

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**O POSSÍVEL PAPEL DA PROTEÍNA ROC1 NA EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA CICLINA D1 EM MELANOMAS CUTÂNEOS.**

Gisele Alborghetti Nai

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

B O T U C A T U - S P

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**O POSSÍVEL PAPEL DA PROTEÍNA ROC1 NA EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA CICLINA D1 EM MELANOMAS CUTÂNEOS.**

Doutoranda: Gisele Alborghetti Nai

Orientadora: Prof^a. Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

B O T U C A T U - S P

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Nai, Gisele Alborghetti.

O possível papel da proteína ROC1 na expressão da proteína ciclina D1 em melanomas cutâneos / Gisele Alborghetti Nai. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientadora: Mariângela Esther Alencar Marques
Assunto CAPES: 40105008

1. Melanoma 2. Pele - Câncer

CDD 616.994

Palavras chave: Hibridação “*in situ*”; Melanoma; Proteína Ciclina D1; Proteína ROC1

Epigrafe

“We have never been allowed to lose sight of the fact that the main purpose to be served... is the case of the sick”.

(Dr. Willian J. Mayo, 1935)

"Se as coisas são impossíveis... Ora,
Isso não é motivo para não querê-las.
Que tristes os caminhos se não fora
A mágica presença das estrelas."

(Mário Quintana)

Dedicatória

À minha mãe, Sra. Nilse Alborghetti Nai,
que sempre se interessou por tudo o que fiz, mesmo, muitas vezes,
compreendo pouco, e quem nunca me deixou desistir dos meus sonhos.

Aos meus alunos da Faculdade de Medicina da Universidade do Oeste Paulista
(UNOESTE), para quem eu quero me tornar melhor e sem os quais tudo isto
teria pouco sentido.

*Agradecimentos
Especiais*

À minha orientadora, Prof. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques, não só pelo que me ensinou e pelas oportunidades que me deu, mas também pelo carinho, amizade e confiança.

Ao meu pai, Sr. Benedito Olavo Nai, por todos seus esforços e anos de trabalho para que eu tivesse uma boa educação.

Ao amigo e colega de trabalho, José Luiz Santos Parizi, pelo companheirismo, incentivo e torcida.

À minha querida amiga, Maria Fernanda Grilo Milanezi, pela amizade e ensinamentos.

Ao meu querido amigo, Rogério de Almeida Ribeiro, por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos, Ana Rosa Correa Mota e Carlos César Ramos, pelo apoio logístico e amizade.

À Mi, o anjinho que Deus nos deu.

Agradecimientos

À Prof. Dra. Márcia Guimarães da Silva do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por toda ajuda.

À minha querida amiga Samia Demachi, quem me ensinou a analisar casos de imuno-histoquímica, pelo eterno incentivo e torcida.

À Dra. Dina Leitão do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular (IPATIMUP) da Universidade do Porto – Portugal, pela gentileza e preocupação com que me ensinou a técnica de FISH.

Aos pesquisadores, alunos e funcionários do Laboratório TOXICAM do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial, ao Prof. Dr. João Lauro Vianna de Camargo, por permitir o uso das instalações para realização da técnica de FISH, e a Merielen Nascimento Bruno Castaldi e João Paulo de Castro Marcondes, meus colegas de FISH.

Aos funcionários do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Marcos Roberto Franchi, Celene Maria Carvalho Gandin, Luis Fernando Franchi, pela realização do estudo imuno-histoquímico e gentileza comigo.

Aos docentes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelos ensinamentos que me transmitiram, em especial a Profa. Dra. Kunie Iabuki Rabello Coelho, Prof. Dr. Júlio Defaveri, Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, Profa. Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira e Prof. Dr. Mario Rubens Montenegro (*in memoriam*), com o qual realizei meu primeiro trabalho científico.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, sempre tão gentis e prestativos.

Aos funcionários do Setor de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela gentileza com que sempre atenderam meus pedidos urgentes.

Ao Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu pelo auxílio com a análise estatística.

Aos meus colegas patologistas, Marilda da Costa Brandão e Carlos Zelandi Filho, por toda ajuda e amizade desde que voltei a Presidente Prudente.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), que suportaram bravamente todas minhas ausências.

À Dra. Maria Aparecida de Sousa, coordenadora geral dos laboratórios da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), e à Sra. Ana Cardoso Maia de Oliveira Lima, digníssima Reitora da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pelo incentivo a realização do meu doutorado.

À MedGen Comércio e Importação Ltda. por ceder as alíquotas do anticorpo anti-ROC1 para teste e padronização da diluição.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa (Processo nº 07/53269-6).

À muitas outras pessoas que me ajudaram durante esta jornada, mas que seria impossível citar aqui, das quais não me esquecerei.

Índice

INTRODUÇÃO.....	16
A proteína ciclina D1 e melanomas cutâneos.....	22
Proteólise mediada por ubiquitina.....	25
As proteínas “RING”.....	26
O complexo SCF.....	28
A proteína ROC1.....	29
A proteína ROC1 e a proteína ciclina D1.....	29
Referências bibliográficas.....	30
OBJETIVO.....	39
Objetivo geral.....	40
Objetivos específicos.....	40
FIGURAS.....	41
MANUSCRITO 1 – ROC PROTEIN, CELL CYCLE AND CÂNCER.....	51
Abstract.....	52
Introduction.....	52
Ubiquitin-Mediated Proteolysis.....	52
Ring Proteins.....	53
The SCF Complex.....	53
ROC1 Protein.....	54
ROC1 Protein And Cell Cycle Proteins.....	54
The Detection of ROC1 Protein in Tissues.....	55
General Comments.....	55
Acknowledgement.....	55
Finantial Support.....	56
References.....	55
MANUSCRITO 2 – A PROTEÍNA ROC1 NO CONTROLE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CICLINA D1 EM MELANOMAS CUTÂNEOS.....	58
Resumo.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	63
Resultados.....	67
Discussão.....	71
Conclusões.....	75
Referências Bibliográficas.....	76
Figuras.....	82
CONCLUSÕES.....	89
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91
ANEXO.....	93

Introdução

Melanócitos são células derivadas da crista neural que sintetizam melanina, pigmento responsável pela coloração da pele. São células polidendríticas, localizadas principalmente no estrato basal da epiderme, unidade pilo-sebácea e ductos sudoríparos. A melanina é sintetizada em organelas especiais, conhecidas por melanossomos e doada aos queratinócitos epidérmicos através dos prolongamentos dendríticos^{1,2} (Figura 1).

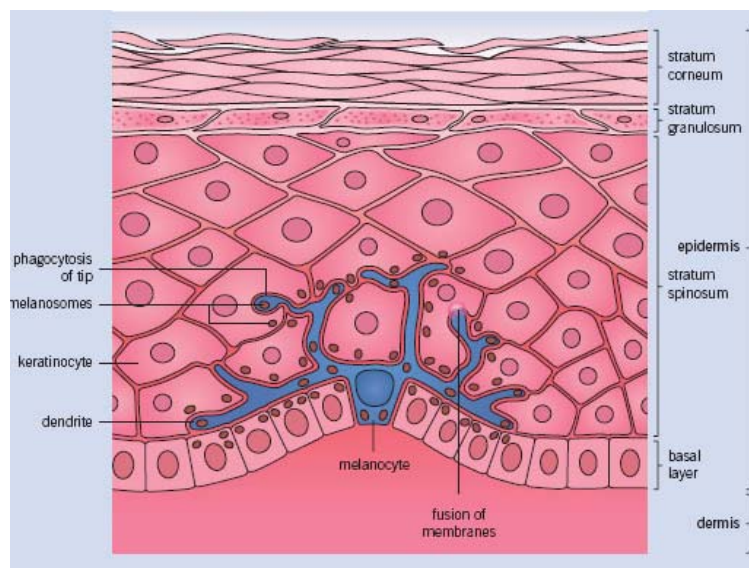


Figura 1 - Esquema da localização do melanócito na epiderme (Fonte: Nestle & Kerl, 2005¹).

Melanócitos podem dar origem à neoplasias benignas e malignas que diferem na sua aparência clínica e histológica e principalmente no comportamento biológico². Os tumores melanocíticos benignos são chamados nevos melanocíticos. A transformação maligna dos melanócitos dá origem ao melanoma, neoplasia altamente agressiva. A incidência desse tipo de tumor em toda a população mundial está crescendo numa taxa anual suficiente para que essa seja dobrada a cada década^{3,4}.

O melanoma cutâneo é menos freqüente do que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas), no entanto, sua letalidade é mais elevada. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, anualmente, ocorram cerca de 132 mil casos novos desse câncer no mundo, e, que a prevalência seja de cerca de 2,5%. Sua incidência no Brasil é baixa, 2.950 casos novos, em homens, e 2.970 casos novos, em mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul⁵.

O prognóstico do melanoma de pele pode ser considerado bom, se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer, principalmente devido à detecção precoce do mesmo. A média mundial estimada de sobrevida em cinco anos é de 69%. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto, nos países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56%⁵.

Os melanomas cutâneos apresentam duas fases distintas de crescimento: radial e vertical. O crescimento radial significa crescimento horizontal no interior das camadas epidérmica e dérmica papilar, por período de tempo, geralmente prolongado. Durante este estágio, as células componentes do melanoma não têm capacidade de metastatizar. Com o decorrer do tempo variável, o padrão de crescimento assume um componente vertical, no qual o melanoma agora cresce em profundidade, penetrando nas camadas dérmicas de forma expansiva, tumorigênica⁶ (Figura 2). Esse evento é anunciado, clinicamente, pelo desenvolvimento de uma elevação representada por pápula ou nódulo sobre a lesão anteriormente plana, que coincide com o aparecimento de um clone de células com verdadeiro potencial metastático⁶.

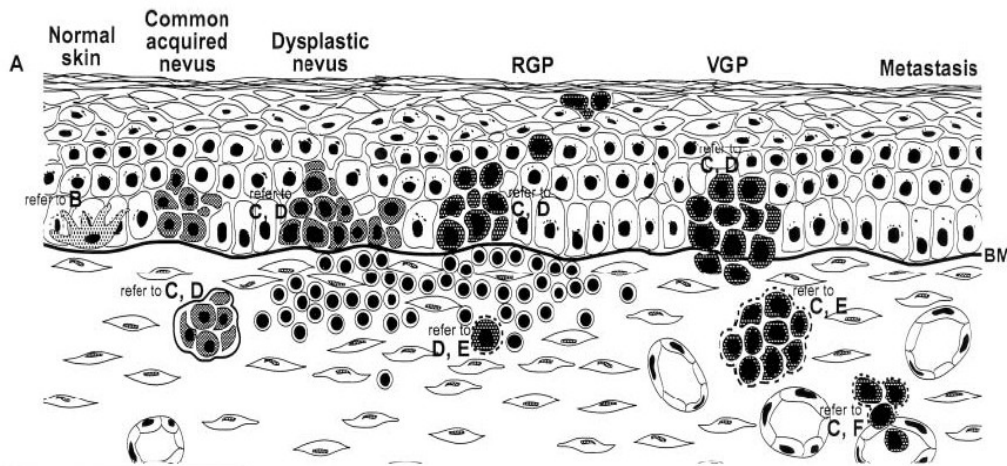


Figura 2 - Esquema de progressão dos melanomas cutâneos (Fonte: Hsu et al., 2002⁶). RGP: fase de crescimento radial. VGP: fase de crescimento vertical; BM: membrana basal.

A apresentação clínica e histológica do melanoma pode variar significativamente. A classificação proposta separa os melanomas em melanoma extensivo superficial (ES), lentigo maligno melanoma (LMM), melanoma nodular (MN)^{7,8} e melanoma acral lentiginoso (AL)⁹. O critério proposto para esta classificação foi baseado na presença e no padrão de crescimento da fase radial¹⁰ do melanoma: 1. ES: padrão chamado pagetóide com melanócitos solitários ou em ninhos esparsos ao longo da epiderme (Figura 3A); 2. LMM e AL: padrão lentiginoso com melanócitos solitários ao longo da junção dermo-epidérmica (Figuras 3B e 3C); 3. MN: melanoma invasivo sem fase de crescimento radial identificada (Figura 3D). Estes padrões histológicos mostram alguma correlação com a localização anatômica (ES e NM no tronco e extremidades, LMM na face e AL nas palmas, solas e região subungueal), padrão de exposição solar (aguda e intermitente para ES e MN, crônica para LMM e sem associação nos AL) e idade do paciente (ES e NM mais frequentes em pacientes abaixo de 60 anos, LMM e AL mais frequentes em pacientes acima de 60 anos)⁴.

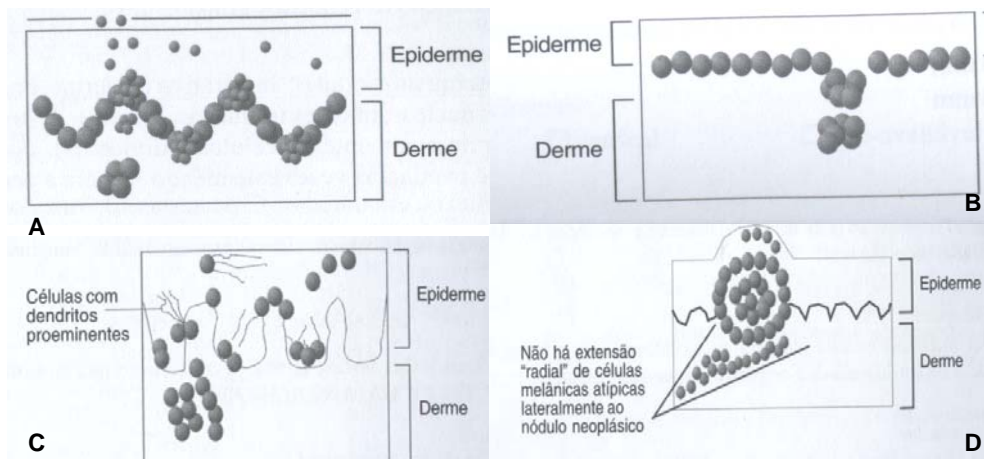


Figura 3 - Desenho esquemático dos tipos histológicos de melanoma cutâneo. A – Extensivo superficial; B – Lentigo maligno melanoma; C – Acral lentiginoso; D – Melanoma nodular (Fonte: Marques, 2006¹⁰).

Na tentativa de prover ao cirurgião as informações pertinentes do paciente, para que possam ser tomadas as mais apropriadas decisões, o patologista deve incluir todas as características histopatológicas importantes para o prognóstico¹¹. Dessa forma, no laudo histopatológico dos melanomas é importante constar a localização e a medida macroscópica da lesão, a fase de crescimento, a intensidade do infiltrado linfocitário, o nível de invasão da derme (nível de Clark), a medida da espessura de Breslow, o índice mitótico, presença de regressão histológica, de ulceração e de lesões satélites¹⁰. O fator prognóstico isolado mais importante dos melanomas é a medida da espessura de Breslow, que é realizada no local de maior invasão microscópica¹ (Figura 4). Outro fator prognóstico isolado de grande importância é o índice mitótico¹²⁻¹⁴, o qual tem sido considerado como fator preditivo de positividade em linfonodos sentinelas¹⁵.

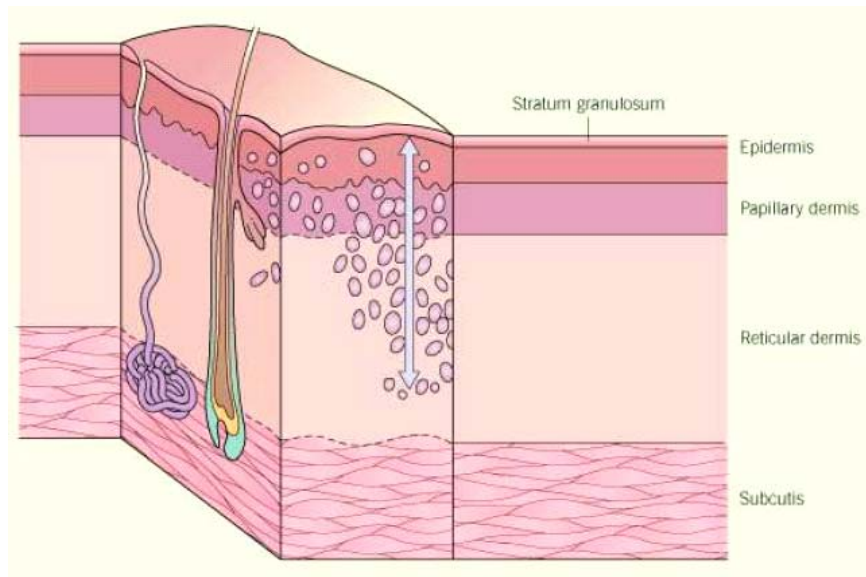


Figura 4 - Esquema da medida da espessura de Breslow (Fonte: Nestle & Kerl, 2005¹).

A última classificação TNM da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) para estadiamento de melanomas cutâneos, realizada em 2001, baseia-se nas características do tumor na medida de Breslow e presença de ulceração, mostrando a importância desta medida no prognóstico destes tumores¹⁶.

A aquisição de anormalidades no ponto de checagem G1/S parece ser o passo mais crucial na gênese e progressão dos melanomas¹⁷⁻¹⁹. A inativação das vias da pRB e p53 na transição G1/S é requisito fundamental para gênese da maioria dos cânceres humanos, incluindo o melanoma¹⁹.

A característica do desenvolvimento dos tumores sólidos é a aquisição de múltiplos defeitos genéticos envolvendo genes supressores tumorais e ativação de oncogenes. Em melanomas cutâneos, deleções e rearranjos não randomizados são vistos em diversas regiões cromossômicas, incluindo 1p, 7q, 9p, 10q e 11q²⁰, e ampliações, indicando áreas de oncogenes potenciais, são vistas em 4q12, 5p14.3-pter, 7q33-qter, 8q12-13, 11q13.3-14.2 e 17q25²¹.

A região mais freqüentemente amplificada em todos os tipos de melanomas é do cromossomo 11q13^{4,21}, que contém o gene da ciclina D1, mas com fraca associação entre o número de cópias gênicas e a espessura do tumor²¹.

A proteína ciclina D1 e melanomas cutâneos

A regulação da proliferação celular é o evento chave no desenvolvimento normal, nas respostas à agressão celular e na tumorigênese. A progressão ordenada das células por meio da regulação do ciclo celular depende do balanço entre as concentrações de ciclina ativada e de quinases ciclina-dependentes (cdk)²². A ciclina D1 decodifica a subunidade reguladora de uma holoenzima, que fosforila e inativa a proteína do retinoblastoma (pRB) e promove a progressão para a fase G1/S do ciclo celular (Figura 5).

A amplificação ou expressão exagerada de ciclina D1 desempenha um papel importante na tumorigênese²³ em vários cânceres humanos, incluindo os mamários, linfomas, cólon retal e nos melanomas, e pode ocorrer por vários mecanismos¹⁷. Embora a maioria dos melanomas primários expresse altos níveis de ciclina D1, quando comparado com lesões melanocíticas benignas, essa proteína tem seu papel questionado no desenvolvimento do fenótipo metastático^{22,24-26}, mas o aumento de sua expressão é um evento crucial que leva a progressão dos melanomas²⁷, com alguns trabalhos mostrando associação do aumento de expressão de ciclina D1 com altas taxas de proliferação nos melanomas^{28,29}. Alonso et al.¹⁸ encontraram maior expressão de ciclina D1 em melanomas em fase radial de crescimento e discreto aumento no estágio metastático.

A retirada dos mitógenos mantém as células estagnadas em G1 primariamente pela cessação da síntese de ciclinas do tipo D. A superexpressão de ciclinas do tipo D pode permitir a entrada anormal da célula no ciclo celular.

Dois principais mecanismos, a amplificação gênica da ciclina D1 e o aumento da estabilidade protéica da ciclina D1, têm sido associados com oncogênese em diferentes tipos de cânceres humanos³².

A ciclina D1 é uma proteína nuclear codificada pelo gene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13. A amplificação do gene *CCND1* tem sido identificada em mais de 44% dos melanomas acrais lentiginosos, mas é menos freqüente nos outros subtipos de melanomas^{17,30}. A amplificação do gene *CCND1* nos melanomas acrais lentiginosos aparece precocemente, antes mesmo da fase *in situ* da neoplasia, diferente dos outros tipos de melanoma que apresentam amplificação mais tardiamente, durante sua progressão^{30,33}.

Todos os casos de melanomas com aumento no número de cópias do gene *CCND1* mostraram expressão exagerada de ciclina D1, porém, aproximadamente 25% dos melanomas com expressão exagerada de ciclina D1 apresentaram número normal de cópias do gene *CCND1*, sugerindo que os níveis de expressão da ciclina D1 são modulados por outros mecanismos, não somente por cópias gênicas^{17,19,33}.

A estabilidade protéica da ciclina D1 é normalmente regulada por proteólise dependente de ubiquitina^{32,34}.

Proteólise mediada por ubiquitina

A maioria das proteínas que são degradadas no citosol é transferida para grandes complexos de proteínas, denominados proteassomas, que estão presentes em muitas cópias, por toda célula. Cada proteassoma consiste de um cilindro central, formado a partir de proteases múltiplas distintas na sua face interna e de grandes complexos bloqueadores protéicos na extremidade. Acredita-se que esses bloqueadores protéicos selecionam as proteínas para destruição, ligando-se a elas e empurrando-as para dentro da câmara interna do cilindro, onde múltiplas proteases degradam as proteínas em pequenos peptídeos que são liberados no citoplasma da célula. Os proteassomas atuam sobre as proteínas que foram especialmente marcadas para destruição, pela ligação covalente de uma pequena proteína, denominada ubiquitina³¹.

A proteólise dependente de ubiquitina e subsequente degradação pelo proteassoma de enzimas regulatórias controla a estabilidade protéica e tem um papel importante na regulação de um amplo espectro de processos biológicos, incluindo entrada no ciclo celular, transcrição e transdução de sinal³⁵⁻³⁹.

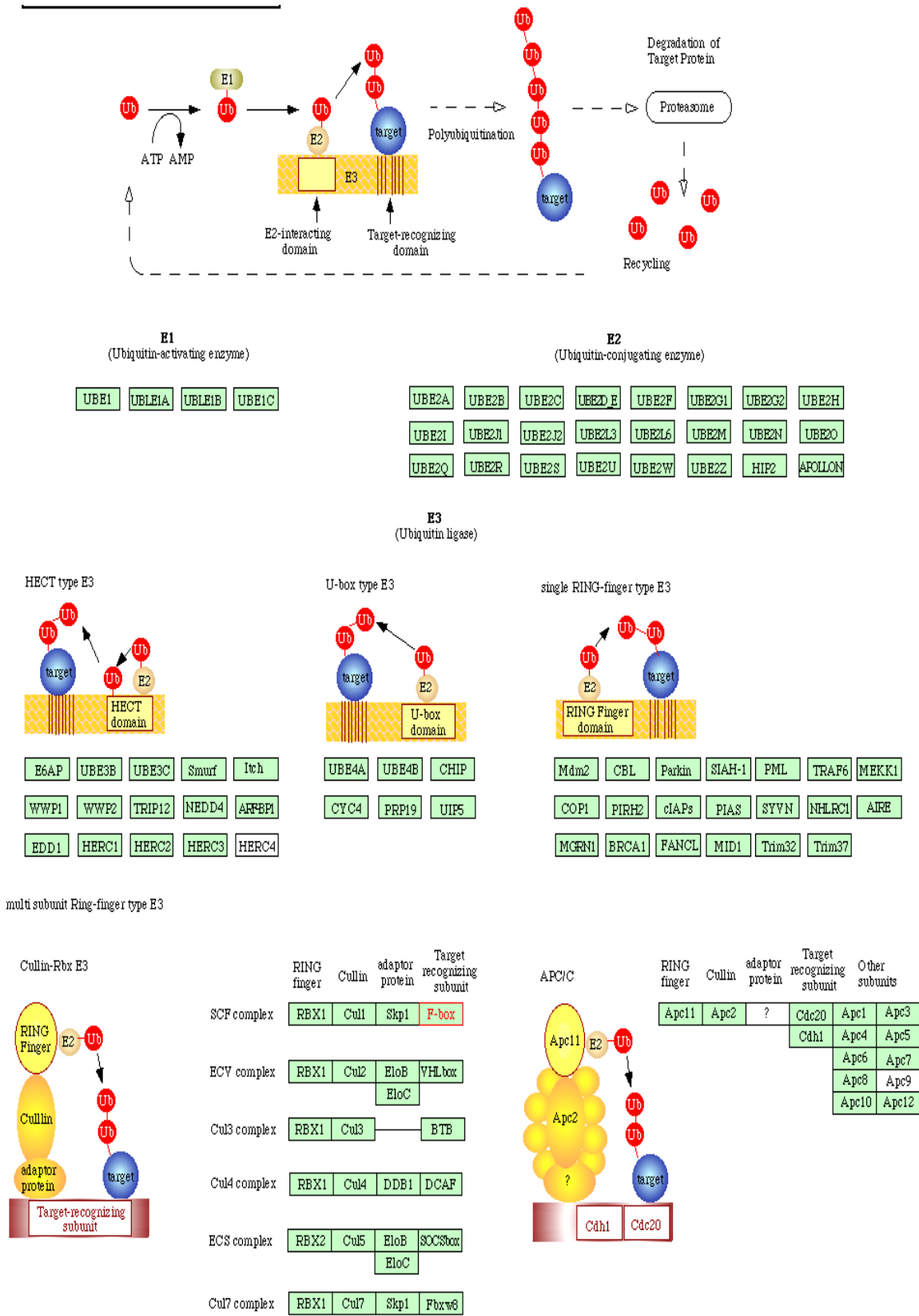
Diferentes vias proteolíticas, dependentes de ubiquitina, utilizam enzimas conjugadas a ubiquitinas distintas, que são estruturalmente similares, associadas com subunidades de reconhecimento das proteínas que carregam um sinal particular de degradação. A enzima conjugada adiciona a ubiquitina a um resíduo de lisina de uma proteína-alvo, e posteriormente, adiciona uma série de ubiquitinas, formando uma cadeia multi-ubiquitinada, que será reconhecida por uma proteína receptora específica no proteassoma^{31,40}. A cadeia multi-ubiquitinada é ligada covalentemente a proteína alvo através de cascata de três enzimas: a ubiquitina-ativadora (E1), a ubiquitina-conjugadora

(E2) e uma ubiquitina-ligase (E3). Atuando no último estágio desta cascata, as ubiquitina-ligases E3 funcionam como um componente central da via de ubiquitinação, catalisando a transferência final de ubiquitina da E2 ao substrato, e governando a especificidade e o tempo da reação modificada (Figura 6)^{35,37-38,40,41}.

As proteínas “RING”

A ligação entre as proteínas E2 e E3 é feita através de um fragmento protéico chamado proteína “RING”, uma estrutura conservada ao longo da evolução, encontrada em mais de 200 proteínas, na qual duas alças de aminoácidos, cujas extremidades são unidas nas bases por oito cisteínas ou resíduos de histidinas, que se ligam a dois íons de zinco. Muitas proteínas “RING” participam da ubiquitinação e são essenciais para a atividade ubiquitina-ligase^{42,43}.

Existe um grande número de proteínas “RING” em todos eucariotos e mais de 350 no genoma humano. Ambos, comprimento e seqüência das cisteínas e histonas variam significativamente entre as diferentes proteínas “RING”. Baseado no arranjo dos resíduos de cisteínas e histidinas, as proteínas “RING” podem ser classificadas em três subclasses: C3H2C3 (ou RING-2), C3HC4 (ou RING-HC) e menos frequentemente C2H2C4⁴³.



04120 12/28/07

Figura 6 - Proteólise mediada por ubiquitina (Fonte: www.genome.jp/kegg⁵⁸).

O complexo SCF

A proteína SCF (SKP1-CUL1(CDC53)-E-box) e o complexo promotor da anáfase (APC) são os dois maiores complexos ubiquitina-ligase que regulam proteólise mediada por ubiquitina durante G1/S e a anáfase, e contêm as pequenas proteínas “RING” ROC1 (RING of Cullins) e APC11, respectivamente^{32,44-46}. O complexo ubiquitina-ligase SCF é composto por quatro subunidades maiores, Skp1, Cul1, Rbx1/ROC1 e uma das muitas proteínas F-box (Figura 6)⁴⁵.

As proteínas SCF ubiquitina-ligases incluem um membro da família das proteínas F-box (assim chamadas pois a ciclina F foi uma das primeiras proteínas em que este fragmento foi identificado), as quais servem para reconhecer e recrutar a proteína-alvo⁴⁷. As proteínas F-box estão ligadas ao módulo CUL1/ROC1 pela proteína adaptadora Skp1 (proteína associada a quinase da fase S – 1)^{41,48,49}. As cullins (CUL) são uma família de proteínas, conservadas durante a evolução, que agregam a grande família das ligases E3 dependentes de cullins (CDL). Todas as cullins contêm um domínio carboxi-terminal, de aproximadamente 100 aminoácidos, que se liga às pequenas proteínas ROC1 e APC11^{35,50}.

O controle da formação do complexo SCF é feito através da proteína Cand1, que inibe sua formação, prevenindo o acesso da Skp1 e das proteínas F-box a fração CUL1-ROC1, assim evitando a ubiquitinação das proteínas pela F-box. A proteína Cand1 se liga a fração CUL1-ROC1 e inibe o acesso ao complexo E3^{39,51-57}.

A proteína ROC1

A proteína “RING” ROC1 (também chamada Rbx1 e Hrt1) é bastante estável, sendo subunidade essencial da proteína SCF ubiquitina-ligase^{32,43}. Pertence à subclasse C3H2C3 (ou RING-2) das proteínas “RING”. Foi inicialmente isolada em leveduras⁵⁹ e purificada bioquimicamente como componente comum do complexo SCF de humanos e leveduras^{36,60,61}, e do complexo supressor tumoral von Hippel-Lindau (CBC^{VHL} ou C_{ul}2-Elongin BC-VHL)^{41,62}.

A proteína ROC1 é codificada pelo gene humano Rbx1, composto por cinco éxons, localizado no cromossomo 22q 13⁶³. Mutações pontuais em apenas um aminoácido no domínio da proteína ROC1 são capazes de inativar completamente a atividade da ubiquitina-ligase^{32,43,59,64}. É um mediador da degradação de substratos protéicos requeridos para progressão do ciclo celular, transdução de sinal e para execução de atividades supressoras tumorais⁶². Diferente da proteína APC11 que somente interage com a proteína cullin/APC2, a proteína ROC1 se liga a CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A e CUL4B, e age como um adaptador a enzima ubiquitina-conjugadora E2, o que amplia seu papel na ubiquitinação^{36,43,59,60,62,65}. A proteína ROC1 apresenta dois domínios, um C-terminal que é suficiente para ativar a UBC5-E2 e um N-terminal que se liga a CUL1, que por sua vez se ligará a uma E2⁴³.

A proteína ROC1 e a proteína ciclina D1

Estudos demonstraram o papel da proteína SCF-ROC1 na ubiquitinação das ciclinas D1 e também das ciclinas D2 e D3 em humanos, mostrando que esta proteína tem papel importante na regulação da proteólise das ciclinas^{32,34,66}.

Desde que, os níveis de expressão das ciclinas D estão relacionados ao potencial de malignidade e ao prognóstico dos melanomas, tentativas de entender o mecanismo que rege a superexpressão destas ciclinas é importante para o desenvolvimento de terapêuticas para melanomas que superexpressam ciclinas do tipo D.

Referências bibliográficas

1. Nestle FO, Kerl H. Melanoma. In: Bologna B, Jorizzo J, Rapini R (Eds.). *Dermatology*. Section 18, Chapter 114, p. 1789-1816, 1st edition. Elsevier Editora. New York. 2005.
2. Carlson JA, Ross JS, Slominski AJ. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clinics in Dermatology* 2009; 27:75–102.
3. Elder DE, Murphy GF. Melanocytic tumors of the skin. *Atlas of tumor pathology*. 3rd series. Fascicle 2. Washington, DC. Armed Forces Institute, 1991.
4. Bastian BC, Olshen AB, Leboit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number. *Am J Pathol* 2003;63(5):1765-70.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2007.
6. Hsu M, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 2002;70:522-36.

7. Clark Jr WF, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29:705-27.
8. McGovern V.J, Mihm Jr MC, Bailly C et al. Classification of malignant melanoma and his histologic reporting. *Cancer* 1973;32:1446-57.
9. Reede RJ. Acral lentiginous melanoma. New concepts in surgical pathology of the skin. Editado por W Hartmann, S Kay, RJ Reed. John Wiley & Sons, Inc, Nova Iorque, p. 89-90, 1976.
10. Marques MEA. Melanomas cutâneos. In: Bachi CE, Almeida PCC, Franco M (Eds.). *Manual de Padronização de laudos histopatológicos*. Sociedade Brasileira de Patologia. Capítulo 3, página 13, 3ª edição. Reichmann & Affonso Editores. Rio de Janeiro. 2006.
11. Scolyer RA, Thompson JF, Stretch JR, Sharma R, McCarthy SW. Pathology of melanocytic lesions: new, controversial, and clinically important issues. *J Surg Oncol* 2004;86(4):200-11.
12. Francken AB et al. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. *Ann Surg Oncol* 2004;11(4):426-33.
13. Barnhill RL, Katzen J, Spatz A, Fine J, Berwick M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol* 2005;32(4):268-73.
14. Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Insa A, Fortea JM. Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. *Melanoma Res* 2005;15(3):169-77.

15. Kesmodel SB et al. Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas. *Ann Surg Oncol* 2005;12(6):4449-58.
16. Balch CM et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;(19):3635-48.
17. Sauter RE, Yeo U, Von Stemm A, Zhu A, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer research* 2002;26:3200-6.
18. Alonso RS, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gomes B, Sánchez L, Acuña MJ, Pajares R, Martínez-Tello, Hortelano CM, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. *Am J Pathol* 2004;164(1):193-203.
19. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS, Zhuang L, McCarthy SW, Scolyer RA. The role of regulatory proteins in pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38(4):287-301.
20. Walker G, Hayward NK. Pathways to melanoma development: lessons from the mouse. *J Invest Dermatol* 2002;119:783-92.
21. Bastian BC, Leboit PE, Hamm H, Bröcker E-B, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998;58:2170-5.
22. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001;54(3):229-35.
23. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145(12):5439-47.

24. Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(9):3614-20.
25. Bachmann IM, Straume O, Asklen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol* 2004;25(6):1559-65.
26. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diag Pathol* 2005;9(4):185-8.
27. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho K-H, Aiba S, Bröker E-B, Leboit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353(20):2135-47.
28. Lebe B, Pabuççuoglu U, Ozer, E. The significance of ki-67 proliferative index and cyclin D1 expression of dysplastic nevi in the biologic spectrum of melanocytic lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15(2):160-4.
29. Stefanaki C, Stefanaki K, Antoniou C, Argyrakos T, Stratigos A, Patereli A, Katsambas A. G1 cell cycle regulators in congenital melanocytic nevi. Comparasion with acquired nevi and melanomas. *J Cutan Pathol* 2008; doi: 10.1111/j.1600-0560.2007.00912.x.
30. Yamamura M, Takata M, Miyasaki A, Saida T. Specific dermoscopy patterns and amplifications of the cyclin D1 gene to define histopathologically unrecognizable early lesions of acral melanoma in situ. *Arch Dermatol* 2005;141:1413-8.
31. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell*. London: Garland Science Publishing; 2004.

32. Maeda I, Ohta T, Koizumi H, Fukuda M. In vitro ubiquitination of cyclin D1 by ROC1-CUL-1 and ROC1-CUL-3. *FEBS letters* 2001;494:181-5.
33. Bastian BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene* 2003;22:3081-6.
34. Russell A, Thompson MA, Hendley J, Trute L, Armes J, Germain D. Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* 1999;18:1983-91.
35. Deshaines RJ. SCF and cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:435-67.
36. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowyra D, Moreland RJ, Iliopoulos O, Lane WS, Kaelin Jr WG, Elledge SJ, Conaway RC, Harper JW, Conaway JW. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999;284:657-61.
37. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* 2000; 34(suppl):40-51.
38. Ciechanover A, Orian A, Schwartz, AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000;22:442-51.
39. Goldenberg SJ, Cascio TC, Shumway SD, Garbutt KC, Liu J, Xiong Y, Zheng N. Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell* 2004;119(4):517-28.
40. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1989;67:425-7.

41. Kamura T, Browe CS, Conaway RC, Conaway JW. A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of VHL ubiquitin. *J Biol Chem* 2002;277(33):30388-93.
42. Barinaga M. A new finger on the protein destruction button. *Science* 1999;286(5438):223-5.
43. Furukawa M, Ohta T, Xiong Y. Activation of UBC5 ubiquitin-conjugating enzyme by the RING finger of ROC1 and assembly of active ubiquitin ligases by all cullins. *J Biol Chem* 2002;277(18):15758-65.
44. Peters JM. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:759-68.
45. Carrano AC, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol* 2001;153(7):1381-90.
46. Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, Miyazono K. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 2001;12(5):1431-43.
47. Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M, Pagano M. Identification of a human family of F-box proteins. *Curr Biol* 1999;9: 1177-9.
48. Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma, L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 1996;86:263-74.
49. Patton EE, Willems AR, Tyers M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Gen* 1998;14:236-43.

50. Jackson P, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 2000;10: 429-39.
51. Yogosawa S, Makino Y, Yoshida T, Kishimoto T, Muramatsu M, Tamura T. Molecular cloning of a novel 120-kDa TBP-interacting protein. *Biochem Biophys Res* 1996;229:612-7.
52. Liu J, Furukawa M, Matsumoto T, Xiong, X. NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120 (CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding SCF ligases. *Mol Cell* 2002;10:1511-8.
53. Zheng J, Yang X, Harrell JM, Ryshikov S, Shim EH, Lykke-Andersen K, Wei N, Sun H, Kobayashi R, Zhang H. CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell* 2002;10:1519-26.
54. Min KW, Hwang JW, Lee JS, Park Y, Tamura TA, Yoon JB. TIP120A associates with cullins and modulates ubiquitin ligase activity. *J Biol Chem* 2003;278:15905-10.
55. Oshikawa K, Matsumoto M, Yada M, Kamura T, Hatakeyama S, Nakayama KI. Preferential interaction of TIP120A with Cul1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1. *Biochem Biophys Res* 2003;303:1209-16.
56. Petroski MD, Dehaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:9-20.
57. Chew E-H, Hagen T. Substrate-mediated regulation of cullin neddylation. *J Biol Chem* 2007;282(23):17032-40.

58. Cell cycle - Ubiquitin mediated proteolysis. Disponível em: www.genome.jp/kegg. Acessado em 15 de janeiro de 2008.
59. Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ, Xiong Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 1999;3(4):535-41.
60. Tan P, Fuchs SY, Chen A, Wu K, Gomez C, Ronai Z, Pan ZQ. Recruitment of ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell* 1999;3(4):527-33.
61. Seol JH, Feldmen RM, Zacharie W, Shevchenko A, Correll CC, Lyapina S, Chi Y, Galova M, Claypool J, Sandmeyer S, Nasmyth K, Deshaies RJ, Schevchenko A, Deshaies RJ. Cdc53/cullin and essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define an ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes & Dev* 1999;13:1614-26.
62. Chen A, Wu K, Fuchs SY, Tan P, Gomez C, Pan Z. The conserved RING-H2 finger of ROC1 is required for ubiquitin ligation. *J Biol Chem* 2000;275(20):15432-9.
63. Périn J-P, Seddiqi N, Charbonnier F, Goudou D, Belkadi L, Rieger F, Alliel PM. Genomic organization and expression of the ubiquitin-proteasome complex-associated protein Rbx1/ROC1/Hrt1. *Cell Mol Biol* 1999;45(8):1131-7.
64. Sasagawa Y, Urano T, Kohara Y, Takahashi H, Higashitani A. *Caenorhabditis elegans* RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes Cells* 2003;8(11):857-72.

65. Skowyra D, Koepp DM, Kamura T, Conrad MN, Conaway MC, Conaway JW, Elledge SJ, Harper JW. Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCF^{GRR1} and Rbx1. *Science* 1999;284:662-5.
66. Yu ZK, Gervais, GL, Zhang H. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21 (CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95(19):11324-9.

Objetivos

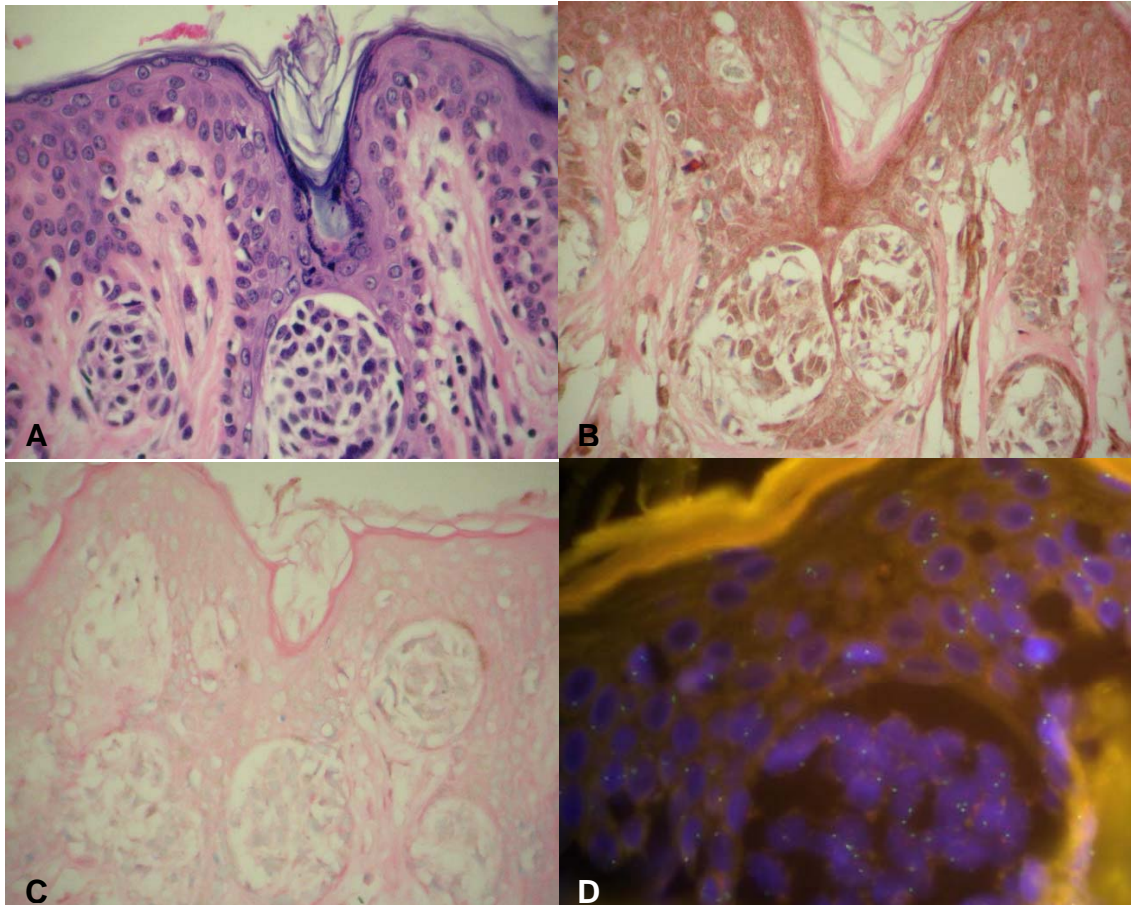
Objetivo geral

Avaliar a relação entre a expressão da proteína ROC1 e a expressão da proteína ciclina D1 em melanomas cutâneos.

Objetivos específicos

- Avaliar a expressão da proteína ROC1 nos melanomas cutâneos e nevos melanocíticos.
- Comparar a relação entre a expressão das proteínas ROC1 e ciclina D1 nos melanomas cutâneos e nevos melanocíticos.
- Comparar a relação entre a amplificação do gene *CCND1* e a expressão das proteínas ROC1 e ciclina D1 nos melanomas cutâneos e nevos melanocíticos.

Figuras



Capa – Caso 5.58 – Nevo melanocítico. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 entre 51 a 75% das células (imunomarcacão com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 em menos de 25% das células (imunomarcacão com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Área com número normal de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

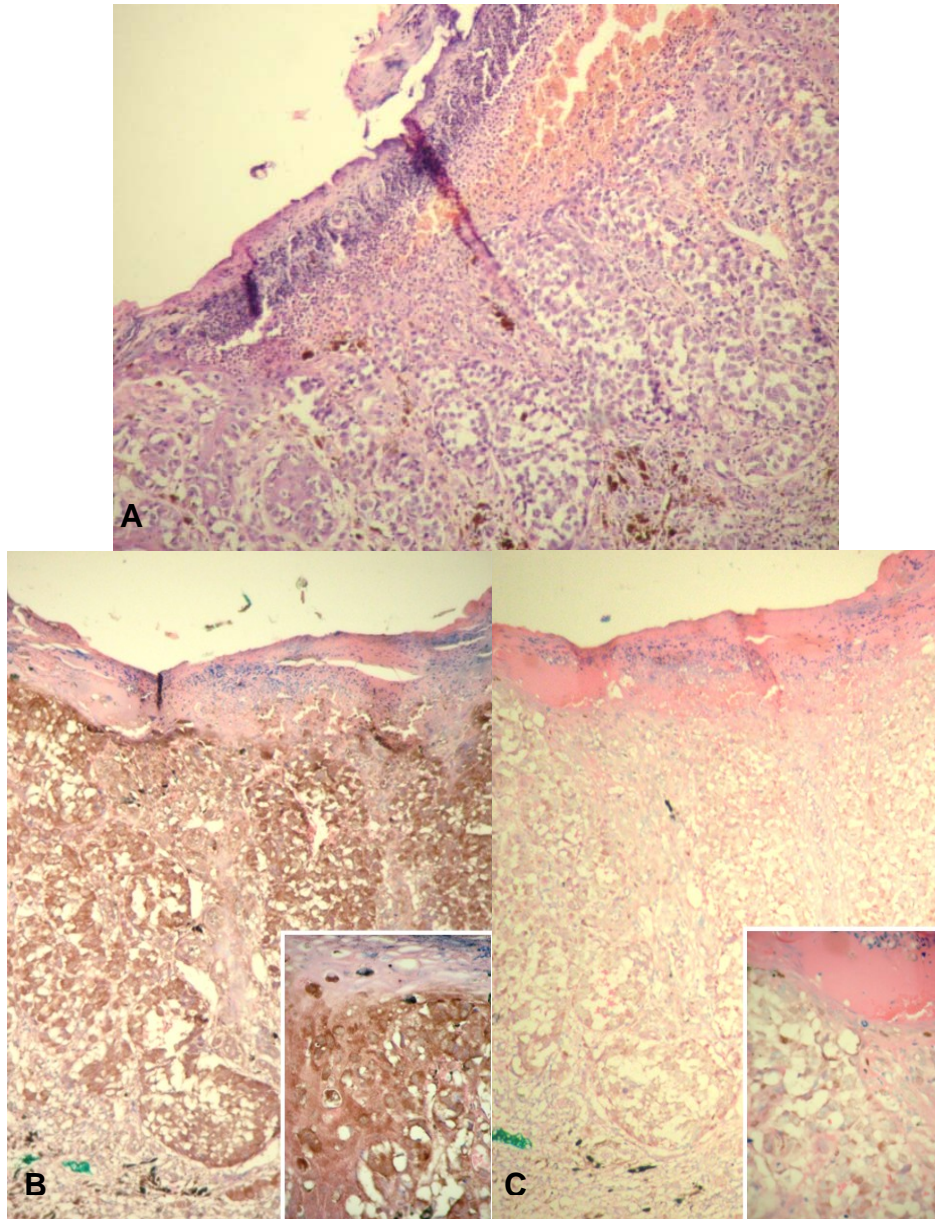


Figura 1 – Caso 2.14 – Melanoma extensivo superficial. A – Hematoxilina-eosina. B – Expressão de proteína ROC1 em mais de 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION). C – Expressão da proteína ciclina D1 em menos de 25% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB). Aumento de 100x.

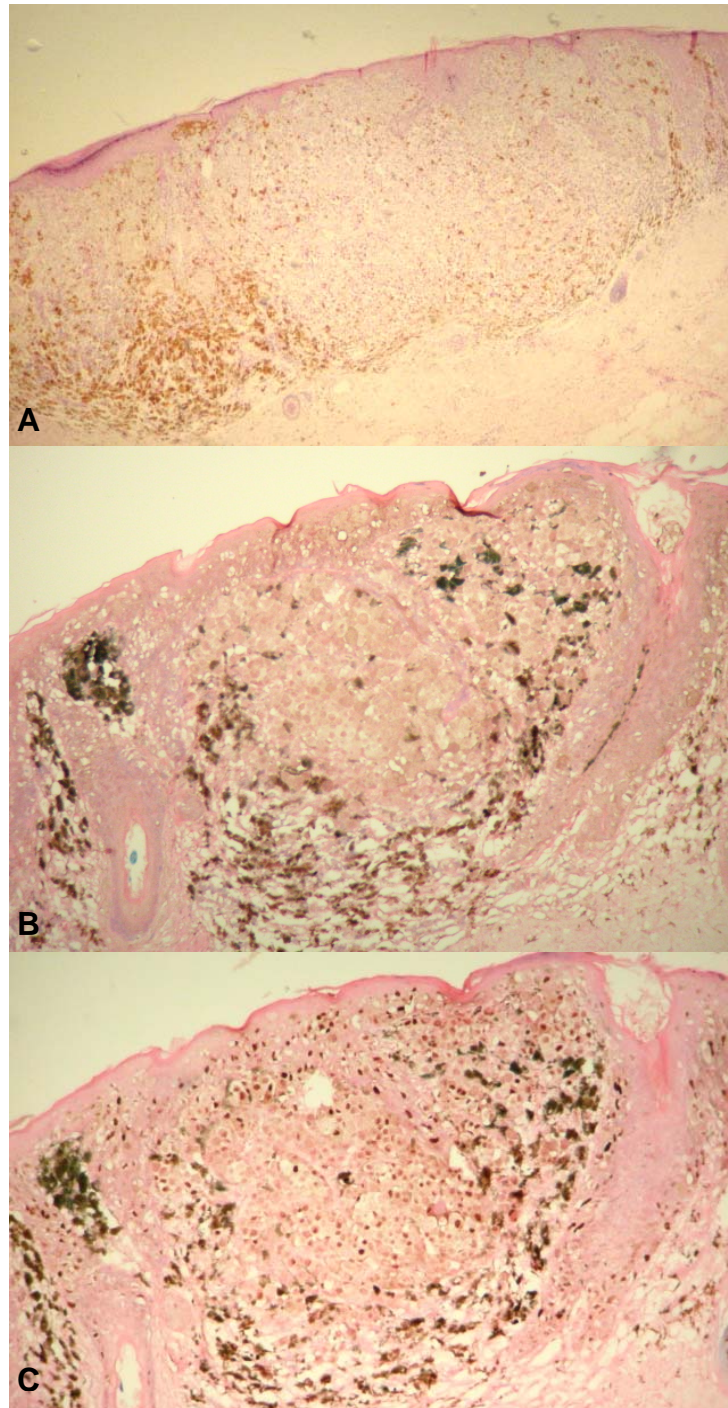


Figura 2 – Caso 2.7 – Lentigo maligno melanoma. A – Hematoxilina-eosina (Aumento de 40x). B – Expressão de proteína ROC1 em menos de 25% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION). Aumento de 100x. C – Expressão da proteína ciclina D1 em mais de 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB). Aumento de 100x.

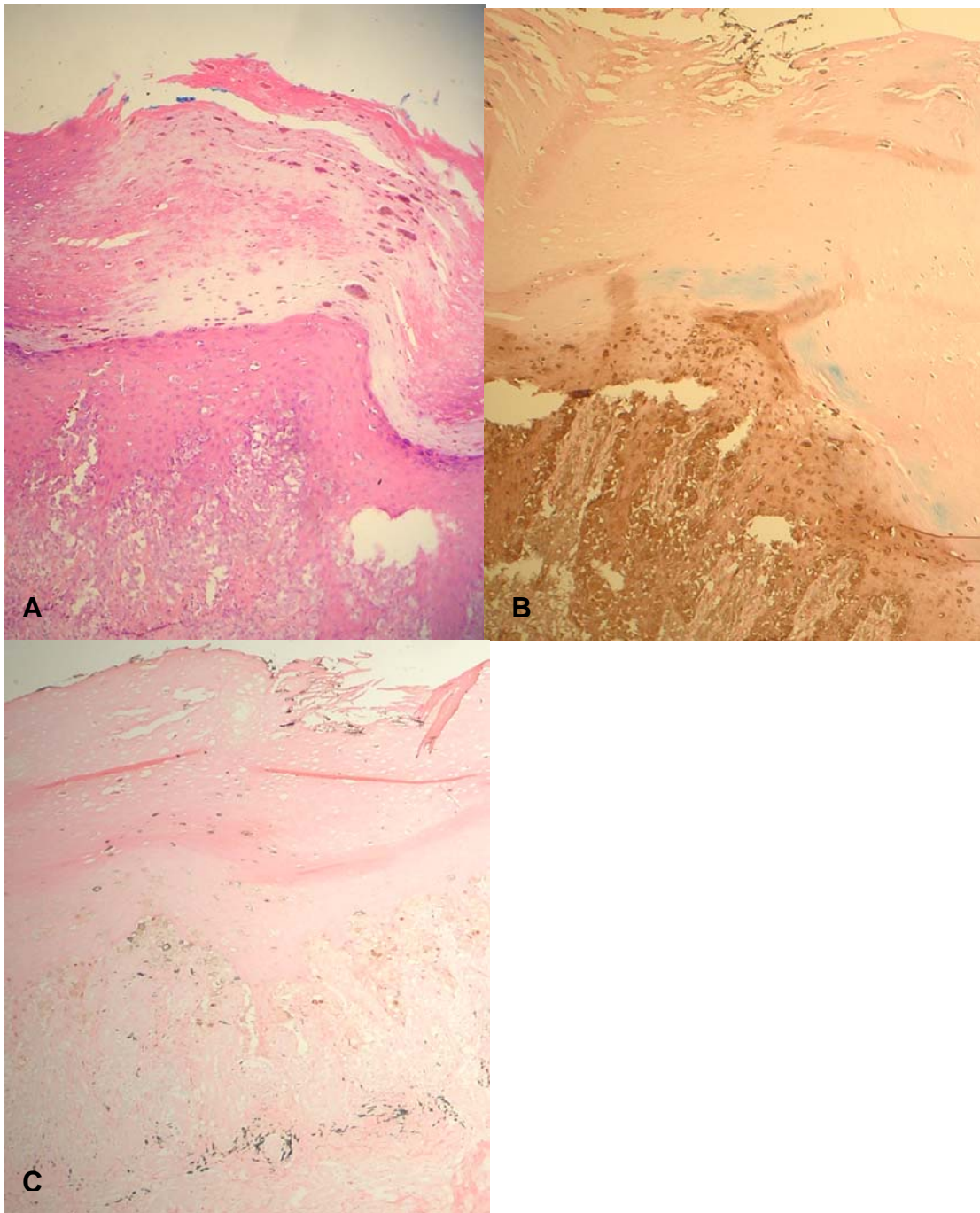


Figura 3 – Caso 1.14 – Melanoma acral lentiginoso – A – Hematoxilina-eosina. B – Expressão de proteína ROC1 em mais de 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION). C – Expressão de ciclina D1 em menos de 25% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB). Aumento de 100x.

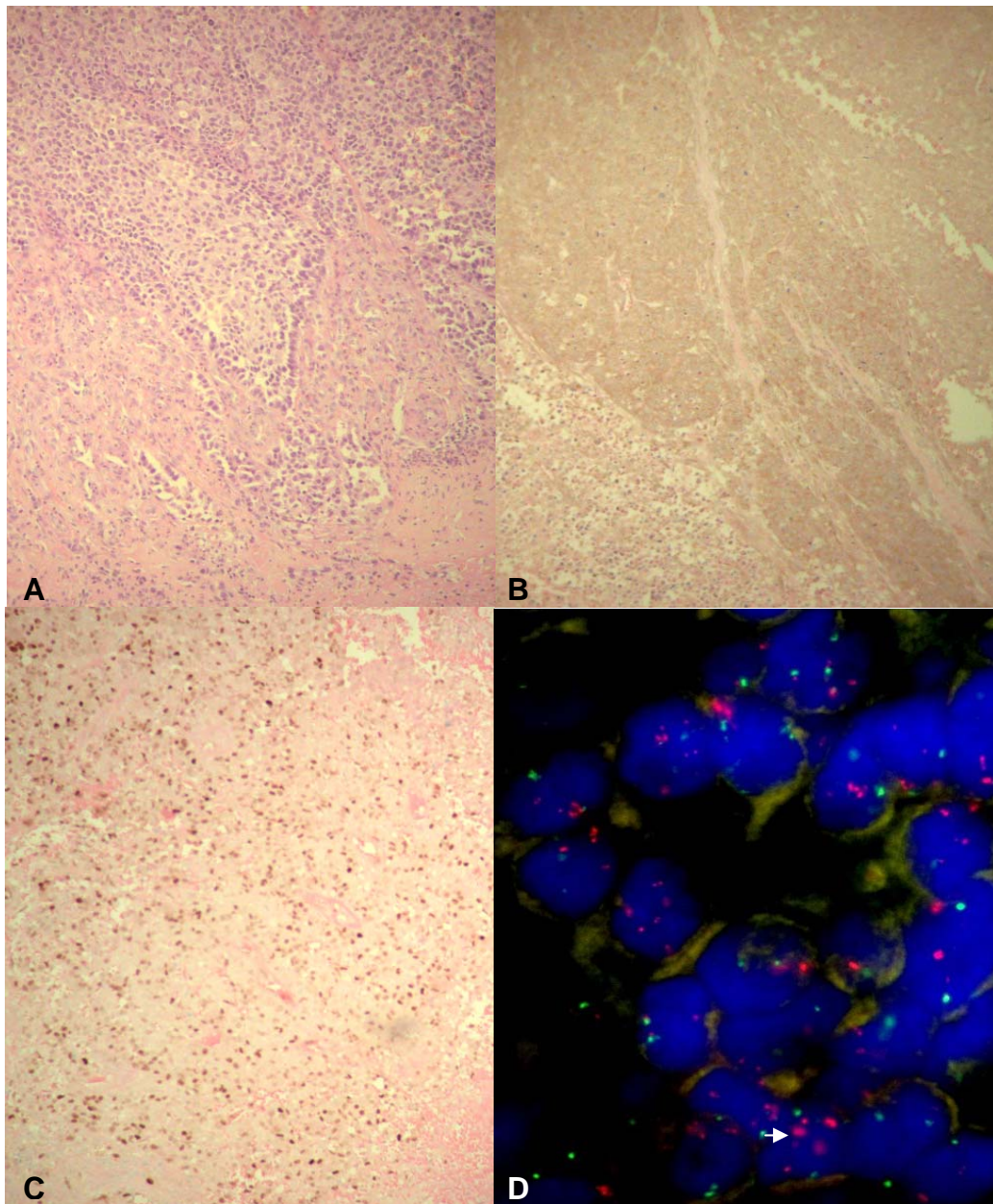


Figura 4 – Caso 4.16 – melanoma acral lentiginoso. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 em menos de 25% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 entre 51 a 75% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Aumento do número de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

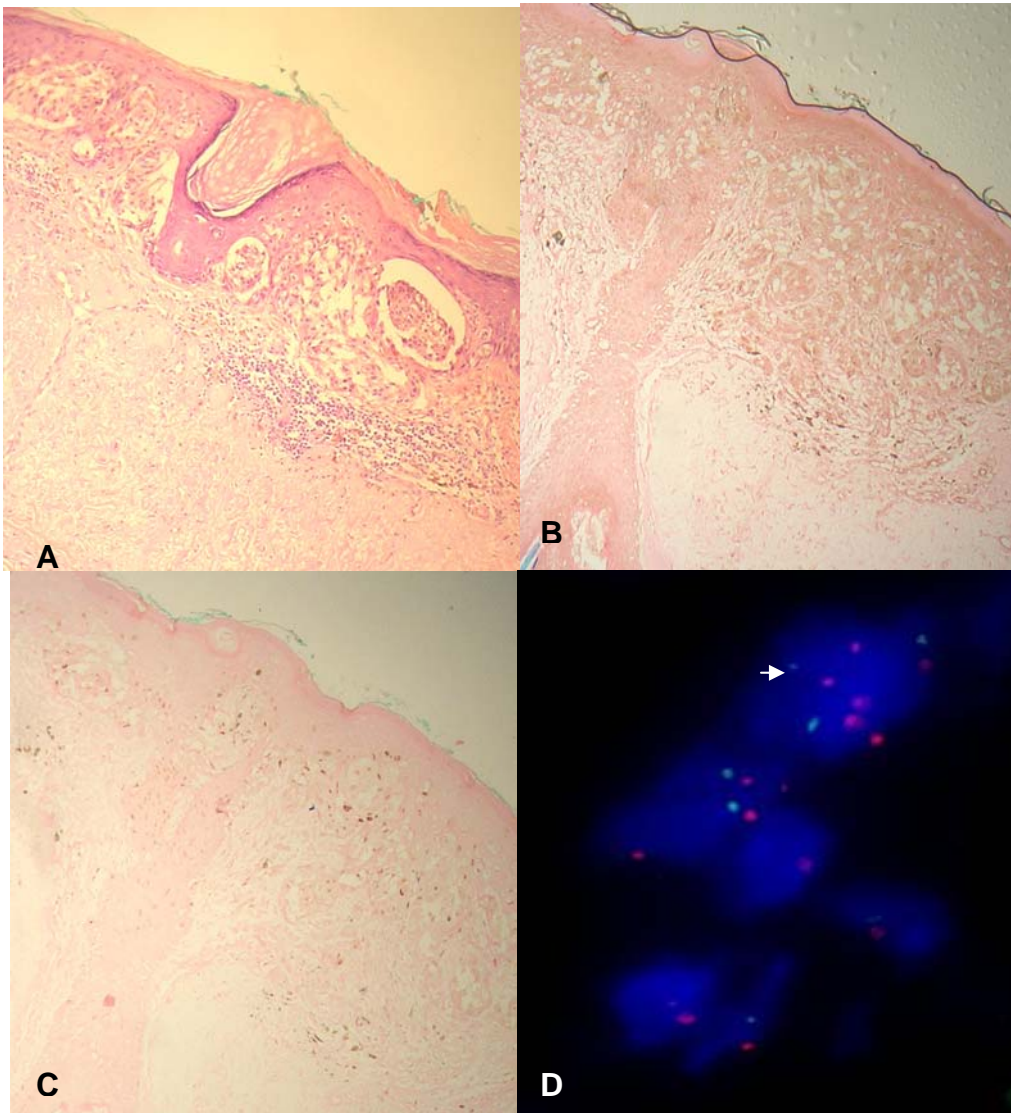


Figura 5 – Caso 1.7 – Melanoma extensivo superficial. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 entre 51 a 75% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 em menos de 25% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Área com aumento do número de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

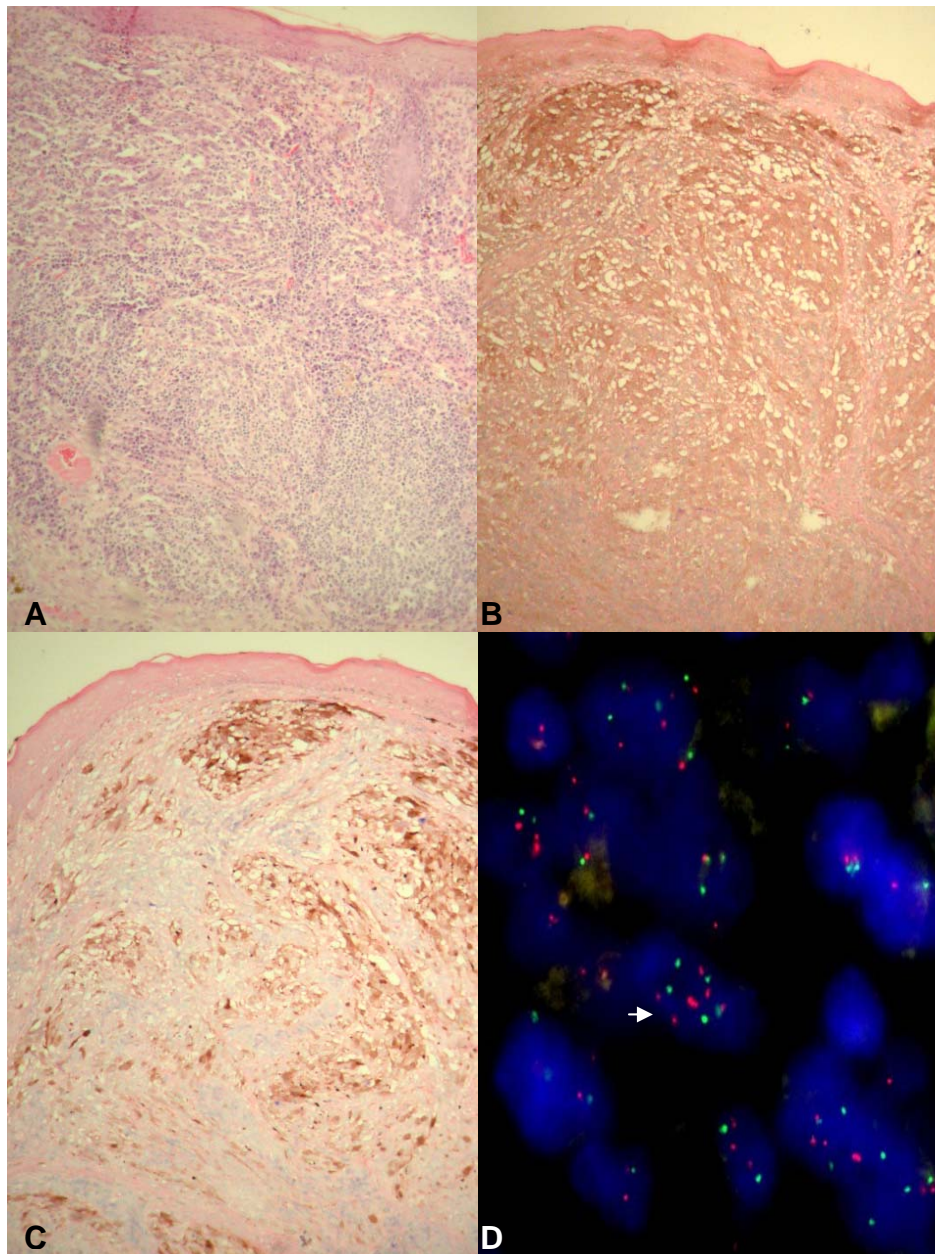


Figura 6 – Caso 2.8 – Lentigo maligno melanoma. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 entre 51 a 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 entre 51 a 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Área com aumento do número de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

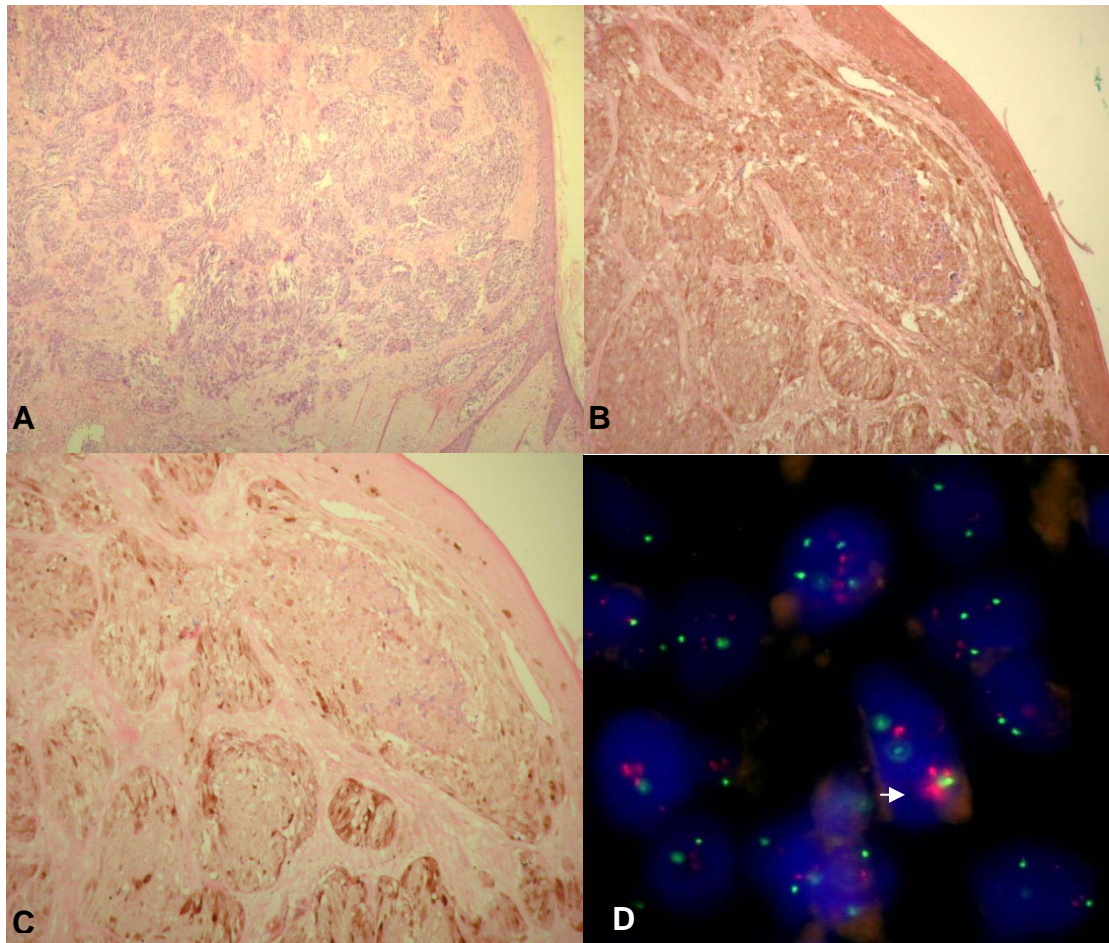


Figura 7 – Caso 3.11 – Melanoma extensivo superficial. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 40x). B - Expressão de proteína ROC1 em mais de 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 entre 51 a 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Área com aumento do número de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

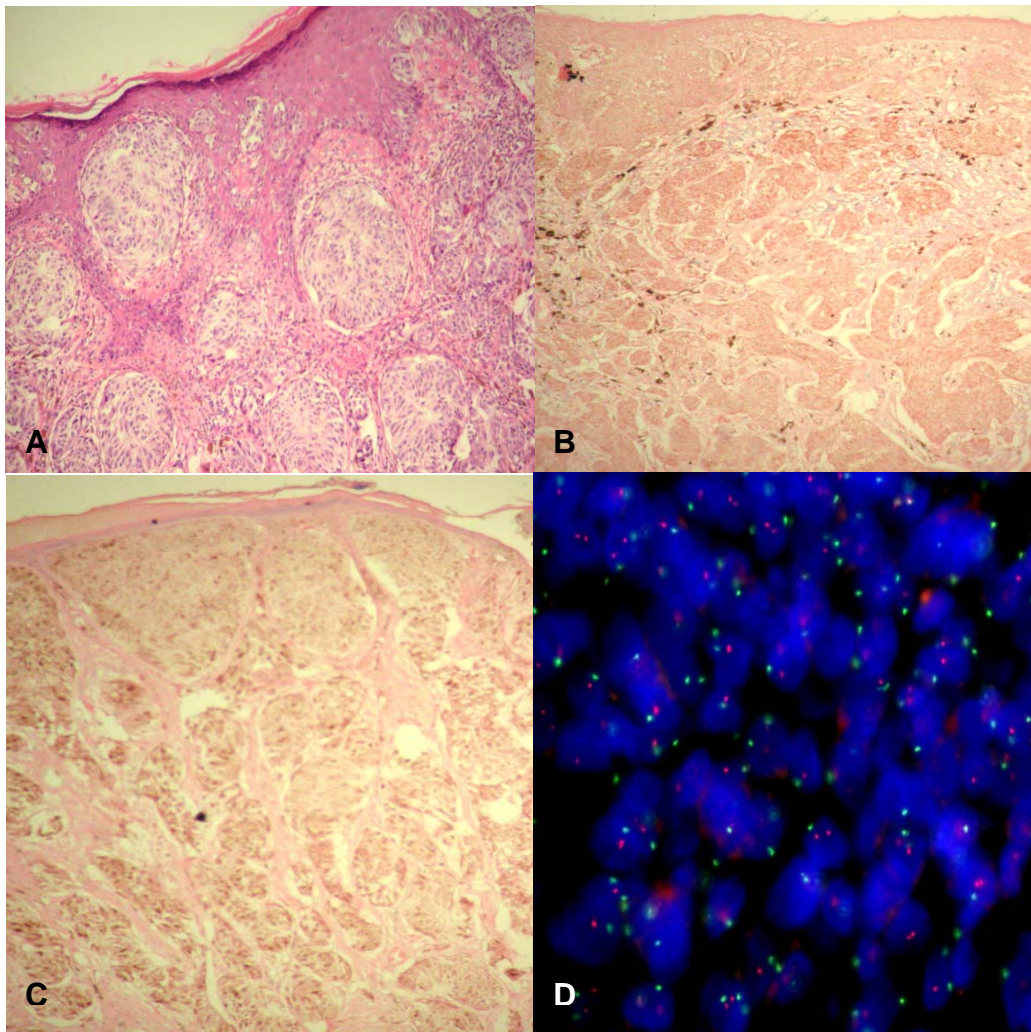


Figura 8 – Caso 4.6 – Melanoma extensivo superficial. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 em mais de 75% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 em mais de 75% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Número normal de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

Manuscrito 1

Original Article

ROC1 Protein, Cell Cycle and Cancer

Gisele Alborghetti Nai; MD¹ Mariangela Esther Alencar Marques²

Pathology Department, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Pathology Department, Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP).

Abstract

Enhanced proliferation and increased survival are important characteristics of neoplastic cells. Ubiquitination and subsequent degradation by regulatory proteasome's enzymes controls several biological processes, including entry into the cell cycle, transcription and signal transduction. The proteolysis of many regulatory proteins in G1 phase is mediated by the ubiquitin-ligase complex SFC (SKP1-CUL1(CDC53)-F-box) which is composed by four major subunits (Skp1, Cul1, Rbx1/ROC1) and of many F-box proteins. The ROC1 proteins are RING finger proteins from ubiquitin-ligase E3 family. They function as a central component in the ubiquitination pathway, not only participating in the transference of ubiquitin-conjugating enzyme E2, but also being responsible for the reaction specificity. Mutations in one amino acid in ROC1 protein domain are able to completely inactivate ubiquitin-ligase activity, which suggests that this domain is essential for this activity, and consequently essential for control of cell cycle proteins. Therefore, mutations can cause loss in control of cell cycle regulation, which leads to enhanced proliferation and increased survival of neoplastic cell.

Keywords: Neoplams. Cell Cycle. ROC1 Protein. Ubiquitin.

Introduction

Cell proliferation regulation is the key event in normal development, in the responses to cell aggression and in tumorigenesis. Cells orderly progression of the cells through cell cycle regulation depends on the balance between the concentrations of activated cyclin and Cyclin-dependent kinases.¹

Both genic amplification and the increase of proteic stability of cell cycle regulatory proteins may cause the latter's superexpression in tissues² and both mechanisms have been associated with oncogenesis in different types of human cancers.³

Degradation of cell cycle G1 phase regulatory proteins is as important for the end of mitosis as is their synthesis for the beginning of mitosis. Many of these proteins are destroyed quickly by proteolysis in the transition metaphase-anaphase. This process requires a sequence-sign in the polypeptidic chain of the protein to be destroyed, making it to degrade by supplying

ubiquitin a ligation site.² Thus, these proteins proteic stability is normally regulated by ubiquitin-dependent proteolysis.³

Ubiquitin-Mediated Proteolysis

Most proteins degraded in cytosol are transferred to great protein complexes called proteasomes, which are present in many copies in the entire cell. Each proteasome consists of a central cylinder, formed by multiple different proteases in its inner surface and great

Correspondence

Gisele Alborghetti Nai

Laboratório de Anatomia Patológica – UNOESTE

Rua José Bongiovani, 700

19050680 Presidente Prudente, Brazil

Fone: 55 18 32291059 Fax 55 18 32291194

E-mail: patologia@unoeste.br

protein-blocking complexes in the outer. Proteasomes act on proteins targeted to destruction by a covalent link of a small protein called ubiquitin.²

Ubiquitin-dependent proteolysis and subsequent degradation by regulatory enzymes' proteasome control proteic stability and has an important role in the regulation of several biological processes, including entry into the cell cycle, transcription and signal transduction.⁴⁻⁸

Different ubiquitin-dependent proteolytic pathways use enzymes conjugated to different ubiquitins, which are structurally similar, associated to subunits of recognition of proteins targeted by a particular sign of degradation. The enzyme that, when conjugated, adds ubiquitin to a residue of lysine of a target-protein, and subsequently, adds a series of additional ubiquitins, forming a polyubiquitin chain that is recognized by a specific receptor protein in proteasomes.^{2,9} Polyubiquitin chains are linked covalently to the target-protein through a cascade of three enzymes: ubiquitin-activating enzymes (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2) and ubiquitin-protein ligases (E3). Acting in the last stage of cascades, ubiquitin-protein ligases (E3) work as a central component of ubiquitination pathways, catalyzing the final transfer of ubiquitin from E2 to the substrate, and governing the specificity and the time of the modified reaction (Figure 1).^{4,5,7-10}

Ring Proteins

The interaction of E2 and E3 proteins is done by proteic fragments called RING proteins, evolutionarily conserved structures found in more than 200 proteins, in which loops of two amino acids, are pulled together at their base by eight cysteines or histidine residues that bind to two zinc ions. Many RING proteins participate

in ubiquitination and are essential for ubiquitin-ligase activity.¹²

There are many RING proteins in all eukaryotes and more than 350 in human genome. Both the length and sequence of cysteines and histones vary significantly in the different RING proteins. Depending on the arrangement of cysteine and histidine residues, RING proteins may be classified in three subclasses: C3H2C3 (or RING-2), C3HC4 (or RING-HC) and less frequently C2H2C4.¹³

The SCF Complex

SCF protein (SKP1-CUL1(CDC53)-F-box) and Anaphase Promoter Complex (APC) are the two major ubiquitin-ligase complexes, regulating ubiquitin-mediated proteolysis during G1/S phase and anaphase, and they contain the small RING ROC1 and APC11 proteins, respectively.^{3,14-16} SFC ubiquitin-ligase complex is composed by four major subunits, Skp1, Cul1, Rbx1/ROC1 and one of the many F-box proteins (Figure 2).¹⁴

SCF ubiquitin-ligase proteins include a member of the family of F-box proteins (so called because cyclin F was one of the first proteins in which this fragment was identified), which serve to recognize and to recruit target-proteins.¹⁷ F-box proteins bind to the module CUL1/ROC1 by the adapter protein Skp1 (S-phase kinase associated protein-1).^{10,18-19} The cullins (CUL) are a family of evolutionarily conserved proteins that assemble a large family of cullin-dependent E3 ligases (CDL). All cullins have a carboxyl-terminal domain of about 100 amino acids, which binds to the small RING ROC1 and APC11 proteins.^{4,20}

Cand1 protein controls SFC complex formation, inhibiting it, preventing Skp1 and of F-box proteins

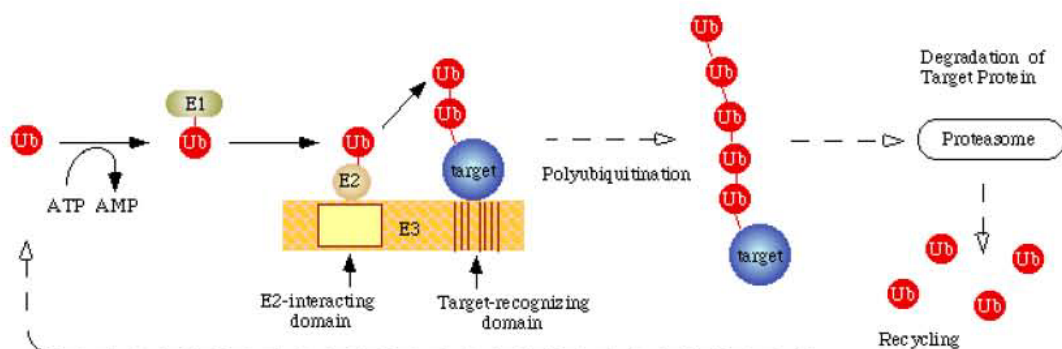


Figure 1 – Ubiquitin-mediated proteolysis (Source: www.genome.jp/kegg¹¹)

*target: target-protein to be degraded.

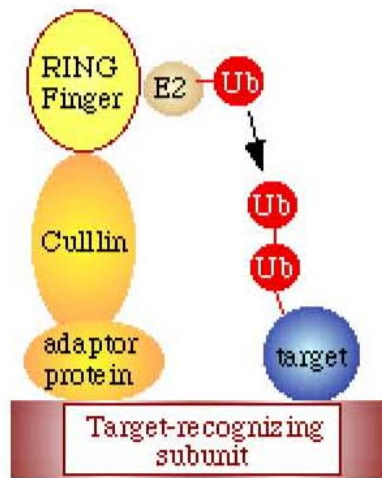


Figure 2 – Scheme of SCF complex targeting protein for proteolysis (Source: www.genome.jp/kegg¹¹)

*target-recognizing subunit: F-box protein; adaptor protein: Skp1 protein; RING finger: ROC1 protein; target: target-protein to be degraded.

access of the to CUL1-ROC1 fraction, thus avoiding ubiquitination of F-box proteins. Cand1 binds to CUL1-ROC1 fraction and it inhibits the access to E3 complex.^{5,21-27}

ROC1 Protein

ROC1 RING protein (RING of Cullins), also called Rbx1 and Hrt1, is quite stable, being an essential subunit of ubiquitin-ligase SCF protein.^{3,13} It belongs to the C3H2C3 (or RING-2) subclass of RING proteins. It was first isolated in levedures²⁸ and purified biochemically as a common component of SCF complex of humans and levedures^{6,29-30} as well as of von Hippel-Lindau tumor-suppressor complex (CBCVHL or Cul2-Elongin BC-VHL).^{10,31}

ROC1 protein is encoded by human gene Rbx1, composed of five exons, located in chromosome 22q 13.³² Mutations in only one amino acid in ROC1 protein domain are able to completely inactivate ubiquitin-ligase activity.^{3,13,28,33} It is a mediator of proteic substrates degradation required for cell cycle progression, signal transduction and tumor-suppressing activities.³¹ In contrast to APC11 protein that only interacts with cullin/APC2 protein, ROC1 interacts to cullin (CUL

1, CUL2, CUL3, CUL4A and CUL4B, and functions as an adapter of ubiquitin-conjugating enzyme E2, amplifying its role in ubiquitination.^{6,13,28-29,31,34} ROC1 has two domains, a C-Terminal able to activate UBC5-E2 and a N-Terminal that interacts to CUL1, which by its turn will ligate to an E2.¹³

ROC1 Protein And Cell Cycle Proteins

NF-kappa B (NF-kB) transcription factor activation has an anti-apoptotic role in the response to cell damage. Stimuli that normally activate NF-kB pathway include Interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF) - α , lipopolysaccharides, hypoxia/reoxygenation³⁵ and the apoptosis-inducing ligand related to tumor necrosis factor (TRAIL).³⁶ This requires phosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of the NF-kappa B inhibitor, I kappa B alpha (I κ B).³⁵⁻³⁷ Phosphorylated I κ B may be recognized by F-box^{HOs} protein³⁸⁻⁴⁰ and is flagged to degradation by the proteasome, which recruits for this SCFHOS-ROC1 ubiquitin ligase E3.^{4,28-29,38,41}

Cytokines of transforming growth factor (TGF)- β family are multifunctional proteins that regulate growth, differentiation, apoptosis and morphogenesis of several cell types. TGF- β antagonizes mitogenic activity of many other growth factors interfering with cell cycle progression.¹ Smads are the central mediators of TGF- β family.¹⁵ TGF- β family is regulated by ubiquitin-mediated degradation. Both Smad concentration in non-stimulated cells and Smad protein levels after TGF- β pathway activation are controlled by ubiquitination. Ubiquitin-ligase E3 associated to Smad degradation are Smad ubiquitination-related factor 1 (Smurf1), Smurf2, Smurf3 and the SCF/ROC1 complex.^{15,43-44} Abnormalities in ubiquitin-ligase E3 that control TGF- β family components may cause the development and progression of several cancer types.⁴⁴

Cyclin D1 decodes the regulating subunit of a holoenzyme, which phosphorylates and inactivates retinoblastoma protein (pRB), promoting progression to cell cycle G1/S phase.¹ Cyclin D1 exaggerated amplification or expression has an important role in tumorigenesis⁴⁵ in several human cancers, including breast cancer, lymphomas, melanomas and colorectal cancer.⁴⁶ Studies have shown the role of SCF-ROC1 protein in cyclins D1, D2 and D3 in humans, proving the important role this protein has in cyclin-proteolysis regulation.^{3,46-47}

The entry of cells in phase S of cell cycle depends on the degradation of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, p27 protein, at the end of phase G1 through ubiquitination pathway, which demands first its phosphorylation and subsequent recognition by SKp2 protein and SCF-ROC1 complex, for it to be degraded.⁴⁹⁻⁵³ Decrease of p27 due to the increase of its degradation is correlated to more aggressiveness and poor prognosis in human epithelial tumors and lymphomas.^{14,54-55} The weakening of the interaction of histones and DNA, which makes possible the recruitment of repair proteins, facilitates DNA damage repair. Biochemical studies indicate that CUL4-DDB-ROC1-mediated histone ubiquitination weakens the interaction of histones and DNA.⁵⁶

DNA synthesis depends on prereplicating complex, which has an essential component CDT1 (Cdc10-dependent transcript 1). The increase of CDT1 expression is associated to replication induction and polyploidie.⁵⁷ CDT1 is degraded by ubiquitin-dependent proteasomal pathway during cell cycle S phase. In mammals, CDT-1 degradation induced by DNA damage is catalyzed by CUL4-DDB1-ROC1 ubiquitin E3 ligase.⁵⁸⁻⁶¹ CDT1 levels fall immediately after gamma or ultraviolet (UV) irradiation and the interaction between CDT1 and CUL4-DDB1-ROC1 is in part regulated by gamma irradiation.⁶² CDT1 constitutive expression is associated to the development of a subgroup of lung non-small cell carcinoma in humans, indicating the critical importance of CDT1 levels to the beginning of DNA replication and maintenance of genome integrity.⁶³

p53 protein has a role in inhibiting cell proliferation and apoptosis triggering. It obstructs neoplastic transformation using three mechanisms: activating cell cycle temporary interruption, inducing cell cycle permanent interruption or promoting apoptosis. Aggressions to genome cause an increase of p53 levels, which combines with transcription factors for preventing the cell from entering in the S phase and allowing repairing of DNA damage and the reestablishment of genome integrity. If DNA alterations exceed repairing capacity, p53 protein unleashes cell death by apoptosis.⁶⁴ One of the first references to ubiquitin-mediated p53 protein proteolysis was done in a study of the way human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 protein E6 inactivates p53. Cell protein E6-AP, an ubiquitin-ligase E3, interacts with protein E6 of HPV, forming the E6/E6-AP complex, which ligates and flags p53 protein for ubiquitin-mediated proteolysis. Many

evidences suggest that this activity has an important role in the HPV-associated carcinogenesis.⁶⁵ Protein E1B-55K of adenovirus type 5 neutralizes in the first phase of infection p53 protein activity, which may adversely affect viral replication or promote host cell apoptosis.⁶⁶⁻⁶⁷ One of the mechanisms by which protein E1B-55K neutralizes p53 protein is acting with protein E4-orf6 for stimulating p53 degradation by proteasomes.⁶⁶⁻⁶⁷ It was shown that cellular factors, including CUL7, CUL5, Elongin B, Elongin C and ROC1 protein interact with E1B-55K and E4-orf6 and cause p53 ubiquitination and promote their degrading.⁶⁶⁻⁶⁸

The Detection of ROC1 Protein in Tissues

ROC1 protein can be detected by using epitope-specific rabbit polyclonal antibody for ROC1. It is a synthetic peptide derived from the C-Terminal portion of human ROC1 protein that may be used to Western Blot, immunoprecipitation, ELISA and immunohistochemistry in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues.⁶⁹

In immunohistochemical assays, ROC1 protein has a nuclear staining and the squamous epithelium of tonsil, and HeLa cells can be used as positive controls for reactions.⁶⁹ (Figure 3)

General Comments

ROC1 RING protein has a critical role in ubiquitination and is thus vital for controlling proteins involved in cell cycle. Mutations in the gene that encodes ROC1 may cause loss of control of cell cycle regulation, favoring tumor cells quick proliferation and increasing their survival. Studies on the possible role of this protein in the origin of human cancers are still necessary, principally in cases where there is cell cycle proteins overexpression without alteration of genic expression.

Acknowledgement

To MedGen Comércio e Importação Ltda. for supplying ROC1 antibody aliquots for test.

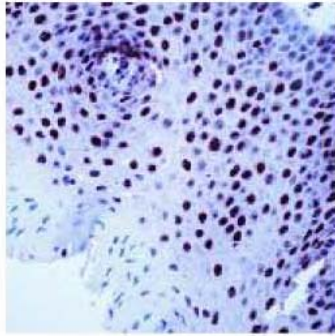


Figure 3 - Nuclear immunostaining with ROC1 antibody in squamous epithelium of tonsil (Source: www.labvision.com)²⁰

Financial Support

GA Nai is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (grant 07/53269-6).

References

- Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001;54(3):229-35.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 4ª ed. Porto Alegre: ArtMed Editora; 2004.
- Maeda I, Ohta T, Koizumi H, Fukuda M. In vitro ubiquitination of cyclin D1 by ROC1-CUL-1 and ROC1-CUL-3. *FEBS letters* 2001;494:181-5.
- Deshaines RJ, SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:435-67.
- Goldenberg SJ, Cascio TC, Shumway SD, Garbutt KC, Liu J, Xiong Y, Zheng N. Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell* 2004;119(4):517-28.
- Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowryra D, Moreland RJ, Iliopoulos O, Lane WS, Kaelin Jr WG, Elledge SJ, Conaway R.C, Harper JW, Conaway JW. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999;284:657-61.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* 2000;34(suppl):40-51.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000;22:442-51.
- Heishko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1989;67:425-7.
- Kamura T, Browe CS, Conaway R.C, Conaway JW. A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of VHL ubiquitin. *J Biol Chem* 2002;277(33):30388-93.
- Cell cycle - Ubiquitin mediated proteolysis. Available at: <http://www.genome.jp/kegg>. Accessed January 15, 2008.
- Barinaga M. A new finger on the protein destruction button. *Science* 1999;286(5438):223-5.
- Furukawa M, Ohta T, Xiong Y. Activation of UBC5 ubiquitin-conjugating enzyme by the RING finger of ROC1 and assembly of active ubiquitin ligases by all cullins. *J Biol Chem* 2002;277(18):15758-65.
- Carrano AC, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol* 2001;153(7):1381-90.
- Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, Miyazono K. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 2001;12(5):1431-43.
- Peters JM. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:759-68.
- Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M, Pagano M. Identification of a human family of F-box proteins. *Curr Biol* 1999;9:1177-9.
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 1996;86:2630-74.
- Patton EE, Willems AR, Tyers M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Gen* 1998;14:236-43.
- Jackson P, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 2000;10: 429-39.
- Min KW, Hwang JW, Lee JS, Park Y, Tamura TA, Yoon JB. TIP120A associates with cullins and modulates ubiquitin ligase activity. *J Biol Chem* 2003;278:15905-10.
- Liu J, Furukawa M, Matsumoto M, Tsiong X. NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120 (CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding SCF ligases. *Mol Cell* 2002;10:1511-8.
- Oshikawa K, Matsumoto M, Yada M, Kamura T, Hatakeyama S, Nakayama KI. Preferential interaction of TIP120A with Cull1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1. *Biochem Biophys Res* 2003;303:1209-16.
- Yogozawa S, Makino Y, Yoshida T, Kishimoto T, Muramatsu M, Tamura T. Molecular cloning of a novel 120-kDa TBP-interacting protein. *Biochem Biophys Res* 1996;229:612-7.
- Zheng J, Yang X, Harrell JM, Ryschikov S, Shim EH, Lykke-Anderesen K, Wei N, Sun H, Kobayashi R, Zhang H. CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell* 2002;10:1519-26.
- Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:9-20.
- Chew E-H, Hagen T. Substrate-mediated regulation of cullin neddylation. *J Biol Chem* 2007;282(23):17032-40.
- Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ, Xiong Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 1999;3(4):535-41.
- Tan F, Fuchs SY, Chen A, Wu K, Gomez C, Ronai Z, Pan ZQ. Recruitment of ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell* 1999;3(4):527-33.
- Seol JH, Feldmen RM, Zacharie W, Shevchenko A, Correll CC, Lyapina S, Chi Y, Galova M, Claypool J, Sandmeyer S, Nasmyth K, Deshaies RJ, Schevchenko A, Deshaies RJ. Cdc53/cullin and essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define an ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes & Dev* 1999;13:1614-26.
- Chen A, Wu K, Fuchs SY, Tan F, Gomez C, Pan Z. The conserved RING-H2 finger of ROC1 is required for ubiquitin ligation. *J Biol Chem* 2000;275(20): 15432-39.
- Périn J-P, Seddiqi N, Charbonnier F, Goudou D, Belkadi L, Rieger F, Alliel PM. Genomic organization and expression of the ubiquitin-proteasome complex-associated protein Rbx1/ROC1/Hrt1. *Cell Mol Biol* 1999;45(8):1131-7.
- Sasagawa Y, Urano T, Kohara Y, Takahashi H, Higashitani A. *Caenorhabditis elegans* REX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes*

ROC1 Protein, Cell Cycle and Cancer

- Cells 2003;8(11):857-72.
34. Skowrya D, Koepf DM, Kamura T, Conrad MN, Conaway MC, Conaway JW, Elledge SJ, Harper JW. Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGR1 and Rbx1. *Science* 1999;284:662-5.
 35. Fan C, Yang J, Engelhardt JF. Temporal pattern of NF- κ B activation influences apoptotic cell fate in a stimuli-dependent fashion. *J Cell Sci* 2002;115:4843-53.
 36. Kim S, Choi K, Kwon D, Benveniste EN, Choi C. Ubiquitin-proteasome pathway as a primary defender against TRAIL-mediated cell death. *CMLS* 2004;61:1075-81.
 37. Schweitzer K, Bozko PM, Dubiel W, Naumann M. CNS controls NF- κ B by deubiquitinylation of I κ B α . *EMBO J* 2007;26:1532-41.
 38. Spiegelman VS, Tang W, Chan AM, Igarashi M, Aaronson SA, Sassoon DA, Katoh M, Slaga TJ, Fuchs SY. Induction of homolog of slimb ubiquitin ligase receptor by mitogen signaling. *J Biol Chem* 2002;277(39):36624-30.
 39. Fuchs SY, Chen A, Xiong Y, Pan ZQ, Ronai Z. HOS, a human homolog of Slimb, forms an SCF complex with Skp1 and Cullin1 and targets the phosphorylation-dependent degradation of I κ B α and beta-catenin. *Oncogene* 1999;18(12):2039-46.
 40. Suzuki H, Chiba T, Kobayashi M, Takeuchi M, Suzuki T, Ichiyama A, Ikenoue T, Omata M, Furuichi K, Tanaka K. I κ B α ubiquitination is catalyzed by a SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins, betaTrCP1 and betaTrCP2. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256(1):127-32.
 41. Wu K, Fuchs SY, Chen A, Tan P, Gomez C, Ronai Z, Pan Z-Q. The SCFHOS/ β -TRCP-ROC1 E3 ubiquitin ligase utilizes two distinct domains within CUL1 for substrate targeting and ubiquitin ligation. *Mol Cell Biol* 2000;20(4):1382-93.
 42. Seo N, Tokura Y, Takigawa M, Egawa K. Depletion of IL-10 and TGF- β -producing regulatory γ 8T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. *Immunology* 1999;163:242-9.
 43. Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGF β signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* 2004;23(11):2071-8.
 44. Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci* 2008;99(11):2107-12.
 45. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell R.G. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;45(12):5439-47.
 46. Sauter RE, Yeo U, Von Steinn A, Zhu A, Litwin S, Tichansky DS, Pistrutto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer research* 2002;26:3200-6.
 47. Thompson MA, Hendley J, Trute L, Armes J, Germain D. Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* 1999;18:1983-91.
 48. Yu ZK, Gervais GL, Zhang H. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21 (CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95(19):11324-9.
 49. Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. Skp2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the Cdk-inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999;1:193-9.
 50. Ganoth D, Borntein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Hershko A. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF (Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 2001;3(3):321-4.
 51. Zhu X-H, Nguyen H, Halicka HD, Traganos F, Koff A. Noncatalytic requirement for cyclin a-cdk2 in p27 turnover. *Mol Cell Biol* 2004;24(13):6058-66.
 52. Ji P, Goldin L, Ren H, Sun D, Guardavaccaro D, Pagano M, Zhu L. Skp2 contains a novel cyclin binding domain that directly protects cyclin A from inhibition by p27Kip1. *J Biol Chem* 2006;281(333):24058-69.
 53. Ji P, Sun D, Wang H, Bauzon F, Zhu L. Disrupting Skp2-cyclin A interaction with a blocking peptide induces selective cancer cell killing. *Mol Cancer Ther* 2007;6(2):684-91.
 54. Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilkosi M, Corato P, Pizzolo G, Magidson J, Montagnoli A, Pagano M. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p 27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000;95:619-26.
 55. Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9(1):67-80.
 56. Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y. Histone H3 and H4 ubiquitinylation by CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 2006;22(3):383-94.
 57. Yanow SK, Lygerou Z, Nurse P. Expression of Cdc18/Cdc6 and Cdt1 during G2 phase induces initiation of DNA replication. *EMBO J* 2001;20:4648-56.
 58. Hu J, McCall CM, Ohta T, Xiong Y. Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2004;6(10):1003-9.
 59. Hu J, Xiong Y. An evolutionarily conserved function of proliferating cell nuclear antigen for Cdt1 degradation by Cul4-Ddb1 ubiquitin ligase response to DNA damage. *J Biol Chem* 2006;281(7):3753-6.
 60. Kim Y, Kipreos ET. Cdt1 degradation to prevent DNA re-lication: conserved and non-conserved pathways. *Cell Division* 2007;2:18. doi:10.1186/1747-1028-2-18.
 61. Alekseev S, Luijsterburg MS, Pines A, Geverts B, Mari PO, Gigli-Mari G, Lans H, Houtsmuller AB, Mullenders LH, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. Cellular concentrations of DDB2 regulate dynamic binding of DDB1 at UV-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* 2008. doi:10.1128/MCB.01108-08.
 62. Higa LAA, Mihaylov IS, Banks DP, Zheng J, Zhang H. Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat Cell Biol* 2003;5(11):1008-15.
 63. Karakaidos P, Taraviras S, Vassiliou LV, Zacharatos P, Kastrinakis NG, Kougiou D, Kouloukoussa M, Nishitani H, Papavassiliou AG, Lygerou Z, Gorgoulis VG. Overexpression of the replication licensing regulators hCdt1 and hCdc6 characterizes a subset of non-small-cell lung carcinomas: synergistic effect with mutant p53 on tumor growth and chromosomal instability--evidence of E2F-1 transcriptional control over hCdt1. *Am J Pathol* 2004;165:1351-65.
 64. Soto Martinez JL, Cabrera Morales CM, Serrano Ortega S, Lopez-Nevot MA. Mutation and homozygous deletion analyses of genes that control the G1/S transition of the cell cycle in skin melanomas: p53, p21, p16 and p15. *Clin Transl Oncol* 2005;7(4):156-64.
 65. Huijbregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *PNAS* 1995;92:2563-7.
 66. Harada JN, Shevchenko A, Shevchenko A, Pallas DC, Berk AJ. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virology* 2002;76(18):9194-206.
 67. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW, Branton PE. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a cullin-containing complex. *Gen & Dev* 2001;15:31104-17.
 68. Andrews P, He YJ, Xiong Y. Cytoplasmic localized ubiquitin ligase cullin 7 binds to p53 and promotes cell growth by antagonizing p53 function. *Oncogene* 2006;25(33):4534-48.
 69. <http://www.exactantigen.com/gene/human/RBX1-antibody.html>. Accessed November 13, 2008.
 70. ROC1. Neo Markers. Labvision Corporations. Available at: <http://www.labvision.com>. Accessed July 23, 2008.

Manuscrito 2

A PROTEÍNA ROC1 NO CONTROLE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CICLINA D1 EM MELANOMAS CUTÂNEOS. *

Gisele Alborghetti Nai, MD^{*}, Mariângela Esther Alencar Marques, MD, PhD[†].

^{*}Médica patologista, professora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Presidente Prudente da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

[†]Professora adjunta do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

Endereço para correspondência: Gisele Alborghetti Nai - Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia – UNOESTE – Rua José Bongiovani, 700 – CEP: 19050-680 – Presidente Prudente – SP - fone: (18) 3229-1059 – fax: (18) 3229-1194 – e-mail: patologia@unoeste.br.

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*O presente manuscrito é o original em português. A versão em inglês será submetida à apreciação do Corpo Editorial de The American Journal of Dermatopathology (Fator de impacto: 1.503) – ISSN: 0193-1091 / Online ISSN: 1533-0311. Este artigo está formatado segundo as normas de The American Journal of Dermatopathology.

RESUMO

O aumento da expressão de ciclina D1, demonstrado em melanomas cutâneos, provavelmente está relacionado ao potencial invasivo do tumor. A diminuição da proteína ROC1, envolvida na degradação da ciclina D1, pode constituir uma alternativa para explicar o aumento desta proteína na ausência de superexpressão gênica. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação da proteína ROC1 com a expressão de ciclina D1 em melanomas cutâneos. Foram estudados 62 casos de melanomas primários de pele e 58 nevos melanocíticos compostos. Realizou-se imuno-histoquímica com marcação para os anticorpos ciclina D1 e ROC1, e hibridação "in situ" fluorescente para avaliação da expressão do gene *CCND1*. Em 87,9% dos nevos melanocíticos, a expressão da proteína ROC1 foi evidenciada em mais de 50% das células, enquanto nos melanomas ocorreu em 45,2% dos casos ($p=0,0014$). A correlação entre a expressão da proteína ROC1 e da proteína ciclina D1 foi significativa e negativa em todos os casos estudados ($p=0,0008985$). Nos nevos melanocíticos, o aumento de expressão de ROC1 em relação à ciclina D1 ocorreu em 86,2% dos casos e nos melanomas em 45,2% ($p<0,001$). A relação ROC1/ciclina D1 não está associada à medida de Breslow ($p=0,166$), nem ao tipo histológico de melanoma ($p=0,605$). Entre os melanomas não amplificados, 50% daqueles que apresentaram expressão de ciclina D1 em mais de 50% das células mostraram expressão de proteína ROC1 em menos de 25% delas. A expressão da proteína ROC1 está correlacionada negativamente à expressão da proteína ciclina D1 nos melanomas, mostrando sua importância para degradação da ciclina D1 nestas neoplasias.

Palavras-chave: Melanoma, ciclina D1, proteína ROC1, ubiquitinação.

INTRODUÇÃO

A transformação de melanócitos em células de melanoma é caracterizada por proliferação anormal, resultante de alterações nas duas maiores vias de controle celular, a do retinoblastoma (Rb) e a do gene supressor tumoral p53¹. Quase todas as linhagens de melanomas testadas apresentaram alterações na via do Rb, por deficiência de p16 ou de pRb, por mutação de cdk4 ou por superexpressão de ciclina D1^{1,2}.

A região mais freqüentemente amplificada em todos os tipos de melanomas é do cromossomo 11q13^{3,4}, que contém o gene da ciclina D1. Embora a ciclina D1 seja um promotor de crescimento bem conhecido, ela pode também funcionar como um fator de sobrevivência para as células tumorais^{5,6}. A amplificação ou expressão exagerada da ciclina D1 é um evento crucial que leva a progressão dos melanomas⁷, e está associado a altas taxas de proliferação nestes tumores^{2,8}. Provavelmente, a falha na regulação da superexpressão de ciclina D1 nos melanócitos promova proliferação celular e previna a diferenciação².

A ciclina D1 é uma proteína nuclear codificada pelo gene *CCND1*, localizado no cromossomo 11q13. A amplificação do gene *CCND1* tem sido identificada em mais de 44% dos melanomas acrais lentiginosos, mas é menos freqüente nos outros subtipos de melanomas^{5,6}.

Todos os casos de melanomas com aumento no número de cópias do gene *CCND1* mostraram expressão exagerada de ciclina D1, porém, aproximadamente 25% dos melanomas com expressão exagerada de ciclina D1 apresentaram número normal de cópias do gene *CCND1*, sugerindo que os níveis de expressão da ciclina D1 são modulados por outros mecanismos, não

somente por cópias gênicas^{1,5,9}. Uma possibilidade para superexpressão de ciclina D1 é a falha na sua degradação, levando ao aumento de sua estabilidade. A degradação da ciclina D1 é regulada pela proteólise dependente de ubiquitina^{10,11}.

Diferentes vias proteolíticas dependentes de ubiquitina utilizam enzimas conjugadas a ubiquitinas distintas, que são estruturalmente similares, associadas com subunidades de reconhecimento das proteínas que carregam um sinal particular de degradação. A enzima que conjugada adiciona a ubiquitina a um resíduo de lisina de uma proteína-alvo, e posteriormente, adiciona uma série de ubiquitinas adicionais, formando uma cadeia multi-ubiquitinada, que seria reconhecida por uma proteína receptora específica no proteassoma^{12,13}. A cadeia multi-ubiquitinada é ligada covalentemente à proteína alvo através de cascata de três enzimas: a ubiquitina-ativadora (E1), a ubiquitina-conjugadora (E2) e uma ubiquitina-ligase (E3). Atuando no último estágio desta cascata, as ubiquitina-ligases E3 funcionam como um componente central da via de ubiquitinação, catalisando a transferência final de ubiquitina da E2 ao substrato¹³⁻¹⁷. A ligação entre as proteínas E2 e E3 é feita através de um fragmento protéico chamado proteína "RING". A proteína SCF (SKP1-CUL1(CDC53)-E-box) e o complexo promotor da anáfase (APC) são os dois maiores complexos ubiquitina-ligase que regulam proteólise mediada por ubiquitina durante G1/S e a anáfase, e contêm as proteínas "RING" ROC1 e APC11, respectivamente^{11,18-20}.

Estudos demonstraram o papel da proteína SCF-ROC1 na ubiquitinação das ciclinas D1 e também das ciclinas D2 e D3 em humanos, mostrando que essa proteína tem papel importante na regulação da proteólise das

ciclinas^{10,11,21}, porém não há trabalhos na literatura mostrando o padrão de expressão imuno-histoquímica da proteína ROC1 ou comparando a expressão desta proteína com a expressão da proteína ciclina D1 em melanomas ou em outros tumores.

Desde que, os níveis de expressão das ciclinas D estão relacionados ao potencial de malignidade e ao prognóstico dos melanomas, tentativas de entender o mecanismo que rege a superexpressão destas ciclinas é importante para o desenvolvimento de terapêuticas para melanomas que superexpressam ciclinas do tipo D.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação entre a expressão das proteínas ROC1 e ciclina D1 em melanomas cutâneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos de estudo

Realizou-se um estudo transversal e analítico no período de 1991 a 2008, onde foram selecionados 62 casos de melanomas primários de pele divididos em quatro grupos: 15 casos de melanomas até 1 mm de espessura (Grupo 1), 15 casos de melanomas entre 1 e 2 mm (Grupo 2), 15 casos de melanomas entre 2 e 4 mm (Grupo 3) e 17 casos de melanomas maiores de 4 mm (Grupo 4). Um total de 58 casos diagnosticados como nevos melanocíticos compostos foi utilizado como controle (Grupo 5). Foram excluídos os casos de melanomas originados em nevos melanocíticos e casos com regressão histológica.

Imuno-histoquímica

A coloração imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 4µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas previamente tratadas com o aderente poli-D-lisina, seguindo a técnica do ABC brevemente descrita a seguir. Primeiramente, realizou-se desparafinização em xilol seguida de hidratação em solução aquosa de álcool etílico e lavagem com água. Após o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 35% por dez minutos, os cortes histológicos foram colocados em solução de ácido cítrico a 0.001M, pH 6 e submetidos à temperatura de 121°C em ambiente de microondas por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após período de 20 minutos de resfriamento, incubaram-se os anticorpos primários ROC1 (clone RB-069-P, LABVISION) usado na diluição de 1/800 e ciclina D1 (clone RBT14, BioSB) a 1/100, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem das lâminas em solução salina tamponada, foram adicionados os reagentes secundário (Biotinilado anti-mouse Ba 2000 - Vector) e terciário (ABC PK 6100 – Vector), incubando-os por 60 e 45 minutos, respectivamente. A reação foi revelada com DAB (Sigma Co., S Louis, EUA) por cinco minutos e contra corada com Giemsa²². Como controle negativo da reação, omitiu-se a etapa do anticorpo primário, com continuação da reação de maneira idêntica em todos os demais passos do procedimento. A pele normal adjacente foi usada como controle positivo para a imunomarcagem da proteína ROC1 e tecido mamário normal foi usado para o controle da proteína ciclina D1.

Um esquema de escore semi-quantitativo foi usado para descrever a coloração imuno-histoquímica observada. Os núcleos das células são positivos ou negativos para ROC1 e ciclina D1. A porcentagem de positividade das

células tumorais coradas foi quantificada e dividida em quatro categorias: 1 (0 a 25% de células coradas), 2 (26 a 50% de células coradas), 3 (51 a 75% de células coradas) e 4 (76 a 100% de células coradas).

Para fins comparativos, estabeleceram-se as seguintes relações entre as expressões da proteína ROC1 e proteína ciclina D1 (relação ROC1/ciclina D1): 1. aumento de expressão de ROC1 em relação à ciclina D1, quando a porcentagem de células coradas para ROC1 foi maior que a porcentagem de células coradas para ciclina D1; 2. expressão proporcional de ambas as proteínas, quando a porcentagem de células coradas para ROC1 foi igual à porcentagem de células coradas para ciclina D1; 3. aumento de expressão de ciclina D1 em relação à ROC1, quando a porcentagem de células coradas para ciclina D1 foi maior que a porcentagem de células coradas para ROC1.

Hibridação "in situ" fluorescente (FISH)

Cortes de 4µm de espessura de cada bloco de parafina foram desparafinizados em xilol e posteriormente desidratados em etanol. As lâminas foram colocadas em 2xSSC durante 3 minutos, posteriormente transferidas para uma cuba com tampão citrato a 98°C durante 10 minutos e posteriormente lavadas em 2xSSC.

O processo de digestão foi realizado com solução de pepsina a 4mg/mL (Dako Corporation) a 37°C durante 5 minutos numa plataforma de controle de tempo e temperatura (Spot-Light[®] Cish[™] Hybridizer, Invitrogen). Posteriormente as lâminas foram lavadas em 2xSSC e desidratadas em série de concentração crescente de etanol.

Foram adicionados 10µl da sonda LSI[®] cyclin D1 (11q13) Probe Set (Vysis[®]) a cada lâmina, as quais foram recobertas com lamínulas e seladas

com cola e aquecidas por 5 minutos a 95°C (fase de desnaturação) e posteriormente por 16 horas a 37°C (fase de hibridação) no Spot-Light® Cish™ Hybridizer, Invitrogen.

As lâminas foram lavadas em solução de 2xSSC/0,3% Tween20 a 73°C durante 5 minutos e a temperatura ambiente por duas vezes, e montadas com meio de montagem DAPI Vectashield® (Vector) para contra-coloração dos núcleos em azul, e recobertas com lamínula.

Foram analisados 60 núcleos de cada amostra, utilizando-se o software Sistema FISHView/SPOTView (Applied Spectral Imaging, Israel) para quantificação da expressão gênica em cada núcleo e para análise da diferença de expressão gênica dentro de um mesmo tumor.

A sonda LSI® cyclin D1 (11q13) Probe Set (Vysis®) é uma sonda *dual-color* com marcação locus específica (gene *CCND1*) em vermelho e marcação do centrômero do cromossomo 11 (CEP11), onde está localizado o gene *CCND1*.

Foi considerado negativo para aumento da expressão gênica quando a relação CEP11/*CCND1* foi menor que 1,8; equívoco quando a relação CEP11/*CCND1* foi entre 1,8 e 2,2; amplificado quando a relação CEP11/*CCND1* foi maior que 2,2.

Análise Estatística

Para a detecção de diferenças na expressão das proteínas em relação à idade, sexo, local da lesão, grupo, tipo de melanoma e medida de Breslow foram feitos o teste exato de Fisher e teste do Qui-quadrado. Para avaliação da correlação entre a expressividade dos marcadores foi usado o coeficiente de correlação de Spearman. Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível

de significância de $\alpha = 0,05$.

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (OF. 79/2007-CEP).

RESULTADOS

A mediana de idade dos pacientes no grupo dos melanomas foi de 60,5 anos (23 a 89 anos) e no grupo dos nevos melanocíticos foi de 30,5 anos (4 a 71 anos).

Predominaram os melanomas do tipo extensivo superficial (41,9%) seguidos por melanomas nodulares (20,9%), lentigo maligno melanoma (19%), acral lentiginoso (16,6%) e 1 caso inclassificável.

As expressões das proteínas ROC1 e ciclina D1 não variaram segundo a idade, sexo ou local da lesão, tanto no grupo dos melanomas quanto no grupo dos nevos melanocíticos ($p > 0,05$).

A expressão da proteína ROC1 esteve associada ao tipo de neoplasia, benigna ou maligna ($p = 0,0014$), assim como a expressão da proteína ciclina D1 ($p = 0,000$). Em 62,1% dos casos ($n = 36$) de nevos melanocíticos, a proteína ROC1 apresentou expressão em mais de 75% das células e em 87,9% ($n = 51$) a expressão foi acima de 50% das células ($p < 0,05$). Em contrapartida, a proteína ciclina D1 apresentou expressão em até 25% das células na grande maioria dos casos (91,4% - $n = 53$), apenas um caso apresentou positividade entre 51 a 75% das células e nenhum apresentou positividade acima de 75% ($p < 0,05$).

Nos melanomas, a expressão da proteína ROC1 foi acima de 50% das células em 45,2% dos casos (n=28) e abaixo de 25% em 27,4% das amostras, enquanto a expressão de ciclina D1 foi abaixo de 25% das células em 45,2% (n=28) dos casos e acima de 50% em 35,5% das amostras (n=40) ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatística entre as expressões das proteínas ROC1 e ciclina D1 e o tipo histológico dos melanomas ($p > 0,05$).

Embora também não haja diferença estatística entre as expressões das proteínas ROC1 e ciclina D1 com relação à medida da espessura de Breslow ($p > 0,05$), observa-se, nos grupos 1, 3 e 4, predomínio de casos com expressão de proteína ROC1 abaixo de 25% das células (entre 33,3 e 35,3% das amostras) e no grupo 2, predomínio de casos com expressão de ROC1 acima de 75% das células (66,8%) (Figura 1). Com relação à proteína ciclina D1, houve, também, um predomínio de expressão abaixo de 25%, exceto no grupo 4 onde predominou expressão acima de 50% das células (70,6% das amostras). O grupo 2 não apresentou nenhum caso com expressão de ciclina D1 em mais de 75% das células.

Observa-se correlação significativa e negativa entre a expressão das proteínas ROC1 e ciclina D1, independente do tipo de neoplasia (benigna ou maligna) ($p = 0,0008985$). A comparação entre as expressões da proteína ROC1 e da proteína ciclina D1 nos melanomas e nevos melanocíticos estão representadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Em alguns casos de melanoma, podem ser observadas dentro do mesmo tumor áreas com expressão da proteína ROC1 em mais de 75% das células e de ciclina D1 em menos de 25% das células, adjacentes a áreas com expressão da proteína ROC1 em menos de 25% das células e de ciclina D1 em

mais de 75% das células, não associada a aumento de expressão gênica (Figura 2).

A relação ROC1/ciclina D1 não variou segundo a idade, sexo ou local da lesão, tanto nos melanomas quanto nos nevos melanocíticos ($p>0,05$). O aumento de expressão da proteína ROC1 em relação à proteína ciclina D1 predominou em todas as amostras (65% dos casos).

Os nevos melanocíticos apresentaram um predomínio marcante de aumento de expressão da proteína ROC1 em relação à proteína ciclina D1 (86,2% dos casos). Os melanomas também apresentaram predomínio de aumento de expressão da proteína ROC1 em relação à proteína ciclina D1, porém em 45,2% dos casos ($p<0,001$) (Tabela 3).

Embora, haja um predomínio de expressão proporcional de ambas as proteínas em melanomas acima de 2 mm de espessura e um grande número de casos de aumento de expressão da proteína ciclina D1 em relação à proteína ROC1 nos casos com mais de 4mm de espessura (35,3%), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,166$).

Os melanomas acrais lentiginosos foram os únicos que apresentaram grande número de casos (40%) com aumento de expressão da proteína ciclina D1 em relação à proteína ROC1; em contrapartida, também foram os que apresentaram maior número de casos com aumento de expressão da proteína ROC1 em relação à proteína ciclina D1 (50%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a relação ROC1/ciclina D1 e os tipos histológicos de melanoma ($p=0,605$).

Seis casos apresentaram amplificação do gene *CCND1* (cinco melanomas e um nevo melanocítico), sendo que quatro destes apresentaram

amplificação apenas focal. Os dois casos amplificados globalmente eram melanomas dos tipos acral lentiginoso e nodular, ambos apresentavam medida de Breslow maior que 4 mm; o melanoma acral lentiginoso expressou ciclina D1 entre 51 a 75% de suas células e nodular em mais de 75% das células e a expressão da proteína ROC1 em ambos foi em menos de 25% das células (Figura 3). Três casos amplificados focalmente eram melanomas, dois extensivos superficiais e um LMM, a medida de Breslow foi menor que 1 mm em um caso, entre 1,1 e 2 mm em outro e entre 2,1 e 4mm no terceiro caso. Destes casos com amplificação focal, dois apresentaram positividade de ciclina D1 entre 51 a 75% das células e um em menos de 25% delas, e expressão da proteína ROC1 entre 51 a 75% das células em dois casos e maior que 75% em um caso.

O quarto caso amplificado focalmente foi um nevo melanocítico, localizado na região genital, que mostrou expressão da proteína ciclina D1 entre 51 a 75% das células associada à expressão de proteína ROC1 entre 26 a 50% das células (Figura 4), o qual foi o único nevo melanocítico a apresentar aumento de expressão de ciclina D1 em relação à ROC1.

A maioria dos casos de melanomas amplificados (focal ou globalmente) apresentou expressão proporcional de ambas as proteínas (40% dos casos) e aumento de expressão de ciclina D1 em relação à ROC1 (40% das amostras). Entre os casos de melanomas não amplificados, 50% daqueles que apresentaram expressão de ciclina D1 em mais de 50% das células mostraram expressão de proteína ROC1 em menos de 25% delas (Figura 5) e 43,7% apresentaram expressão da proteína ROC1 em mais de 50% das células. A amplificação do gene *CCND1* não teve associação com a relação entre as expressões das proteínas ($p=0,500$).

DISCUSSÃO

A proteína “RING” ROC1 (RING of Cullins), também chamada Rbx1 e Hrt1, é bastante estável, sendo subunidade essencial da proteína SCF ubiquitina-ligase^{11,23}. Pertence à subclasse C3H2C3 (ou RING-2) das proteínas “RING”. Foi inicialmente isolada em leveduras²⁴ e purificada bioquimicamente como componente comum do complexo SCF de humanos e leveduras²⁵⁻²⁷, e do complexo supressor tumoral von Hippel-Lindau (CBC^{VHL} ou Cul2-Elongin BC-VHL)^{17,28,29}.

A proteína ROC1 é codificada pelo gene humano Rbx1, composto por cinco exons, localizado no cromossomo 22q 13³⁰. Mutações pontuais em apenas um aminoácido no domínio da proteína ROC1 são capazes de inativar completamente a atividade da ubiquitina-ligase^{11,23,24,31}. É um mediador da degradação de substratos protéicos requeridos para progressão do ciclo celular, transdução de sinal, para execução de atividades supressoras tumorais²⁸ e tem papel importante na marcação da ciclina D1 para que esta seja reconhecida pelo proteassoma e assim degradada^{10,11,21}.

Neste estudo, a expressão da proteína ROC1 está relacionada ao tipo de neoplasia (benigna ou maligna). A maioria dos nevos melanocíticos apresentou expressão da proteína ROC1 em mais de 50% das células e em apenas um caso expressão em menos de 25% das células, enquanto os melanomas apresentaram grande número de casos com expressão de ROC1 em menos de 25% das células, mostrando uma deficiência desta proteína em melanomas. Porém, não se observou relação entre a expressão da proteína ROC1 e a medida da espessura de Breslow ou com o tipo histológico de melanoma. A expressão da proteína ciclina D1 também esteve relacionada ao

tipo de neoplasia. Nos casos de melanomas, a expressão desta proteína não esteve associada à medida da espessura de Breslow nem ao tipo histológico destes tumores.

Embora, não se tenha detectado correlação significativa entre a medida da espessura de Breslow e a expressão das proteínas ROC1 e ciclina D1, foi observado predomínio de maior expressão da proteína ROC1 em melanomas entre 1,01 e 2mm de espessura e de proteína ciclina D1 em melanomas maiores que 4mm. Melanomas com medida de Breslow entre 1,01 e 2mm são aqueles onde se pode observar início da fase vertical de crescimento da neoplasia; o aumento de ROC1 em tumores com esta espessura pode ser justificado como uma tentativa do hospedeiro em conter a progressão da lesão. Da mesma forma, maior expressão de ciclina D1 em melanomas acima de 4mm de espessura pode ser interpretada como indicativo de proliferação descontrolada dos tumores mais espessos em franca fase tumorigênica.

Observou-se correlação significativa e negativa entre a expressão de ambas as proteínas nos casos estudados. Quando a expressão de uma das proteínas está aumentada a da outra está diminuída e vice-versa. Este fato fica evidente, quando observamos em alguns melanomas áreas com grande expressão da proteína ROC1 e baixa de ciclina D1 ao lado de áreas com grande expressão de ciclina D1 e baixa de ROC1, evidenciando a presença de diferentes clones celulares nestas lesões, conforme observado na microscopia óptica.

Amplificação do gene *CCND1* em nevos melanocíticos é rara, assim como o aumento de expressão de ciclina D1^{2,32}. De forma inusitada, um caso de nevo melanocítico deste estudo, mostrou amplificação focal do gene

CCND1 e apresentou a maior expressão de ciclina D1 entre todos os casos de nevos melanocíticos (entre 51 a 75% das células marcadas), associada à expressão diminuída de ROC1 (entre 26 a 50% das células marcadas). Trata-se de um nevo melanocítico da região genital, em paciente feminino, de 20 anos de idade. As particularidades observadas foram atividade juncional e celularidade intensas e áreas com células morfológicamente distintas, contíguas umas as outras, à semelhança de clones. A interpretação de um caso isolado é difícil, porém uma possibilidade para explicar a diminuição parcial de ROC1 seria o consumo desta proteína para degradação da ciclina D1 aumentada numa lesão em fase proliferativa.

Neste estudo, os dois melanomas amplificados globalmente mostraram expressão de ciclina D1 em mais de 50% das células e expressão de proteína ROC1 em menos de 25% delas. A maior diminuição de expressão de proteína ROC1 nos melanomas amplificados em comparação ao nevo amplificado, sugere uma deficiência desta proteína nos melanomas e não apenas consumo para marcação da ciclina aumentada. Esta hipótese é corroborada pelo fato dos melanomas amplificados focalmente não apresentarem diminuição importante da proteína ROC1 mesmo em face do aumento da proteína ciclina D1, e de casos não amplificados que apresentaram aumento de expressão de ciclina D1 e diminuição significativa de ROC1.

A relação ROC1/ciclina D1 está associada ao tipo de neoplasia. Os nevos melanocíticos apresentam predomínio de aumento da expressão da proteína ROC1 em relação à proteína ciclina D1 (86,2% dos casos), enquanto os melanomas apresentam aumento de ROC1 em relação à ciclina D1 em 45,2% dos casos. O único caso de nevo melanocítico que mostrou aumento da

expressão de ciclina D1 em relação à ROC1, apresentava amplificação focal do gene *CCND1*, diferente dos melanomas que na maioria dos casos de aumento de ciclina D1 em relação à ROC1 não apresentava amplificação gênica (85,7%). Este fato e a ausência de associação entre a relação ROC1/ciclina D1 e amplificação gênica, observada neste estudo, suportam a idéia da deficiência de ROC1 nos melanomas como parte dos fenômenos responsáveis pelo aumento da ciclina D1.

A amplificação do gene *CCND1* é mais comum nos melanomas acrais lentiginosos seguidos pelos melanomas extensivos superficiais. Nos primeiros, a amplificação pode aparecer precocemente, antes mesmo da fase “in situ” da neoplasia, diferente dos outros tipos de melanoma que apresentam amplificação mais tardiamente, durante sua progressão^{6,9}. Neste estudo, porém, mesmo os melanomas acrais lentiginosos apresentando o maior número proporcional de casos de aumento de ciclina D1 em relação à ROC1 (40%), a relação ROC1/ciclina D1 não esteve associada ao tipo histológico de melanoma, bem como não esteve associada à medida da espessura de Breslow. Tal fato mostra que a alteração na expressão da proteína ROC1 pode ser evento da oncogenese de melanomas não relacionado ao tipo histológico. Mesmo não ocorrendo correlação entre a relação ROC1/ciclina D1 e a medida de Breslow, o grande número de casos com aumento de expressão da proteína ROC1 em relação à ciclina D1, entre os melanomas com medidas menores que 2mm de espessura, pode mostrar uma fase onde a resposta do hospedeiro ainda é eficaz na tentativa de conter a progressão tumoral.

Dos 20 casos de melanomas com expressão proporcional de ambas as proteínas (32,3%), apenas dois apresentaram amplificação focal do gene

CCND1. Entre os casos de nevos melanocíticos, seis tinham expressão proporcional de ambas as proteínas (10,3%) e nenhum destes apresentou amplificação gênica. Os nevos melanocíticos com relação proporcional e não amplificados apresentaram expressão de ciclina D1 em menos de 25% das células e na maioria dos casos expressão de ROC1 entre 26 a 50% das células, diferente dos melanomas que em apenas cinco casos apresentaram expressão de ciclina D1 em menos de 25% das células e em seis casos apresentaram expressão de ciclina D1 em mais de 50% das células associada à expressão de ROC1 também em mais de 50% das células. Este dado mostra que nos nevos melanocíticos, embora em alguns casos haja diminuição da expressão de ROC1, não há alteração da expressão de ciclina D1, possivelmente por haver um predomínio de controle gênico da expressão de ciclina D1. Nos melanomas, o mecanismo regulador da expressão de ciclina D1 pode ser outro além do aumento da expressão gênica e da falha de ubiquitinação, podendo envolver deficiência de outras proteínas envolvidas na ubiquitinação das ciclinas, como as cullins.

CONCLUSÕES

A maioria dos nevos melanocíticos expressa proteína ROC1 em mais de 75% das células, e a deficiência de sua expressão está associada aos melanomas cutâneos.

A expressão da proteína ROC1 está correlacionada negativamente à expressão da proteína ciclina D1 nos melanomas cutâneos, mostrando sua importância para degradação da ciclina D1 nestes tumores.

A relação de expressão ROC1/ciclina D1 está associada ao tipo de

neoplasia, predominando nos nevos melanocíticos o aumento de expressão da proteína ROC1 em relação à proteína ciclina D1 e nos melanomas cerca de um quarto dos casos apresentam aumento de expressão da proteína ciclina D1 em relação à proteína ROC1.

Tanto a expressão da proteína ROC1 quanto à relação entre as expressões das proteínas ROC1 e ciclina D1 não estão associadas à medida da espessura de Breslow ou ao tipo histológico de melanoma, porém estudos com um maior número de casos, de melanomas com espessura entre 1,01 e 2mm e de melanomas acrais lentiginosos, serão importantes para interpretar corretamente a eventual associação com estes parâmetros.

Estudos dirigidos para melhor compreensão das causas da diminuição da expressão da proteína ROC1 em melanomas cutâneos, que podem ser responsáveis pelo aumento de expressão de ciclina D1, contribuirão para pesquisas de novas terapêuticas para estes tumores.

AGRADECIMENTOS

A MedGen Comércio e Importação Ltda. por ceder as alíquotas do anticorpo anti-proteína ROC1 para teste, e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (Processo n° 07/53269-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li W, Sanki A, Karim RZ, et al. The role of regulatory proteins in pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38(4):287-301.

2. Stefanaki C, Stefanaki K, Antoniou C, et al. G1 cell cycle regulators in congenital melanocytic nevi. Comparasion with acquired nevi and melanomas. *J Cutan Pathol* 2008; doi: 10.1111/j.1600-0560.2007.00912.x.
3. Bastian BC, Leboit PE, Hamm H, et al. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998;58:2170-5.
4. Bastian BC, Olshen AB, Leboit PE, Pinkel D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number. *Am J Pathol* 2003;63(5):1765-70.
5. Sauter RE, Yeo U, Von Stemm A, et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer research* 2002;26:3200-6.
6. Yamamura M, Takata M, Miyasaki A, et al. Specific dermoscopy patterns and amplifications of the cyclin D1 gene to define histopathologically unrecognizable early lesions of acral melanoma in situ. *Arch Dermatol* 2005;141:1413-8.
7. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353(20):2135-47.
8. Lebe B, Pabuççuoğlu U, Ozer, E. The significance of ki-67 proliferative index and cyclin D1 expression of dysplastic nevi in the biologic spectrum of melanocytic lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15(2):160-4.
9. Bastian BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene* 2003;22:3081-6.
10. Russell A, Thompson MA, Hendley J, et al. Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* 1999;18:1983-91.

11. Maeda I, Ohta T, Koizumi H, Fukuda M. In vitro ubiquitination of cyclin D1 by ROC1-CUL-1 and ROC1-CUL-3. *FEBS letters* 2001;494:181-5.
12. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell*. London: Garland Science Publishing; 2004.
13. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1989;67:425-7.
14. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem* 2000; 34(suppl):40-51.
15. Ciechanover A, Orian A, Schwartz, AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000;22:442-51.
16. Deshaines RJ. SCF and cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:435-67.
17. Kamura T, Browe CS, Conaway RC, Conaway JW. A molecular basis for stabilization of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor protein by components of VHL ubiquitin. *J Biol Chem* 2002;277(33):30388-93.
18. Carrano, AC, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol* 2001;153(7):1381-90.
19. Fukushi M, Imamura T, Chiba T, et al. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 2001;12(5):1431-43.
20. Peters JM. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:759-68.

21. Yu ZK, Gervais, GL, Zhang H. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21 (CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95(19):11324-9.
22. Sálvio AG, Marques MEA. Imuno-histoquímica para a identificação de células neoplásicas no infiltrado ativo de melanomas finos. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42(2):143-8.
23. Furukawa M, Ohta T, Xiong Y. Activation of UBC5 ubiquitin-conjugating enzyme by the RING finger of ROC1 and assembly of active ubiquitin ligases by all cullins. *J Biol Chem* 2002;277(18):15758-65.
24. Ohta T, Michel JJ, Schottelius AJ, Xiong Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 1999;3(4):535-41.
25. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, et al. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999;284:657-61.
26. Seol JH, Feldmen RM, Zacharie W, et al. Cdc53/cullin and essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define an ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes & Dev* 1999;13:1614-26.
27. Tan P, Fuchs SY, Chen A, et al. Recruitment of ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell* 1999;3(4):527-33.
28. Chen A, Wu K, Fuchs SY, et al. The conserved RING-H2 finger of ROC1 is required for ubiquitin ligation. *J Biol Chem* 2000;275(20):15432-9.
29. Nai GA, Marques MEA. ROC1 protein, cell cycle and cancer. *Applied Cancer Res*, 2008;28(2):42-7.

30. Périn J-P, Seddiqi N, Charbonnier F, et al. Genomic organization and expression of the ubiquitin-proteasome complex-associated protein Rbx1/ROC1/Hrt1. *Cell Mol Biol* 1999;45(8):1131-7.
31. Sasagawa Y, Urano T, Kohara Y, et al. *Caenorhabditis elegans* RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes Cells* 2003;8(11):857-72.
32. Carlson JA, Ross JS, Slominski AJ. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clinics in Dermatology* 2009; 27:75–102.

TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as expressões de proteína ROC1 e de proteína ciclina D1 nos melanomas (n=62).

		Expressão da proteína ciclina D1			
		De 0 a 25% (%)	De 26 a 50% (%)	De 51 a 75% (%)	Acima de 75% (%)
Expressão da proteína ROC1	De 0 a 25%	4/17 (23,5%)	2/17 (11,7%)	7/17 (58,7%)	4/17 (23,5%)
	De 26 a 50%	2/5 (40%)	2/5 (40%)	0/5	1/5 (20%)
	De 51 a 75%	5/12 (41,6%)	3/12 (25%)	3/12 (25%)	1/12 (8,4%)
	Acima de 75%	17/28 (60,7%)	5/28 (17,9%)	3/28 (10,7%)	3/28 (10,7%)
Total (%)		28/62 (45,2%)	12/62 (19,3%)	13/62 (21%)	9/62 (14,5%)

p=0,008.

Tabela 2 – Comparação entre as expressões de proteína ROC1 e de proteína ciclina D1 nos nevos melanocíticos (n=58).

		Expressão da proteína ciclina D1			
		De 0 a 25% (%)	De 26 a 50% (%)	De 51 a 75% (%)	Acima de 75% (%)
Expressão da proteína ROC1	De 0 a 25%	1/1 (100%)	0/1	0/1	0/1
	De 26 a 50%	5/6 (83,3%)	0/6	1/6 (16,7%)	0/6
	De 51 a 75%	14/15 (93,3%)	1/15 (6,7%)	0/15	0/15
	Acima de 75%	33/36 (91,6%)	3/36 (8,4%)	0/36	0/36
Total (%)		53/58 (91,4%)	4/58 (6,9%)	1/58 (1,7%)	0/58

p<0,05.

Tabela 3 – Relação entre as expressões de proteína ROC1 e de proteína ciclina D1 e o tipo neoplasia (n=120).

	Relação ROC1/ciclina D1		
	Aumento de expressão de ROC1 em relação à ciclina D1 (%)	Expressão proporcional de ambas as proteínas (%)	Aumento de expressão de ciclina D1 em relação à ROC1 (%)
Nevo melanocítico	50/58 (86,2%)	7/58 (12,1%)	1/58 (1,7%)
Melanoma	28/62 (45,2%)	20/62 (32,3%)	14/62 (22,6%)
Total (%)	78/120 (65,0%)	27/120 (22,5%)	15/120 (12,5%)

p<0,001

FIGURAS

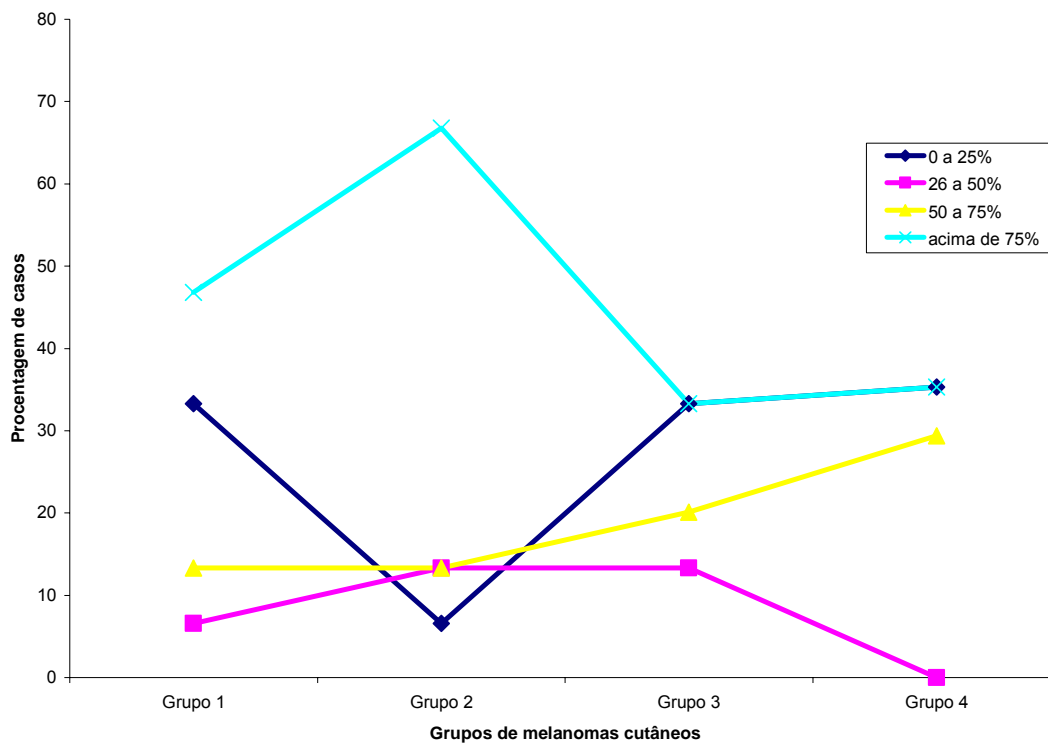


Figura 1 - Expressão da proteína ROC1 nos melanomas, divididos segundo a medida da espessura de Breslow (n=62). $p > 0,05$.

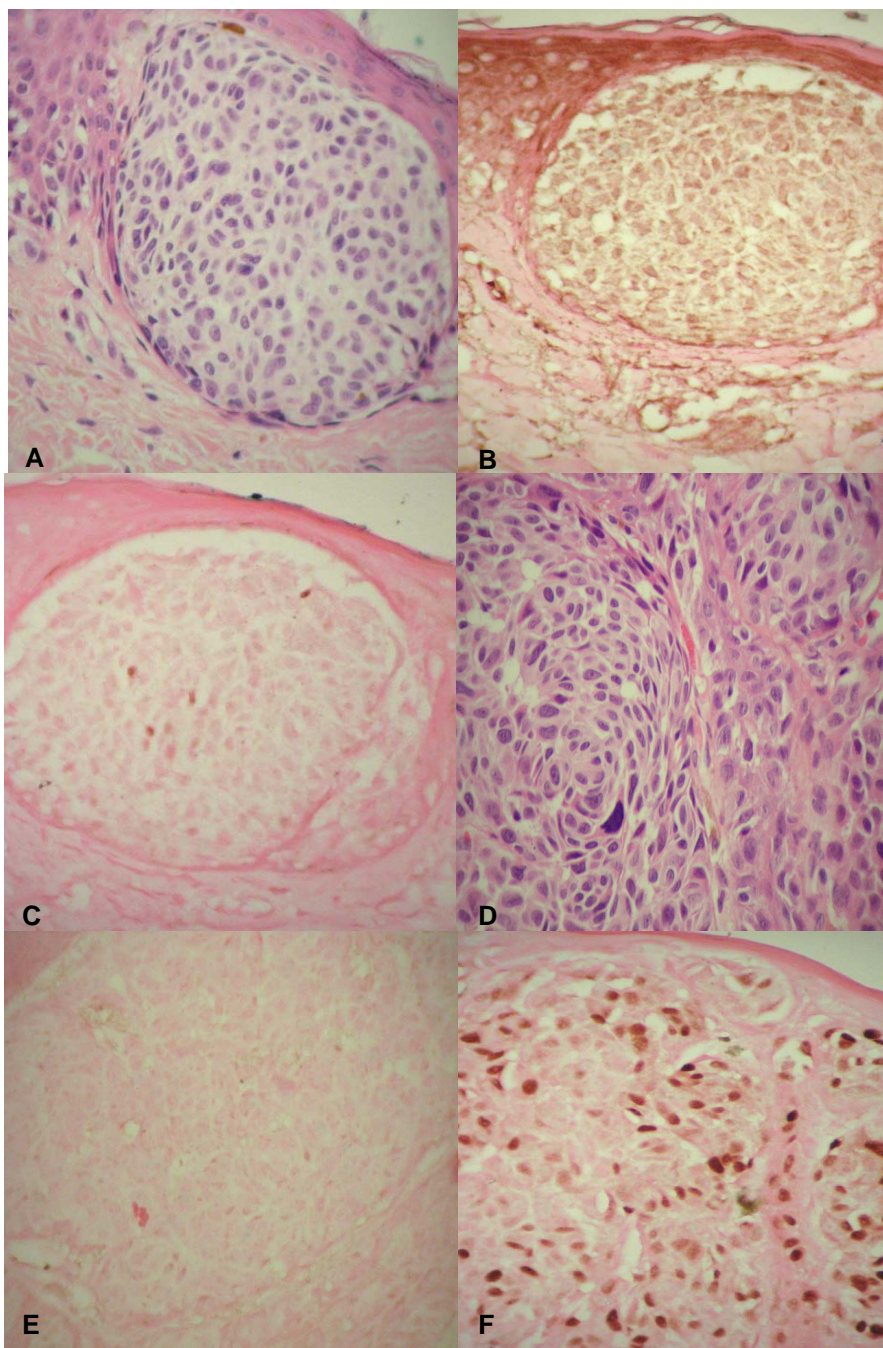


Figura 2 – Caso 1.13 - Melanoma extensivo superficial – A – Área 1 (Hematoxilina-eosina). B – Área 1 - expressão de proteína ROC1 em mais de 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION). C – Área 1 - expressão de ciclina D1 em menos de 25% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB). D – Área 2 (Hematoxilina-eosina). E – Área 2 - expressão de proteína ROC1 em menos de 25% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION). F – Área 2 - expressão de ciclina D1 em mais de 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB). Aumento de 400x.

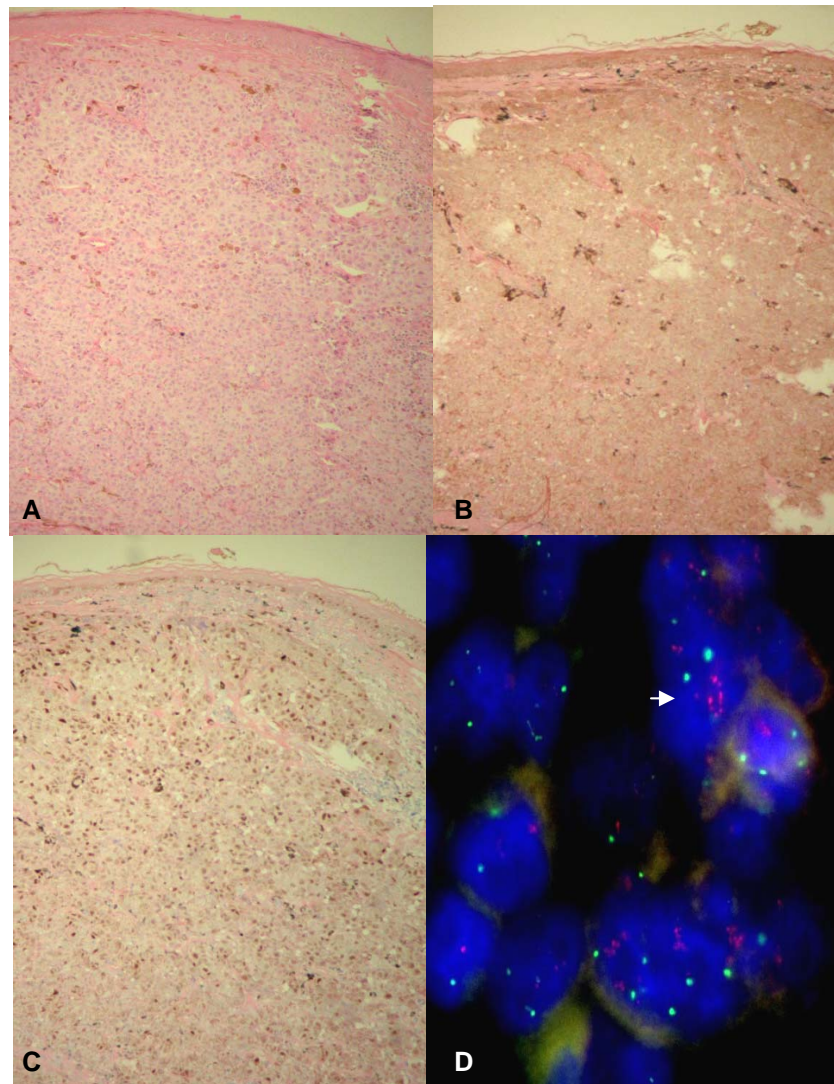


Figura 3 – Caso 4.4 – Melanoma nodular. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 em menos de 25% das células (imunomarcacão com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 acima de 75% das células (imunomarcacão com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Aumento do número de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

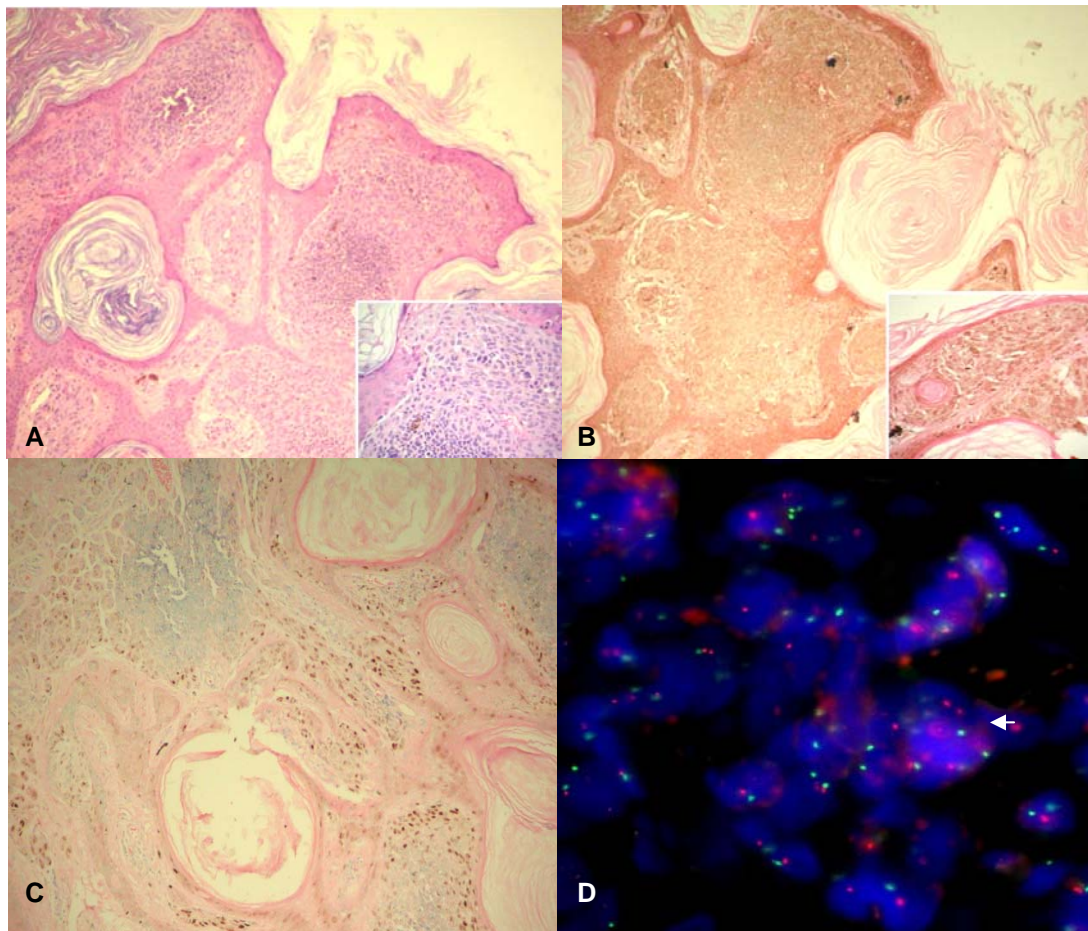


Figura 4 – Caso 5.56 – Nevo melanocítico. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 entre 26 a 50% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 100x). C – Expressão de ciclina D1 entre 51 a 75% das células (imunomarcção com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Área com aumento do número de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

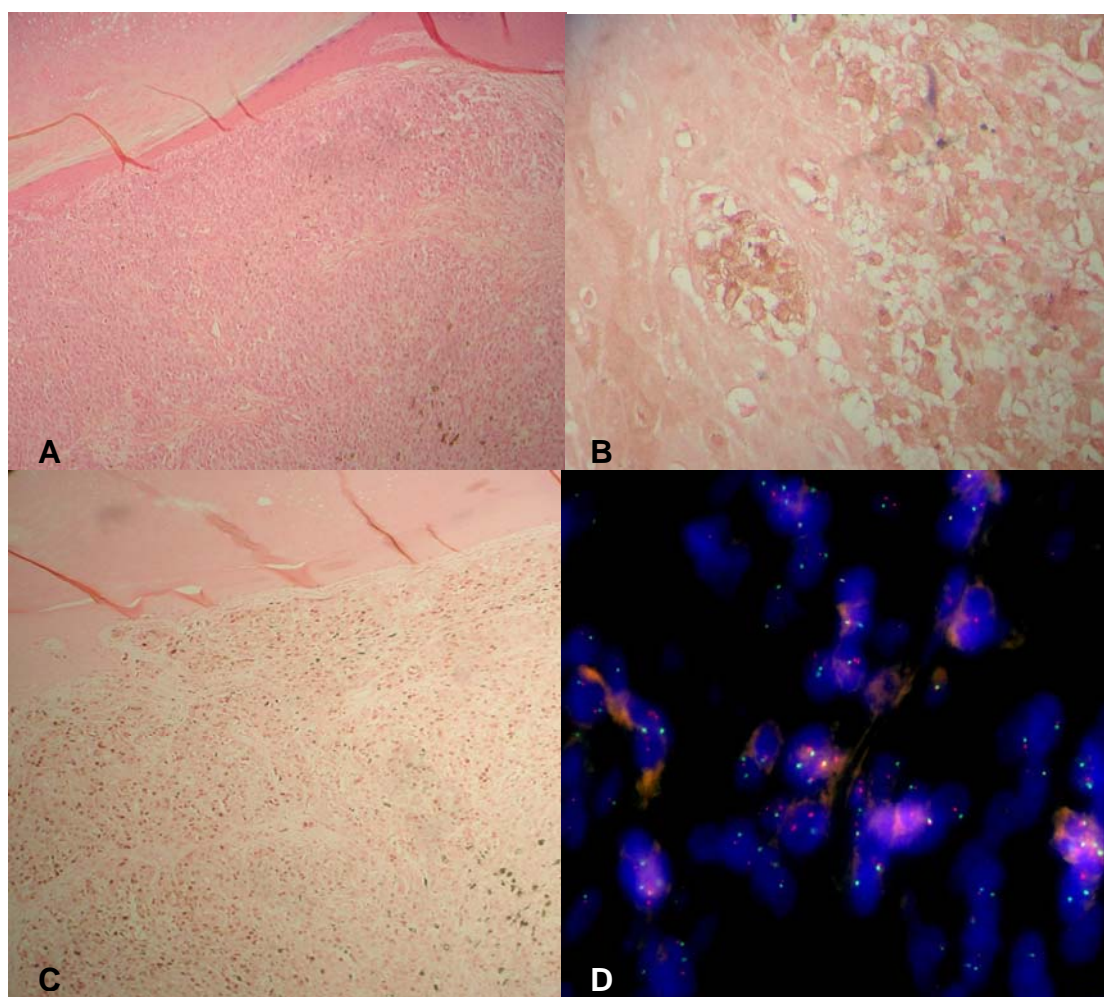


Figura 5 – Caso 4.15 – Melanoma acral lentiginoso. A – Hematoxilina-eosina (aumento de 100x). B - Expressão de proteína ROC1 em menos de 25% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ROC1, clone RB-069-P, LABVISION) (aumento de 400x). C – Expressão de ciclina D1 em mais de 75% das células (imunomarcação com anticorpo anti-ciclina D1, clone RBT14, BioSB) (aumento de 100x). D – Número normal de cópias do gene *CCND1* (FISH – gene *CCND1* marcado em vermelho e CEP11 em verde) (aumento de 1000x).

Conclusões

A maioria dos nevos melanocíticos expressa proteína ROC1 em mais de 75% das células, e a deficiência de sua expressão está associada aos melanomas cutâneos.

A expressão da proteína ROC1 está correlacionada negativamente à expressão da proteína ciclina D1 nos melanomas cutâneos, mostrando sua importância para degradação da ciclina D1 nestes tumores.

A relação de expressão ROC1/ciclina D1 está associada ao tipo de neoplasia, predominando nos nevos melanocíticos o aumento de expressão da proteína ROC1 em relação à proteína ciclina D1 e nos melanomas cerca de um quarto dos casos apresentam aumento de expressão da proteína ciclina D1 em relação à proteína ROC1.

Tanto a expressão da proteína ROC1 quanto à relação entre as expressões das proteínas ROC1 e ciclina D1 não estão associadas à medida da espessura de Breslow ou ao tipo histológico de melanoma, porém estudos com um maior número de casos, principalmente de melanomas acrais lentiginosos, serão importantes para definir corretamente a associação ou não com o tipo histológico.

Perspectivas Futuras

Estudos que avaliem a causa da diminuição da expressão da proteína ROC1 em melanomas cutâneos, o que pode acarretar no aumento de expressão de ciclina D1, poderão contribuir para pesquisa de novas propostas terapêuticas para estes tumores.

Anexa

Anexo 1 – Aprovação para realização do trabalho pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.



**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 02 de abril de 2.007

OF. 79/2007-CEP

*Ilustríssima Senhora
Prof.^a Dr.^a Mariângela Esther Alencar Marques
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu*

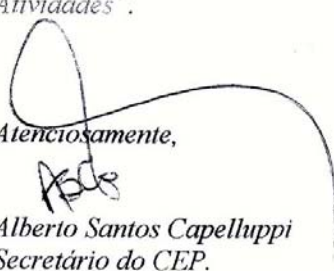
Prezada Dr.^a Mariângela,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "O possível papel da proteína ROC-1 na expressão da proteína ciclina D1 em melanomas cutâneos", a ser conduzido por Gisele Alborghetti Nai, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02 de abril de 2.007.

Situação do Projeto: APROVADO.

OBS: Ao final da execução deste projeto, deverá ser apresentado ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


*Alberto Santos Capellupi
Secretário do CEP.*

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](#)