2/3/1955	2	2		
47	18/11/2006	2	2	comerciante aposentada	1/2/1930	2	1	10	2
48	18/11/2006	2	2	comerciária	30/9/1950	2	2		
49	18/11/2006	1		vigilante de churrascaria	21/4/1949	1	1	3	37
50	18/11/2006	2	2	contabilista	7/7/1964	2	2		
51	18/11/2006	2	2	manipuladora de farmácia	25/10/1970	2	2		
52	20/11/2006	2	2	médica	18/7/1955	2	1	20	5
53	21/11/2006	2	2	agricultora	24/3/1961	1	1	15	28
54	27/11/2006	2	2	passadeira de cola	17/7/1952	2	2		
55	27/11/2006	2	2	cozinheira de pastelaria	15/6/1953	1	1	10	10
56	27/11/2006	2	2	costureira	28/3/1931	2	2		
57	28/11/2006	2	2	agricultora	5/1/1971	2	2		
58	28/11/2006	2	2	doméstica	11/9/1937	2	2		
59	28/11/2006	1		motorista de ambulância	10/3/1978	2	2		
60	28/11/2006	2	2	faxineira	9/12/1981	1	1	10	8

ca	cacorp	tca	med	proc	medtop	fotcl	fotco	quei	nquei	efel	lent	hgut	pigm
2	2		1	2	2	1	97,07	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	68,29	1	10	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	69,2	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	74,4	1	1	2	1	1	1
2	2		1	2	2	1	66,35	2		2	1	1	2
2	2		1	2	2	1	71,74	2		1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	69,66	2		1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	70,55	1	2	2	1	2	1
2	2		1	2	2	1	69,2	1	10	2	1	2	2
2	2		2	2	2	1	70,86	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	68,61	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	65,59	2		1	1	2	2
2	2		2	2	2	1	71,55	1	15	1	1	2	1
2	2		1	2	2	1	71,36	1	3	1	1	2	1
2	2		1	2	2	1	67,84	1	8	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	70,19	2		1	1	2	2
2	2		1	2	2	1	68,19	1	2	2	1	1	1
2	2		2	2	2	1	64,11	1	5	2	1	1	1
2	2		2	2	2	1	72,59	2		1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	71,01	1	7	1	1	1	2
2	2		1	2	2	1	71,64	1	1	2	1	1	1
2	2		1	2	2	1	66,45	2		1	2	2	2
2	2		1	2	2	1	66,52	1	1	2	2	2	1
2	2		2	2	2	1	71,14	1	4,5	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	72,34	1	5	1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	65,44	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	68,47	2		1	2	1	1
2	2		1	2	2	1	70,14	2		1	1	2	1
2	2		1	2	2	1	67,61	1	1	1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	67,24	2		1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	69,08	1	1	1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	66,57	1	10	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	70,89	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	69,63	1	1	1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	69,08	1	1	1	2	2	2
2	2		2	2	2	1	71,99	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	71,98	2		1	1	1	1
2	2		1	2	1(hidratantes)	1	69,81	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	71,06	2		1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	71,96	1	1	2	1	1	1
2	2		2	2	1(filtro)	1	73,06	1	2	1	1	1	1
2	2		1	2	1(filtro)	1	74,57	1	1	1	1	2	1
2	2		1	2	2	1	70,79	1	2	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	69,52	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	1(filtro)	1	70,75	2		1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	74,17	1	2	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	69,55	1	1	1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	70,05	1	10	1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	71,86	1	1	1	1	1	1
2	2		2	2	1(filtro)	1	68,58	1	10	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	69,98	1	2	1	2	2	2
2	2		1	2	2	1	73,7	1	2	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	73,93	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	70,09	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	72,9	1	2	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	71,44	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	73,67	1	1	1	1	1	1
2	2		1	2	2	1	72,94	1	2	1	1	1	1
2	2		2	2	2	1	70,86	2		1	2	2	2
2	2		1	2	2	1	72,95	1	10	1	1	1	1

grupo B	atr_1	cqu_1	displg_1	elast_1	elastg_1	elastc_1	ectv_1	pigm_1	p53es_1
1	1	7	1	1	2	2	1	1	0
2	1	5	1	1	2	2	1	1	0
2	1	6	0	1	2	2	1	1	0
1	1	5	2	1	2	2	1	1	25
1	1	6	0	1	1	1	1	1	0
2	1	4	2	1	2	2	1	1	0
2	1	4	0	1	2	3	1	1	0
1	1	6	0	1	2	2	1	1	0
1	1	8	0	1	1	2	1	1	0
2	1	5	0	1	3	2	1	1	5
2	1	6	0	1	3	2	1	1	0
2	1	6	0	1	3	3	1	1	0
2	1	4	0	1	2	2	1	1	0
1	1	6	0	1	1	2	1	1	5
1	1	5	0	1	2	2	1	1	0
2	1	5	0	1	3	2	1	1	5
2	1	4	0	1	3	3	1	1	5
2	1	4	0	1	2	3	1	1	30
1	1	6	0	1	2	2	1	1	0
2	1	4	1	1	2	2	1	1	0
2	1	10	0	1	3	2	1	1	5
1	1	5	0	1	2	2	1	1	0
1	1	4	0	1	2	1	1	1	0
1	1	5	0	1	2	2	1	1	2
2	1	4	0	1	2	2	1	1	0
2	1	5	0	1	3	2	1	1	10
1	1	4	0	1	2	2	1	1	0
1	1	6	0	1	2	2	1	1	5
2	1	6	1	1	2	2	1	1	10
1	1	5	0	1	3	3	1	1	0
2	1	4	1	1	3	2	1	1	10
2	1	5	0	1	3	3	1	1	30
1	1	7	0	1	2	2	1	1	0
1	1	5	0	1	1	2	1	1	0
1	1	7	1	1	2	2	1	1	0
2	1	6	0	1	3	2	1	1	10
1	1	5	0	1	2	2	1	1	0
1	1	6	0	1	2	2	1	1	25
1	1	5	0	1	2	2	1	1	2
2	1	6	0	1	3	2	1	1	0
2	1	6	0	1	2	2	1	1	0
1	1	5	0	1	1	2	1	1	15
1	1	6	0	1	2	3	1	1	10
1	1	6	0	1	2	2	1	1	0
2	1	5	0	1	3	2	1	1	5
1	1	4	0	1	2	2	1	1	0
1	1	7	1	1	3	3	1	1	10
1	1	5	1	1	3	3	1	1	0
2	1	5	1	1	3	3	1	1	0
1	1	6	0	1	2	2	1	1	10
1	1	4	0	1	1	2	1	1	0
1	1	6	0	1	2	2	1	1	0
1	1	5	0	1	3	2	1	1	5
1	1	4	0	1	3	3	1	1	0
1	1	5	0	1	2	2	1	1	0
1	1	4	1	1	2	3	1	1	10
1	1	6	0	1	1	2	1	1	5
2	1	5	0	1	3	3	1	1	10
1	1	6	0	1	1	2	1	1	0
1	2	10	0	1	1	1	1	1	5

p53em_1	p53eb_1	p53_1	p53fp_1	atr_2	cqu_2	displg_2	elast_2	elastg_2	elastc_2
0	1	0,33	1	1	7	1	1	2	2
10	5	5,00	1	1	8	1	1	3	2
30	30	20,00	999	1	6	1	1	2	2
50	70	48,33	2	1	7	2	1	2	2
1	0	0,33	2	1	8	0	1	1	1
30	2	10,66	1	1	4	2	1	2	2
5	1	2,00	1	1	4	1	1	2	3
10	0	3,33	2	1	6	1	1	2	2
2	2	1,33	2	1	8	1	1	1	2
10	10	8,33	1	1	6	1	1	3	2
2	0	0,66	2	1	6	1	1	3	2
0	1	0,33	999	1	6	1	1	3	3
4	2	2,00	1	1	4	2	1	2	2
70	40	38,33	1	1	6	1	1	1	2
1	0	0,33	2	1	5	1	1	2	2
40	5	16,66	1	1	5	1	1	3	2
50	20	25,00	2	1	4	1	1	3	3
70	70	56,66	2	1	4	2	1	2	3
5	0	1,66	2	1	6	1	1	2	2
10	10	6,66	1	1	5	1	1	2	2
60	10	25,00	1	2	8	1	1	2	3
10	10	6,66	999	1	5	1	1	2	2
10	2	4,00	999	1	4	1	1	2	1
30	10	10,66	1	1	5	1	1	2	2
20	30	16,66	999	1	5	1	1	2	2
45	30	28,33	1	1	4	1	1	2	2
10	10	6,66	2	1	4	1	1	2	2
30	30	21,66	1	1	6	1	1	2	2
30	40	26,66	1	1	6	2	1	2	2
10	10	6,66	2	1	5	1	1	2	3
50	40	33,33	1	1	4	2	1	3	2
90	30	50,00	2	1	5	2	1	3	2
20	10	10,00	999	1	6	1	1	2	2
4	0	1,33	1	1	5	1	1	1	2
5	5	3,33	1	1	7	1	1	2	2
80	60	50,00	1	1	5	1	1	3	2
30	10	13,33	2	1	4	1	1	2	2
90	80	65,00	999	1	5	1	1	2	2
10	20	10,66	1	1	5	1	1	2	2
30	10	13,33	2	1	6	1	1	3	2
5	5	3,33	2	1	6	1	1	2	2
30	25	23,33	1	1	5	1	1	1	2
20	40	23,33	999	1	5	1	1	2	3
1	0	0,33	2	1	6	1	1	2	2
50	10	21,66	2	1	4	1	1	2	2
25	10	11,66	2	1	5	1	1	2	2
40	15	21,66	1	1	6	2	1	2	2
40	25	25,00	999	1	4	1	1	2	3
40	20	20,00	999	1	5	2	1	2	3
30	20	20,00	1	1	5	1	1	2	2
15	10	8,33	2	1	4	1	1	2	2
5	0	1,66	2	1	4	1	1	2	2
50	15	23,33	2	1	5	1	1	2	2
10	5	5,00	2	1	4	1	1	2	3
20	5	8,33	1	1	5	2	1	2	2
40	30	26,66	1	1	4	2	1	2	3
40	20	21,66	2	1	5	1	1	2	2
60	15	28,33	2	1	4	1	1	2	2
30	10	13,33	2	1	5	1	1	1	1
50	25	26,66	2	2	7	0	1	1	1

ectv_2	pigm_2	p53es_2	p53em_2	p53eb_2	p53_2	p53fp_2	Mp53%	Cp53fp
1	1	0	0	1	0,33	1	0,330	sim
1	1	0	10	5	5,00	1	5,000	sim
1	1	0	30	30	20,00	999	20,000	sim
1	1	25	50	70	48,33	2	48,330	sim
1	1	0	1	0	0,33	2	0,330	sim
1	1	0	30	2	10,66	1	10,660	sim
1	1	0	5	1	2,00	1	2,000	sim
1	1	0	10	0	3,33	2	3,330	sim
1	1	0	2	2	1,33	2	1,330	sim
1	1	5	10	10	8,33	1	8,330	sim
1	1	0	5	1	2,00	2	1,330	sim
1	1	0	0	2	0,66	999	0,495	sim
1	1	0	10	1	3,66	1	2,830	sim
1	1	5	60	40	34,00	1	36,165	sim
1	1	0	2	0	0,66	2	0,495	sim
1	1	5	40	10	18,33	1	17,495	sim
1	1	5	50	25	26,66	2	25,830	sim
1	1	5	60	35	33,33	2	44,995	sim
1	1	0	5	0	1,66	2	1,660	sim
1	1	0	15	5	6,66	1	6,660	sim
1	1	5	55	10	23,33	1	24,165	sim
1	1	0	10	10	6,66	999	6,660	sim
1	1	0	10	2	4,00	999	4,000	sim
1	1	2	30	10	14,00	1	12,330	sim
1	1	0	20	30	16,66	999	16,660	sim
1	1	10	45	30	28,33	1	28,330	sim
1	1	0	10	10	6,66	2	6,660	sim
1	1	5	30	30	21,66	1	21,660	sim
1	1	10	30	40	26,66	1	26,660	sim
1	1	0	10	20	10,00	2	8,330	sim
1	1	5	40	30	25,00	1	29,165	sim
1	1	25	90	30	48,33	2	49,165	sim
1	1	0	25	10	11,66	999	10,830	sim
1	1	0	4	0	1,33	1	1,330	sim
1	1	0	5	2	2,33	1	2,830	sim
1	1	10	85	50	48,33	1	49,165	sim
1	1	0	30	10	13,33	2	13,330	sim
1	1	25	90	80	65,00	999	65,000	sim
1	1	2	15	25	14,00	1	12,330	sim
1	1	0	30	10	13,33	2	13,330	sim
1	1	0	5	2	2,33	2	2,830	sim
1	1	15	40	25	26,66	1	24,995	sim
1	1	10	20	40	23,33	999	23,330	sim
1	1	0	2	1	1,00	2	0,665	sim
1	1	10	50	10	23,33	2	22,495	sim
1	1	0	25	10	11,66	2	11,660	sim
1	1	10	40	15	21,66	1	21,660	sim
1	1	0	40	25	21,66	999	23,330	sim
1	1	0	45	25	23,33	999	21,665	sim
1	1	10	30	20	20,00	1	20,000	sim
1	1	0	15	10	8,33	2	8,330	sim
1	1	0	10	2	4,00	2	2,830	sim
1	1	5	50	15	23,33	2	23,330	sim
1	1	0	15	10	8,33	2	6,665	sim
1	1	0	25	10	11,66	1	9,995	sim
1	1	10	50	35	31,66	1	29,160	sim
1	1	5	45	25	25,00	2	23,330	sim
1	1	5	50	20	25,00	2	26,665	sim
1	1	0	30	10	13,33	2	13,330	sim
1	1	5	45	25	25,00	2	25,830	sim

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)