



ELIANE PEREIRA SIMÕES MAGLUTA

**Análise Multifatorial dos Mecanismos de Resistência ao  
Tratamento em Linhagens Celulares Derivadas  
do Linfoma de Burkitt**

**Rio de Janeiro**

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ELIANE PEREIRA SIMÕES MAGLUTA

**Análise Multifatorial dos Mecanismos de Resistência ao  
Tratamento em Linhagens Celulares Derivadas  
do Linfoma de Burkitt**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação do Instituto Nacional de  
Câncer como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em  
Oncologia.

Orientadora: Claudete Esteves Klumb

**Rio de Janeiro**

**2007**

ELIANE PEREIRA SIMÕES MAGLUTA

**Análise Multifatorial dos Mecanismos de Resistência ao Tratamento em  
Linhagens Celulares Derivadas do Linfoma de Burkitt**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de  
**MESTRE EM ONCOLOGIA**  
e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Oncologia do  
Instituto Nacional de Câncer.

---

Prof<sup>o</sup> Luís Felipe Ribeiro Pinto  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Oncologia do INCA

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>o</sup>. Franklin David Rumjanek  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Peixoto Guimarães  
Instituto Nacional de Câncer

---

Prof<sup>a</sup>. Etel Gimba  
Instituto Nacional de Câncer

**Rio de Janeiro, 31 de julho de 2007**

*Ao meu pai e minha mãe  
que deram o melhor deles para o meu melhor.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Claudete E. Klumb por ter acreditado na minha capacidade de realizar esse trabalho, e pelo tempo dedicado à minha formação desde a iniciação científica. Agradeço por ter me ajudado profissionalmente nesse início da minha carreira e por ter sido sempre mais do que orientadora, mas uma pessoa amiga com quem sempre pude contar.

Um agradecimento especial à Prof. Vivian Rumjaneck por todo o apoio, atenção e sabedoria no momento mais preciso.

À Dra. Raquel Maia, Chefe do Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia, pela atenção e ajuda sempre que necessária.

À Dra Jane de Almeida Dobbin, Chefe do Serviço de Hematologia por ter autorizado a realização deste estudo no Laboratório vinculado ao seu Serviço.

Ao Marcos Scheiner por todos os conselhos e pela revisão da dissertação.

À amiga Alexandra Molinaro, que me ouve e apóia há anos.

Ao amigo Geraldo Barroso que me ensinou os primeiros passos dentro do Laboratório.

A todos os colegas do Laboratório de Hematologia Celular e Molecular, e em especial à Flavinha, Marcos e Karina, cujos ensinamentos foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos Flaviana e Alex pela amizade e ajuda em todos os momentos.

À Ana Cris e Elizângela, pela organização de sempre do nosso local de trabalho.

À colega Vanessa Sandim, do Laboratório de Genética Aplicada - HC-I, por toda a colaboração nas horas mais precisas.

À Danielle da CPQ, pela ajuda com os experimentos de radiação.

Aos colegas dos Laboratórios do CEMO.

Ao Juliano Javerth pela ajuda com as linhagens celulares.

À colega Luize Otero pela realização dos cariótipos das linhagens.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação.

À Dra. Denise Guimarães por ter cedido o anticorpo anti-p21 e a linhagem controle para conclusão dos experimentos.

À Dra Eliana Abdelhay pela permissão de utilização do citômetro de fluxo do CEMO para alguns experimentos do estudo.

Ao Dr. Marcelo Barcinski pelo entendimento das dificuldades enfrentadas durante o curso deste estudo.

Aos funcionários da Radiologia, do Banco de Cordão Umbilical e da Sorologia do HC-I por permitirem a realização de alguns experimentos.

Às secretárias da Pós-Graduação em Oncologia do INCA.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Um agradecimento em especial aos meus pais Sergio e Nadia, e ao meu irmão Felipe, que me apoiaram sempre desde o início da minha caminhada e me deram suporte para a realização de mais uma grande etapa da minha vida; e ao meu namorado, Marcello, que esteve do meu lado mesmo nos momentos mais complicados.

## RESUMO

O Linfoma de Burkitt (LB) é o linfoma maligno mais comum da infância. Embora o regime de tratamento utilizado atualmente seja bem sucedido em grande parte dos casos, há uma constante busca por regimes menos tóxicos, e terapêutica de resgate para os pacientes refratários ao tratamento inicial, ou que apresentam recidiva. Nesse sentido, o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência e refratariedade ao tratamento podem auxiliar na obtenção de um modelo de terapia eficaz no caso de falha ao tratamento inicial.

Uma importante via de atuação de diversos agentes quimioterápicos, incluindo aqueles usados no tratamento do LB, é a de indução de apoptose mediada pela proteína p53. O gene *TP53* encontra-se mutado em uma grande proporção de tumores humanos, e já foi mostrado que suas mutações correlacionam-se com a resposta ao tratamento em diversos tipos tumorais. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que diferentes tipos de mutações podem conferir respostas diferentes das células à quimioterapia.

Nesse estudo utilizamos duas linhagens celulares tumorais derivadas do Linfoma de Burkitt – Daudi e Raji – que apresentam mutações distintas do gene *TP53* e correlacionamos a resposta dessas células à indução de morte pela exposição aos agentes citotóxicos doxorrubicina, etoposídeo, cisplatina e radiação gama. Avaliamos também a capacidade desses agentes induzirem aumento de expressão da proteína p53 nessas linhagens, assim como, a funcionalidade das diferentes mutantes da p53 em relação à indução de apoptose, parada do ciclo celular e habilidade de transativação do gene *p21*. Os níveis de survivina, uma importante proteína envolvida no processo apoptótico que está sob regulação direta da p53, e da proteína pró-apoptótica SMAC/Diablo também foram avaliados antes e após a exposição das linhagens aos agentes citotóxicos.

Como resultados observamos variação no percentual de apoptose, que atingiu 60-80% na Raji e 20-30% na Daudi em 48 horas com a mesma concentração de radiação ionizante. Além disso, a  $DL_{50}$  para os quimioterápicos foi diferente entre as duas linhagens, sendo consideravelmente maior na Daudi do que na Raji. A resistência das linhagens aos variados agentes dependeu em grande parte do tipo de mutação do gene *TP53* e do agente utilizado. Observamos ainda diferenças no *status* funcional da proteína p53, em relação a indução de apoptose e transativação de genes alvo, como o gene *p21*, mostrando que diferentes mutações podem levar a conseqüências funcionais diversas. A expressão da survivina foi regulada positivamente pela p53 mutada após a exposição às drogas e à radiação gama, mostrando um papel para essa proteína na apoptose dependente de p53 e resistência.

Nosso estudo sugere que a análise dos mecanismos de resistência à quimioterapia em um contexto fisiológico através da utilização de linhagens celulares tumor-específicas deve considerar, além de mutações específicas do gene *TP53*, outras alterações comuns nas vias apoptóticas que podem estar presentes no modelo celular selecionado, contribuindo dessa forma para a elucidação dos mecanismos de resistência ao tratamento no câncer.

**Palavras-chave:** Linfoma de Burkitt, gene *TP53*, mutação, resistência, apoptose.

## ABSTRACT

Burkitt's Lymphoma (BL) is the most common malignant lymphoma in children. Although the currently used treatment regimens are successful in most cases, new less toxic regimens and rescue therapeutics for patients with refractory disease, or who presented relapse are still in continuous search. In this context, understanding the molecular mechanisms related to chemotherapy resistance and lack of treatment response may help to design new treatment approaches, which could be effective in this clinical setting.

An important mechanism of action of several chemotherapeutic agents, including those used in BL treatment, is the p53-mediated apoptosis induction pathway. *TP53* gene is mutated in a large number of human tumors, and a relationship between p53 mutations and treatment response in many kinds of tumors has been shown. In addition, some studies have reported that different types of *TP53* mutations confer different cell responses to chemotherapy.

In this study we analysed two Burkitt's Lymphoma cell lines – Daudi and Raji – in which distinct mutations of *TP53* gene were previously described. Cell lines response to doxorubicin, etoposide, cisplatin, and gamma radiation-induced cell death were correlated to *TP53* mutations. We also evaluated the ability of these agents to induce overexpression of p53 protein, as well as the functionality of different p53 mutants in relation to apoptosis induction, cell cycle arrest, and capacity to transactivate *p21<sup>WAF1/Cip1</sup>* gene. The levels of expression of survivin, an important protein (under direct regulation by p53) involved in the apoptotic process and the expression of SMAC/Diablo (a pro-apoptotic protein) were evaluated before and after cell lines exposure to the cytotoxic agents.

As result, we observed differences in the apoptosis index, which reached approximately 60-80% in Raji and 20-30% in Daudi cells, 48 hours after exposure to the same concentration of gamma radiation. Besides, the chemotherapeutic LD<sub>50</sub> (lethal dose, 50%) was different between the cell lines, being higher in Daudi when compared to Raji cell line. The resistance to varying types agents in those cell lines depended largely on the type of *TP53* gene mutation and the agent used. We also observed dissimilarities in the functional status of p53 protein, regarding apoptosis induction and transactivation of target genes, such as *p21*, suggesting that those mutations are able to lead to distinct functional consequences. Survivin expression was upregulated by mutated p53 after exposure to drugs and gamma radiation suggesting a possible role played by this protein in p53-dependent apoptosis pathway and resistance.

Overall, our work suggests that analyses of the mechanisms that trigger chemotherapy resistance in a more physiological context using tumor-specific cell lines should be considered. In addition to specific mutations of *TP53* gene, the analysis of other alterations in the apoptotic pathways that may be present in the cellular model selected, might contribute to the understanding of resistance mechanisms related to cancer treatment.

**Key words:** Burkitt's Lymphoma, *TP53* gene, mutation, resistance, apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação esquemática do gene e proteína p53.
- Figura 2- Funções da p53.
- Figura 3- Representação de alguns mecanismos do controle da progressão do ciclo celular.
- Figura 4- Vias intrínseca e extrínseca da apoptose e algumas proteínas que atuam na sua regulação.
- Figura 5- Fórmula molecular plana da cisplatina.
- Figura 6- Fórmulas moleculares planas do etoposídeo, teniposídeo, e podofilotoxina.
- Figura 7- Fórmula molecular plana da doxorrubicina.
- Figura 8- Curva padrão de BSA construída para quantificação da proteína total dos lisados das amostras utilizadas no estudo.
- Figura 9- Cariótipo característico da linhagem celular Daudi.
- Figura 10- Cariótipo característico da linhagem celular Raji.
- Figura 11- Curva de amplificação gênica do EBV (EBNA1) por PCR em tempo real nas linhagens Daudi e Raji.
- Figura 12- Esferogramas representativos das seqüências de DNA correspondentes ao éxon 6 e ao éxon 7 do gene *TP53* na linhagem Raji.
- Figura 13- Esferogramas representativos das seqüências de DNA do éxon 6 e do éxon 8 do gene *TP53* na linhagem Daudi.
- Figura 14- Valores das médias de intensidade de fluorescência (MIF) obtidos para a proteína p53 nas linhagens Raji e Daudi.
- Figura 15- Valores das médias de intensidade de fluorescência (MIF) obtidos para a proteína p21 nas linhagens Raji e Daudi.
- Figura 16- Expressão de p53 e p21 por *Western blotting* em Daudi, Raji e A549.
- Figura 17- Perfis de sensibilidade, analisados pelo método de MTT, da linhagem Daudi tratada com diferentes concentrações de doxorrubicina, etoposídeo e cisplatina, 24, 48 e 72 horas.
- Figura 18- Perfis de sensibilidade, analisados pelo método de MTT, da linhagem Raji tratada com diferentes concentrações de doxorrubicina, etoposídeo e cisplatina por 24, 48 e 72 horas.
- Figura 19- Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Daudi 3, 8, 24 e 48 horas após irradiação com 5 Gy de raios gama.
- Figura 20- Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Daudi 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 25 $\mu$ M de VP-16.
- Figura 21- Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Daudi 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 20  $\mu$ M de CDDP.
- Figura 22- Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Raji 3, 8, 24 e 48 horas após irradiação com 5Gy de raios gama.
- Figura 23- Análises ilustrativas do ciclo celular e apoptose em células da linhagem

Raji 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 0,625  $\mu$ M de VP16.

- Figura 24- Análises ilustrativas do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Raji 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 15  $\mu$ M de CDDP.
- Figura 25- Percentual de células das linhagens Daudi e Raji na fase G0/G1 do ciclo celular após 3, 8, 24 e 48 horas da exposição a 5 Gy de raios gama.
- Figura 26- Percentual de células das linhagens Daudi e Raji na fase G0/G1 do ciclo celular após incubação com VP-16, pelos tempos de 3, 8, 24 e 48 horas.
- Figura 27- Percentual de células das linhagens Daudi e Raji na fase G0/G1 do ciclo celular após tratamento com CDDP, pelos tempos de 3, 8, 24 e 48 horas.
- Figura 28- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após tratamento com VP-16.
- Figura 29- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após tratamento com DOX.
- Figura 30- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após tratamento com CDDP.
- Figura 31- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após exposição à radiação gama.
- Figura 32- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após tratamento com VP-16.
- Figura 33- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após tratamento com DOX.
- Figura 34- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após tratamento com CDDP.
- Figura 35- Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após exposição à radiação gama.
- Figura 36- Ensaio de extrusão de rodamina-123 e modulação pela ciclosporina nas linhagens Daudi e Raji.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Seqüências dos *primers* usados nas reações de PCR para os éxons 6, 7 e 8 do gene *TP53* e tamanho dos respectivos produtos amplificados
- Tabela 2- Etapas de ciclagem da reação de PCR para os éxons 7 e 8.
- Tabela 3- Etapas de ciclagem da reação de PCR “*hot start*” para o éxon 6.
- Tabela 4- Listagem dos anticorpos primários, diluições e anticorpos secundários correspondentes usados para realização do *Western blotting*.
- Tabela 5- Concentrações dos quimioterápicos correspondentes as  $DL_{50}$  aproximadas, em 48 horas para as linhagens Daudi e Raji.
- Tabela 6- Percentual de apoptose avaliado por Anexina V para a linhagem Daudi após 3, 8, 24 e 48 horas da exposição aos diferentes agentes.
- Tabela 7- Percentual de células da linhagem Raji em apoptose avaliado por Anexina V nos tempos de 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com diferentes agentes.
- Tabela 8- Síntese dos resultados observados no estudo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
10X	Dez vezes concentrado
1X	Uma vez concentrado
6FAM	6-carboxilfluoresceína
A	Nucleotídeo adenina
A549	Linhagem celular derivada de carcinoma de pulmão
Ac	Anticorpo
Add	Adição
AFB1	Aflatoxina B1
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
Apaf-1	Fator de Ativação das Proteases Apoptóticas-1
ATM	<i>ataxia telangectasia mutated</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	<i>AT- and Rad3-related</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BIR	<i>baculovirus IAP repeat</i>
BIRC	<i>Baculoviral IAP repeat-containing</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BP	Pares de bases
BSA	Albumina sérica bovina
C	Nucleotídeo citosina
Cdc2	<i>Cell division cycle 2 protein</i>
Cdc25	<i>Cell division cycle 25 protein</i>
CDDP-	Cisplatina
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
C-Flip	<i>Cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
CHK	<i>Cell cycle checkpoint kinase</i>
cIAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CKI	Inibidores de ciclina-CDK
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer of Sanger Institute</i>
Cs	Césio
CSA	Ciclosporina
D.O.	Densitometria óptica
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
del	Deleção

der	Derivativo
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	Complexo sinalizador de morte celular
DL <sub>50</sub>	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOX	Doxorrubicina
DSMZ	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i>
EBNA1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen-1</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EU-4	Linhagem celular derivada de leucemia linfoblástica aguda
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FasL	Fas ligante
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL-1	Canal de fluorescência 1
FLD	<i>Flexible loop regulatory domain</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G	Nucleotídeo guanina
G0	<i>Gap 0</i> (intervalo 0)
G1	<i>Gap 1</i> (intervalo 1)
G2	<i>Gap 2</i> (intervalo 2)
GADD45	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45</i>
Gy	Gray
h	hora
H1299	Linhagem celular derivada de carcinoma de pulmão
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HC-I	Hospital do Câncer I
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papiloma Vírus Humano
HVV-6B	Herpesvírus Humano 6B
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IARC	<i>International Agency for Research in Cancer</i>
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	<i>kilobase</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
KIAP1	<i>Inhibitor of apoptosis protein, kidney</i>
l	Litro
LB	Linfoma de Burkitt
LDGC	Linfoma Difuso de Grandes Células
LLA	Leucemia linfoblástica aguda

LNH-B	Linfoma não-Hodgkin de células B
M	Mitose, ciclo celular
M	Molar
mar	Marcador
Mdm2	<i>Mouse Double minute 2</i>
mg	Miligrama
MGB	<i>minor groove binder</i>
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
MIH	<i>Mammalian iap homolog</i>
mL	Mililitro
ML-IAP	<i>Melanoma inhibitor of apoptosis protein</i>
mM	Milimolar
MRP	Proteína de resistência à múltiplas drogas
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
NaCl	Cloreto de sódio
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetro
P	Fosforilação
p	Braço curto do cromossomo
PBS	Salina Tamponada com fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PgP	Glicoproteína P
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Iodeto de Propídeo
pmol	Picomol
pRb	Proteína retinoblastoma
q	Braço longo do cromossomo
RB	<i>Resuspension Buffer</i>
Redox	Reação de óxido redução
Rho-123	Rodamina-123
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Síntese, ciclo celular
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>

SSC	<i>Side scatter</i>
T	Nucleotídeo timina
t	Translocação cromossômica
TAE	Trizma base/ EDTA /Ácido acético glacial
TBS	Salina Tamponada com Tris
TIAP	<i>Tumor inhibitor of apoptosis protein</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Supressor de tumor ( <i>tumor suppressor</i> )
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-hidroximetilaminometano (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol)
TRUNDD	<i>TRAIL receptor with a truncated death domain</i>
U	Unidade
Ub	Ubiquitina
UV	Ultra-violeta
V	Volts
VM-26	Teniposide
VP-16	Etoposídeo
vs.	<i>versus</i>
wt	Selvagem ( <i>wild type</i> )
XIAP	<i>Inhibitor of apoptosis, X-linked</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1. Linfoma de Burkitt	21
1.1.1. Patogênese do LB	22
1.1.1.1. Associação do LB com o EBV	22
1.1.1.2. Características genéticas e citogenéticas	23
1.2. O gene <i>TP53</i> e a proteína p53	26
1.2.1. O gene <i>TP53</i>	26
1.2.2. A proteína p53	27
1.2.2.1. Estrutura, função e ativação	27
1.2.2.2. Degradação da proteína p53	30
1.2.3. Mutações do gene <i>TP53</i>	30
1.3. O controle do ciclo celular e o papel da p53 na sua regulação	32
1.4. Mecanismos de Apoptose	36
1.4.1. Proteínas inibidoras da apoptose (IAPs)	38
1.4.1.1. Survivina	39
1.4.2. Smac/DIABLO	40
1.4.3. p53 e apoptose	40
1.5. Mecanismo de resistência à quimioterapia mediado por moléculas transportadoras	43
1.6. Tratamento do LB: O LB como um modelo de entendimento de resistência	44
1.7. Mecanismo de ação dos agentes genotóxicos	45
1.7.1. Cisplatina (CDDP)	45
1.7.2. Etoposídeo (VP-16)	46
1.7.3. Doxorrubicina (DOX)	48
1.7.4. Radiação Ionizante	49
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
2.1. Objetivo principal	51
2.2. Objetivos específicos	51
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>52</b>
3.1. Linhagens celulares	52
3.1.1. Caracterização das linhagens celulares	52
3.1.1.1. Análise citogenética das linhagens celulares	52

3.1.1.2. Detecção do vírus Epstein-Barr nas linhagens	52
3.1.1.3. Expressão das proteínas p53 e p21	53
3.1.1.3.1. Marcação com anticorpos monoclonais	54
3.1.1.3.2. Leitura e análise em citômetro de fluxo	55
3.2. Status da proteína p53 nas linhagens celulares do estudo	55
3.2.1. Descrição de mutações nas linhagens celulares Daudi e Raji	55
3.2.1.1. Extração e quantificação do DNA das linhagens	57
3.2.1.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	57
3.2.1.3. Purificação do DNA para seqüenciamento	59
3.2.1.4. Seqüenciamento do DNA	59
3.3. Caracterização funcional da proteína p53 nas linhagens	60
3.3.1. Ensaio de citotoxicidade de agentes quimioterápicos (MTT)	60
3.4. Tratamento das células das linhagens com os quimioterápicos e radiação gama	62
3.5. Análise do ciclo celular e apoptose após indução com radiação gama e quimioterapia	62
3.5.1. Ciclo Celular	62
3.5.2. Apoptose	63
3.6. Expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo	63
3.6.1. Lise celular	64
3.6.2. Dosagem de proteína total dos lisados	64
3.6.2.1. Curva padrão de albumina sérica bovina (BSA)	65
3.6.3. Corrida eletroforética das proteínas	66
3.6.4. Marcação com os anticorpos específicos	66
3.7. Ensaio de modulação de bombas de efluxo das proteínas PgP e MRP	67
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>69</b>
4.1. Caracterização das linhagens celulares	69
4.1.1. Caracterização citogenética das linhagens derivadas de Linfoma de Burkitt	69
4.1.2. Status do vírus Epstein-Barr (EBV) nas linhagens	72
4.1.3. Análise das mutações do gene <i>TP53</i> nas linhagens celulares do estudo	73
4.1.4. Expressão das proteínas p53 e p21	76
4.2. Caracterização funcional da proteína p53	79
4.2.1. Perfil de resistência a agentes citotóxicos	79

4.2.2. Indução de apoptose e parada do ciclo celular por agentes citotóxicos	82
4.3. Análise da expressão de p53, p21, survivina e SMAC/Diablo nas linhagens Daudi e Raji por <i>Western blotting</i> após exposição a agentes genotóxicos.	93
4.4. Análise da funcionalidade das proteínas transportadoras PgP e MRP1	102
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>117</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>119</b>
<b>8. ANEXOS</b>	
ANEXO A - ARTIGO RELACIONADO À DISSERTAÇÃO “Resistência ao tratamento no Linfoma de Burkitt: associação com mutações específicas no gene <i>TP53</i> ?”	
ANEXO B- ARTIGO PUBLICADO NO CURSO DA DISSERTAÇÃO “Retinoblastoma-related gene <i>Rb2/p130</i> are rarely mutated in Burkitt's lymphoma from Brazil.”	

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt (LB) foi originalmente descrito por Dennis Burkitt em 1958, na África Equatorial, como uma neoplasia maligna de alta frequência, cuja manifestação inicial envolvia freqüente acometimento mandibular (BURKITT, 1958; BURKITT & O'CONNOR, 1961). O LB é o linfoma maligno mais comum da infância, ocorrendo de duas formas distintas: a endêmica e a esporádica. O LB é endêmico na África Equatorial afetando anualmente 4/100.000 indivíduos com idade abaixo de 15 anos. A forma esporádica ocorre em outras regiões, sendo observada em 0,2/100.000 indivíduos por ano na mesma faixa etária, podendo também acometer adultos. Embora muito semelhantes do ponto de vista histopatológico, as duas formas apresentam diferenças em diversos aspectos. Na forma esporádica, o local primário da doença envolve o abdômen em 80% dos pacientes, e a mandíbula em menor proporção (14%). Já no LB endêmico observa-se envolvimento mandibular e maxilar em 60% dos pacientes, acometimento abdominal em proporção similar (58%), seguido pelo sistema nervoso central e região para-espinhal. (MAGRATH, 1997). Outra diferença entre a forma endêmica e esporádica é a associação com o vírus Epstein-Barr (EBV). Na forma endêmica, esta associação é de 100%, enquanto na forma esporádica situa-se em torno de 15 a 30%. No Brasil, uma frequência intermediária (72 e 87%) foi demonstrada por dois grupos (KLUMB et al, 2004a; ARAÚJO et al, 1996).

Há ainda uma terceira forma de LB que está relacionada com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em adultos e crianças, acometendo frequentemente linfonodos e sítios extra nodais. Esta forma pode apresentar-se como leucemia aguda e está associada com o EBV em 30 % dos casos (LINDSTRÖM & WIMAN, 2002; HECHT & ASTER, 2000).

O LB é um tumor de células B de tamanho intermediário que infiltra difusamente tecidos nodulares e extra nodulares. Um padrão histológico característico do LB é a presença de inúmeras células apoptóticas dentro de macrófagos fagocíticos dispersos, dando a aparência de “céu estrelado”. A taxa de divisão celular do LB é uma das mais elevadas entre os tumores humanos (HECHT & ASTER, 2000) podendo ocorrer a duplicação do tumor em 24 horas.

### 1.1.1. Patogênese do LB

#### 1.1.1.1. Associação do LB com o EBV

Inicialmente, foi observado que a distribuição no LB na África coincidia com a distribuição da febre amarela, uma doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*. De fato, a distribuição do tumor coincidia com a dos mosquitos em geral, sendo dependente da temperatura e época de chuvas o que levou à observação de que a distribuição do tumor ocorria em áreas endêmicas para a malária.

Na busca de uma etiologia viral para a doença, em 1964, o EBV foi descoberto por Epstein e Barr em uma biópsia de um paciente com diagnóstico de LB (EPSTEIN et al, 1964). Posteriormente foi demonstrado que crianças com LB endêmico apresentavam altos títulos de anticorpos contra o EBV e que o genoma do vírus estava presente em todas as células do LB africano (MAGRATH, 1997).

O EBV é um herpesvirus humano que estabelece uma infecção latente em linfócitos B (RUF et al, 2001). O vírus é o causador da mononucleose infecciosa humana, uma doença linfoproliferativa auto-limitante de transmissão oral, e também está associado com uma variedade de tumores humanos, além de ser capaz de imortalizar células B *in vitro* (MAGRATH, 1997).

Há dois tipos de vírus EBV, originalmente chamados tipo A e B, porém agora conhecidos como tipos 1 e 2. Os dois tipos apresentam polimorfismos, com 50 a 80% de homologia do DNA dependendo do *locus*. Além disso, foi demonstrado que o tipo 1 é mais potente que o tipo 2 na imortalização de células B *in vitro* e ambos estão presentes em casos de LB na África e Nova Guiné (MAGRATH, 1997).

A forte correlação do EBV com o LB endêmico e o fato do vírus ter a capacidade de imortalizar células B *in vitro*, sugere um papel importante para ele no desenvolvimento do LB. Entretanto, percebe-se claramente que o vírus não é essencial na transformação maligna, já que a maioria dos casos de LB esporádico é EBV-negativo, assim como, a grande incidência de indivíduos infectados previamente pelo vírus (> de 90% da população adulta), não se acompanha de grande incidência de casos de LB em regiões em que o tumor não é endêmico. No entanto, estudos recentes sugerem que o EBV contribui para patogênese do LB

pela inibição da apoptose induzida pela proteína c-Myc com pelo menos dois mecanismos: aumento da expressão de Bcl-2 e, mais significativamente, por uma diminuição concomitante na expressão de c-Myc, aparentemente ao nível de tradução, sob condições limitantes de crescimento. Este último mecanismo é ainda proposto como sendo o principal meio pelo qual o EBV promove a sobrevivência da célula, principalmente pelo fato do c-Myc ser o principal mediador da apoptose no LB (RUF et al, 2001; MAGRATH, 1997).

#### 1.1.1.2. Características genéticas e citogenéticas

O LB está geralmente associado com translocações cromossômicas que levam a perda da regulação e aumento da expressão do gene *c-myc*. Este gene é um membro de uma família de genes que inclui o *N-myc* e o *L-myc* e é encontrado ativado em uma grande variedade de tumores humanos. As proteínas Myc são fatores de transcrição da família bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) que regulam o crescimento celular, diferenciação e apoptose (POPESCU & ZIMONJIC, 2002). As translocações características do LB envolvem o locus do gene *c-myc* 8q24, para os loci das imunoglobulinas (Igs) no cromossomo 14q32 (cadeia pesada  $\mu$ ), 2p11 (cadeia leve  $\kappa$ ) ou 22q11 ( $\lambda$ ). Estas translocações justapõem toda a seqüência codificante do gene *c-myc* ao ativador transcricional do gene da Ig (Fig. 1). A proximidade ao locus da Ig, que é altamente ativo transcricionalmente em células B que estão produzindo Igs, resulta em uma expressão anormal do gene *c-myc* translocado. Estas translocações ocorrem em um estágio inicial da ontogenia das células B como resultado de uma disfunção da recombinase V-D-J, ou durante os processos de diversificação no curso da resposta imune que ocorrem no centro germinativo e são mediados pelo mecanismo de hipermutação somática (POPESCU & ZIMONJIC, 2002; VANASSE et al, 1999).

Além disso, as seqüências reguladoras negativas do gene *c-myc* geralmente são perdidas como consequência direta da translocação cromossômica ou estão mutadas por outros mecanismos, contribuindo ainda mais para o aumento da atividade da proteína c-Myc (HECHT & ASTER, 2000).

A proteína c-Myc influencia processos celulares que contribuem positiva ou negativamente para a transformação celular. O aumento da expressão dessa proteína resulta em conseqüente aumento na proliferação, apoptose e metabolismo celular (HECHT &

ASTER, 2000).

O papel da c-Myc no ciclo celular não é totalmente conhecido, mas sabe-se que ela está normalmente expressa em todas as células em divisão, o que induz a progressão do ciclo celular, mas tem baixa expressão em células que estão na fase do bloqueio do ciclo e/ou em diferenciação. Foi sugerido que além de aumentar a proliferação, uma importante consequência da superexpressão da c-Myc é a indução da instabilidade genômica que pode contribuir para conseqüente transformação, entretanto, como este efeito “pró-mutacional” aplica-se ao LB ainda não está claro. Além dessas conseqüências, a c-Myc ainda impede a diferenciação celular por impedir que as células saiam do ciclo celular para poderem se diferenciar; regula diversos processos metabólicos como a síntese proteica, síntese de nucleotídeos e metabolismo de ferro; em alguns contextos, induz a apoptose, o que pode explicar o padrão histológico de “céu estrelado” do LB; diminui a adesão celular facilitando o escape das células do LB do sistema imune; e ainda promove imortalização celular pelo fato de manter a expressão da telomerase (HECHT & ASTER, 2000).

Outras alterações genéticas importantes também estão presentes no LB, incluindo silenciamento do gene *p16INK4a*, mutações dos genes *TP53*, *p73*, *Bax*, e *BCL-6* que podem promover o crescimento celular e/ou antagonizar a apoptose (LINDSTRÖM & WIMAN, 2002). Uma alteração controversa foi descrita por CINTI et al. (2000). Este grupo descreveu 84,6% de mutações do gene da família do retinoblastoma, *pRb2/p130* em pacientes com LB endêmico e 20% de mutações em pacientes com LB esporádico. De forma diversa em um estudo realizado por nosso grupo em pacientes brasileiros com LB esporádico, nenhuma mutação no gene *pRb2/p130* foi detectada (KLUMB et al, 2007).

Mutações do gene *TP53* são as alterações genéticas mais freqüentes em cânceres humanos. No LB, elas são encontradas em pelo menos 22% das biópsias dos tumores ao diagnóstico e não apresentam correlação com o *status* do EBV (KLUMB et al, 2004b). A superexpressão da proteína c-Myc resulta em indução da apoptose dependente de p53 em células normais (HERMEKING & EICK, 1994). Desse modo, quando ocorre ativação do gene *c-myc* no estágio inicial do desenvolvimento do LB, há inativação dessa via apoptótica, seja por mutações no gene *TP53* ou alterações em outros genes dessa via, como a via *Arf-p19<sup>ARF</sup>*, garantindo assim a progressão tumoral (SANCHEZ-BEATO et al, 2003). Isso pôde ser comprovado em estudo com camundongos transgênicos que super-expressavam c-Myc e apresentaram mutações ou deleções do gene *TP53* (EISCHEN et al, 1999).

Recentemente foi demonstrado que o gene *BCL-6* inibe os sinais anti-proliferativos da via p19<sup>ARF</sup>-p53 na senescência em um processo dependente da indução da ciclina D1 (SHVARTS et al, 2002). Também foi observado que este gene é encontrado mutado no LB (CAPELLO et al, 1997). No entanto, a descoberta mais surpreendente dos últimos anos foi a função da proteína BCL-6 como repressora da transcrição da p53 no centro germinativo através da ligação em dois sítios do promotor do gene *TP53* tornando a proteína inativa no centro germinativo. Este achado implica que a perda da regulação da proteína BCL-6 contribui para a gênese dos linfomas derivados de células do centro germinativo e o LB é classicamente um linfoma derivado de uma célula do centro germinativo (PHAN & DALLAFAVERA, 2004). Por outro lado, também recentemente, Margalit e colaboradores (2006), através de estudos empregando a tecnologia de *microarrays*, detectaram uma região no gene *BCL-6* que contém um *motif* de resposta à p53 que denominaram p53RE. Esta região do gene *BCL-6* é altamente conservada somente em primatas. A proteína p53 liga-se a essa região RE do *BCL-6* e aumenta os níveis de RNA mensageiro de BCL6 após radioterapia e quimioterapia. Este novo achado sugere que existe uma alça de auto-regulação entre os genes *BCL-6* e *TP53*. Em linhagens celulares derivadas do LB como as linhagens Daudi, Raji e Ramos, o gene *BCL-6* é regulado de forma negativa após a exposição à quimioterapia. Esta observação é contrária ao mecanismo descrito por Margalit e colaboradores (2006), porém, pode ser facilmente interpretada visto que estas três linhagens derivadas do LB apresentam mutação no gene *TP53*.

Algumas questões surgem a partir desta descoberta. De que forma as mutações presentes nestas linhagens e que também podem ocorrer nos pacientes, afetam a função da p53 no contexto desta alça de regulação entre os dois genes? Sabe-se que mutações do gene *BCL-6* nos linfomas difusos de grandes células (LDGC) estão relacionadas a um prognóstico mais favorável (VITOLLO et al, 2002). Nessa situação, o refinamento da localização dessas mutações no gene *BCL-6* poderia permitir uma correlação mais precisa com o prognóstico?

A superexpressão de BCL-6 causa quebra da alça de auto regulação e pode levar ao desenvolvimento de linfoma, no entanto, outros estudos são necessários para definir um subgrupo de pacientes com Linfoma não-Hodgkin de células B (LNH-B), (incluindo neste grupo o LB) com BCL6p53 RE não funcional e as implicações clínicas deste achado.

## 1.2. O gene *TP53* e a proteína p53

### 1.2.1. O gene *TP53*

O gene supressor tumoral *TP53* humano está localizado no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1). Ele possui 20 kb de DNA e é composto de 11 éxons (Fig. 1). Os éxons 2, 4, 5, 7 e 8 codificam cinco regiões altamente conservadas durante a evolução (domínios I-V) apresentando homologia estrutural com diversas espécies (BENCHIMOL et al, 1985).

Inicialmente foi sugerido que o gene *TP53* era um oncogene. Isso se deu pelo fato de que esse gene mostrou capacidade de transformar e imortalizar células embrionárias normais pela cooperação com o oncogene Ha-ras e essas células transformadas, que expressavam altos níveis da proteína p53, eram capazes de formar tumores em animais singeneicos (ELIYAHU et al. 1984; ROVINSKI & BENCHIMOL, 1988). Entretanto, outros estudos da mesma época demonstraram que a perda da função normal da proteína p53 estava relacionada com o processo de transformação neoplásica (MOWAT et al, 1985; CHOW et al, 1987; BEN DAVID et al, 1988). Essa controvérsia foi solucionada pela demonstração de que a seqüência selvagem do gene *TP53* não codificava uma proteína com capacidade de transformação. Quando fibroblastos de embrião de rato foram transfectados com uma proteína p53 selvagem e um gene *ras* ativado foi mostrado que essas células não se transformavam. A confusão surgida anteriormente foi causada pela utilização na transfecção de cDNAs derivados de *TP53* que possuíam mutações pontuais com efeito dominante negativo que interferiam com a conformação e função normal da proteína. (FINLAY et al, 1988; ELIYAHU et al, 1988; HINDS et al, 1989).

Estudos posteriores estabeleceram o papel do gene *TP53* como um gene supressor tumoral. Em um deles, foi mostrado que mutações em ambos os alelos do gene *TP53* são essenciais para seu papel no processo da oncogênese. Nesse estudo, cópias exógenas de *TP53* com mutações pontuais ou cópias exógenas selvagens foram introduzidas em células de osteosarcoma (Saos-2) que não apresentavam *TP53* endógeno. A expressão da proteína p53 selvagem suprimiu o fenótipo neoplásico nessas células, enquanto a expressão de p53 mutada conferiu uma vantagem proliferativa às células na ausência de p53 selvagem (CHEN et al,

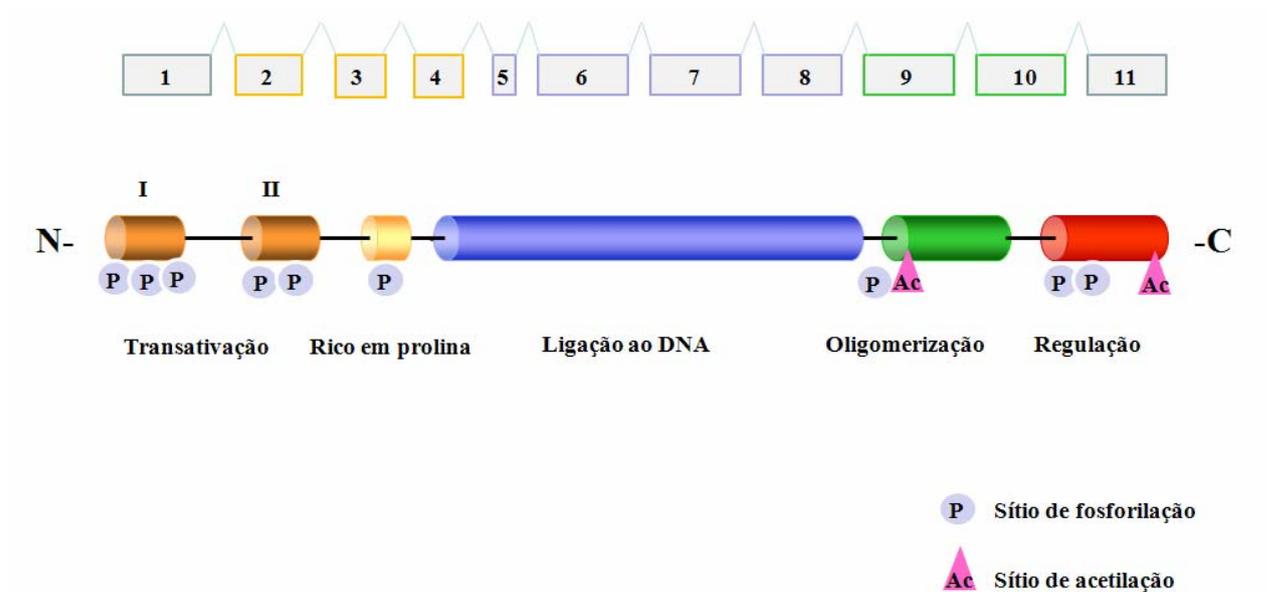
1990).

## **1.2.2. A proteína p53**

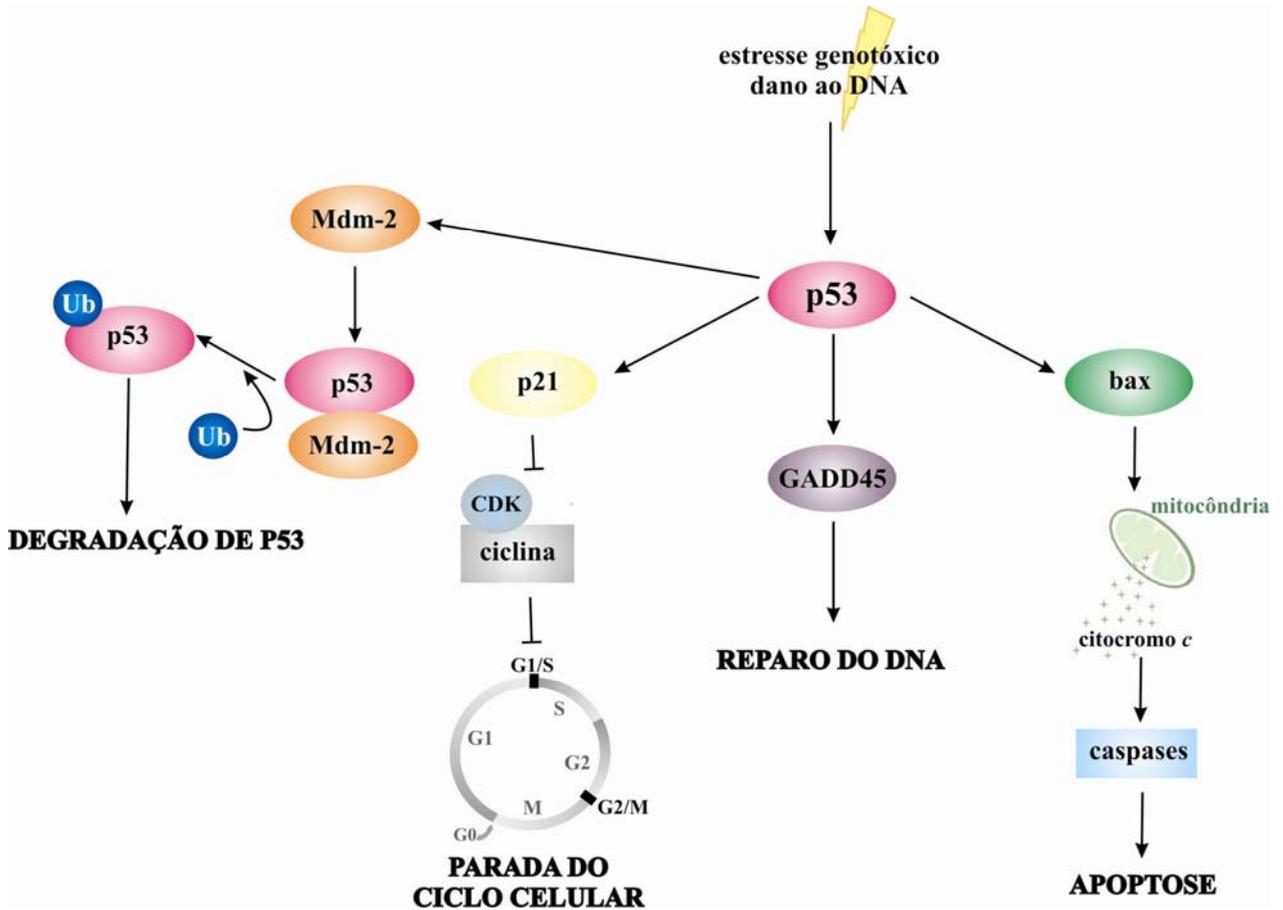
### **1.2.2.1. Estrutura, função e ativação**

A proteína p53, de 53 kDa, tem 393 aminoácidos e é um fator de transcrição capaz de regular a expressão de vários genes. Ela possui cinco domínios funcionais com funções distintas. Um domínio de transativação e um domínio rico em prolina (resíduos 1 a 43 e 61 a 94, respectivamente) estão presentes na porção N-terminal. O domínio de ligação ao DNA está localizado na porção central da proteína (resíduos 110 a 286). Finalmente, um domínio de tetramerização e uma região regulatória (resíduos 326 a 355 e 363 a 393, respectivamente) estão localizados na porção C-terminal (Fig.1) (CHÈNE, 2001).

A proteína p53 encontra-se envolvida em diversas vias de resposta ao estresse que impedem o crescimento e sobrevivência de células potencialmente malignas. Células normais apresentam níveis extremamente baixos de proteína p53 selvagem, visto que a proteína é rapidamente degradada após a síntese. A atividade da proteína p53 selvagem é fortemente estimulada por estresse genotóxico, como dano ao DNA por sinais exógenos e endógenos, que incluem, por exemplo, radiação gama (ALONI-GRINSTEIN et al, 1995; KUERBITZ et al, 1992), radiação ultra violeta (UV) (MALTZMAN & CZYZYK, 1984; LU & LANE, 1993), e substâncias químicas (ZHAN et al, 1993). Também ocorre ativação no caso de desgaste de telômeros, ativação de oncogenes, hipóxia, e perda de sinais normais de crescimento e sobrevivência. Essa ativação pode induzir várias respostas nas células, incluindo diferenciação, senescência, reparo do DNA e a inibição da angiogênese, mas as respostas mais conhecidas são a habilidade da p53 induzir bloqueio do ciclo celular e morte celular por apoptose (morte celular programada) (Fig. 2). Essas duas respostas permitem que a proteína p53 iniba o crescimento de células com danos tanto por um bloqueio do ciclo celular, que pode ser reversível ou transitório, para permitir reparo do DNA e recuperação antes da célula entrar novamente em replicação; ou por remoção permanente das células com danos extensos através da apoptose. Qualquer uma dessas respostas impede a replicação de células que estão sofrendo alterações oncogênicas e assim impede o desenvolvimento tumoral. (BATES & VOUSDEN, 1996; RYAN et al, 2001).



**Figura 1- Representação esquemática do gene e proteína p53.** Os 11 éxons do gene *TP53* e os cinco domínios da proteína p53 (domínio de transativação, rico em prolina, de ligação ao DNA, de oligomerização e de regulação) são mostrados. As regiões dos principais sítios de fosforilação e acetilação da proteína estão indicadas. (Adaptado do banco de dados do IARC)



**Figura 2- Funções da p53.** As principais funções da proteína p53 – parada do ciclo celular, indução de apoptose e reparo do DNA – e via de degradação de p53 pela proteína MDM-2 são assinaladas no esquema. Para detalhes, ver texto. *Ub*, Ubiquitina.

### 1.2.2.2. Degradação da proteína p53

Um dos componentes mais importantes da degradação da p53 é a proteína *mouse double minute 2* (Mdm2), o produto do gene *mdm2* que é ativado transcricionalmente pela p53, em um *feedback* regulatório negativo. A habilidade da Mdm2 de marcar a p53 por ubiquitinação para degradação pelo proteossomo 26S representa o principal mecanismo de controle da atividade da p53 durante o crescimento celular (KUBBUTAT et al, 1998; OREN et al, 2002). Existem duas formas da proteína Mdm2 (p90Mdm2, de extensão completa e p76Mdm2, que não possui parte do domínio de ligação à p53). Apenas a forma de extensão completa tem capacidade de se ligar e mono-ubiquitinar p53. Acredita-se que para se tornar poli-ubiquitinada, a p53 tem que ser mono-ubiquitinada pela ligação à Mdm2. A partir dessa mono-ubiquitinação, a Mdm2 é deslocada pela proteína p300 que então poli-ubiquitina a p53 (KOHN & POMMIER, 2005).

Outros mecanismos de degradação da proteína p53 independentes da Mdm-2 já foram descritos. Entre eles estão o complexo E6/E6AP. A oncoproteína E6 do papiloma vírus humano (HPV) liga-se a uma proteína celular de 100 kDa, chamada proteína associada a E6 (E6-AP). Esse complexo E6/E6AP interage com a p53, resultando na rápida degradação da proteína de forma dependente de ubiquitina (SCHEFFNER et al, 1993). Também foi mostrado que JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) é um regulador da estabilidade e degradação da p53. Fuchs, et al (1998) relataram que p53 sem o sítio de ligação de JNK apresentava meia-vida maior do que a proteína p53 selvagem (*wt*) com o sítio de ligação, e que a quantidade de complexo JNK-p53 era inversamente proporcional ao nível de p53 livre.

### 1.2.3. Mutações do gene *TP53*

Mutação do gene *TP53* é a lesão genética mais comum em muitas formas de neoplasias humanas herdadas e adquiridas. Essas mutações foram encontradas em cânceres de mama, cólon, bexiga, pâncreas, e pulmão, assim como, em tumores do cérebro, leucemias, linfomas, carcinomas gástricos, hepatocarcinomas e osteosarcomas. Essas mutações geralmente são encontradas nas regiões conservadas da proteína (NIGRO et al, 1989), e cerca

de setenta e quatro por cento dessas mutações são pontuais (*missense*).

Estudos que analisaram o significado de mutações pontuais do gene *TP53* em relação ao tipo de tumor (HOLLSTEIN, 1991; CARON DE FROMENTEL & SOUSSI, 1992) mostraram que mais de 90% dessas mutações estavam agrupadas na parte central da p53 e afetavam aminoácidos conservados em todas as espécies de p53. Outro ponto descoberto foi em relação aos três aminoácidos onde mais ocorrem mutações, chamados de “*hotspots*”. Nesses três aminoácidos (Arg175, Arg248 e Arg273) encontram-se 22% de todas as mutações. Esses três codons (CGN) de arginina contêm um dinucleotídeo CpG que é freqüentemente metilado no genoma de vertebrados e a desaminação da 5-metilcitosina pode gerar uma transição C:T após a replicação do DNA (ORY et al, 1994). Transversões do gene *TP53* também são documentadas incluindo transversões G:C para T:A em câncer de pulmão em associação ao tabaco, G:C para T:A no códon 249 em câncer de fígado em associação à exposição a Aflatoxina B1 (AFB1) (HAINAUT & VAHAKANGAS, 1997).

A freqüência de mutações do gene *TP53* nos tumores é muito maior do que em outros genes supressores de tumor e isso sugere que proteínas p53 mutadas conferem alguma vantagem seletiva na carcinogênese através da perda da capacidade de suprimir o crescimento tumoral. Entretanto, a alta freqüência de mutações e os altos níveis de expressão da proteína p53 nas células neoplásicas, sugerem um “ganho de função” que além de contribuir para o desenvolvimento do câncer e sua progressão, pode também interferir com a resposta à quimioterapia, talvez por uma função anti-apoptótica. Mutantes de p53 têm a habilidade de interferir com a apoptose dependente de p53 por um mecanismo negativo dominante, e com a apoptose independente de p53, por um mecanismo ainda desconhecido que pode envolver transativação (SIGAL & ROTTER, 2000). Este “ganho de função” decorrente de mutações contribui para carcinogênese, mas também, tem sido alvo de diversos estudos que exploram essas mutantes da p53 como alvos para novos tratamentos do câncer. (BYKOV et al, 2002).

Nas últimas duas décadas o conceito simplista da incapacidade funcional da p53 decorrente da presença de mutação *per se* foi adotado como um dogma e obscureceu as pesquisas funcionais com relação ao tipo de mutação, sítio de localização e os diferentes efeitos funcionais relacionados à progressão tumoral (perda da função supressora da proteína) e capacidade de induzir a apoptose após dano ao DNA (função apoptótica da proteína).

Martin et al (2002) realizaram uma análise dos efeitos das mutações do gene *TP53* sobre a estrutura do domínio central da proteína. Eles sugerem que muitas mutações do gene

TP53 não podem ser explicadas usando apenas critérios de avaliação estrutural, pelos efeitos previstos no dobramento da proteína ou interação da proteína com o DNA, e que o efeito biológico de uma substituição não é necessariamente proporcional à extensão de perturbação estrutural prevista. Estes pesquisadores também sugerem que há mutações que ocorrem na superfície do domínio central da p53 que podem estar envolvidas em funções diferentes de ligação ao DNA através de interações com outros domínios ou proteínas.

### 1.3. O controle do ciclo celular e o papel da p53 na sua regulação

O período entre duas divisões mitóticas em uma célula define o ciclo celular somático. O ciclo celular típico de mamíferos consiste de duas fases principais, a interfase, que é o tempo entre o fim de uma mitose e o início de outra, e a mitose propriamente dita (fase M). A interfase por sua vez é dividida em 3 fases: *gap* (G) 1, síntese (S) e *gap* (G) 2. Também há uma fase fora do ciclo celular, G0. Em G1, a célula começa a crescer em tamanho e ocorre a síntese de RNAs (transcrição) e proteínas (tradução). A fase S subsequente é marcada pelo início da síntese de DNA para produzir uma cópia exata do genoma para as células-filhas. Após toda a duplicação do DNA, a fase S termina e começa a fase G2, onde ocorre crescimento celular e produção de proteínas para que duas células filhas viáveis possam se formar. Essa fase estende-se até a fase M, onde ocorre a separação das células-filhas, cada uma com um conjunto diplóide de cromossomos. Após essa fase, a célula pode re-entrar no ciclo celular, ou pode parar de se dividir e permanecer em G0 (LEWIN, 2001).

A progressão de células eucarióticas através do ciclo celular é mediada pela ligação sequencial e ativação de uma família de serina-treonina-quinases, as quinases dependentes de ciclina (CDKs). As ciclinas ligam-se e fosforilam as CDKs, ativando-as. As “ciclinas de G1” incluem as ciclinas C, D<sub>1-3</sub> e E, e o acúmulo dessas ciclinas é limitante para a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. As “ciclinas mitóticas ou de G2” que incluem ciclina A e ciclina B estão envolvidas no controle da transição da fase G2 para a fase M (VIALLARD et al, 2001). As CDKs ativadas inibem as proteínas da família de proteínas do retinoblastoma (pRb1, pRb2/p130 e p107) que têm a capacidade de modular negativamente o ciclo celular pela ligação com fatores de transcrição da família E2F, que promovem a proliferação celular e a passagem de G1 para a fase S (WEINBERG et al, 1995). A maior parte dos complexos E2F

nucleares em células quiescentes ou diferenciadas estão ligados às proteínas da família pRb, e desta forma inativos. Quando as células são estimuladas a entrar na fase S, as proteínas da família pRb são fosforiladas pelas CDKs e há a liberação de E2F livre, que irá ativar a transcrição de genes alvo para que a progressão do ciclo ocorra (DYSON, 1998).

Os complexos ciclina-CDK são, portanto, os principais reguladores da progressão do ciclo celular em G1. Duas classes de proteínas inibidoras dos complexos ciclina-CDK (CKIs), as famílias de proteínas INK4 e Cip/Kip, também atuam nessa fase do ciclo regulando os complexos ciclina-CDK de G1. A família INK4 é composta das proteínas p15, p16, p18 e p19 que ligam-se a CDK4/6 monomérica impedindo a ativação da ciclina D; e os membros da família Cip/Kip, p21, p27 e p57 ligam-se e inativam complexos ciclina-CDK2 heterodiméricos (HO & DOWDY, 2002).

Em um ciclo celular normal, a passagem de uma fase do ciclo para outra é fortemente controlada. Os *checkpoints* do ciclo celular e o reparo do DNA são as principais defesas contra a instabilidade genômica. A função mais importante desses *checkpoints* do dano e replicação é parar a progressão do ciclo celular quando ocorre dano ao DNA para que as lesões possam ser removidas e o ciclo possa recomeçar. A primeira etapa na iniciação desses *checkpoints* é o reconhecimento do dano ao DNA por proteínas “sensoras”. A partir daí, proteínas “transdutoras de sinal” levam o sinal para proteínas “efetoras” que irão disparar uma cascata de eventos que levará ao bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA, ou apoptose, nos casos onde o dano for irreparável.

A primeira etapa de reconhecimento do dano é realizada pelos fatores RAD1, RAD9, e HUS 1 que formam o complexo “9-1-1” que circunda o DNA de forma semelhante ao PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e RAD 17 que regula o recrutamento do complexo 9-1-1 para o local do dano no DNA. Outro grupo de proteínas que também está envolvido no reconhecimento precoce do dano ao DNA é ATM (*ataxia telangectasia mutated*) e ATR (*AT- and Rad3-related*). ATM e ATR ativadas fosforilam diversos substratos, dentre eles, CHK1, CHK2 e p53 que por sua vez ativam proteínas efetoras que fazem o bloqueio do ciclo celular. (NIIDA & NAKANISHI, 2006; QIN & LI, 2003). Estudos mostram que ATM é necessária para resposta imediata ao dano do DNA ocorrido em todas as fases do ciclo celular e que ela possui diferentes alvos funcionais nas diferentes fases do ciclo celular. (PANDITA et al, 2000).

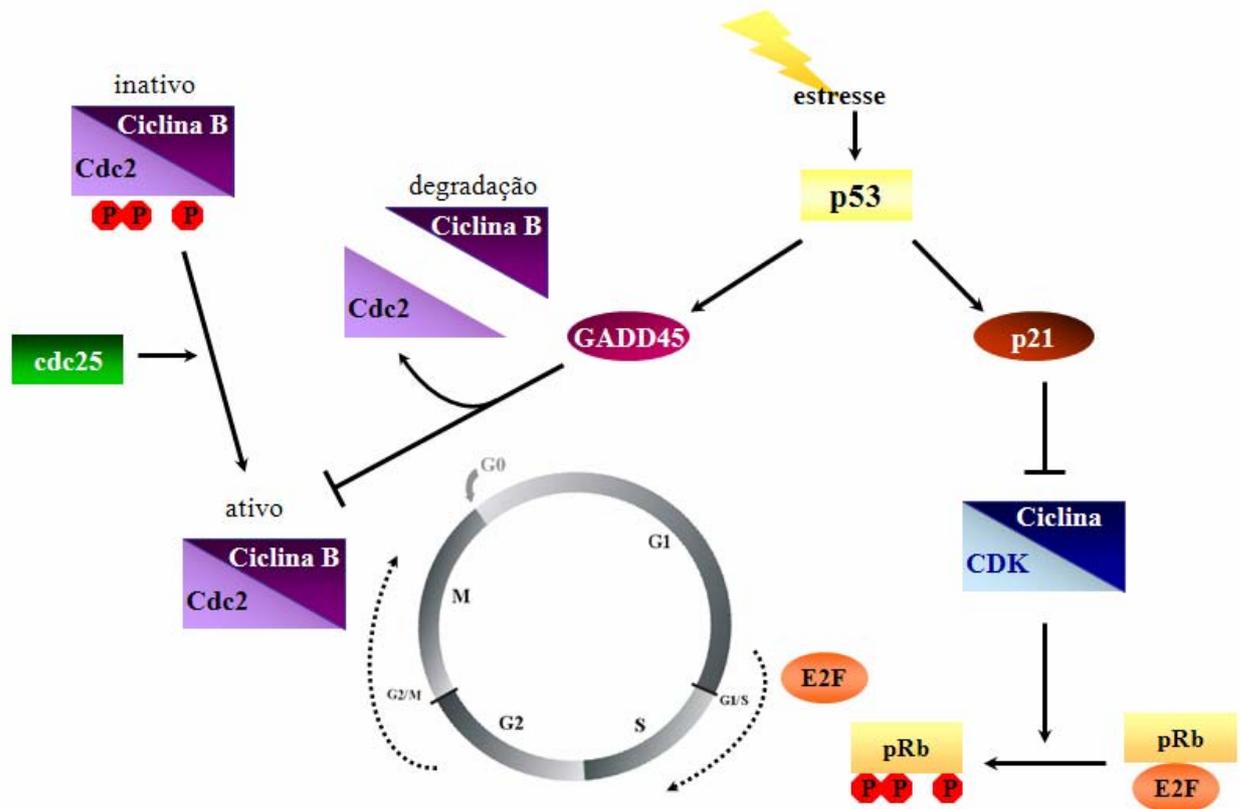
O controle da transição G1/S é primariamente feito pela proteína p53 através da

transativação do gene inibidor de ciclina  $p21^{Waf1/Cip1}$ . Uma vez ativada, a proteína p21 liga-se aos complexos ciclina-CKD e inibe sua atividade, bloqueando as células na fase G1 do ciclo celular (DULIC et al, 1994; EL DEIRY, 1998), e desta forma, permite que ocorra o reparo do DNA.

Entretanto, evidências recentes mostram mecanismos de parada do ciclo celular em G1/S independentes de p53. Um estudo em células com p53 selvagem mostrou que a infecção causada pelo herpesvírus humano 6B (HVV-6B) causou bloqueio do ciclo celular em G1/S e parada da proliferação das células infectadas. Entretanto, embora tenha ocorrido acúmulo de p53, o efeito não foi mediado por esta proteína, já que não houve acúmulo de p21 e o uso de pifitrina- $\alpha$  (inibidor de p53) não reverteu o bloqueio induzido por HVV-6B (OSTER et al, 2006). Agüero et al (2005) mostraram recentemente que fenoxodiol, um derivado de isoflavona da genisteína com mecanismo de ação desconhecido, causou parada em G1/S como consequência da perda de atividade de CDK2 induzida por p21, mas independente de p53. Esses achados mostram que há outras vias de ativação de p21 e de parada do ciclo celular na fase G1/S que não dependem da atividade da proteína p53.

O mecanismo pelo qual a proteína p53 controla a transição G2/M envolve a regulação da quinase dependente de ciclina Cdc2 que é essencial para entrada na fase M do ciclo celular. Durante a fase G2 o complexo Cdc2/Ciclina B é mantido inativo por fosforilação. Quando a mitose se inicia, a fosfatase Cdc25 desfosforila o complexo Cdc2/Ciclina B e esse complexo por sua vez fosforila Cdc25 em um mecanismo de *feedback* positivo. Com a ativação desse complexo, a mitose pode ocorrer (TAYLOR & STARK, 2001). GADD45, proteína induzida pela p53, dissocia Cdc2 da ciclina B1, pela interação direta com Cdc2 (JIN et al, 2000). Foi mostrado ainda que expressão de GADD45 em células com p53 inativada não foi capaz de induzir parada do ciclo em G2/M, demonstrando que a parada da transição G2/M mediada por GADD45 requer função normal da proteína p53 (JIN et al, 2002). Outros alvos de p53 que não afetam Cdc2 também colaboram para o bloqueio do ciclo em G2, como por exemplo a Topoisomerase II que é uma enzima essencial para a segregação dos cromossomos durante a mitose, tem seu promotor inibido pela proteína p53 selvagem (SANDRI et al, 1996; WANG et al, 1997).

A figura 3 resume alguns dos mecanismos de progressão do ciclo celular e o controle da transição G1/S e G2/M realizado pela proteína 53.



**Figura 3- Representação de alguns mecanismos do controle da progressão do ciclo celular.** A transição entre as fases G1 e S é realizada pela inibição das proteínas da família pRb por fosforilação mediada pelas CDKs ativas, liberando E2F livre que promove a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular. O controle desse *checkpoint* realizado pela proteína p53 após diversos tipos de estresses envolve a proteína p21 que inibe os complexos ciclina/CDK. A transição entre as fases G2 e M é realizada pela desfosforilação mediada por Cdc25 do complexo ciclina B/Cdc2, ativando-o. A p53 atua nessa transição pela ativação de GADD45 que se liga a Cdc2 e dissocia o complexo ciclina B/Cdc2 promovendo a degradação da ciclina B.

#### 1.4. Mecanismos de Apoptose

A morte celular é um elemento essencial do funcionamento de organismos multicelulares. O processo conhecido por apoptose ou morte celular programada é uma das vias existentes para a realização da morte celular. A apoptose é um processo fisiológico de morte celular altamente regulado e dependente de energia que ocorre tanto em tecidos normais como em tecidos patológicos, eliminando células danificadas ou em excesso no organismo, sem danificar células e tecidos adjacentes. Esse processo é necessário para o desenvolvimento normal de um organismo multicelular durante a embriogênese, e para a manutenção da homeostase tecidual em adultos (PHILCHENKOV, 2004).

A apoptose pode ser iniciada por vários sinais externos ou internos e é executada através de diversas vias de sinalização inter-relacionadas. Do ponto de vista molecular, o maquinário de morte celular por apoptose forma uma cascata complexa de eventos ordenados, controlados pela expressão de genes e proteínas relacionados à apoptose. A ação desses componentes resulta finalmente na formação dos corpos apoptóticos e morte celular. Os componentes mais importantes desse maquinário são os membros da família das caspases (PHILCHENKOV, 2004).

As caspases são uma família de cisteína proteases responsáveis por funções celulares como inflamação e apoptose. Características comuns a todos os membros dessa família de proteases incluem o resíduo de cisteína catalítico no sítio ativo, e a habilidade de clivar substratos no sítio carboxil dos resíduos de aspartato. As caspases podem ser classificadas de acordo com características estruturais e funcionais. Com base nas características estruturais, as caspases são classificadas em duas categorias: com pró-domínio NH<sub>2</sub>-terminal curto (20-30 resíduos de aminoácidos), essa categoria abrangendo as caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 e -12, e com pró-domínio NH<sub>2</sub>-terminal longo (mais de 90 resíduos de aminoácidos), onde estão incluídas as caspases-3, -6, -7 e -14. Do ponto de vista funcional, as caspases são classificadas como caspases inflamatórias (-1, -4, -5, e -11) e apoptóticas (-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10, -12, e -14). As caspases apoptóticas podem ainda ser divididas em caspases “iniciadoras” (-2, -8, -9, -10, -12) que ativam o segundo grupo das caspases “efetoras” (-3, -6, -7, -14) diretamente, por proteólise, ou indiretamente por um mecanismo de segundo mensageiro. Ativadas, as caspases efetoras degradam diretamente vários substratos incluindo proteínas regulatórias e

estruturais no núcleo, citoplasma e citoesqueleto, levando a execução do programa apoptótico. (HO & HAWKINS, 2005; NUÑEZ et al, 1998; PHILCHENKOV, 2004).

Há duas vias principais para a ativação das caspases, a via “extrínseca” e a via “intrínseca”. A via extrínseca é iniciada pela ligação de hormônios ou agonistas extracelulares que pertencem a superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) incluindo TNF $\alpha$ , Fas ligante (FasL) e ligante Apo2/TRAIL aos seus receptores correspondentes, TNFR1, Fas e Apo2. Essa ligação promove o recrutamento de proteínas específicas com conseqüente formação do complexo sinalizador de morte celular (DISC) e ativação de caspases iniciadoras, como caspase-8 ou caspase-10 que por sua vez ativam caspases efetoras, como as caspases-3 e -7 que executam o programa de morte celular (ZAFFARONI et al, 2005, NUÑEZ et al, 1998, JIANG & WANG, 2004).

De forma diversa, a via intrínseca ou via mitocondrial não depende da ligação a receptores de membrana para iniciar a cascata de eventos que culmina na morte apoptótica da célula. Esta via é ativada por diversos estresses extra e intracelulares, tais como falta de fatores de crescimento, hipóxia, dano ao DNA, e ativação e indução de oncogenes (OKADA & MAK, 2004). Esses sinais pró-apoptóticos causam permeabilização da membrana mitocondrial e a liberação de citocromo *c*, que é o principal evento dessa via. O citocromo *c* junto com desoxiadenosina trifosfato (dATP) ou adenosina trifosfato (ATP) ligam-se e ativam Apaf-1 (Fator de Ativação das Proteases Apoptóticas-1) formando um complexo heptamérico, o apoptossomo, formado por sete moléculas de citocromo *c* ligadas a Apaf-1 circundando sete moléculas de procaspase-9. Com isso ocorre ativação de caspase-9 e início da cascata das caspases (ZAFFARONI et al, 2005; JIANG & WANG, 2004).

Dentre os processos da via intrínseca, apenas a etapa de permeabilização da membrana mitocondrial pode ser regulada. Essa regulação é feita pelos membros da família de proteínas Bcl-2. Entretanto, uma vez que ocorre a liberação de citocromo *c*, a ativação da cascata das caspases é irreversível (OKADA & MAK, 2004).

A família de proteínas Bcl-2 é composta por membros anti- e pró-apoptóticos que possuem pelo menos um domínio BH (*Bcl-2 homology*). As proteínas anti-apoptóticas são Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, A1, Bcl-w e Mcl1; as pró-apoptóticas pertencem a duas famílias: Bax e proteínas BH3-*only*. A família de proteínas Bax é composta pelos membros Bax, Bak e Bok, já a família BH3-*only* é composta pelas proteínas Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa e Puma (CORY & ADAMS, 2002).

A proteína Bcl-2 e as proteínas homólogas inibem a apoptose induzida por vários tipos de estresses. Elas têm a capacidade de se associar à membrana mitocondrial externa e manter sua integridade. Dessa forma, essas proteínas impedem a liberação de citocromo *c* e a conseqüente ativação de caspase-9 (CORY & ADAMS, 2002). Em 1993 foi mostrado pela primeira vez que a Bcl-2 e Bax tinham a capacidade de interagir fisicamente formando heterodímeros *in vivo* e foi ainda sugerido que a razão entre Bcl-2 e Bax determinaria a sobrevivência ou a morte após um estímulo apoptótico. (OLTVAI et al, 1993).

Bax e proteínas associadas promovem apoptose atuando na mitocôndria. Em células que estão sofrendo apoptose, a forma ativada de Bax acumula-se na membrana mitocondrial externa e isso resulta na permeabilização da membrana mitocondrial, com liberação de citocromo *c* e outras moléculas pró-apoptóticas, como Smac/DIABLO, endonuclease G e AIF (*apoptosis inducing factor*), promovendo morte celular apoptótica (SCORRANO & KORSMEYER, 2003).

#### **1.4.1. Proteínas inibidoras da apoptose (IAPs)**

As IAPs são uma família de proteínas que tem a capacidade de inibir as caspases e impedir a apoptose. Elas foram identificadas em baculovírus, em 1993, por meio de um rastreamento genético para identificar reguladores da viabilidade das células do hospedeiro durante uma infecção viral (CROOK et al, 1993). Duas estruturas foram encontradas nas IAPs de baculovírus: o domínio BIR (*baculovirus IAP repeat*), com cerca de 70 aminoácidos e o domínio RING. Até o momento, oito IAPs foram descritas em humanos: XIAP (ILP-1, MIHA, BIRC4), c-IAP1 (HIAP2, MIHB, BIRC2), c-IAP2 (HIAP1, MIHC, BIRC3), ILP-2 (Ts-IAP), ML-IAP (Livin, KIAP, BIRC7), NAIP (BIRC1), Survivina (TIAP, BIRC5), Apollon (Bruce, BIRC6). Todas as IAPs possuem domínio BIR, característico dessa família de proteínas, mas apenas cinco possuem domínios RING (SALVESEN & DUCKETT, 2002).

A inibição direta das caspases é o mecanismo mais bem conhecido pelo qual as IAPs impedem a apoptose, mas possivelmente elas também regulam apoptose por outros mecanismos como regulação do ciclo celular, degradação de proteínas e cascatas de transdução de sinal independentes das caspases (TAKAHASHI et al, 1998; SCHIMMER, 2004).

#### 1.4.1.1. Survivina

A survivina é uma proteína bifuncional que tem papel na regulação do ciclo celular e na inibição de apoptose (JIANG et al, 2001). Ela é caracterizada pela presença de um domínio BIR e não possui o domínio RING carboxi-terminal na sua estrutura (SAH et al, 2006).

A survivina é expressa de uma maneira dependente do ciclo celular. Sua expressão é dez vezes maior na fase G2/M do que nas fases G2 ou S do ciclo celular. O promotor do gene da survivina tem um elemento dependente do ciclo celular e regiões de homologia com proteínas do ciclo. Essas regiões estão tipicamente presentes em genes expressos na fase G2/M, como ciclina A e ciclina B (SAH et al, 2006). A survivina atua na divisão celular controlando a estabilidade dos microtúbulos e formação de um fuso mitótico normal, como mostrado em células onde anticorpos contra survivina foram injetados e ocorreu retardo das fases de pró-metáfase e metáfase, e formação de fusos mitóticos encurtados com quantidade de microtúbulos drasticamente reduzida (GIODINI et al, 2002). Também foi demonstrado que quebras dessas interações survivina-microtúbulos resultam em perda da função anti-apoptótica da survivina e aumento da atividade de caspase-3 (LI et al, 1998).

A survivina tem um papel importante na supressão de apoptose pela inibição direta ou indireta das caspases. Ela tem capacidade de se associar diretamente com Smac/DIABLO, uma proteína pró-apoptótica liberada pela mitocôndria junto com o citocromo *c* que promove a ativação das caspases pela ligação e neutralização das IAPs (SONG et al, 2003), e com as caspases efetoras -3 e -7 (TAMM et al, 1998) sendo capaz de inibir a apoptose induzida tanto pela via extrínseca como pela via intrínseca.

Há cinco variantes diferentes da survivina, produzidas por *splicing* alternativo do seu pré-RNA: survivina selvagem, survivina- $\Delta$ Ex3, survivina 2 $\alpha$ , survivina-2B e survivina 3B que possuem regulação diferenciada e parecem ter papéis diferentes no desenvolvimento do câncer (LI & LING, 2006).

A survivina é altamente expressa em órgãos embrionários e fetais, mas sua expressão não foi detectada em tecidos normais diferenciados. A survivina também está expressa na maioria dos tipos tumorais incluindo cânceres de pulmão, mama, cólon, gástrico, esofágico, pancreático, bexiga, uterino, ovariano e próstata, linfomas não-Hodgkin, leucemias,

neuroblastoma, tumores cerebrais, feocromocitoma, sarcomas de tecidos moles, melanomas e outros cânceres de pele (TAMM et al, 1998; ZAFFARONI et al, 2005).

#### 1.4.2. Smac/DIABLO

Na busca por moléculas que antagonizassem os efeitos das IAPs, dois grupos independentes descreveram uma molécula pró-apoptótica que tinha a capacidade de se ligar e inibir IAPs: Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*) (DU et al, 2000) ou DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*) (VERHAGEN et al, 2000).

A Smac/DIABLO está localizada na mitocôndria e é liberada durante o estímulo apoptótico. Foi relatado que ela promove a atividade da caspase iniciadora-9, e das caspases efetoras-3 e -7 pela ligação às IAPs, como cIAP-1, cIAP-2, XIAP e survivina, com conseqüente neutralização dos efeitos inibitórios dessas proteínas. A Smac/DIABLO tem ainda a capacidade de potencializar a apoptose induzida por receptores de morte (via extrínseca) na presença de Bcl-x<sub>L</sub> sugerindo que também desempenha um papel nessa via (DU et al, 2000; SRINIVASULA et al, 2000).

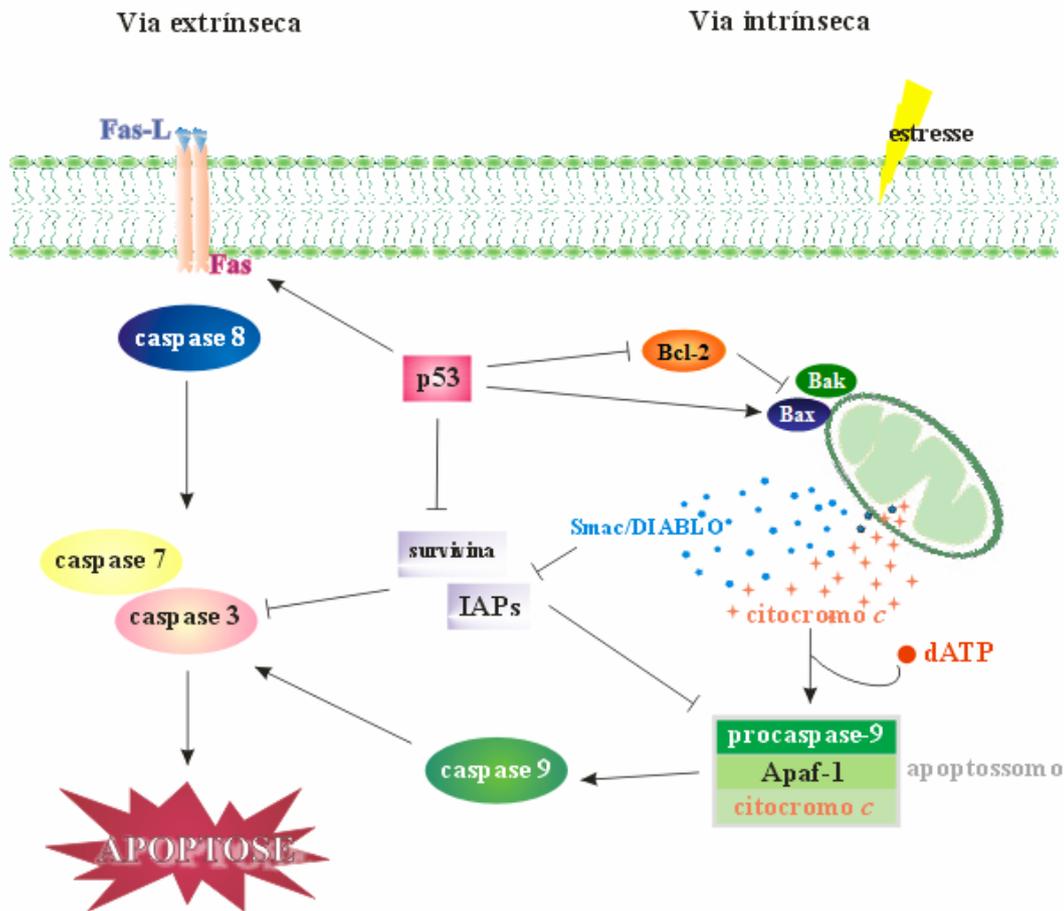
#### 1.4.3. p53 e apoptose

A proteína p53 promove apoptose através da ativação transcricional de vários genes alvo. Dentre esses, o receptor DR4, um dos receptores do ligante TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) que promove apoptose após ligação a TRAIL pela via extrínseca, foi mostrado como sendo regulado pela p53 (LIU et al, 2004). Da mesma forma, outros receptores como DR5, Fas, DcR1/TRID e DR2/TRUNDD também são regulados pela p53, embora os dois últimos não sejam transdutores de sinais apoptóticos, mas ao invés disso, competem com os receptores de “morte” pela ligação ao ligante, e assim, inibem a apoptose induzida por esses ligantes (LIU et al, 2005; SHEIKH & FORNACE, 2000). A p53 também regula a expressão das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, Bax, Noxa e PUMA, atuando também dessa forma na regulação da apoptose (NAKAJIMA & TANAKA, 2007; MIYASHITA & REED, 1995; MIYASHITA et al, 1994).

Estudos mostraram que a p53 selvagem liga-se diretamente ao promotor do gene da survivina reprimindo-o tanto em células com p53 endógena como induzida (HOFFMAN et al, 2002). De fato, um estudo realizado com a linhagem celular EU-4 derivada de leucemia linfoblástica aguda, mostrou que o tratamento dessas células com doxorrubicina gerou um aumento da expressão de p53 selvagem e esse aumento foi acompanhado por regulação negativa de survivina e apoptose. Entretanto, células com p53 mutada, expressando p53 constitutivamente, ou células p53-*null* não mostraram regulação negativa de survivina, e se mostraram resistentes a essa droga. (ZHOU et al, 2002).

Embora a maior parte dos efeitos da proteína p53 seja atribuída a sua função como fator de transcrição, alguns estudos sugerem que p53 também induz apoptose independentemente de nova síntese proteica. Foi relatado que a p53 induz apoptose pela ligação à proteína Bcl-2. Dessa forma, a p53 inativa Bcl-2 através da ligação a um domínio regulatório negativo, FLD (*flexible loop regulatory domain*), localizado na proteína Bcl-2, e assim os complexos Bax/Bcl-2 localizados na mitocôndria dissociam-se liberando Bax “livre” que atua na membrana mitocondrial promovendo permeabilização e liberação de citocromo *c* (DENG et al, 2006). Além disso, após estresse celular, a p53 mitocondrial tem capacidade de interagir fisicamente com o membro pró-apoptótico da família Bcl-2, a proteína Bak. Essa interação promove oligomerização de Bak, liberando essa proteína do seu complexo com a proteína anti-apoptótica da mesma família, Mcl1. Com isso, Bak livre, causa liberação de citocromo *c* da mitocôndria promovendo apoptose (LEU et al, 2004). De uma forma semelhante, a p53 citosólica ativa diretamente Bax, operando com um mecanismo análogo ao subgrupo de proteínas pró-apoptóticas BH3-*only* da família Bcl-2 e promovendo apoptose (CHIPUK et al, 2004).

A figura 4 resume as vias apoptóticas e algumas proteínas que atuam nesse contexto.



**Figura 4-Vias intrínseca e extrínseca da apoptose e algumas proteínas que atuam na sua regulação.** Via extrínseca: Receptores de “morte” (ex: Fas e TNFR1) ativados por seus ligantes (ex: Fas, TNF $\alpha$ ) ativam as caspases iniciadoras (ex: caspase-8), que por sua vez causam a ativação das caspases efetoras (ex: caspase-3 e -7) com conseqüente indução de apoptose. Via intrínseca: Proteínas pró-apoptóticas (ex: Bax, Bak) causam liberação de citocromo *c* e Smac/DIABLO pela mitocôndria. Citocromo *c* e dATP junto com procaspase-9 e Apaf-1 formam o apoptossomo que ativa caspase-9 com conseqüente ativação das caspases efetoras e apoptose. Smac/DIABLO antagoniza os efeitos das IAPs, incluindo survivina, que inibem o apoptossomo e as caspases efetoras. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (ex: Bcl-2) impedem a permeabilização da membrana mitocondrial. Alguns mecanismos pelos quais a p53 regula os processos apoptóticos são: ativação de receptores de membrana, inativação de Bcl-2, ativação direta, ou indireta de Bax e Bak, e repressão de survivina.

### 1.5. Mecanismo de resistência à quimioterapia mediado por moléculas transportadoras

O mecanismo mediado por proteínas de transporte é o mais comumente envolvido na quimioresistência nas doenças neoplásicas. No grupo das proteínas envolvidas nesse processo estão as moléculas pertencentes à superfamília dos transportadores ABC (adenosina trifosfato ou *ATP Binding-Cassette*), que funcionam como bombas de efluxo dependentes de energia que transportam quimioterápicos do interior para o meio extracelular, reduzindo as suas concentrações a níveis sub-letais. Dentre as moléculas pertencentes a este grupo, as mais estudadas são a glicoproteína-P (PgP), a proteína associada a multiresistência ou *multidrug resistance associated protein* (MRP) e a proteína relacionada à resistência a mitoxantrona ou *breast cancer resistance protein* (BCRP/MXT). Outra proteína também associada à multiresistência, mas não pertencendo à superfamília dos transportadores ABC, é a LPR (do inglês *lung-resistance related protein*) encontrada no citoplasma e relacionada com estruturas vesiculares, estando envolvida no transporte bidirecional de quimioterápicos entre o núcleo e o citoplasma conferindo resistência a drogas que se ligam ao DNA (STAVROVSKAYA, 2000).

A PgP é uma proteína transmembrana codificada pelo gene *MDR-1* localizado no cromossomo 7 (7q2.11) especializada no transporte celular dependente de energia. Ela promove o efluxo de diferentes agentes quimioterápicos tais como antimetabólitos, alcalóides da vinca e epipodofilotoxinas além de outros produtos naturais tóxicos para a célula. A superexpressão da PgP, diminui a concentração desses quimioterápicos no interior das células neoplásicas, impedindo-os de atingirem os seus alvos intracelulares e portanto, impedindo a morte celular (VAN DER BLIEK & BORST, 1989; STAVROVSKAYA, 2000).

A MRP é outro membro da família ABC de transportadores de membrana. Ela é uma glicoproteína integral de membrana que possui alto grau de homologia com a PgP. A MRP gera um mecanismo de resistência semelhante àquele mediado pela PgP e quando superexpressa, também diminui a concentração dos quimioterápicos no interior da célula (ZAMAN et al, 1994).

A proteína MRP, assim como a PgP, são bombas de efluxo dependentes de ATP cuja finalidade é a extrusão de substâncias citotóxicas para o meio extracelular. Ambas as bombas apresentam afinidade em comum para as antraciclinas, alcalóides da vinca e

epipodofilotoxina, extruindo também corantes fluorescentes como a rodamina-123 (Rho-123). Porém, a MRP e a PgP não apresentam exatamente o mesmo espectro de resistência. A PgP tem uma afinidade para grandes cátions hidrofóbicos e a MRP parece ser mais eficaz no transporte de ânions orgânicos. Adicionalmente, a MRP apresenta a capacidade de transportar glutathiona, componentes conjugados ao sulfato e glucuronidas (RENES et al, 2000).

### **1.6. Tratamento do LB: O LB como um modelo de entendimento de resistência tumoral**

O prognóstico dos pacientes com LB mudou drasticamente nas duas últimas décadas com a introdução de quimioterapia intensiva de curta duração (REITER et al, 1999, PATTE et al, 2001). Recentemente, o foco tem sido a modificação do tratamento para regimes eficazes, porém com menor toxicidade, principalmente, nas crianças (PATTE et al, 2007a). Outro foco é a exploração do conhecimento da biologia molecular da doença para o desenvolvimento de estratégias de terapia que possam resgatar os pacientes refratários ao tratamento inicial, ou que apresentam recidiva. O LB é um caso ímpar de doença maligna em que um tratamento utilizado inicialmente em crianças foi aplicado em pacientes adultos resultando em melhora da resposta e sobrevida (MAGRATH et al, 1996). No entanto, o emprego de regimes intensivos em adultos está relacionado a uma maior toxicidade incluindo, neurotoxicidade, mucosite severa e toxicidade hematológica. Alguns estudos mostram que adultos com doença de baixo risco podem ser tratados com regimes de quimioterapia menos intensivos, no entanto, os adultos em estágios avançados da doença, têm sobrevida inferior se o regime empregado for menos intensivo (LASCACE et al, 2004). O mesmo ocorre com os pacientes na faixa etária definida como adolescência (PATTE et al, 2007b). Desta forma torna-se mais evidente que a idade é um fator prognóstico relacionado à sobrevida, além da baixa tolerância dos pacientes de maior faixa etária à quimioterapia, sugerindo que diferenças inatas na biologia do tumor em diferentes faixas etárias possam ocorrer.

Um dos temas instigantes recentes relacionados à biologia do LB - além da identificação de uma assinatura molecular definida por *microarrays* (HUMMEL et al, 2006; DAVE et al, 2006) - tem sido a investigação dos mecanismos de resistência e refratariedade ao tratamento nesta doença. Estudos recentes têm investigado o papel dos mecanismos anti-apoptóticos envolvendo c-Flip e NF- $\kappa$ B. c-Flip é uma proteína que inibe a ativação da caspase 8 através

da inibição do seu recrutamento pelo complexo sinalizador de morte celular (IRMLER et al, 1997). A expressão dessa proteína em amostras tumorais de pacientes com LB foi correlacionada com uma sobrevida livre de eventos encurtada (24%), quando comparada com aquela dos pacientes que não expressavam este marcador (93%) (VALNET-RABIER et al, 2005). Tafuku e colaboradores (2006) evidenciaram o papel do NF- $\kappa$ B no LB. Estes autores mostraram que linhagens de LB positivas para o EBV expressam NF- $\kappa$ B ativado, e são resistentes à apoptose induzida por TRAIL. Outros mecanismos de resistência ao tratamento podem estar relacionados à presença de alterações cariotípicas complexas envolvendo os cromossomos 7 e 20, assim como, translocações envolvendo o braço curto do cromossomo 17, onde está localizado o gene *TP53* (KARPOVA et al, 2006). Também, as mutações do gene *TP53* podem influenciar a resposta ao tratamento (KLUMB et al, 2003).

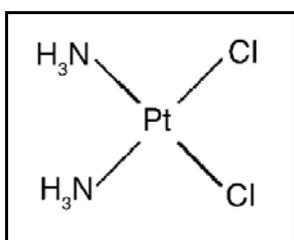
### **1.7. Mecanismo de ação dos agentes genotóxicos**

Agentes que induzem dano ao DNA – os denominados genotóxicos – têm sido usados com sucesso há décadas no tratamento de pacientes com câncer. A descoberta de que agentes químicos que interagiam ou induziam dano ao DNA tinham a capacidade de bloquear a progressão do câncer, abriu uma perspectiva infinita, e levou à descoberta de muitas moléculas que são usadas até hoje. As genotoxinas alteram o DNA das células e este dano é detectado por “sensores” levando a ativação da p53 e a morte das células tumorais. Estas drogas são em geral agentes que interagem diretamente com o DNA resultando em quebras, e interferindo com a replicação e transcrição, dois processos essenciais que quando danificados resultam em apoptose. Alguns agentes genotóxicos não interferem diretamente com o DNA, porém agem através da inibição de proteínas fundamentais para a síntese do DNA, ou proteínas responsáveis por manter a topologia do DNA (ex. topoisomerasas), resultando na inibição da replicação e síntese proteica (MICHOD & WIDMAN, 2007).

#### **1.7.1. Cisplatina (CDDP)**

Sintetizada pela primeira vez em 1847 por M. Peyrone, a cisplatina [cisdiaminodicloroplatino(II)] (Fig. 5) teve sua atividade quimioterápica contra o câncer

descoberta na década de 60. Atualmente, a cisplatina é um dos agentes citotóxicos mais amplamente usados no tratamento de malignidades epiteliais tais como câncer de pulmão, cabeça e pescoço, ovário, bexiga e testículo (BOULIKAS & VOUGIOUKA, 2003). Esta droga também é utilizada nos principais protocolos de recidiva dos LNH, incluindo o LB (HAGEMEISTER, 2002; MEY et al, 2006). Entretanto, a utilização desse agente pode levar a reações adversas severas incluindo toxicidade renal e gastrointestinal, neuropatia periférica, astenia e ototoxicidade (BOULIKAS & VOUGIOUKA, 2003)



**Figura 5-** Fórmula molecular plana da cisplatina (Brabec & Kasparkova, 2005).

A principal via pela qual a cisplatina, assim como outros agentes quimioterápicos induz morte celular é por apoptose, através da indução de diversas vias de transdução de sinal, especialmente da família c-Jun N-terminal quinase (JNK) de MAP (*mitogen-activated protein*) quinases. O alvo da cisplatina é o DNA. Ela reage com sítios nucleofílicos no DNA formando mono-aductos e ligações cruzadas entre as fitas, que podem ocorrer na mesma fita ou em pontos adjacentes entre duas fitas do DNA (BOULIKAS & VOUGIOUKA, 2003) que causam parada do ciclo celular e apoptose. A principal via de reparo do DNA para esses aductos é por excisão de nucleotídeos, mas a eficiência do reparo é baixa (WERNYJ & MORIN, 2004).

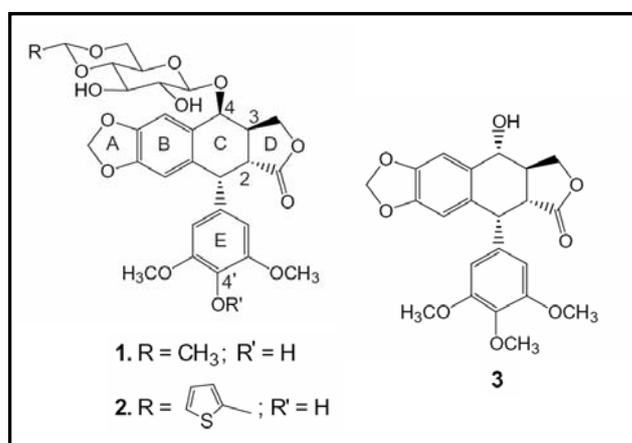
A resistência à cisplatina é um problema freqüentemente encontrado na terapia de alguns tipos de tumor. Ela pode ser mediada por vários mecanismos como aumento do efluxo da droga, diminuição da entrada de droga na célula, detoxificação, intenso reparo do DNA, ou mecanismos que levam a um aumento da sobrevivência das células, principalmente alterações nas vias de sinalização que afetam a apoptose (WERNYJ & MORIN, 2004).

### 1.7.2. Etoposídeo (VP-16)

As podofilotoxinas são lignanas de ocorrência natural, encontradas em plantas,

particularmente no gênero *Podophyllum*. Há mais de 1000 anos elas têm sido usadas como medicamento para diversas condições, entretanto devido às propriedades tóxicas das podofilotoxinas elas foram retiradas da farmacopéia Americana em 1942. Após esse período, estudos mostraram que as podofilotoxinas eram úteis no tratamento de verrugas venéreas e posteriormente outras características dessas substâncias foram sendo elucidadas como as propriedades anti-mitóticas pela ligação à tubulina, e antineoplásicas. Entretanto, os efeitos de toxicidade gastrointestinal tornavam o uso clínico dessas substâncias inaceitável (IMBERT, 1998).

Na década de 50, pesquisadores do Sandoz Pharmaceuticals começaram a sintetizar diversos derivados de podofilotoxina na tentativa de identificar agentes que mantivessem a atividade anti-neoplásica, mas apresentassem menos toxicidade. A partir dessas tentativas, foram sintetizados o etoposídeo (VP-16) e o teniposídeo (VM-26). (Fig. 6) que em estudos clínicos mostraram atividade anti-neoplásica na leucemia mielóide aguda (LMA), doença de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin, câncer de pulmão (de células pequenas e não pequenas), câncer gástrico, câncer de mama e câncer de ovário (HANDE, 1998).



**Figura 6-** Fórmulas moleculares planas do etoposídeo (1), teniposídeo (2), e podofilotoxina (3) (XIAO et al, 2004).

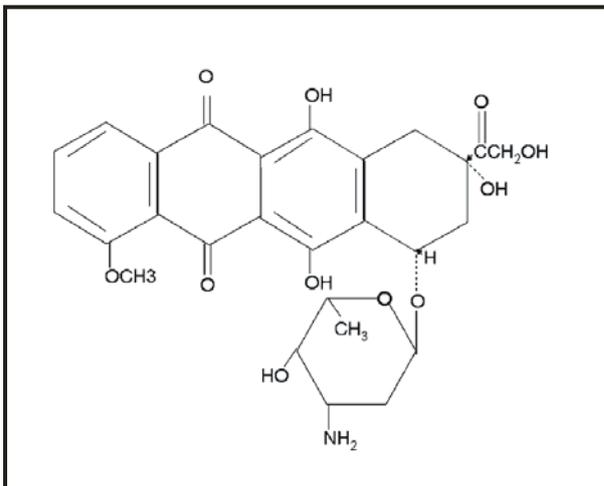
O etoposídeo (VP-16) é um dos agentes quimioterápicos mais usados na terapia do câncer. O fármaco é fase-específico, agindo no final da fase S e início da fase G<sub>2</sub> do ciclo celular pela inibição da topoisomerase II (SLEVIN, 1991).

As topoisomerases do tipo II são enzimas dependentes de ATP que catalisam o transporte de um segmento de DNA (o segmento T) através de uma quebra transitória na fita dupla de DNA de um segundo segmento (segmento G). O papel dessa enzima na célula é

controlar o super-enrolamento do DNA e relaxar as concatenações que surgem durante a replicação ou recombinação do DNA (CHARVIN et al, 2003). O etoposídeo, assim como outros inibidores de topoisomerase II, não causa a morte das células pelo bloqueio da função catalítica da enzima. Ao invés disso, esse fármaco aumenta a concentração do estado estacionário dos complexos de DNA clivados pela topoisomerase II dentro das células, impedindo a re-ligação das quebras das duplas-fitas no genoma de células em replicação. Essa ação converte as topoisomerases em toxinas fisiológicas que introduzem altos níveis de quebras transitórias no genoma das células (HANDE, 1998). Este agente indutor de dano ao DNA, freqüentemente usado em protocolos de tratamento de pacientes com LB refratário ao tratamento de primeira linha, também pode ativar o *checkpoint* da mitose, à semelhança de agentes inibidores de microtúbulos como os alcalóides da vinca (MIKHAILOV et al, 2002; VOGEL et al, 2005).

### 1.7.3. Doxorrubicina (DOX)

Doxorrubicina (DOX) ou adriamicina (Fig. 7) é um antibiótico antraciclina da classe das quinonas amplamente usado para o tratamento de vários tipos de tumores. O principal mecanismo de ação proposto para esse composto envolve dano ao DNA pela inibição da topoisomerase II e geração de radicais livres de oxigênio por reação redox (MIZUTANI et al, 2005). Entretanto, foram propostos vários outros mecanismos, além dos já citados, para as ações citostáticas e citotóxicas da DOX e outras antraciclinas. Dentre esses mecanismos estão incluídos intercalação no DNA com conseqüente inibição da biosíntese de macromoléculas, ligação ao DNA e alquilação, interferência com o desenrolamento do DNA ou separação das fitas do DNA atividade da helicase e efeitos diretos na membrana (GEWIRTZ et al, 1999).



**Figura 7-** Fórmula molecular plana da doxorubicina (WOLF & BAYNES, 2006).

Um dos principais efeitos adversos do tratamento com DOX é cardiomiopatia e insuficiência cardíaca e esse efeito é devido a capacidade desse composto induzir apoptose em cardiomiócitos pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KALYANARAMAN et al, 2002). Entretanto, o mecanismo anti-tumoral da DOX envolve inibição de topoisomerase II e síntese de DNA, e esse mecanismo é diferente do mecanismo de cardiotoxicidade, ou seja, DOX induz apoptose em células normais e células tumorais por mecanismos diferentes. Foi mostrado que em células endoteliais e cardiomiócitos, DOX induziu apoptose por um mecanismo mediado pela formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e esse mecanismo é independente da ativação de p53. Entretanto, a indução de apoptose em células tumorais foi dependente da ativação de p53 (WANG et al, 2004).

#### 1.7.4. Radiação Ionizante

A radiação ionizante gera quebras da dupla-fita de DNA, que levam a indução dos *checkpoints* do ciclo celular resultando em parada do ciclo celular nas fases G1/S ou G2/M, ou indução de apoptose. O dano das células causado pela radiação ionizante ocorre através de um aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que leva a indução de mecanismos de defesa anti-oxidativos na célula (VUCIĆ et al, 2006).

Os níveis de p53 selvagem tendem a aumentar após indução com radiação ionizante, provavelmente como o resultado do aumento da meia vida da proteína e aumento da tradução do RNA mensageiro (RNAm). A radiação ionizante também tem capacidade de causar

fosforilação da serina 15 da p53, em parte pela atividade de ATM (GIACCIA & KASTAN, 1998).

Aumento da atividade da proteína quinase ATM é observado em todas as fases do ciclo celular em células induzidas com radiação ionizante, portanto diversas vias atuam gerando a resposta a este estímulo, já que ATM tem diversos alvos funcionais, além de p53, em diferentes fases do ciclo celular (PANDITA et al, 2000).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo principal

- Avaliar a correlação entre o tipo de mutação da proteína p53, presente em linhagens derivadas do Linfoma de Burkitt, e o seu *status* funcional, através da análise da viabilidade celular, indução de apoptose, progressão no ciclo celular e indução da expressão das proteínas p53 e p21 de forma a explorar mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar os efeitos mediados pelos quimioterápicos doxorrubicina, cisplatina e etoposídeo na indução da apoptose, progressão no ciclo celular e expressão das proteínas p53 e p21 nas linhagens Daudi e Raji.
- Avaliar os efeitos da radiação ionizante nas linhagens Daudi e Raji, na indução de apoptose, progressão no ciclo celular e indução da expressão das proteínas p53 e p21.
- Analisar o perfil de expressão das proteínas relacionadas a apoptose, survivina e Smac/Diablo, nas linhagens Daudi e Raji, antes e após a exposição à radiação ionizante e aos quimioterápicos doxorrubicina, cisplatina e etoposídeo.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Linhagens celulares**

As linhagens celulares selecionadas para este estudo foram Daudi, estabelecida por E. Klein e G. Klein em maio de 1967 e Raji, estabelecida por R. J. V. Pulvertaft em 1963. Ambas são derivadas do LB e são infectadas pelo EBV.

As linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 (*RPMI medium 1640* /Invitrogen Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Foetal Bovine Serum*/Invitrogen Life Technologies) em atmosfera úmida, 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e a renovação do meio de cultura foi realizada a cada três dias.

##### **3.1.1. Caracterização das linhagens celulares**

###### **3.1.1.1. Análise citogenética das linhagens celulares**

A análise cromossômica por bandeamento G das linhagens Daudi e Raji foi realizada utilizando a técnica de identificação descrita por Seabright (1971). A análise citogenética foi realizada pelo Laboratório de Citogenética do Centro de Transplante de Medula Óssea-CEMO, do INCA.

###### **3.1.1.2. Detecção do vírus Epstein-Barr nas linhagens**

A presença EBV foi analisada através do estudo da expressão gênica do EBV por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando o método TaqMan (BUSTIN, 2002). O PCR em tempo real pelo método TaqMan é um sistema onde a reação em cadeia da polimerase convencional contém iniciadores (*primers*) e uma sonda marcada com 2 moléculas que emitem fluorescência (*reporter* e *quencher*). Durante a amplificação, a

sonda é clivada causando a separação das moléculas *reporter* e *quencher* com emissão da fluorescência. A intensidade da fluorescência aumenta em proporção direta à quantidade do produto específico amplificado e, ciclo a ciclo, as alterações são mensuradas. Os resultados são computados durante a fase exponencial da reação, quando a fluorescência emitida é proporcional à identificação do número de cópias do DNA molde. A vantagem de usar sondas marcadas com fluoróforos é a necessidade de ocorrer uma hibridização específica entre a sonda e a seqüência alvo para gerar emissão de fluorescência. Desta forma, ampliações não específicas devido a artefatos como *primer-dimers* não geram sinais, garantindo a especificidade da reação (BUSTIN, 2002; KWOK & HIGUCHI, 1989).

Foram utilizados *primers* e sondas para um fragmento gênico *EBNA1* do vírus. Os dados da seqüência do genoma do EBV foram obtidos no *GenBank Sequence Database* (número de acesso V01555). *Primers* e sondas do gene *EBNA1* foram desenhados pela empresa Applied Biosystem®. Foi utilizada uma sonda TaqMan MGB (*Applied Biosystems*) com fluorocromo *reporter* 6-FAM (6-carboxilfluoresceína) ligado a porção 5' da sonda, um *quencher* não fluorescente na porção 3' da sonda para detecção da seqüência de interesse (concentração final de 250 nM) (MGB (*minor groove binder*)).

As reações foram realizadas sempre em duplicata e confirmadas em uma reação posterior. Como controle negativo não foi adicionado DNA do vírus em uma das duplicatas. Esta metodologia foi implantada recentemente no Laboratório de Hematologia Celular e Molecular do Serviço de Hematologia do Hospital do Câncer I/ INCA (MACHADO et al, 2007).

O equipamento *Applied Biosystems® 7500 Real Time PCR System* foi utilizado para a reação.

### **3.1.1.3. Expressão das proteínas p53 e p21**

A caracterização do nível de expressão das proteínas p53 e p21 nas linhagens celulares sem exposição a agentes citotóxicos foi realizada por citometria de fluxo e por *Western blotting*. A seguir, descrevemos a metodologia utilizada para a técnica de citometria de fluxo. A metodologia referente à técnica de *Western blotting* utilizada para essa etapa do estudo será descrita mais adiante, para facilitar o entendimento e organização dos resultados.

### 3.1.1.3.1. Marcação com anticorpos monoclonais

Foram utilizadas  $4 \times 10^5$  células provenientes da suspensão celular preparada como descrito anteriormente para marcação com cada proteína (p53 e p21). O volume correspondente a essa concentração celular foi centrifugado a 2000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, após homogeneização, foi incubado com solução de lise (*BD FACST<sup>TM</sup> Lysing Solution* / BD Biosciences) previamente diluída a 10% em água destilada por 10 minutos em temperatura ambiente para permeabilização celular. Após esse tempo, foi feita uma centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos, descarte do sobrenadante, homogeneização do sedimento, e lavagem com 2 mL de solução de Tween-20 diluído a 0,5% em solução salina tamponada com fosfato pH 7.4 (PBS/Tween-20 0,5%), seguida por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos com posterior descarte do sobrenadante e homogeneização do sedimento. A seguir foram adicionados aos tubos 500  $\mu$ L de albumina sérica bovina a 1% em PBS e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação com descarte do sobrenadante, o sedimento homogeneizado foi incubado com 5  $\mu$ L dos anticorpos monoclonais de camundongo anti-p53 humana (*DO-7* / DakoCytomation) diluído a 1:50, ou anti-p21<sup>WAF1/Cip1</sup> humana (*NCC-RAS-001* / DakoCytomation) diluído a 1:25, ou sem anticorpo (controle isotípico) por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após essa incubação foi realizada lavagem com 2 mL de solução de PBS/Tween-20 0,5%, centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos, descarte do sobrenadante e homogeneização do sedimento. A seguir, foram adicionados 5  $\mu$ L do anticorpo anti-Ig conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*F 0313* / DakoCytomation) em todos os tubos por 30 minutos mantendo em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após lavagem com 2 mL de solução de PBS/Tween-20 a 0,5%, centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e descarte do sobrenadante, ao sedimento homogeneizado foram adicionados 300  $\mu$ L de formaldeído diluído a 1% em PBS e os tubos foram armazenados a 4°C ao abrigo da luz até o momento da leitura.

### 3.1.1.3.2. Leitura e análise em citômetro de fluxo

As leituras e as análises foram feitas em um citômetro de fluxo de 3 canais (*BD FACScan™ Flow Cytometer* / BD Biosciences) empregando o programa CellQuest (*The Cell Quest™ Software* / BD Biosciences) com aquisição de 12000 eventos. Os parâmetros FSC X SSC em escala linear, foram usados para selecionar a população de células (*gate*) que seria analisada quanto à expressão das proteínas em estudo. O nível de expressão das proteínas p53 e p21 foi analisado com o parâmetro FL1, em escala logarítmica, que detecta a fluorescência verde liberada pelo fluorocromo FITC, que indica a reação antígeno/anticorpo.

Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas e em percentual da população celular positiva para os anticorpos com os quais a marcação foi realizada. A quantificação antigênica das proteínas p53 e p21 foi dada pela média de intensidade de fluorescência (MIF), que foi calculada como a razão da intensidade de fluorescência da amostra marcada com os anticorpos monoclonais anti-p53, e -p21, respectivamente, pela intensidade de fluorescência da amostra marcada com o anticorpo anti-IgG1 (controle).

## 3.2. Status da proteína p53 nas linhagens celulares do estudo

### 3.2.1. Descrição de mutações nas linhagens celulares Daudi e Raji

As informações foram obtidas no banco de dados de mutações da proteína p53 em linhagens celulares da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - *International Agency for Research in Cancer*) (PETITJEAN et al, 2007).

No banco de dados do IARC as informações são arquivadas tendo como base publicações descritas na literatura cuja metodologia de detecção de mutações da p53 foi realizada por seqüenciamento de DNA. Para algumas linhagens, inclusive para as selecionadas em nosso estudo, há discordância em relação ao sítio da mutação e esta informação é assinalada no banco de dados.

Na linhagem Daudi foram descritas duas mutações do gene *TP53* nesse banco de dados. A mutação R213X está localizada no éxon 6, códon 213 e causa a troca de um

nucleotídeo citosina por uma timina (CGA → TGA) levando a uma substituição do aminoácido arginina por um códon de parada (stop) (mutação *frameshift*) no sítio de ligação ao DNA da proteína. Este foi o primeiro relato de mutações do gene *TP53* em linhagens derivadas do LB e foi descrito por Gaidano et al. em 1991. A outra mutação na linhagem Daudi assinalada no banco de dados do IARC é a G266E e só foi descrita em 2004 no COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer of Sanger Institute*) localizada no éxon 8, códon 266. Esta mutação causa a troca de uma guanina por adenina (GGA → GAA) levando a substituição do aminoácido glicina por um glutamato em um sítio de ligação ao DNA (BAMFORD et al, 2004).

Na linhagem Raji também foram descritas duas mutações no banco de dados do IARC. Este dado é discordante em 2 estudos. Uma mutação *missense* foi descrita por Farrell et al. (1991) localizada no códon 213 em (éxon 6) R213Q e causa a substituição de uma guanina por adenina (CGA → CAA) levando a troca do aminoácido arginina por uma glutamina no sítio de ligação ao DNA da proteína. Esta mutação é descrita em somente um alelo do gene *TP53*. Ainda há uma descrição de mutação no éxon 7, códon 234 que leva a uma mutação *missense* Y234H ocorrendo a troca tirosina por histidina e foi relatada por Chow et al (1993) afetando um só alelo.

### 3.2.1.1. Extração e quantificação do DNA das linhagens

Inicialmente, uma suspensão celular contendo  $10^6$  células foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi lavado com cloreto de sódio 0,9% e centrifugado novamente a 2000 rpm por 5 minutos. O precipitado de células resultante foi então armazenado em  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior extração do DNA.

A extração do DNA das células foi realizada usando o kit *GFX Genomic Blood DNA Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences) seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA das linhagens celulares e de indivíduos saudáveis (controle negativo) foi quantificado (*NanoDrop*<sup>®</sup> *ND-1000* /NanoDrop) em comprimento de onda de 260 nm, diluído para 100 ng/ $\mu\text{L}$  e posteriormente 100 – 500 ng de DNA foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o segmento de DNA correspondente aos éxons onde foram descritas as mutações no gene *TP53* nessas linhagens. O DNA de indivíduos saudáveis foi usado como controle negativo das mutações.

### 3.2.1.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os *primers* usados para esse estudo foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies e o tamanho, em pares de bases, dos produtos resultantes da PCR estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1-** Sequências dos *primers* usados nas reações de PCR para os éxons 6, 7 e 8 do gene *TP53* e tamanho dos respectivos produtos amplificados

Éxon	Direção	Seqüência	Produto (bp)
6	Senso	5' CAC TGA TTG CTC TTA GGT CT 3'	144
	Antisenso	5' AGT TGC AAA CCA GAC CTC AG 3'	
7	Senso	5' CTA GGT TGG CTC TGA CTG TA 3'	118
	Antisenso	5' TGA CCT GGA GTC TTC CAG TG 3'	
8	Senso	5' CTT CTC TTT TCC TAT CCT GA 3'	180
	Antisenso	5' TCT TGT CCT GCT TGC T 3'	

A reação de PCR para os éxons 6 e 8 foi realizada em um volume final de 25 µL e para o éxon 7 de 45 µL. Cada reação era composta de 100-500 ng de DNA; 25 pmoles de cada *primer* dos éxons 6, 7 ou 8; 0,2 mM de dNTPs; 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies); 1,5 a 3 mM/L de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen Life Technologies) e Tampão de Reação 10X (*10X PCR Buffer* / Invitrogen Life Technologies). Para os controles negativos da reação não foi adicionado DNA à reação. Essa mistura foi então colocada em um termociclador (*PTC-100* /MJ Research) e submetida à reação de PCR de acordo com o programa mostrado na tabela 2, exceto para o éxon 6, em que uma reação de “*hot start*” foi realizada. Todos os componentes da mistura de reação, exceto a Taq DNA Polimerase foram colocados no termociclador e após uma desnaturação inicial durante 10 minutos a 98°C, a enzima foi então adicionada e a reação procedeu com as etapas subseqüentes. O programa da reação de PCR para esse éxon está descrito na tabela 3.

**Tabela 2:** Etapas de ciclagem da reação de PCR para os éxons 7 e 8.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	94 °C	2 min
2	94 °C	1 min
3	58 °C	1 min
4	72 °C	2 min
5	Repete etapas 2 a 4 – 35 vezes	
6	72 °C	7 min
7	Fim	

**Tabela 3:** Etapas de ciclagem da reação de PCR “*hot start*” para o éxon 6.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	98 °C	10 min
2	Pausa para acrescentar a solução de Taq DNA	
3	94 °C	2 min
4	55 °C	1 min
5	72 °C	2 min
6	Repete etapa 3 a 5 – 35 vezes	
7	72 °C	7 min
8	Fim	

### 3.2.1.3. Purificação do DNA para seqüenciamento

Os produtos amplificados na reação de PCR foram submetidos à purificação visando posterior seqüenciamento. Ao volume total dos produtos da reação de PCR foram misturados 2 µL de tampão de amostra contendo os corantes azul de bromofenol e xileno cianol e aplicados em um gel de agarose a 2% imerso em tampão TAE 1X (Trizma base, EDTA 0,5 M pH 8,0, Ácido acético glacial) e já contendo brometo de etídeo (10 µg/µL). Como marcador de aferição dos produtos gerados foi utilizado um padrão de peso molecular de 100 bp (*100 bp DNA Ladder* / Invitrogen Life Technologies). A corrida eletroforética do gel com os fragmentos amplificados foi realizada a 100 volts por 1 hora. Após esse tempo, foi feita excisão das bandas correspondentes aos éxons estudados de cada linhagem. As bandas foram então colocadas em tubos identificados e purificadas usando o *GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences) conforme instruções do fabricante. Após este procedimento o DNA purificado foi quantificado (*NanoDrop® ND-1000* /NanoDrop) em comprimento de onda de 260 nm.

### 3.2.1.4. Seqüenciamento do DNA

Uma massa de 50 ng do DNA de cada produto purificado foi submetida a seqüenciamento pela empresa Macrogen (Coréia do Sul) usando os *primers* correspondentes a cada éxon cuja mutação foi referida no Banco de dados do IARC. Para a linhagem Raji foram seqüenciados os éxons 6 e 7, e para a linhagem Daudi os éxons 6 e 8.

As seqüências obtidas foram alinhadas às seqüências de p53 selvagem através do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível *online* através do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando os parâmetros padrão de análise.

### 3.3. Caracterização funcional da proteína p53 nas linhagens

A análise funcional da proteína p53 nas linhagens Daudi e Raji foi realizada através da utilização de radiação ionizante gama e três quimioterápicos (cisplatina, etoposídeo e doxorubicina), com posterior avaliação da capacidade desses agentes induzirem apoptose, parada do ciclo celular, e expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular e apoptose. O perfil de resistência à quimioterapia também foi avaliado e correlacionado com o *status* da proteína p53.

As análises da indução de apoptose e ciclo celular não foram realizadas com a utilização de doxorubicina. Isso se deu pelo fato de que a concentração desse quimioterápico necessária para o estudo interferiu na leitura do citômetro de fluxo, pela emissão de fluorescência do mesmo comprimento de onda que a emitida pelo reagente utilizado nos ensaios (iodeto de propídeo), impossibilitando uma análise precisa dos dados. Entretanto, o estudo da expressão de p53 e proteínas relacionadas ao ciclo celular, assim como o perfil de resistência a quimioterapia foi testado também com essa droga.

#### 3.3.1. Ensaio de citotoxicidade de agentes quimioterápicos (MTT)

O ensaio do MTT foi usado para medir a citotoxicidade dos quimioterápicos etoposídeo (VP-16), cisplatina (CDDP) e doxorubicina (DOX) sobre as linhagens celulares Daudi e Raji. Esse ensaio mede a capacidade de atividade da desidrogenase mitocondrial. Em células vivas, o sal brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium (MTT) é reduzido para formazana (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazana) que pode ser analisada colorimetricamente (MOSMANN, 1983). Dessa forma esse método foi usado para avaliar a capacidade citotóxica das drogas estudadas e determinar a dose capaz de diminuir a viabilidade celular de 50% das células ( $DL_{50}$ ) em 48 horas de exposição ao fármaco.

Foram usadas cinco concentrações de cada fármaco na realização do experimento. Inicialmente o experimento foi realizado com uma faixa mais ampla de concentrações, por exemplo 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M e 1 mM, para que se tivesse uma noção de onde a concentração ideal estaria, já que o perfil de resposta dessas linhagens a essas drogas não era

conhecido.

Com base nesse rastreamento inicial, a faixa de dosagem foi sendo reduzida até que a faixa ideal foi alcançada. A faixa considerada ideal era aquela na qual a concentração mais baixa e a concentração mais alta utilizadas forneciam valores de viabilidade extremos e as concentrações intermediárias forneciam valores intermediários de viabilidade para ambas as linhagens.

Dessa forma, as faixas de dosagem ideais foram de 0,1 µM; 0,2 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM e 5 µM de doxorubicina (DOX) para a linhagem Raji e 0,2 µM; 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM e 5 µM para a linhagem Daudi; 0,312 µM; 0,625 µM; 1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM e 10 µM de etoposídeo (VP-16) para a linhagem Raji e 5 µM; 10 µM; 25 µM; 50 µM; 75 µM e 150 µM da mesma droga para a linhagem Daudi e 5 µM; 10 µM; 15 µM; 20 µM; 25 µM e 30 µM de cisplatina (CDDP) para a linhagem Raji e 10 µM; 15 µM; 20 µM; 25 µM e 30 µM e 50 µM para a linhagem Daudi.

Para realização do experimento, uma suspensão celular contendo  $2 \times 10^5$  células/mL de cada linhagem celular foi preparada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Em cada poço de uma placa de 96 poços foram colocados 10 µL das soluções preparadas pela diluição de cada droga em NaCl 0,9% para as concentrações finais indicadas anteriormente, 100 µL da suspensão celular e 90 µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Nos poços de controle, ao invés da adição de droga, foi adicionado apenas diluente (NaCl 0,9%). Em cada experimento foram feitas triplicatas para cada concentração de droga.

As células foram incubadas em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24, 48 e 72 horas. Quatro horas antes de terminar o tempo estabelecido (24, 48 ou 72 horas) foram adicionados 20 µL de MTT (20 mg/mL). As placas foram então mantidas nas mesmas condições de incubação anteriores pelas quatro horas restantes para formação dos cristais de formazana. Após esse tempo, 180 µL do sobrenadante foram retirados de cada poço, 150 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) foram adicionados e homogeneizados para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial. A seguir foi feita a medida da densidade óptica por espectrofotometria em comprimento de onda de 570 nm (*MiniSwift* / Tecan).

A porcentagem de viabilidade celular foi então calculada com base na densidade óptica encontrada nos poços de controle em relação aos poços com droga e a média de três experimentos independentes foi utilizada para calcular a DL<sub>50</sub> em 48 horas.

### **3.4. Tratamento das células das linhagens com os quimioterápicos e radiação gama.**

Suspensões celulares contendo  $10^5$  células/mL de cada linhagem em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foram irradiadas com 5-Gy de raios gama em temperatura ambiente por um irradiador de  $Cs^{137}$  (*IBL 437C* / CIS Biointernational) durante 20 minutos ou tratadas com as concentrações correspondentes às  $DL_{50}$  dos quimioterápicos DOX, VP-16 e CDDP, e mantidas em atmosfera contendo 5% de  $CO_2$  a  $37^\circ C$  pelos tempos de 3, 8, 24 e 48 horas. Suspensões celulares sem os devidos tratamentos foram usadas como controles (tempo 0h).

### **3.5. Análise do ciclo celular e apoptose após indução com radiação gama e quimioterapia**

#### **3.5.1. Ciclo Celular**

O ciclo celular das linhagens celulares do estudo foi analisado pela marcação com iodeto de propídeo e leitura em citômetro de fluxo. O iodeto de propídeo é um fluorocromo que tem a capacidade de se ligar ao material genético da célula. Dessa forma, a marcação das células com esse fluorocromo, após degradação do RNA pela enzima RNase, e leitura em citômetro de fluxo indicam a quantidade de DNA presente no interior das células, fornecendo assim informação sobre a fase do ciclo celular ( $G_0/G_1$ , S ou  $G_2/M$ ) em que as células se encontram.

Suspensões celulares contendo  $5 \times 10^5$  células tratadas pelos tempos determinados com radiação ionizante, VP-16 e CDDP, ou não-tratadas (controles), foram centrifugadas em um tubo de FACScan a 2000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, os *pellets* celulares foram homogeneizados e foi realizada adição de solução de iodeto de propídeo (iodeto de propídeo 74,8mM; tampão citrato 4mM; Triton X 100 0,3%) e solução de RNase (RNase 100mM, Tampão citrato 40mM) diluídas 1:1 a cada tubo. O material foi deixado incubar em temperatura ambiente por 15 minutos na ausência de luz e a seguir foi analisado em um citômetro de fluxo (*BD FACScan™ Flow Cytometer* / BD Biosciences®).

### 3.5.2. Apoptose

A marcação das células tratadas ou dos controles com anexina V e iodeto de propídeo (PI) foi usada para determinar o percentual de células vivas, em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose.

A anexina V é uma proteína que tem a capacidade de se ligar a fosfolípidos de membrana de forma dependente de cálcio. Durante o processo de apoptose, ocorrem várias alterações na célula. Dentre essas alterações está a exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática em uma fase precoce do processo apoptótico (VAN ENGELAND et al, 1998; CLODI et al, 2000). A anexina V liga-se à fosfatidilserina externalizada durante a apoptose inicial e, portanto, é um indicador de que esse processo está ocorrendo. O PI liga-se aos ácidos nucleicos e, por sua vez, sua ligação só ocorrerá se houver rompimento da membrana plasmática. Por esse motivo ele é indicador de que está ocorrendo necrose ou apoptose tardia na célula.

As suspensões celulares com  $5 \times 10^5$  células com ou sem os tratamentos descritos anteriormente foram centrifugadas e os precipitados homogeneizados. Aos precipitados foram então adicionados: tampão de ligação 10X (*Annexin V Binding Buffer* / BD Biosciences) diluído para 1X em água deionizada e 5  $\mu\text{L}$  de anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Annexin V-FITC* / BD Biosciences) em um volume final de 90  $\mu\text{L}$  por tubo. Após incubação de 15 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 1X, e no momento da leitura no citômetro de fluxo foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de PI (*Propidium Iodide Staining Solution* / BD Biosciences).

A leitura foi realizada com aquisição de 12000 eventos em um citômetro de fluxo de 3 canais (*BD FACScan™ Flow Cytometer* / BD Biosciences®) empregando o programa CellQuest (*The Cell Quest™ Software* / BD Biosciences).

### 3.6. Expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo

A detecção da expressão da proteína p53, do seu alvo transcricional, p21, e das proteínas relacionadas à apoptose, survivina e SMAC/Diablo foi realizada por *Western blotting* antes e após os tratamentos com os quimioterápicos ou radiação gama. A linhagem

celular A549 derivada de carcinoma de pulmão tratada com cisplatina foi utilizada como controle positivo para expressão de p21 e p53, por apresentar a proteína p53 selvagem.

### 3.6.1. Lise celular

As células, após tratamento como descrito anteriormente pelos tempos de 3, 8, 24 e 48 horas ou controles sem tratamento (tempo 0h) foram submetidas à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante as células foram lavadas três vezes com NaCl 0,9% e contadas. Alíquotas contendo  $10^6$  células foram então colocadas em tubos e centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado. A esse precipitado celular, foram adicionados 20  $\mu$ L de tampão de ressuspensão (Tampão RB; EDTA 10mM pH 8.0, Tris-HCl 40mM pH 7.5) e 20  $\mu$ L de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10%. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 100°C por 15 minutos e imediatamente congeladas.

### 3.6.2. Dosagem de proteína total dos lisados

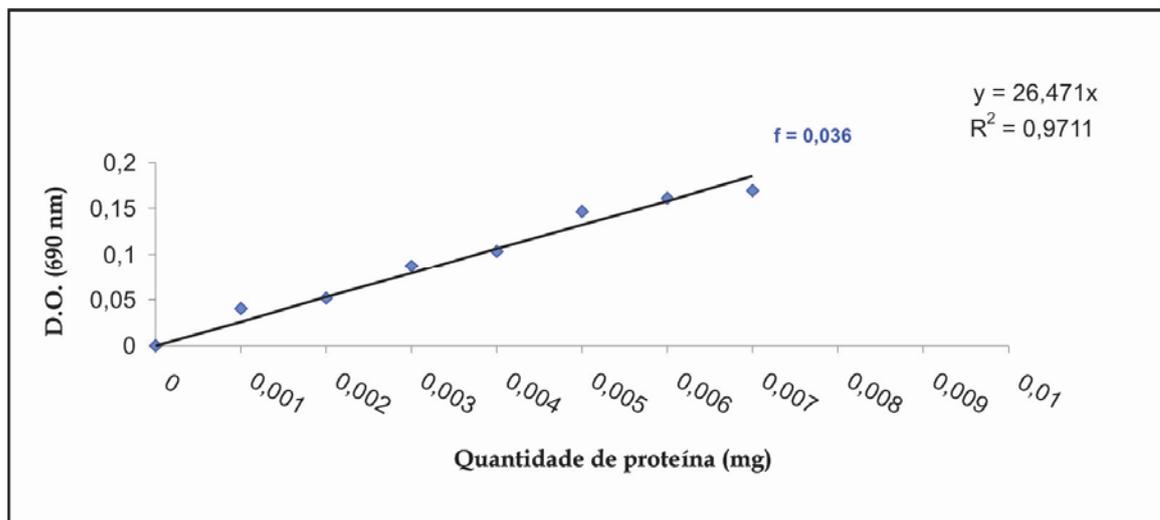
A quantidade de proteína presente nos lisados celulares foi quantificada por ensaio colorimétrico compatível com adição de detergente (*DC Protein Assay* / Bio-Rad).

As amostras e um controle negativo sem proteína foram submetidos ao ensaio de acordo com as recomendações do fabricante em uma placa de 96 poços e as densidades ópticas (D.Os) foram medidas em um comprimento de onda de 690 nm. Os valores das D.Os das amostras teve o valor da D.O. do controle descontado e a D.O. resultante foi utilizada para a quantificação de proteína (*Miniswift* / Tecan).

Para o cálculo da quantidade de proteína total presente nas amostras do estudo, foi realizada uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) diluída nos mesmos tampões utilizados para a lise das células (SDS 10% e tampão RB 1:1) para padronização da técnica.

### 3.6.2.1. Curva padrão de albumina sérica bovina (BSA)

Soluções com concentrações de 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,2 mg/mL e 1,4 mg/mL de BSA diluído em SDS 10% e tampão RB 1:1 foram utilizadas para a realização da curva padrão. Essas soluções e um controle negativo sem proteína foram submetidos ao ensaio como descrito anteriormente. O ensaio foi realizado em triplicata. Das D.Os correspondentes a cada solução foi descontada a D.O. correspondente ao controle negativo e esses valores foram plotados em um gráfico (D.O. vs. mg de proteína) (Fig.8). A partir desse gráfico, foi calculado o fator que relaciona a densidade óptica à quantidade de proteína para realização da quantificação de proteína das amostras do estudo.



**Figura 8-** Curva padrão de BSA construída para quantificação da proteína total dos lisados das amostras utilizadas no estudo.

### 3.6.3. Corrida eletroforética das proteínas

Uma massa de 50 µg de proteína de cada amostra foi utilizada para corrida em gel de SDS-PAGE. O volume correspondente a essa quantidade de proteína com a adição de tampão de corrida redutor (Tris-HCl pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%) com β-mercaptoetanol foi aplicado em gel de acrilamida 12%-SDS e submetido a uma corrida eletroforética a 70 volts por 18 horas em 18°C em tampão de corrida (Tris 0,025M; Glicina 0,192M; SDS 0,1%; pH 8.3) com a utilização de um marcador de peso molecular (*Full Range Rainbow™ Molecular Weight Markers* / GE Healthcare). Após a corrida, as proteínas foram eletrotransferidas a 100V por 1,5 hora a 4-8°C para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL Nitrocellulose Membrane* / GE Healthcare) em tampão de transferência 1X (Tris 25mM; Glicina 192mM, Metanol 20%).

### 3.6.4. Marcação com os anticorpos específicos

Inicialmente foi realizada uma etapa de bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo à membrana de nitrocelulose pela incubação das membranas em leite em pó desnatado diluído a 0,5% em solução salina tamponada com Tris (TBS) / Tween-20 0,2% (TBS/Tween 0,02%) por 2 horas. Após esse tempo, foram realizadas três lavagens de 5 minutos com TBS/Tween 0,02% e incubação das membranas com um dos anticorpos (Ac) primários listados na tabela 4, diluídos em leite em pó desnatado 0,5% em TBS/Tween 0,02% para as diluições também indicadas na tabela 4, *overnight* em 4-8°C. Após essa incubação, foram realizadas três lavagens de 15 minutos com TBS/Tween 0,02% e incubação com os anticorpos secundários específicos, listados na tabela 4, por 1 hora. O anticorpo anti-camundongo utilizado foi *HRP-Rat Anti-Mouse IgG* e o anticorpo anti-coelho foi *HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)*, ambos fabricados por Zymed Laboratories, Inc. e diluídos a 1:2000 em leite em pó desnatado 0,5% em TBS/Tween 0,02%. Após esta última incubação, foram realizadas mais quatro lavagens de 15 minutos com TBS/Tween 0,02% e as bandas foram detectadas por quimioluminescência com o uso do reagente ECL (*Amersham ECL™ Western blotting System*, GE Healthcare).

Todo o procedimento de bloqueio, lavagens e revelação foi realizado novamente na mesma membrana para detecção da proteína constitutiva  $\beta$ -actina que serve como padrão da reação de *Western blotting*, com o uso do anticorpo primário de camundongo anti- $\beta$ -actina humana (AC15, Sigma-Aldrich) diluído 1:2000 em leite em pó desnatado 0,5% em TBS/Tween 0,02%.

Após revelação as bandas foram quantificadas por densitometria (densidade ótica, D.O.) no programa Labworks 4.0. A expressão das proteínas de interesse (p53, p21, survivina e Smac/DIABLO) foi normalizada pela expressão da proteína  $\beta$ -actina (D.O. resultante = D.O. proteína de interesse / D.O.  $\beta$ -actina). As densitometrias (D.O. resultante) para a expressão da proteína de interesse nos diferentes tempos de tratamento foram comparadas sempre com as D.Os resultantes dos controles na mesma membrana.

**Tabela 4-** Listagem dos anticorpos primários, diluições e anticorpos secundários correspondentes usados para realização do *Western blotting*.

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Diluição</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
Monoclonal anti-p53 (DO-7, Dako Cytomation)	1:1000	anti-camundongo
Policlonal anti-p21 (C-19, Santa Cruz Biotechnology)	1:500	anti-coelho
Policlonal anti-survivina (R&D Systems)	1:2000	anti-coelho
Policlonal anti-Smac/DIABLO (Sigma-Aldrich)	1:3000	anti-coelho

Ac(s): Anticorpo(s)

Nota<sup>1</sup>: todos os anticorpos listados acima são anti-proteína humana.

Nota<sup>2</sup>: todos os anticorpos secundários foram diluídos a 1:2000 em TBS/Tween 20 0,02% / leite em pó desnatado 0,5%

### 3.7. Ensaio de modulação de bombas de efluxo das proteínas Pgp e MRP1

A atividade das bombas de efluxo das proteínas Pgp e MRP1 foi analisada usando o ensaio de efluxo de Rodamina-123 (Rho-123; Sigma, St. Louis) como descrito amplamente por nosso grupo (CAVALCANTI et al, 2004; SILVA et al, 2003, VASCONCELOS et al, 2007). Resumidamente,  $5 \times 10^5$  células foram ressuspensas em RPMI 1640 ou 200 ng/mL de ciclosporina A (CSA; Novartis) e incubadas com 200 ng/mL de Rho-123 por 45 minutos a 37°C. As células foram lavadas em PBS gelado após a incubação. RPMI ou RPMI com adição de CSA foram adicionados, e uma nova incubação de 45 minutos a 37°C foi realizada

sem a presença de Rho-123. Após essa segunda incubação as células foram analisadas por citometria de fluxo. Células sem Rho-123 ou CSA foram usadas como controles para definir os limites de fluorescência. Um deslocamento da curva de fluorescência referente ao tubo com a presença de Rho-123 e CSA é indicativo de positividade para atividade de bombas.

## 4. RESULTADOS

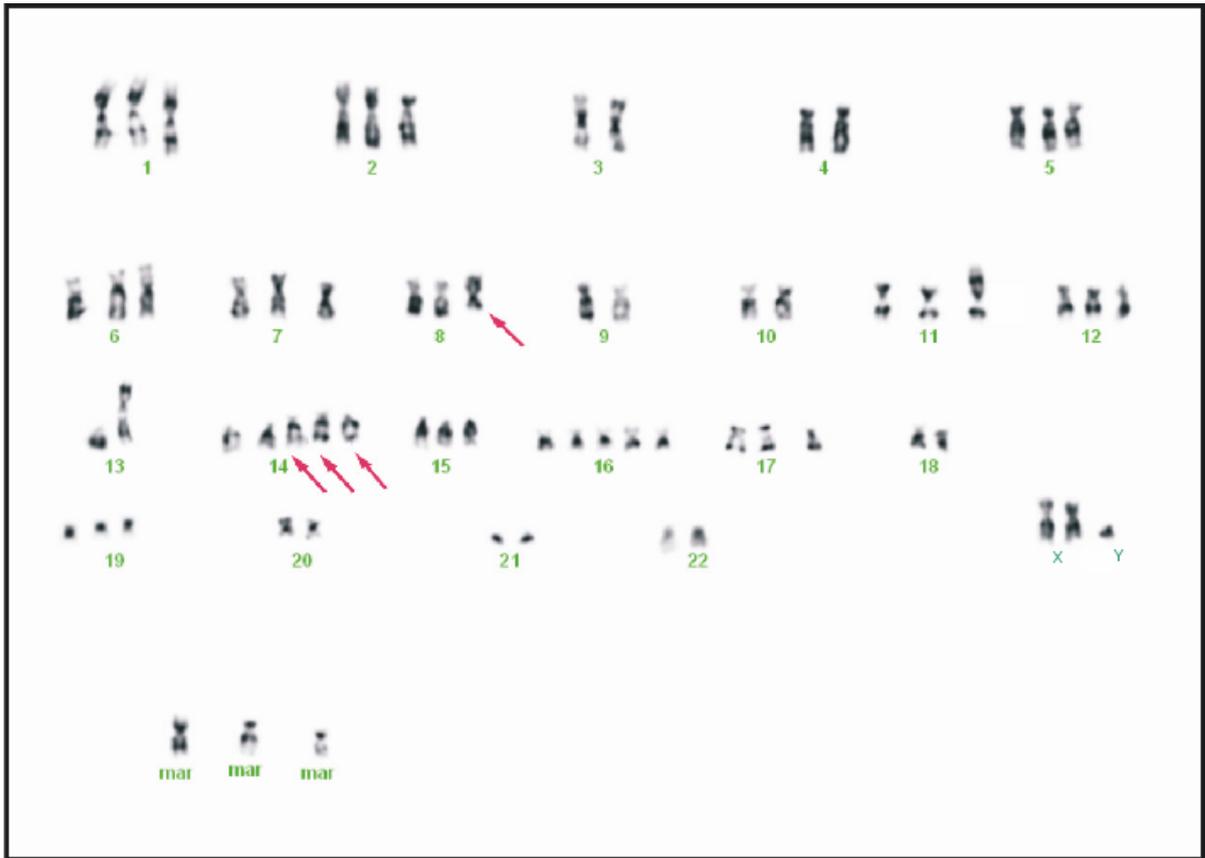
### 4.1. Caracterização das linhagens celulares

#### 4.1.1. Caracterização citogenética das linhagens derivadas de Linfoma de Burkitt

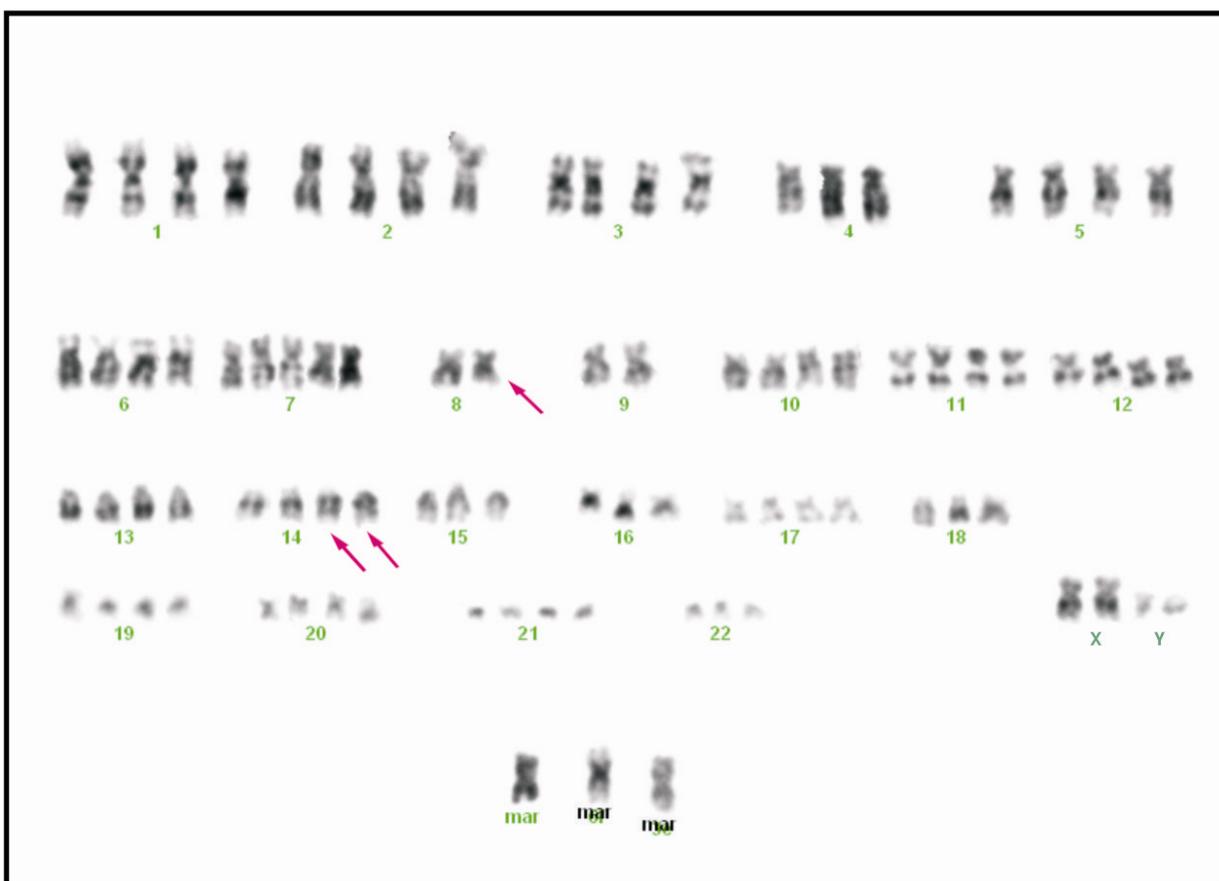
A análise citogenética feita por bandeamento G mostrou a presença da translocação t(8;14) característica do LB em ambas as linhagens.

Para a linhagem Daudi o número de metáfases analisadas variou de 62 a 68. Nesta linhagem foi evidenciado um certo grau de poliploidia e foram ainda observadas deleções, trissomias, e dois marcadores em adição à translocação t(8;14). Já na Raji foram observadas células hipotetraplóides, sendo a linhagem caracterizada principalmente pela presença adicional do cromossomo 4 e pela translocação t(8;14).

Nas figuras 9 e 10 podem ser observados os cariótipos das duas linhagens celulares que está de acordo com dados publicados em bancos de dados internacionais, como o DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*).



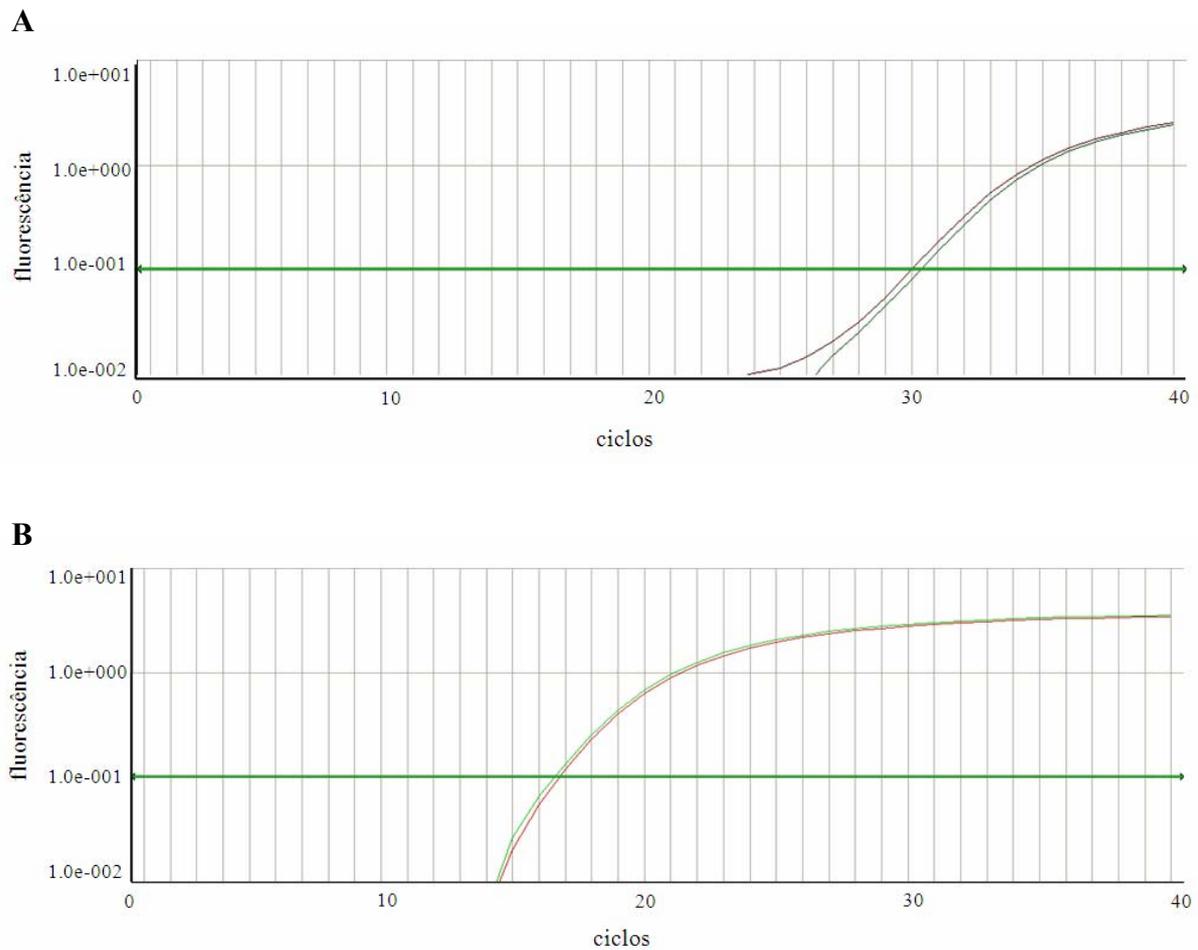
**Figura 9-** Cariótipo característico da linhagem celular Daudi. 62-68, XY, +1, +der(2), del(2)(p24), +4, +5, +6, +7, +8, t(8;14)(q24;q32), +der(11), add(11)(p15), add(13)(p13), +15, +16, +17, +18, +19, +20, +21 mar[20]. As setas indicam a translocação t(8;14) característica do Linfoma de Burkitt.



**Figura 10-** Cariótipo da linhagem celular Raji.  $86(84-92) <4n> XXYY, +3\ mar, add(4)(q35), +der(4)add(4)(q35), -der(8)t(8;14)(q24;q32), +der(14)t(8;14)(q24;q32)[20]$ . As setas indicam a translocação  $t(8;14)$  característica dessa linhagem.

#### 4.1.2. Status do vírus Epstein-Barr (EBV) nas linhagens

A presença de EBV foi detectada nas duas linhagens pela técnica de PCR em tempo real (figura 11).



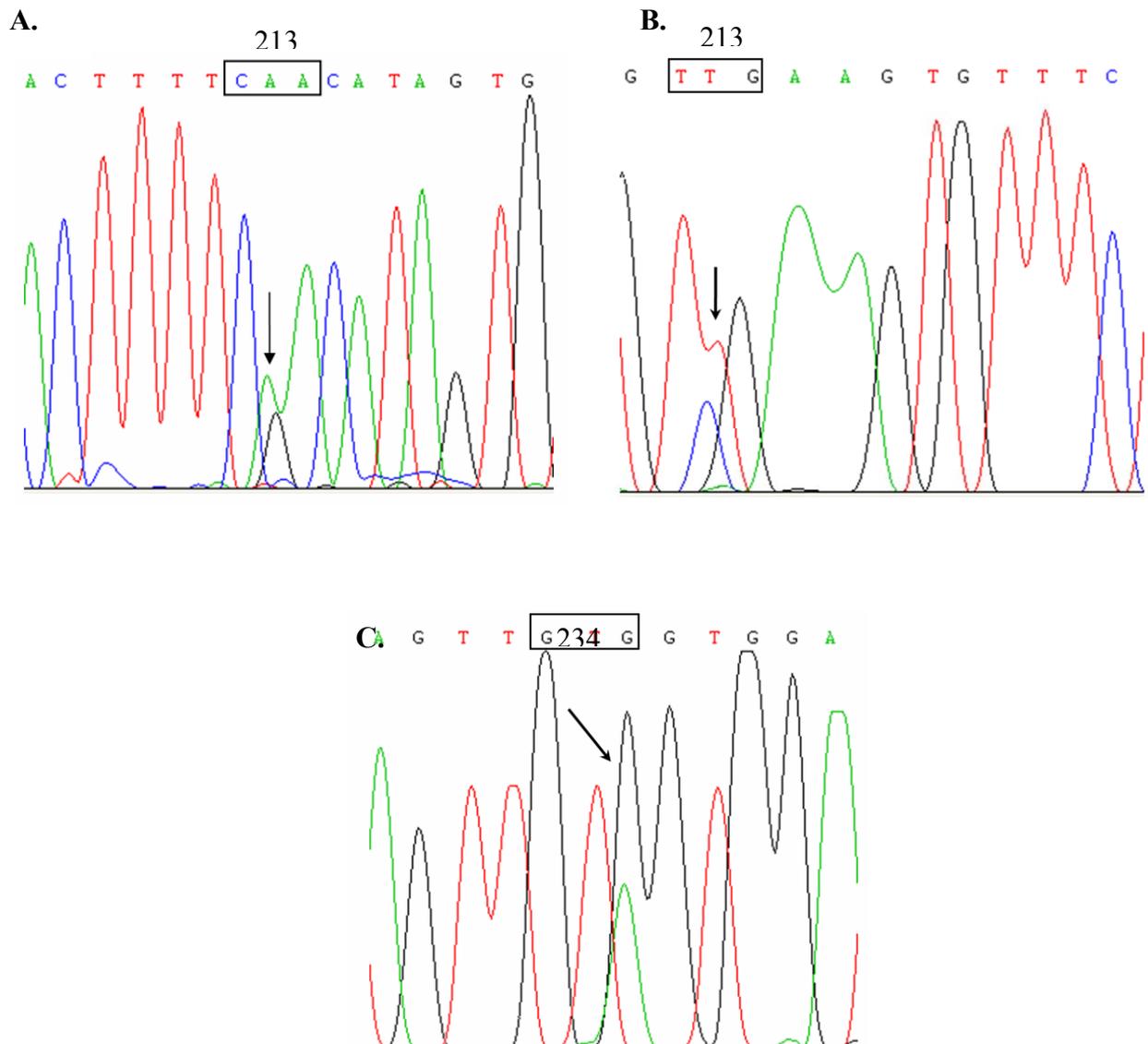
**Figura 11-** Curvas de amplificação gênica do EBV (EBNA1) por PCR em tempo real nas linhagens Daudi (A) e Raji (B). Experimentos realizados em duplicata.

#### **4.1.3. Análise das mutações do gene *TP53* nas linhagens celulares do estudo**

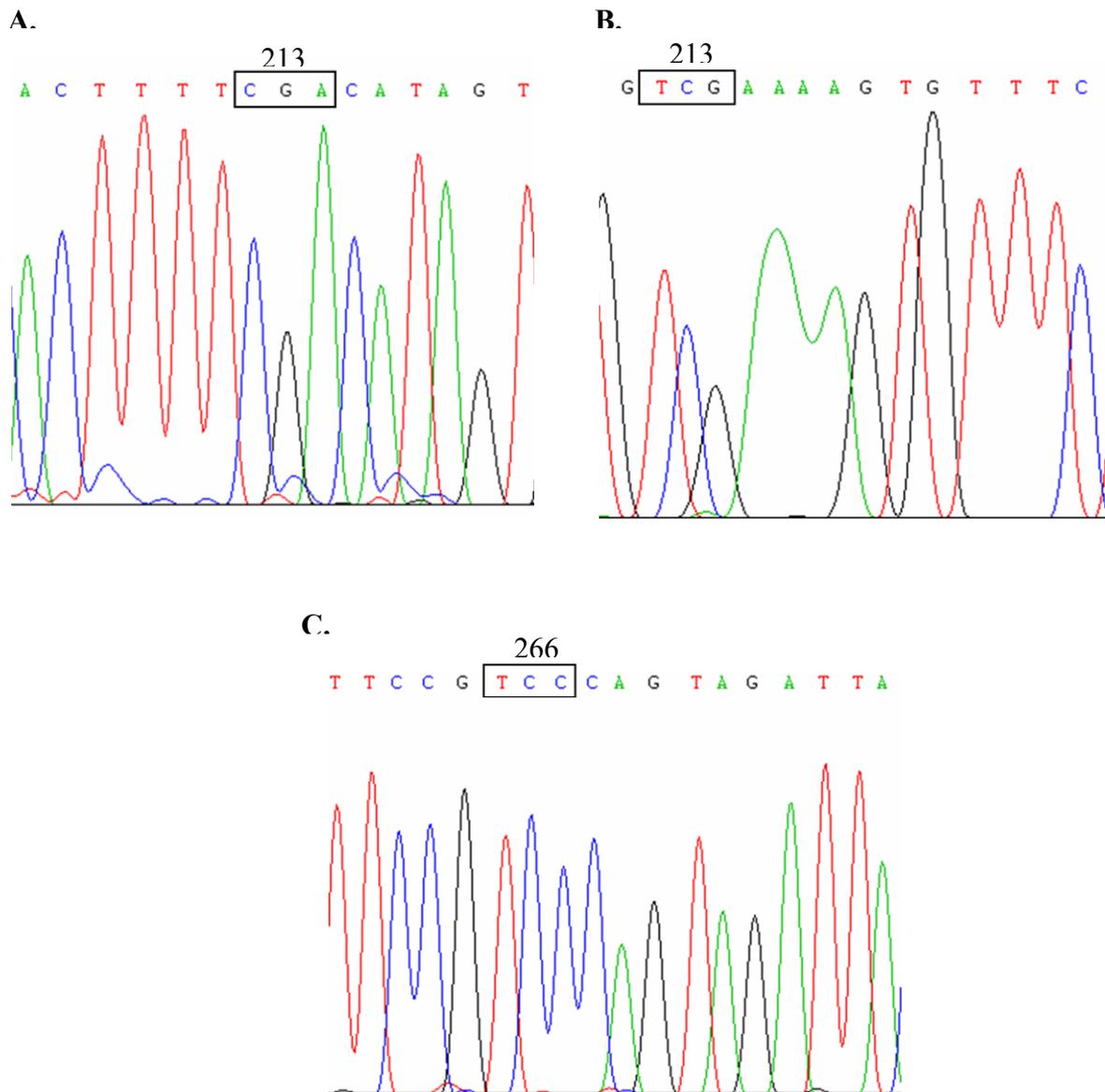
Na linhagem Raji foi detectada a mutação no exon 6, no códon 213 (Fig. 12 **A** e **B**) e a mutação no códon 234, no exon 7 (Fig. 12 **C**). Entretanto, o sequenciamento da seqüência de nucleotídeos da fita senso do éxon 7 não permitiu uma análise precisa dos dados. Dessa forma, apenas a fita anti-senso pôde ser analisada, onde a mutação foi detectada.

Na linhagem Daudi, por sua vez, nenhuma mutação foi detectada (Fig. 13).

Novos experimentos com a utilização de outras técnicas para sequenciamento serão realizados para confirmar os resultados encontrados.



**Figura 12-** Eletroferograma representativos das seqüências de DNA correspondentes ao éxon 6 (A, fita senso e B, fita anti-senso) e ao éxon 7 (C, fita anti-senso) do gene *TP53* na linhagem Raji. As setas indicam a mutação encontrada no códon 213 do éxon 6 (CGA →CAA na fita senso e TCG→TTG na fita anti-senso) e na fita anti-senso do éxon 7 no códon 234 (GTA→GTG). Os retângulos indicam os códons onde as respectivas mutações foram descritas.



**Figura 13-** Eletroferogramas representativos das seqüências de DNA do éxon 6 (**A**, fita senso e **B**, fita anti-senso) e do éxon 8 (**C**, fita anti senso) do gene *TP53* na linhagem Daudi. Os retângulos indicam os códons onde as respectivas mutações foram descritas na literatura.

#### 4.1.4. Expressão das proteínas p53 e p21

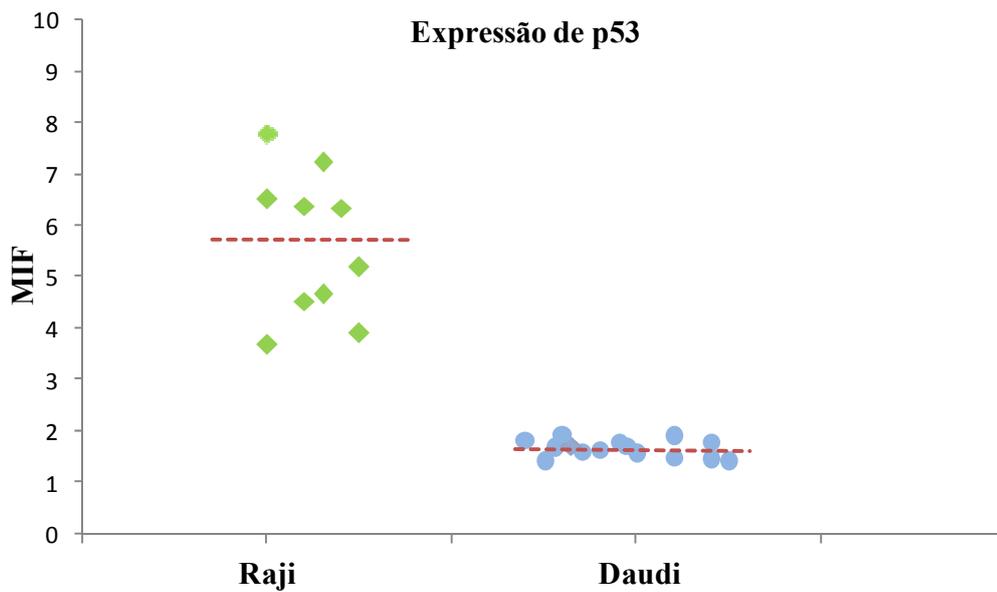
A análise da expressão das proteínas p53 e p21, realizada por citometria de fluxo e por *Western blotting* mostrou que a linhagem Daudi não expressava nenhuma das duas proteínas, enquanto a Raji tinha níveis elevados de expressão de p53, e não apresentava expressão de p21.

Para a linhagem Daudi, os valores das médias de intensidade de fluorescência (MIF) para a proteína p53 variaram de 1,42 a 1,97 (média: 1,68; mediana: 1,68) e de 1,05 a 1,83 (média: 1,38; mediana: 1,36) para a proteína p21. Foram realizados 15 experimentos independentes utilizando essa linhagem para cada proteína.

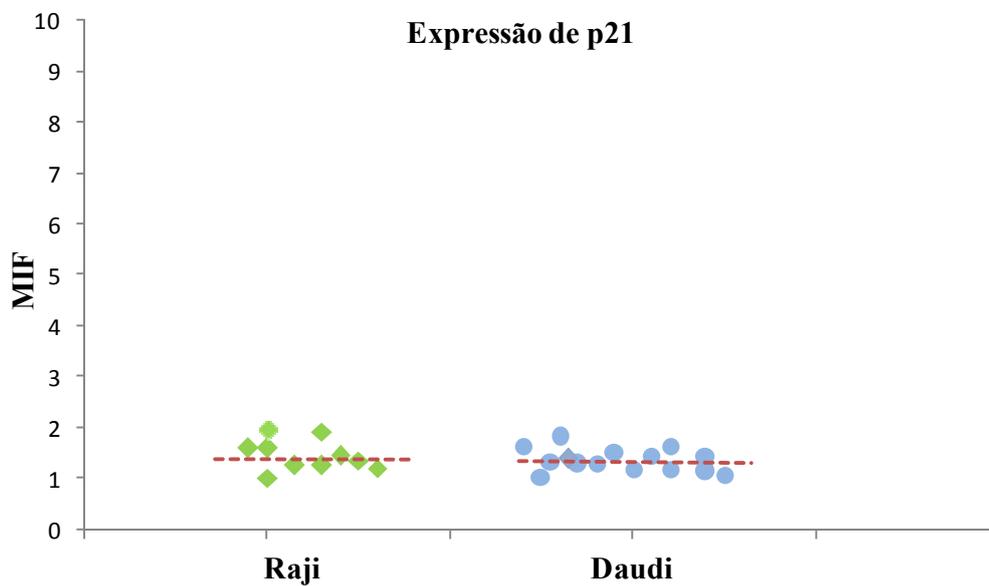
A linhagem Raji, por sua vez, apresentou valores de MIF que variaram de 3,68 a 7,8 (média: 5,62; mediana: 5,76) para a proteína p53, e de 1,03 a 2,00 (média: 1,48; mediana: 1,42) para a proteína p21. Para essa linhagem foram realizados 10 experimentos independentes para cada proteína.

Os valores de MIF obtidos para cada experimento independente, nas duas linhagens celulares, para a proteína p53 estão mostrados na figura 14 e para a proteína p21 na figura 15.

Observou-se que os valores de MIF para p53 foram consideravelmente maiores na linhagem Raji em comparação a Daudi, o que indicou uma maior expressão da proteína nessa linhagem. Entretanto, o nível de expressão da proteína p21 foi muito próximo em ambas as linhagens.

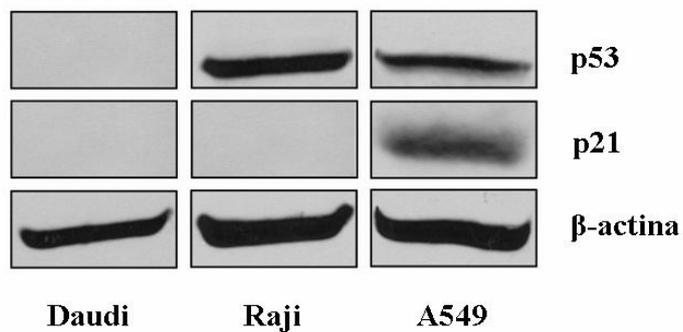


**Figura 14-** Valores das médias de intensidade de fluorescência (MIF) obtidos para a proteína p53 nas linhagens Raji e Daudi em 10 e 15 experimentos independentes, respectivamente. A linha pontilhada representa a mediana obtida.



**Figura 15-** Valores das médias de intensidade de fluorescência (MIF) obtidos para a proteína p21 nas linhagens Raji e Daudi em 10 e 15 experimentos independentes, respectivamente. A linha pontilhada representa a mediana obtida.

Através da técnica de *Western blotting*, foi observada a ausência de expressão da proteína p53 na linhagem Daudi e elevada expressão de p53 em Raji, no nível basal, já a expressão da proteína p21 não foi observada em ambas as linhagens (Fig. 16).



**Figura 16-** Expressão de p53 e p21 por *Western blotting* em Daudi, Raji e A549 (controle positivo). A proteína β-actina foi usada como padrão da reação de *Western blotting*.

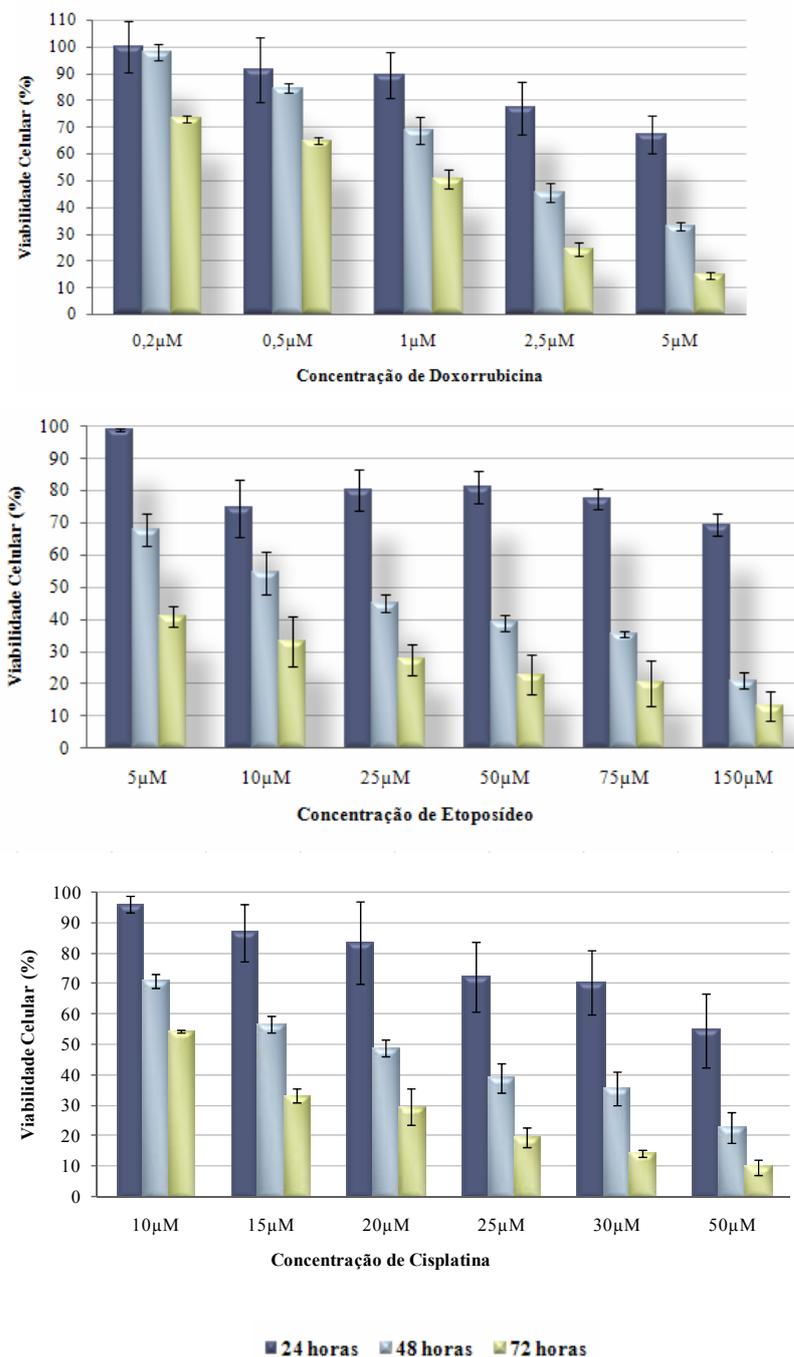
Como podemos observar a partir dos dados de citometria de fluxo e de *Western blotting*, os valores de MIF encontrados na Daudi para as duas proteínas estudadas, e na Raji, para a proteína p21, representam valores que indicam a ausência de expressão dessas proteínas. Entretanto, os valores de MIF da proteína p53 observados na linhagem Raji, foram considerados como representando expressão positiva da proteína.

## **4.2. Caracterização funcional da proteína p53**

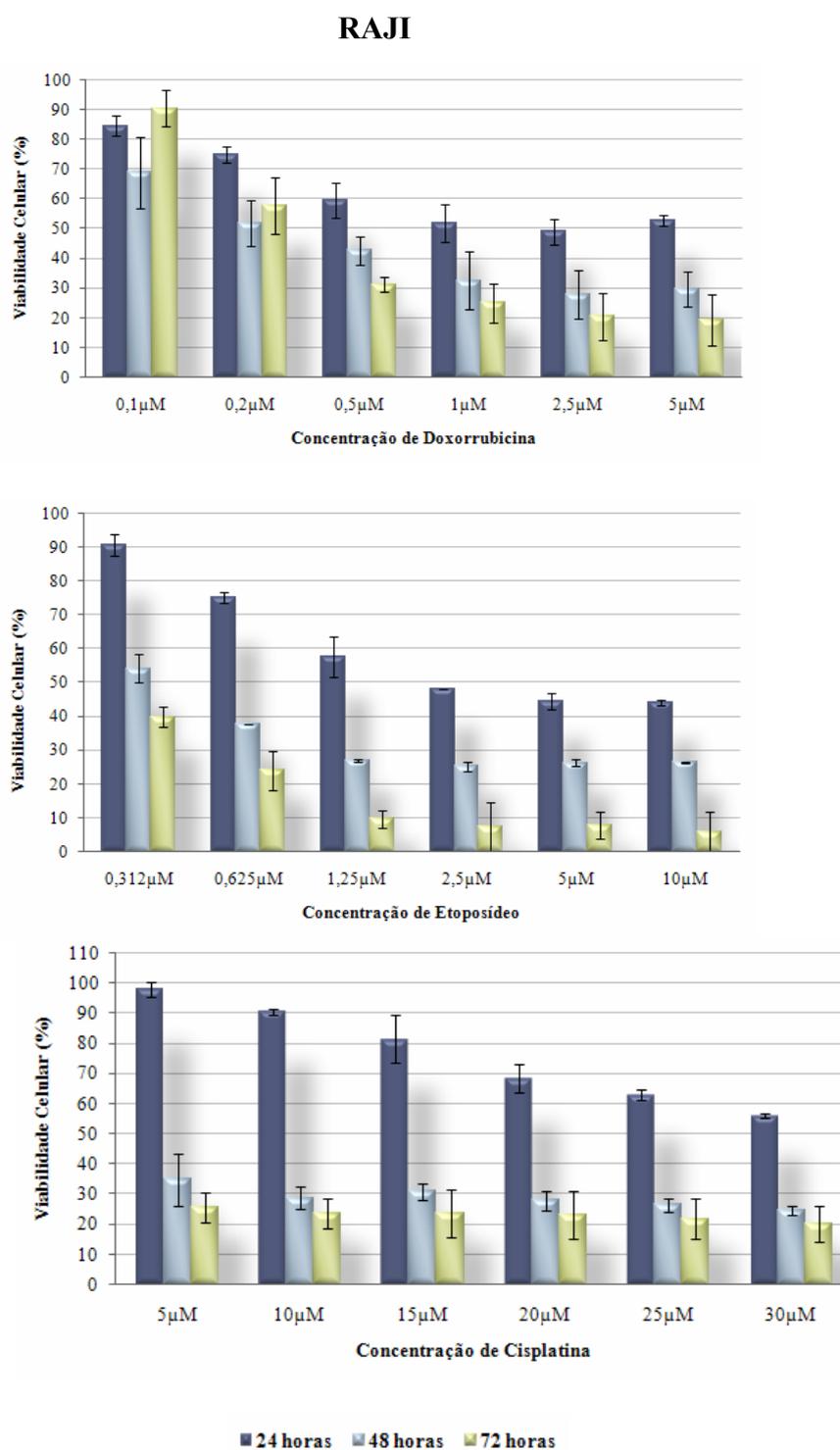
### **4.2.1. Perfil de resistência a agentes citotóxicos**

Os resultados do ensaio de MTT realizado com o tratamento das linhagens celulares com diferentes agentes citotóxicos durante 24, 48 e 72 horas são mostrados a seguir nas figuras 17 e 18.

DAUDI



**Figura 17-** Perfis de sensibilidade, analisados pelo método de MTT, da linhagem Daudi tratada com diferentes concentrações de doxorubicina, etoposídeo e cisplatina, respectivamente, por 24 horas (azul escuro), 48 horas (azul claro) e 72 horas (verde). Os resultados são a média de três experimentos independentes. As linhas acima das barras representam o desvio padrão obtido.



**Figura 18-** Perfis de sensibilidade, analisados pelo método de MTT, da linhagem Raji tratada com diferentes concentrações de doxorribicina, etoposídeo e cisplatina, respectivamente, por 24 horas (azul escuro), 48 horas (azul claro) e 72 horas (verde). Os resultados são a média de três experimentos independentes. As linhas acima das barras representam o desvio padrão obtido.

As concentrações capazes de reduzir a viabilidade de aproximadamente 50% (DL<sub>50</sub>) das células em 48 horas de incubação com os diferentes quimioterápicos são apresentadas na tabela 5.

**Tabela 5-** Concentrações dos quimioterápicos correspondentes as DL<sub>50</sub> aproximadas, em 48 horas para as linhagens Daudi e Raji.

<b>Quimioterápico</b>	<b>Daudi</b>	<b>Raji</b>
<b>DOX</b>	2,5 µM	0,2 µM
<b>VP-16</b>	25 µM	0,625 µM
<b>CDDP</b>	20 µM	15 µM

*DL*, dose letal.

Pode ser observado a partir das figuras 17 e 18 e da tabela 5, que a linhagem celular Daudi foi mais resistente do que a linhagem celular Raji a todos os quimioterápicos testados, e que a viabilidade celular foi dose-dependente.

#### **4.2.2. Indução de apoptose e parada do ciclo celular por agentes citotóxicos**

A Daudi, ao ser irradiada com 5 Gy de raios gama, apresentou baixo percentual de células em apoptose (apoptose inicial + apoptose tardia) como observado nos resultados do ensaio de Anexina V e pela quantidade de células em sub-G0/G1 nos histogramas de ciclo celular (Tabela 6 e Fig. 19). Esse percentual aumentou gradativamente com o tempo após exposição à radiação, atingindo os níveis mais elevados de apoptose em 48 horas. O tratamento dessa linhagem com VP-16 e CDDP teve efeito semelhante (Tabela 6 e Figs. 20 e 21).

**Tabela 6-** Percentual (%) de apoptose (apoptose inicial + apoptose tardia) avaliado por Anexina V para a linhagem Daudi após 3, 8, 24 e 48 horas da exposição aos diferentes agentes.

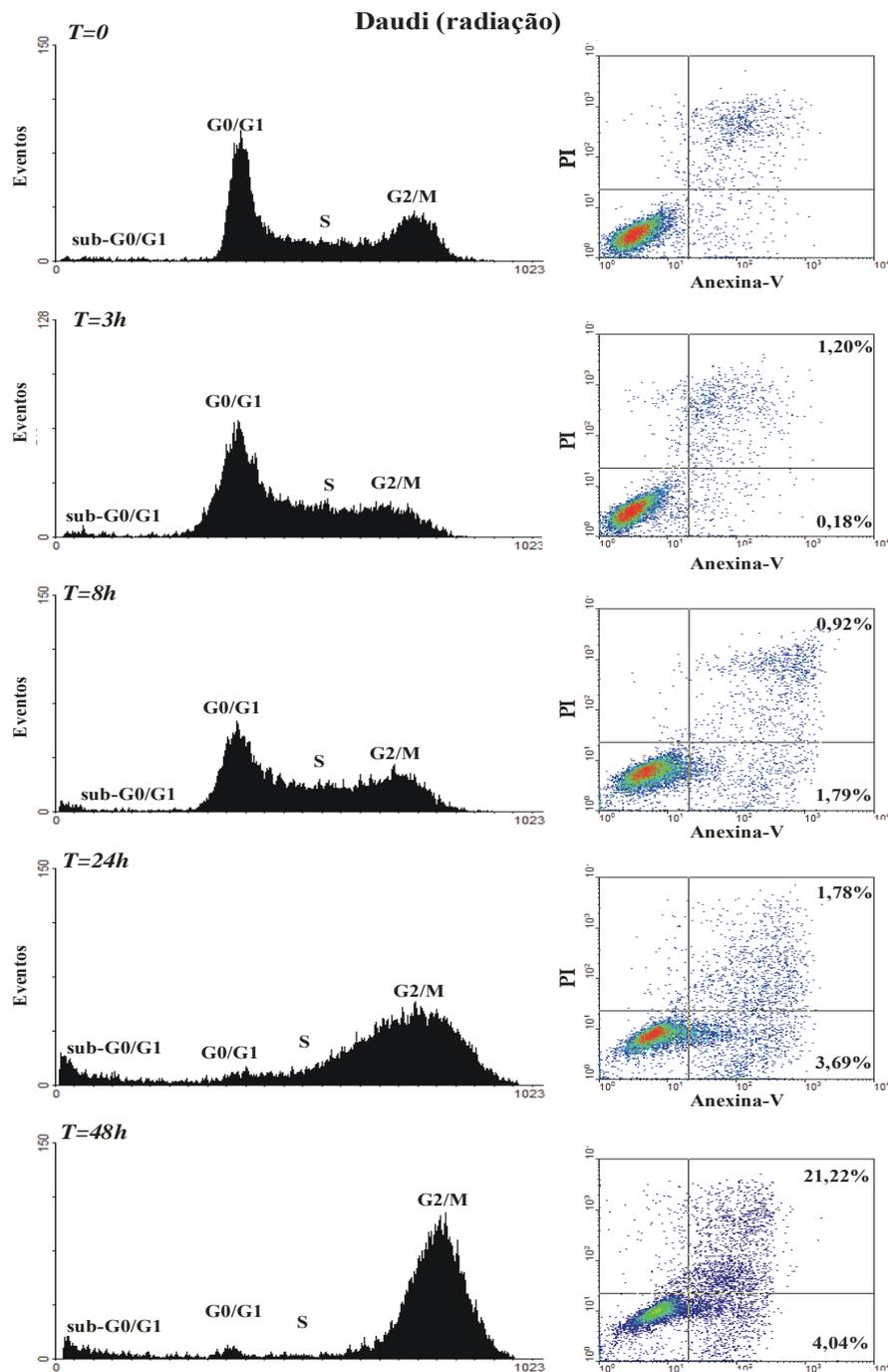
Agente citotóxico	Tempo após exposição			
	3 horas	8 horas	24 horas	48 horas
<b>Radiação Ionizante (5Gy)</b>	1,38 ± 0,25	2,71 ± 1,4	5,47 ± 0,58	25,26 ± 1,55
<b>VP-16 (25 µM)</b>	2,87 ± 0,90	4,71 ± 0,88	6,7 ± 2,73	26,29 ± 0,77
<b>CDDP (20 µM)</b>	0,34 ± 0,23	0,46 ± 0,35	5,53 ± 1,65	28,43 ± 2,70

VP-16, etoposídeo; CDDP, cisplatina

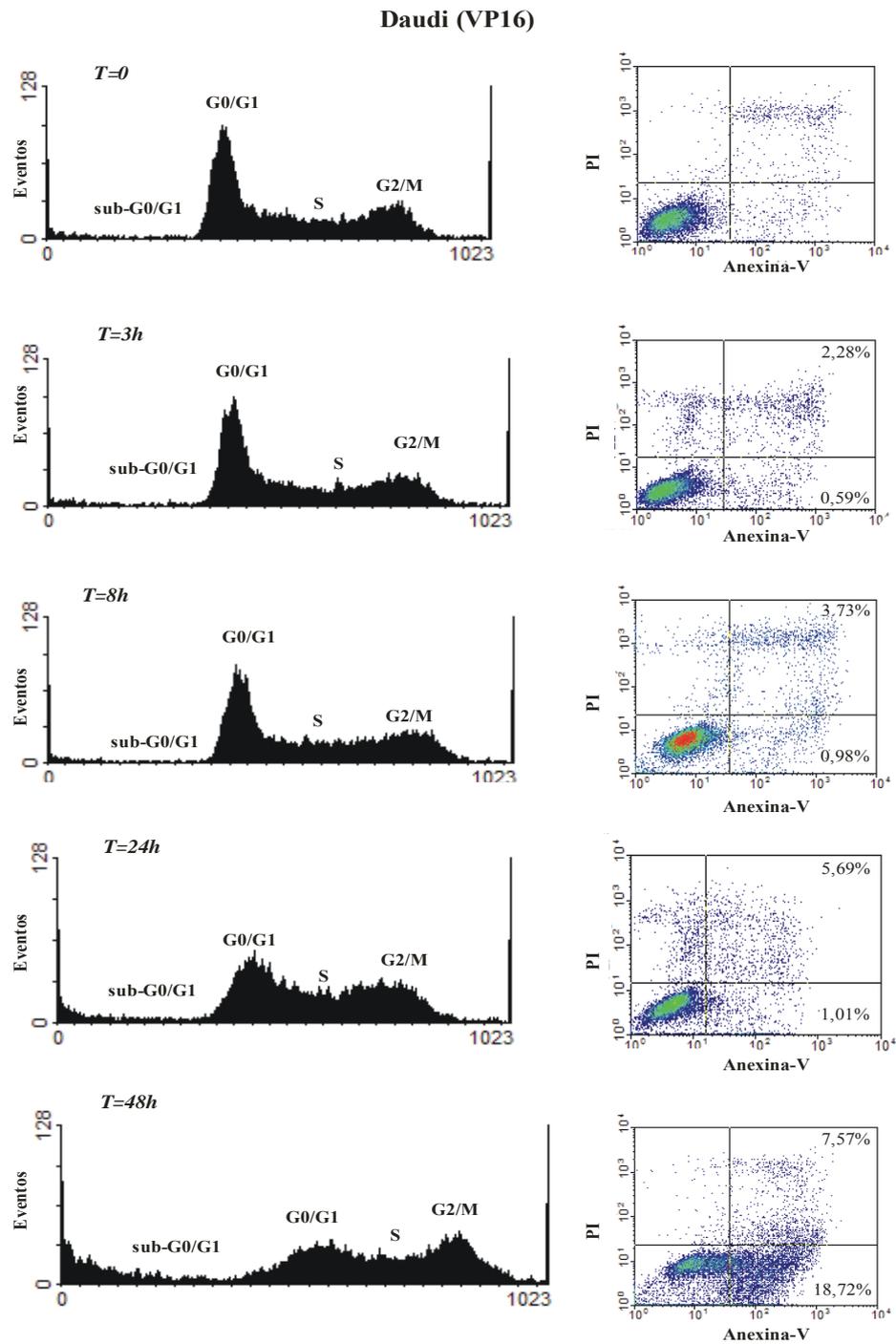
Os resultados são médias de três experimentos independentes ± desvio padrão.

Em relação ao ciclo celular, o tratamento com radiação gama não causou parada do ciclo em G1/S (Figs. 19 e 25), mas causou parada do ciclo celular em G2/M (figura 19).

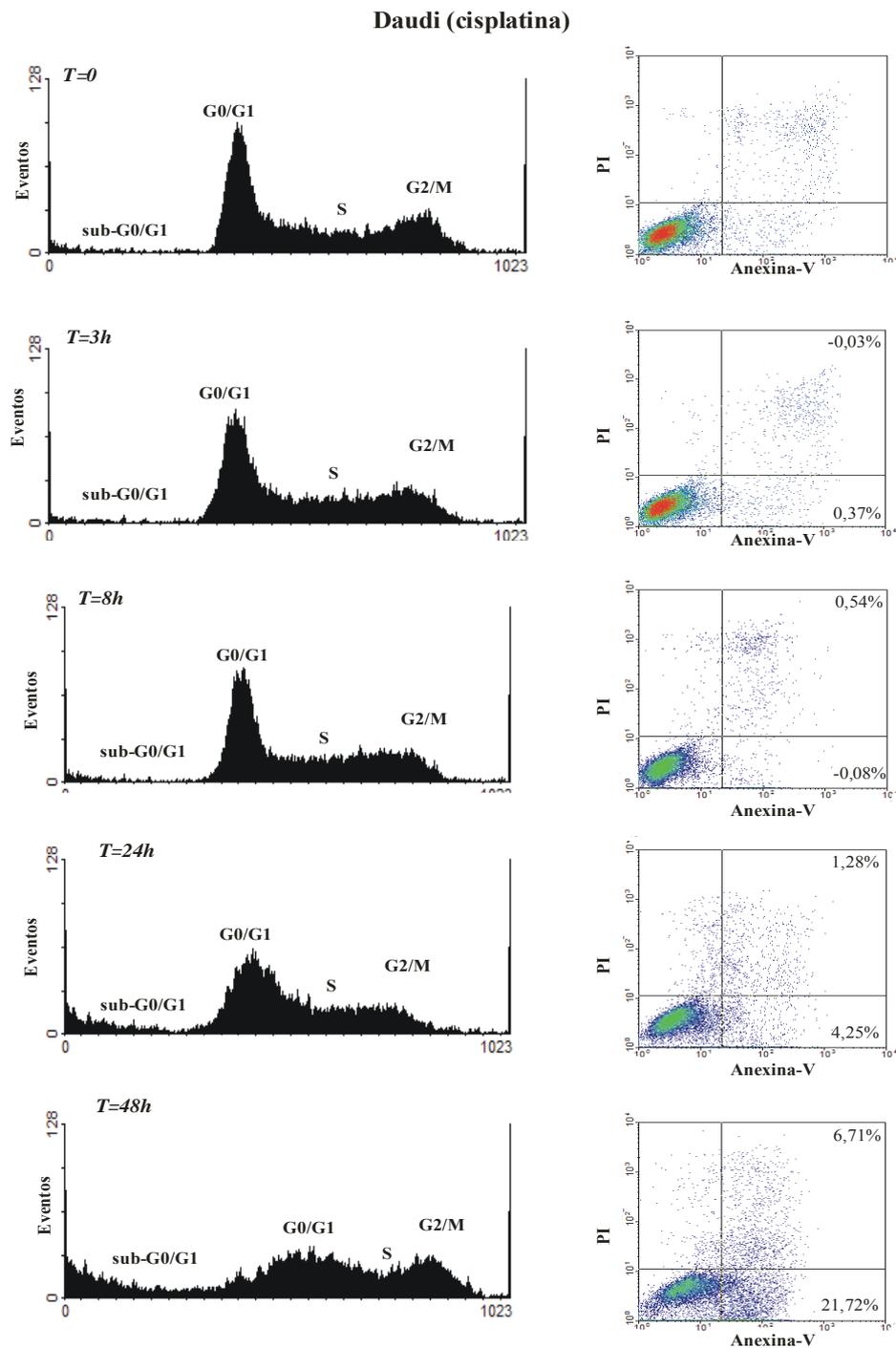
Já os tratamentos com VP-16 e CDDP não foram capazes de induzir parada do ciclo celular nessa linhagem (Figs. 20, 21, 26 e 27).



**Figura 19-** Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Daudi 3, 8, 24 e 48 horas após irradiação com 5 Gy de raios gama, onde observamos parada na fase G2/M do ciclo celular. Os resultados são ilustrativos e os valores de apoptose mostrados representam uma média de três experimentos independentes. O quadrante inferior à direita de cada *plot* representa a apoptose inicial, e o quadrante superior à direita a apoptose tardia. *T*, tempo.



**Figura 20-** Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Daudi 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 25 $\mu$ M de VP-16. Os resultados são ilustrativos e os valores de apoptose mostrados representam uma média de três experimentos independentes. O quadrante inferior à direita de cada *plot* representa a apoptose inicial, e o quadrante superior à direita a apoptose tardia. *T*, tempo.



**Figura 21-** Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Daudi 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 20  $\mu$ M de CDDP. Os resultados são ilustrativos e os valores de apoptose mostrados representam uma média de três experimentos independentes. O quadrante inferior à direita de cada *plot* representa a apoptose inicial, e o quadrante superior à direita a apoptose tardia. T, tempo.

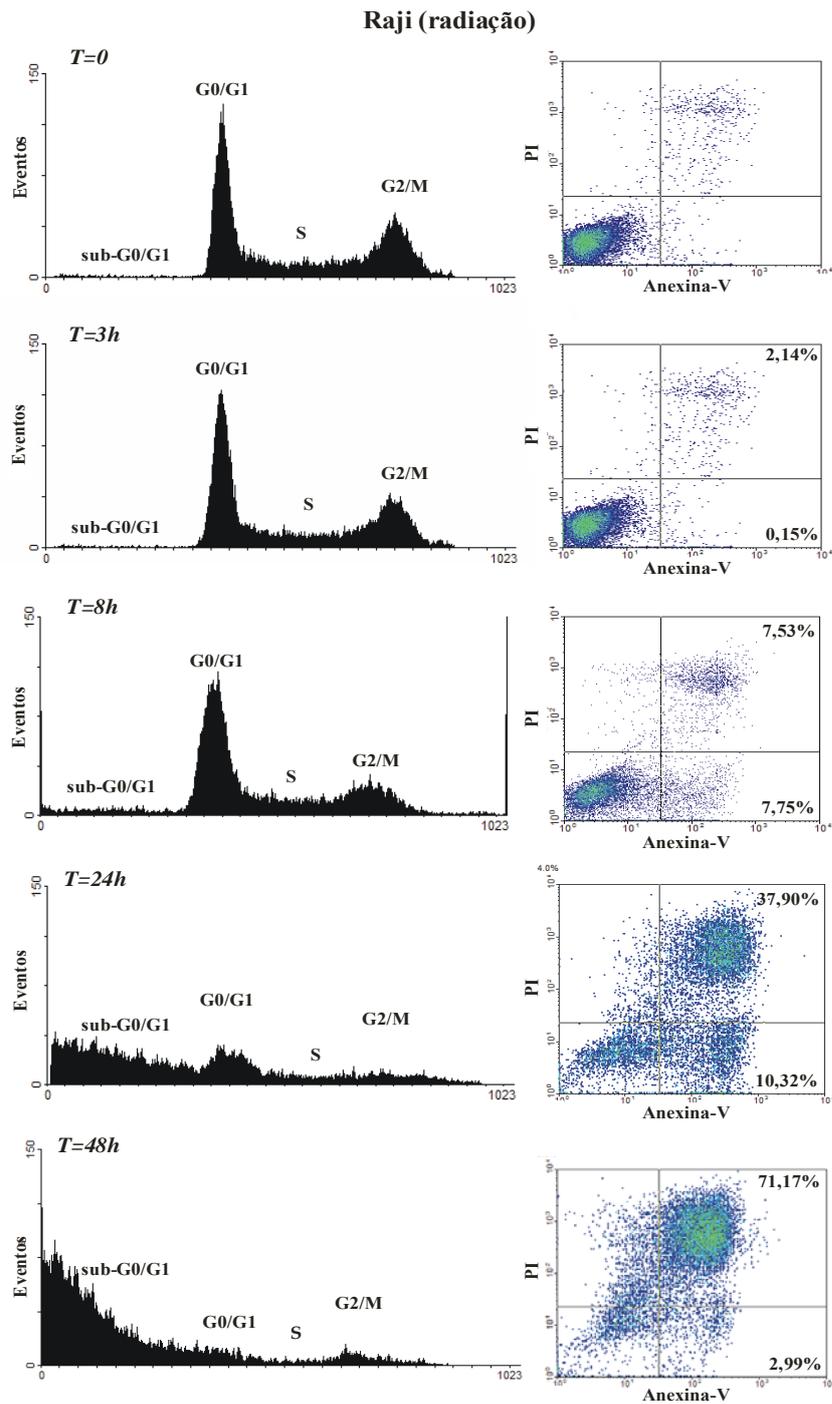
A Raji, por sua vez, quando submetida à exposição com 5 Gy de radiação gama, também não apresentou parada do ciclo celular em G1/S (Figs. 22 e 25). A parada do ciclo na fase G2/M ocorrida na linhagem Daudi ao ser induzida com 5Gy de raios gama, não foi observada em Raji ao ser submetida ao mesmo tratamento como pode ser observado na figura 22. Entretanto, uma quantidade expressiva de células da Raji entrou em apoptose em resposta à radiação, como visto pelo ensaio de anexina V e pelo percentual de células em sub-G0/G1 (Tabela 7 e Fig. 22). O tratamento com VP-16 e CDDP gerou efeito semelhante, onde não houve indução de parada do ciclo celular em G0/G1 (Figs. 23, 24, 26 e 27) e o tratamento com essas drogas gerou indução de apoptose, que aumentou conforme o aumento do tempo de incubação com as drogas (Tabela 7 e Figs. 23 e 24).

**Tabela 7-** Percentual (%) de apoptose (apoptose inicial + apoptose tardia) avaliado por Anexina V para a linhagem Raji após 3, 8, 24 e 48 horas da exposição aos diferentes agentes.

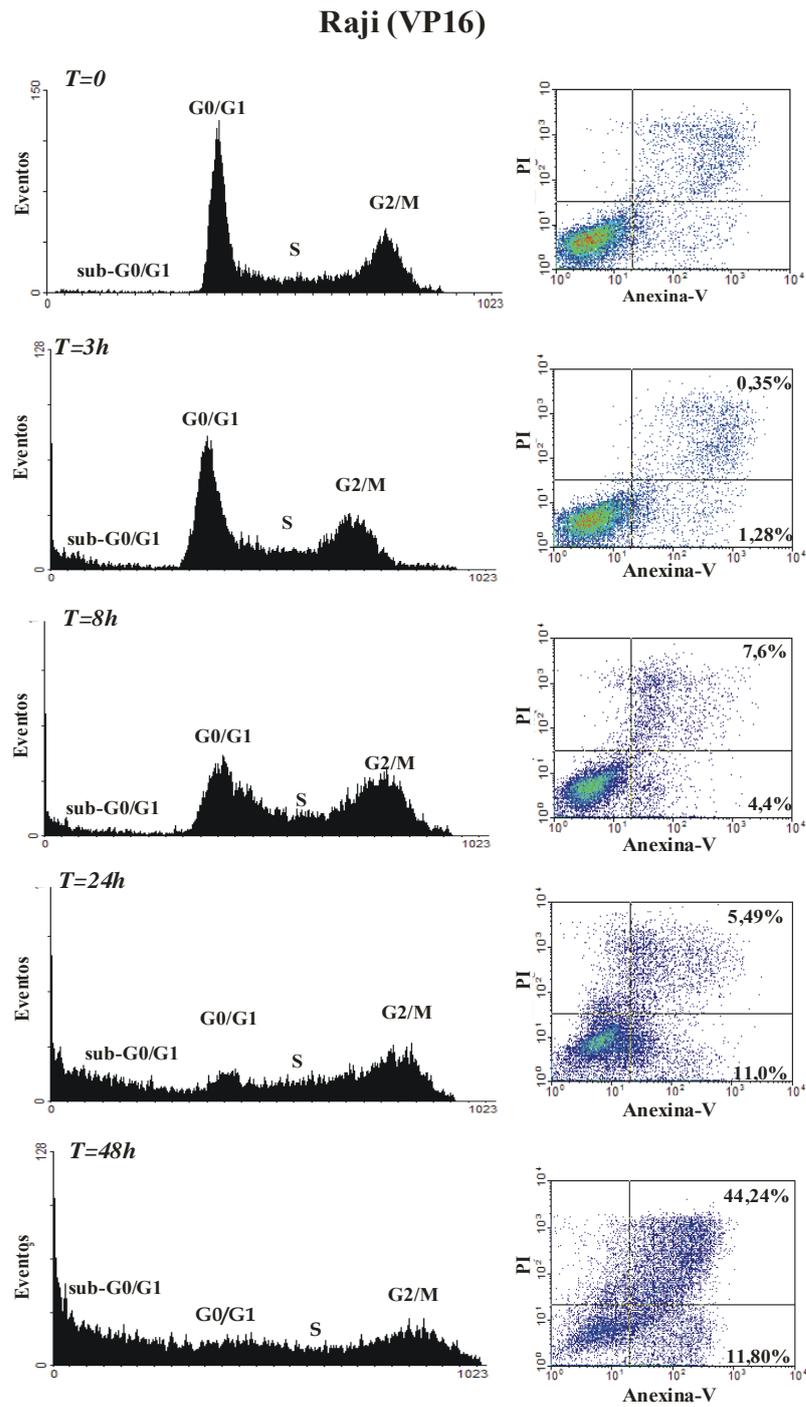
Agente citotóxico	Tempo após exposição			
	3 horas	8 horas	24 horas	48 horas
Radiação Ionizante (5Gy)	2,29 ± 0,92	15,28 ± 2,82	48,22 ± 4,24	74,16 ± 0,29
VP-16 (0,625 µM)	1,63 ± 0,49	12 ± 1,76	16,49 ± 2,07	56,04 ± 10,6
CDDP (15 µM)	1,08 ± 0,69	0,5 ± 1,3	9,88 ± 4,3	63,92 ± 3,01

VP-16, etoposídeo; CDDP, cisplatina

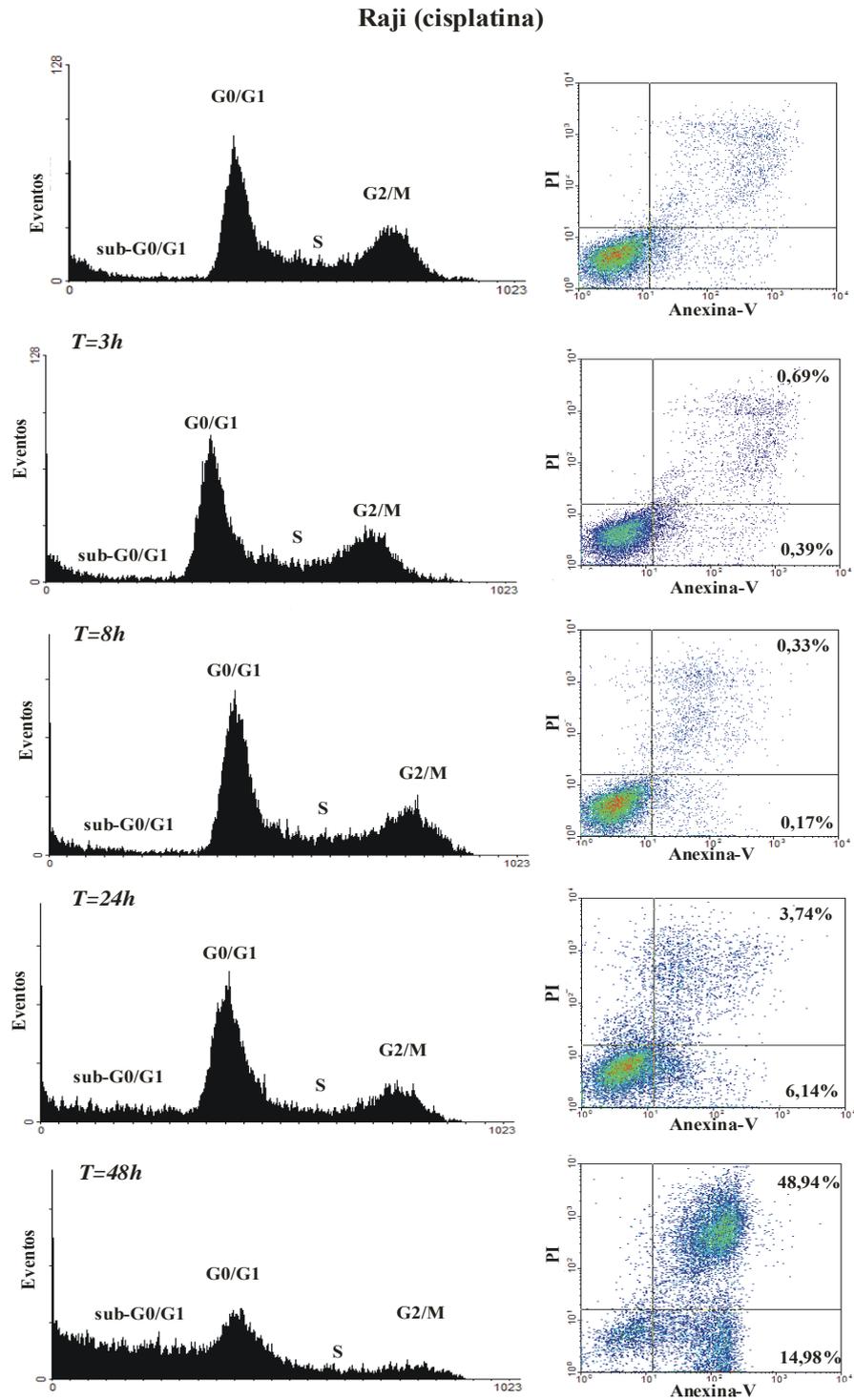
Os resultados são médias de três experimentos independentes ± desvio padrão.



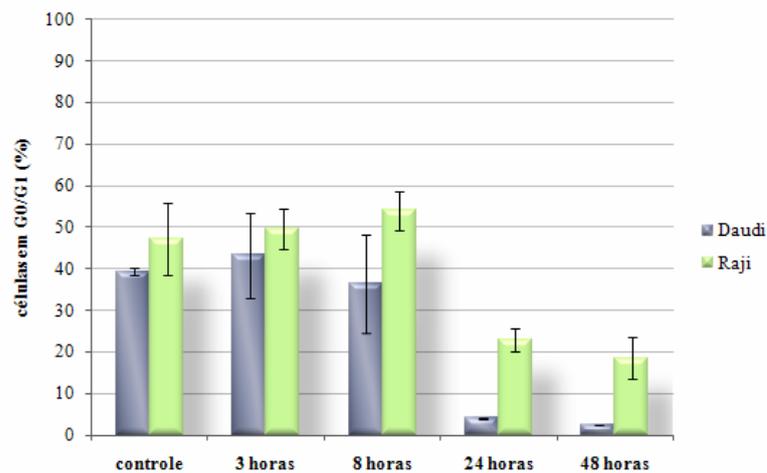
**Figura 22-** Análises do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Raji 3, 8, 24 e 48 horas após irradiação com 5Gy de raios gama. Os resultados são ilustrativos e os valores representam uma média de três experimentos independentes. O quadrante inferior à direita de cada *plot* representa a apoptose inicial, e o quadrante superior à direita a apoptose tardia. *T*, tempo.



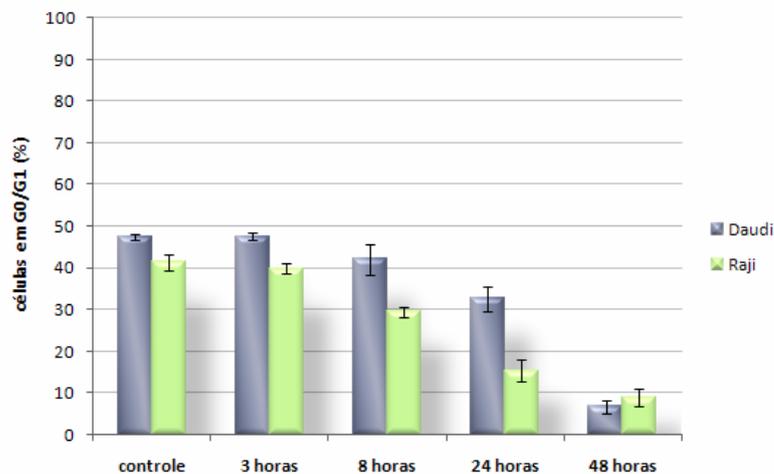
**Figura 23-** Análises ilustrativas do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Raji 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 0,625  $\mu$ M de VP16. Os resultados são ilustrativos e os valores representam uma média de três experimentos independentes. O quadrante inferior à direita de cada *plot* representa a apoptose inicial, e o quadrante superior à direita a apoptose tardia. *T*, tempo.



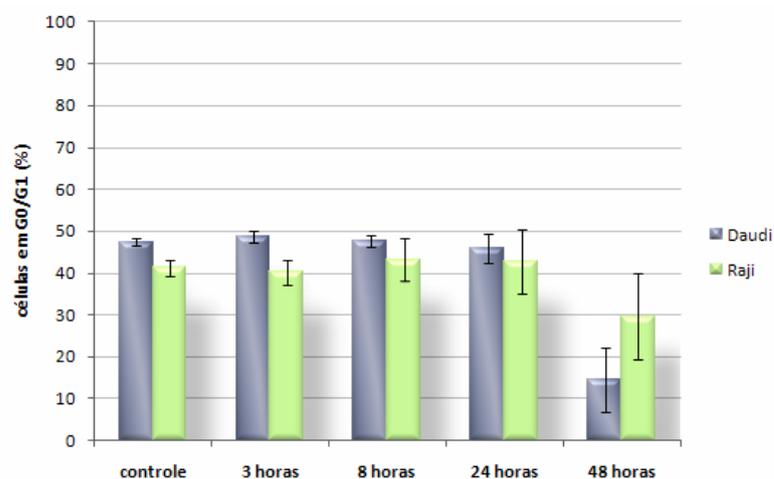
**Figura 24-** Análises ilustrativas do ciclo celular e apoptose em células da linhagem Raji 3, 8, 24 e 48 horas após a incubação com 15  $\mu$ M de CDDP. Os resultados são ilustrativos e os valores representam uma média de três experimentos independentes. O quadrante inferior à direita de cada *plot* representa a apoptose inicial, e o quadrante superior à direita a apoptose tardia. *T*, tempo.



**Figura 25-** Percentual de células das linhagens Daudi (em azul) e Raji (em verde) na fase G0/G1 do ciclo celular após 3, 8, 24 e 48 horas da exposição a 5 Gy de raios gama. Células das linhagens sem nenhum tipo de tratamento foram usadas como controle. Os resultados são a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 26-** Percentual de células das linhagens Daudi (em azul) e Raji (em verde) na fase G0/G1 do ciclo celular após incubação com 25  $\mu$ M e 0,625  $\mu$ M de VP-16, respectivamente pelos tempos de 3, 8, 24 e 48 horas. Células das linhagens sem nenhum tipo de tratamento foram usadas como controle. Os resultados são a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 27-** Percentual de células das linhagens Daudi (em azul) e Raji (em verde) na fase G0/G1 do ciclo celular após incubação com 20  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  de CDDP, respectivamente pelos tempos de 3, 8, 24 e 48 horas. Células das linhagens sem nenhum tipo de tratamento foram usadas como controle. Os resultados são a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

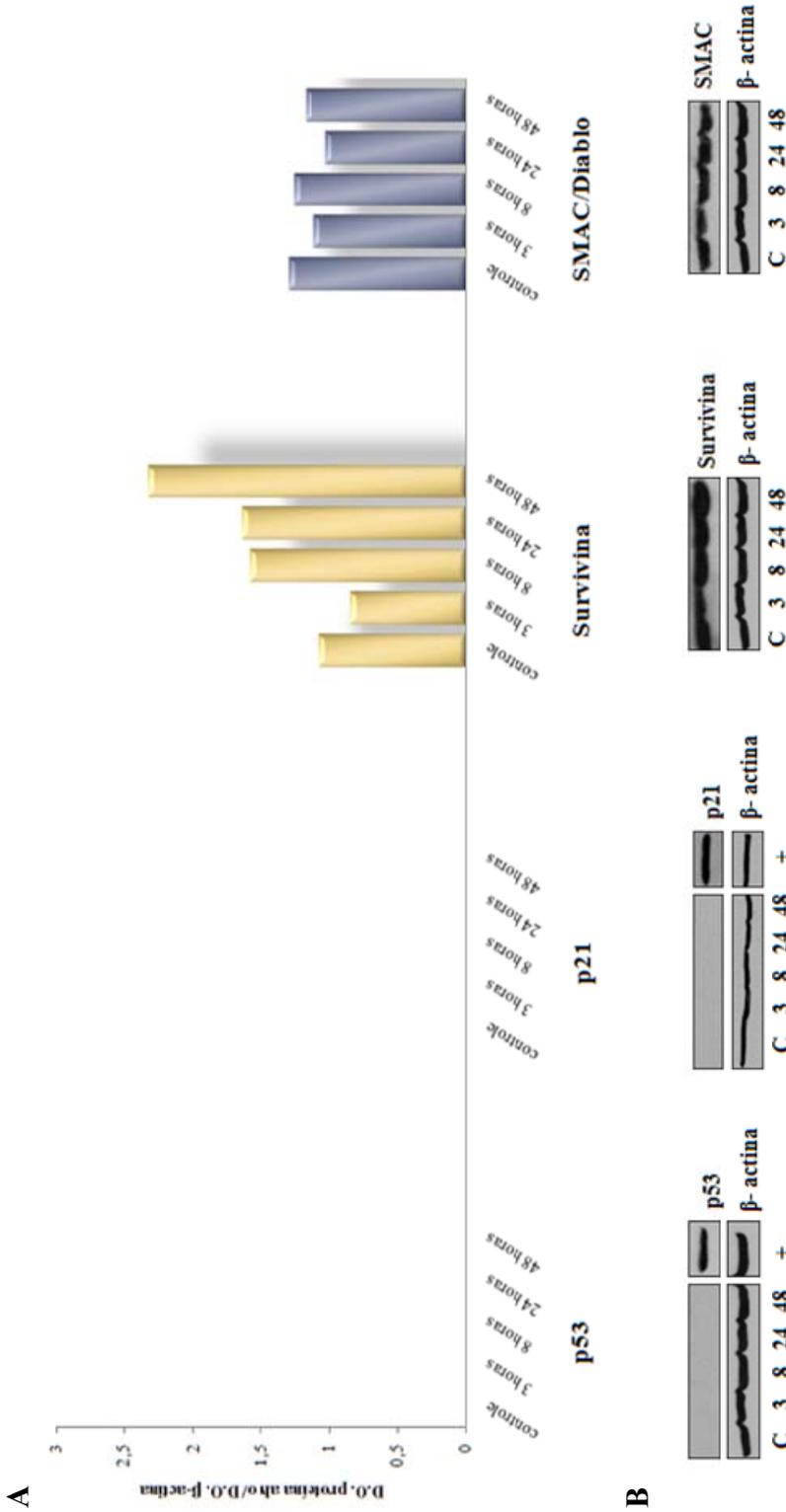
### 4.3. Análise da expressão de p53, p21, survivina e SMAC/Diablo nas linhagens Daudi e Raji por *Western blotting* após exposição a agentes genotóxicos

A expressão de p53, p21, survivina e SMAC/Diablo nas linhagens Daudi e Raji foi avaliada por *Western blotting* 3, 8, 24 e 48 horas após a exposição das células às concentrações equivalentes a  $DL_{50}$  dos quimioterápicos DOX, CDDP, VP-16, ou a 5 Gy de radiação gama.

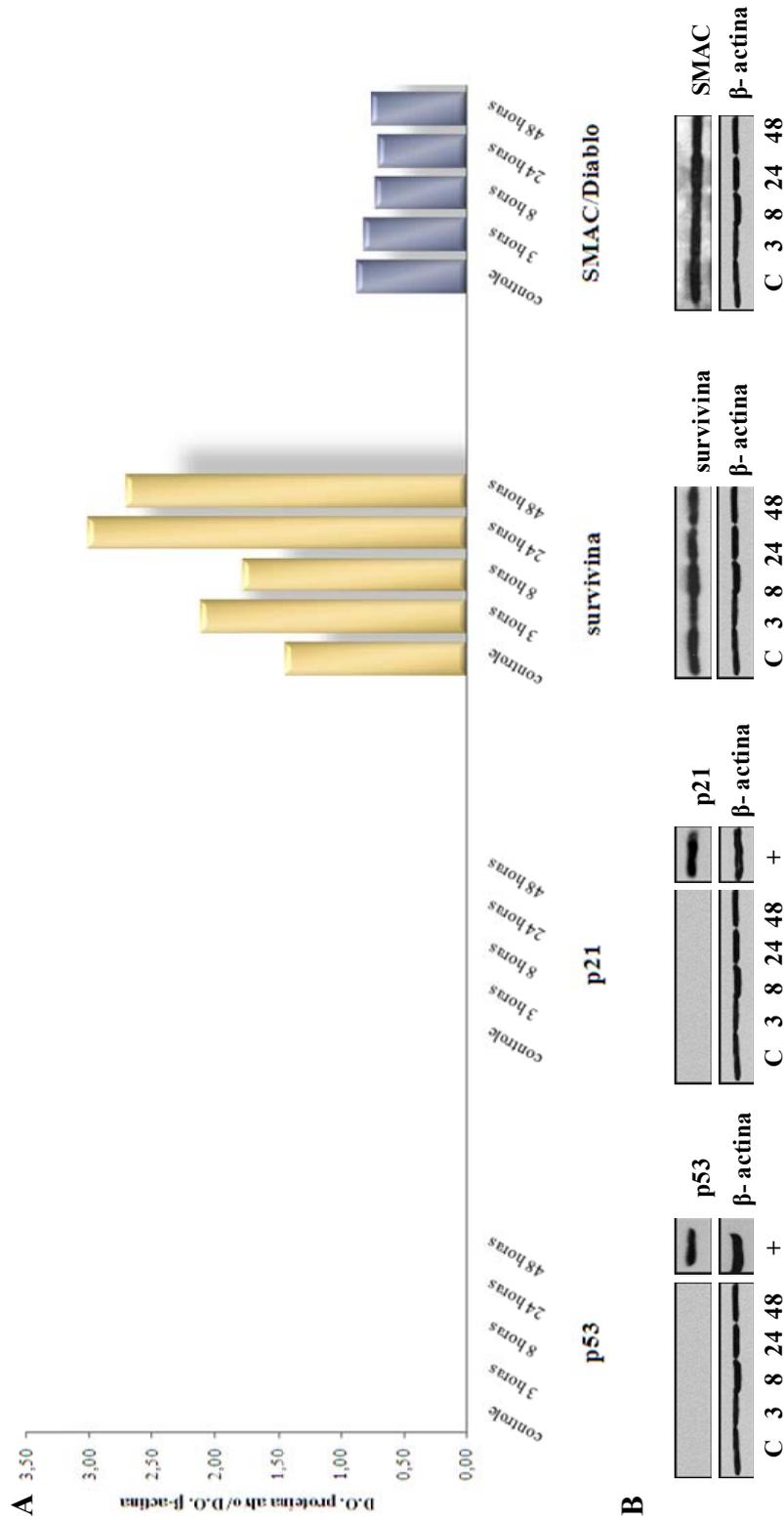
A Daudi não alterou seu perfil de expressão das proteínas p53 e p21 após a exposição aos agentes genotóxicos utilizados. Esta linhagem permaneceu com *status* negativo para expressão de ambas as proteínas após o tratamento. Entretanto, os índices de survivina aumentaram de forma significativa após o tratamento de Daudi com os quimioterápicos e com radiação gama. Já a expressão de SMAC/Diablo não se alterou de forma importante após os tratamentos realizados.

A linhagem Raji por sua vez, apresentou níveis altos de expressão de p53, porém esses não diferiram de forma importante dos níveis de expressão basais (sem tratamento). Um discreto aumento dos índices de expressão de p21 foi observado após os tratamentos com os quimioterápicos, entretanto, esse aumento não foi observado após tratamento das linhagens com radiação ionizante. A expressão de survivina aumentou após tratamento com os quimioterápicos, mas não com radiação ionizante e a expressão de SMAC/Diablo permaneceu praticamente inalterada após tratamento com os quimioterápicos, e níveis reduzidos foram observados após tratamento com radiação ionizante.

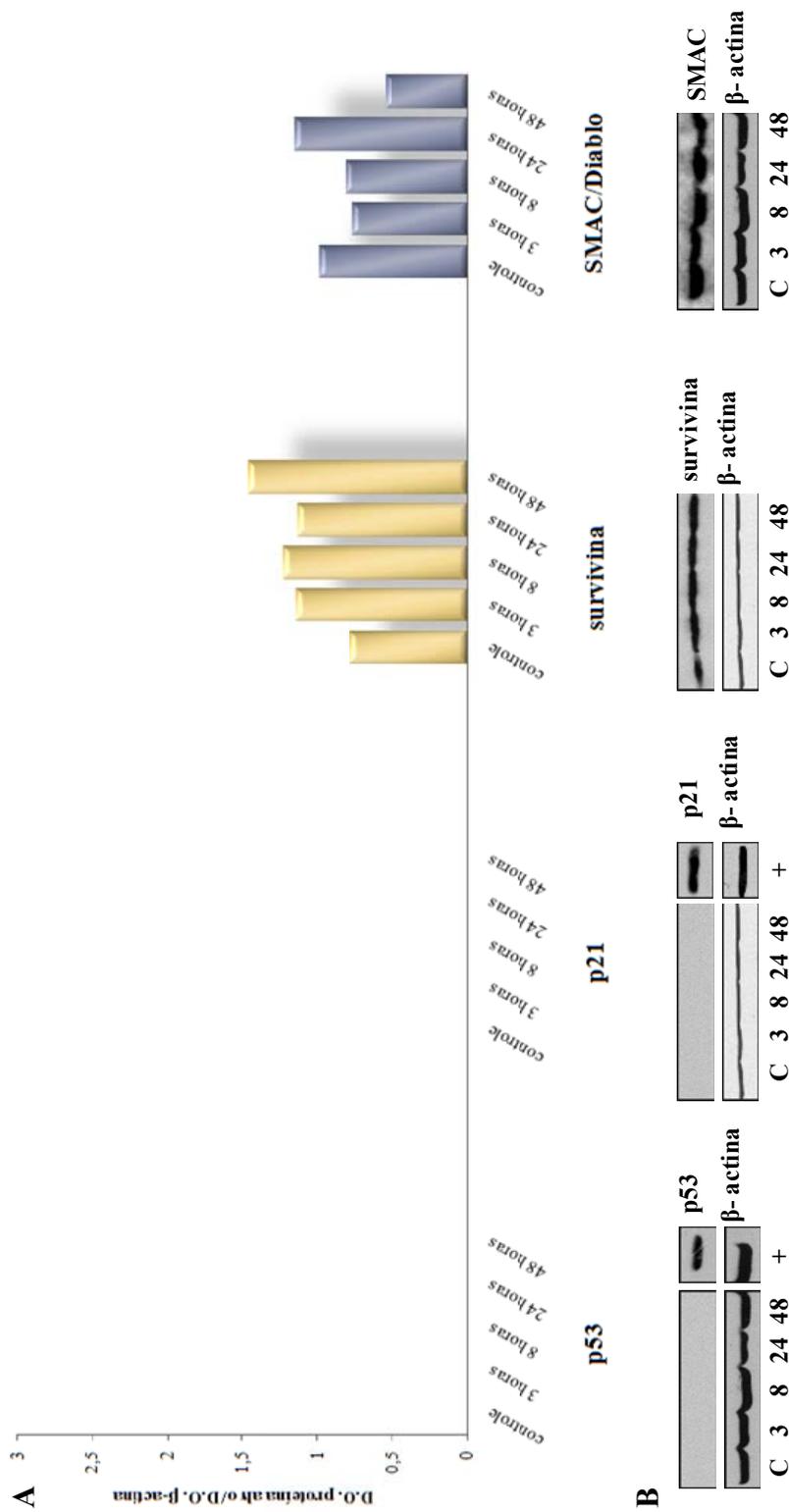
Os dados referentes à densitometria e as bandas ilustrativas dos resultados do *Western blotting* para ambas as linhagens são mostrados nas figuras 28 a 35.



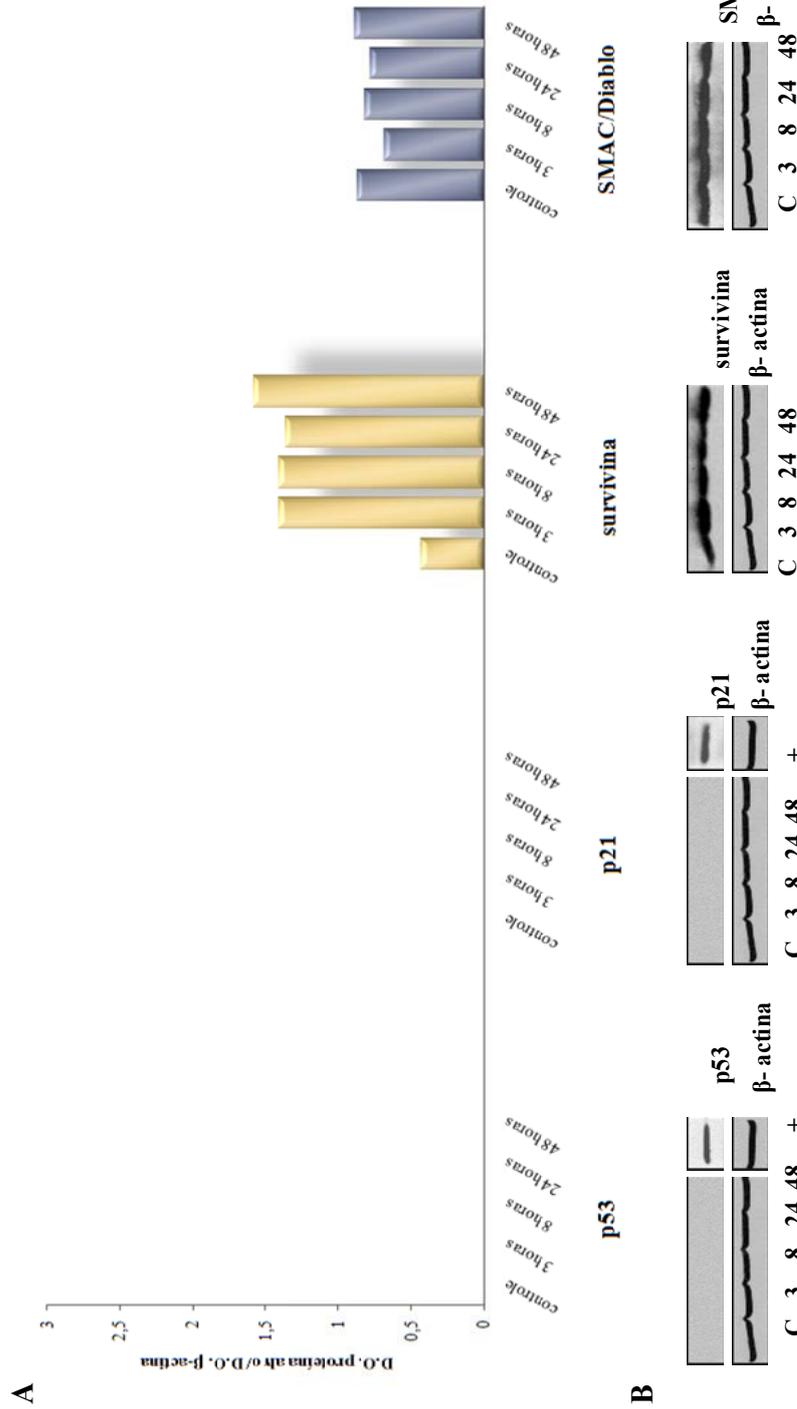
**Figura 28**– Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após tratamento com VP-16. **A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da  $\beta$ -actina após tratamento com VP-16 durante 3, 8, 24 e 48 horas. O controle (C) refere-se a linhagem sem nenhum tipo de tratamento. **B.** *Blots* obtidos para as proteínas alvo e  $\beta$ -actina após 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com VP-16. O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reprodutíveis.



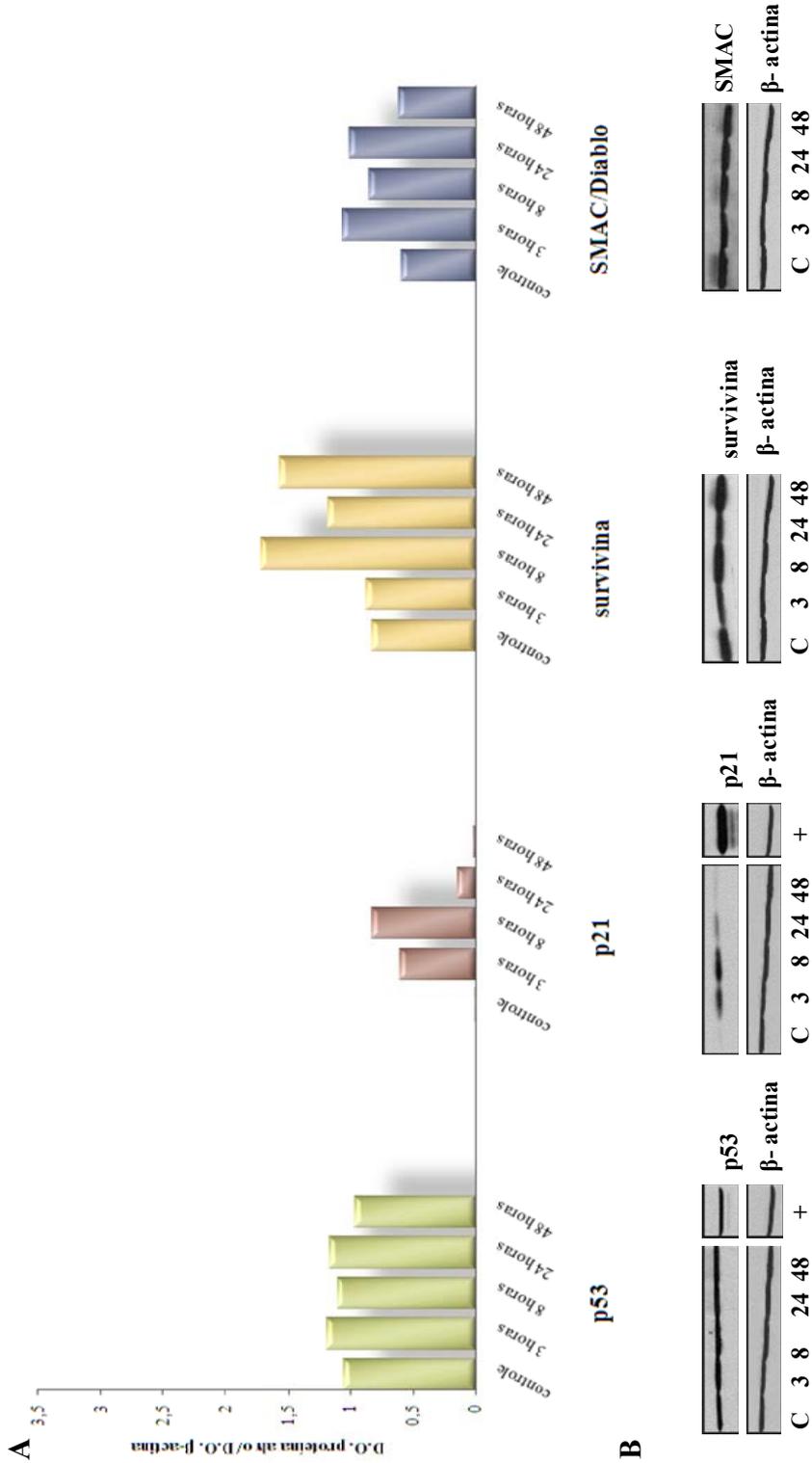
**Figura 29-** Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após tratamento com DOX. **A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da β-actina após tratamento com DOX durante 3, 8, 24 e 48 horas. O controle refere-se a linhagem sem tratamento. **B.** Bandas obtidas para as proteínas alvo e β-actina após 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com DOX. O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reprodutíveis. C, controle.



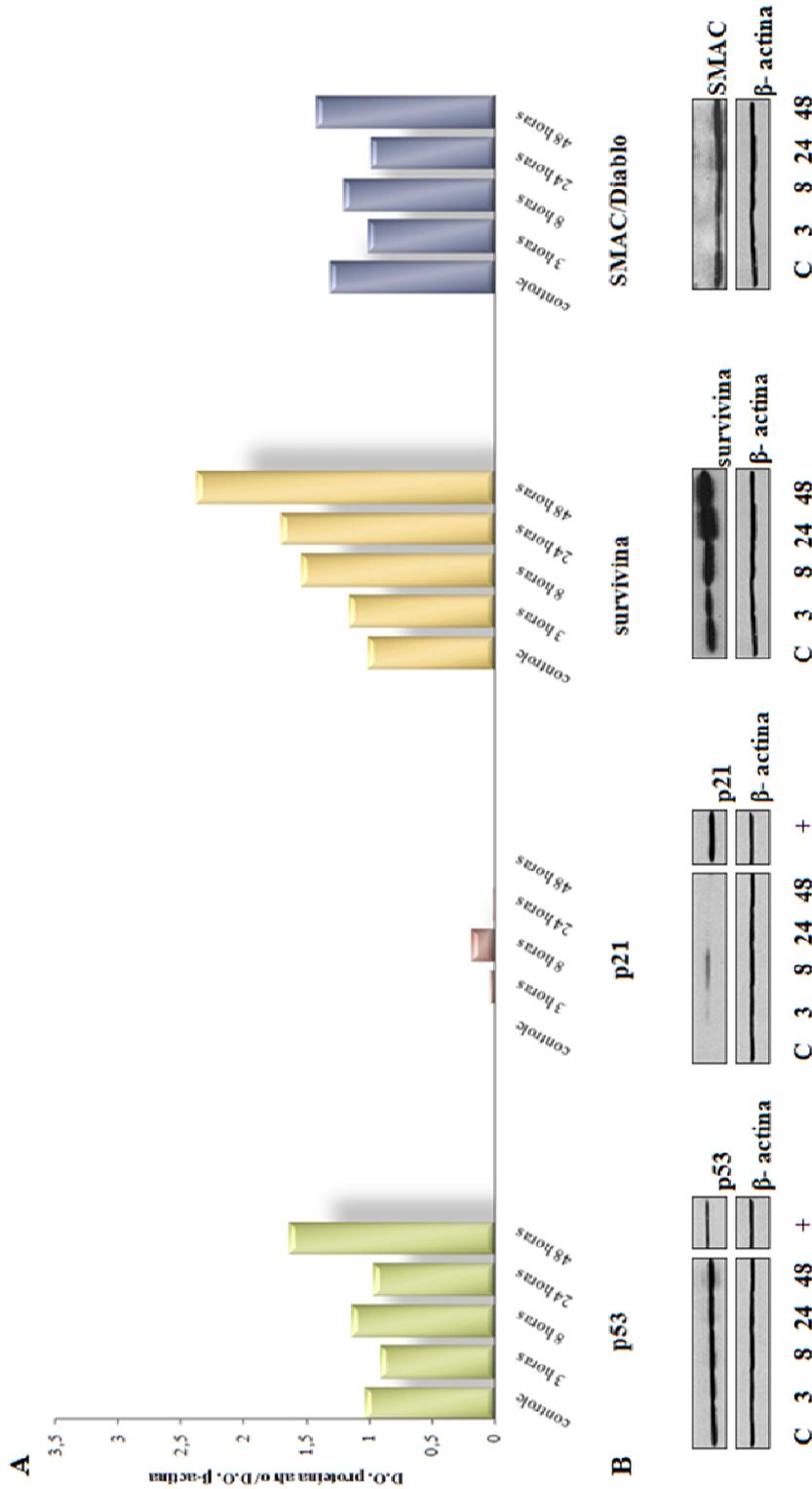
**Figura 30-** Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após tratamento com CDDP. **A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da β-actina após tratamento com CDDP durante 3, 8, 24 e 48 horas. O controle refere-se a linhagem sem tratamento. **B.** Bandas obtidas para as proteínas alvo e β-actina após 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com CDDP O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reprodutíveis. C, controle.



**Figura 31-** Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Daudi após exposição à radiação gama. **A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da β-actina 3, 8, 24 e 48 horas após a exposição. O controle refere-se a linhagem sem tratamento. **B.** Bandas obtidas para as proteínas alvo e β-actina após 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com radiação gama. O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reprodutíveis. C, controle.

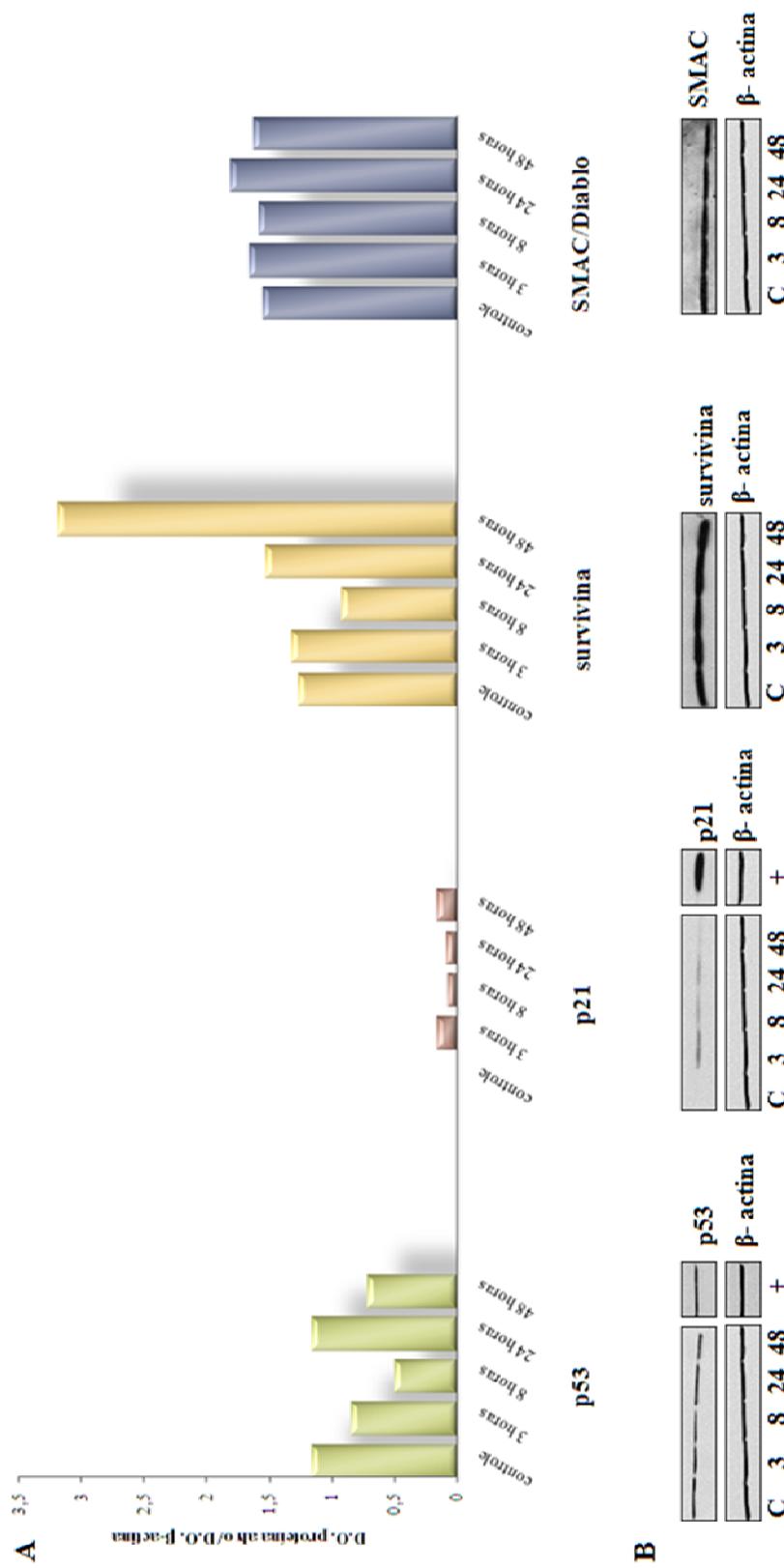


**Figura 32**– Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após tratamento com VP-16. **A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da  $\beta$ -actina após tratamento com VP-16 durante 3, 8, 24 e 48 horas. O controle (C) refere-se a linhagem sem tratamento. **B.** Bandas obtidas para as proteínas alvo e  $\beta$ -actina após 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com VP-16. O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reprodutíveis. C, controle.

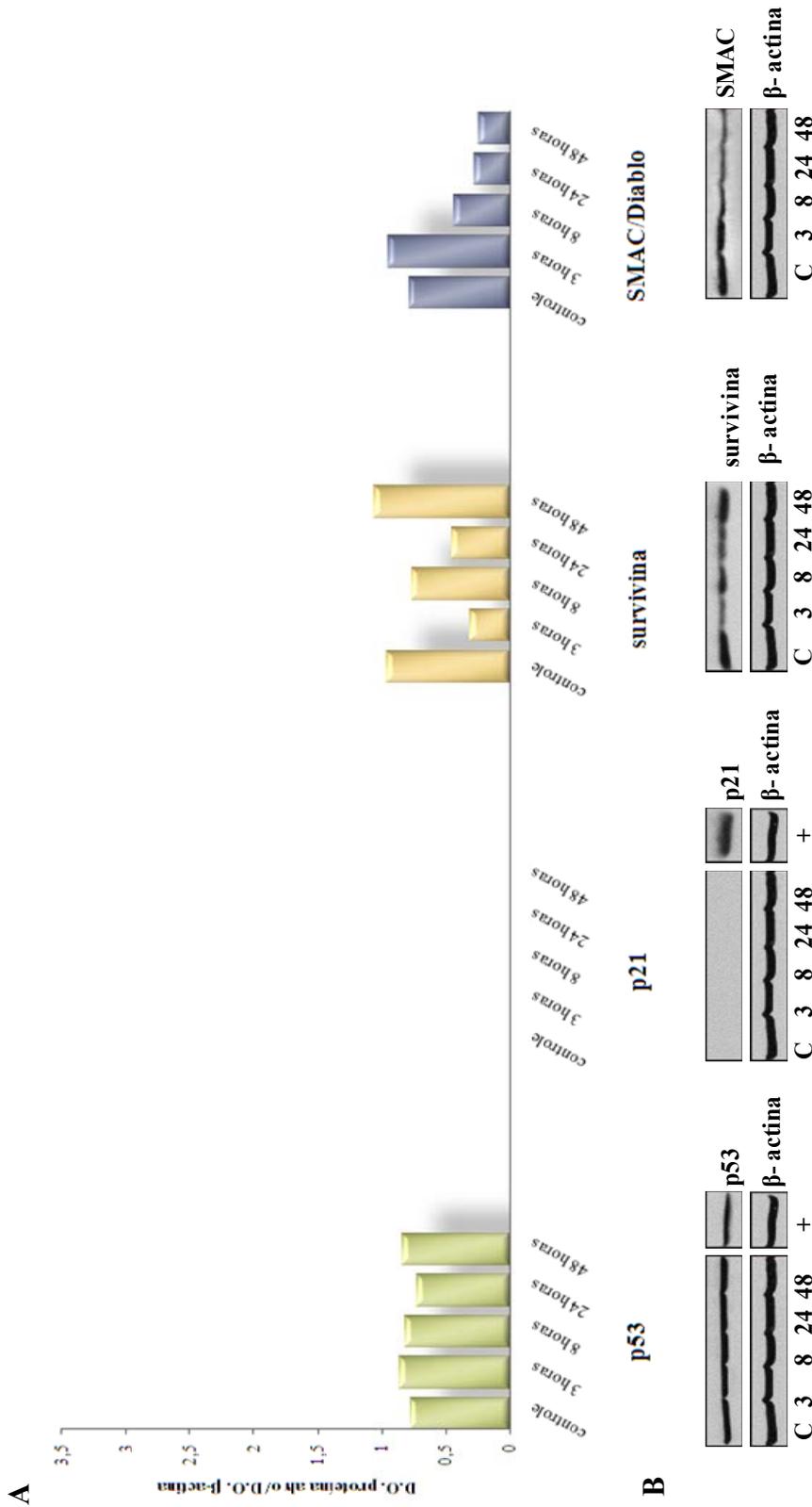


**Figura 33**– Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após tratamento com DOX.

**A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da  $\beta$ -actina após tratamento com DOX durante 3, 8, 24 e 48 horas. O controle refere-se a linhagem sem tratamento. **B.** Bandas obtidas para as proteínas alvo e  $\beta$ -actina após 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com DOX. O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reprodutíveis. C, controle.



**Figura 34-** Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após tratamento com CDDP. **A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da β-actina após tratamento com CDDP durante 3, 8, 24 e 48 horas. O controle refere-se a linhagem sem tratamento. **B.** Bandas obtidas para as proteínas alvo e β-actina após 3, 8, 24 e 48 horas de tratamento com CDDP. O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reprodutíveis. C, controle.

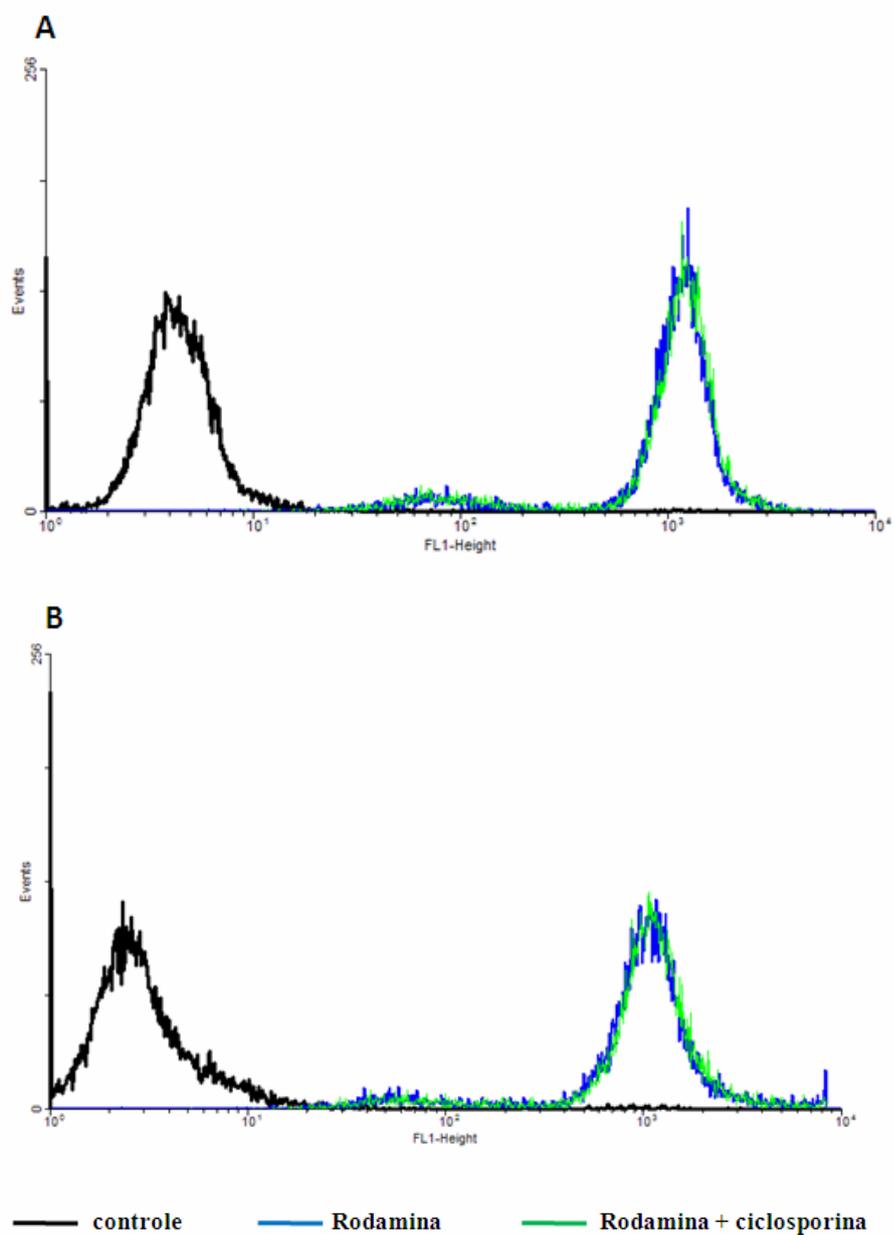


**Figura 35-** Perfil de expressão das proteínas p53, p21, survivina e SMAC/Diablo na linhagem Raji após exposição à radiação gama. **A.** Gráficos mostrando a relação entre as densidades ópticas das proteínas alvo (p53, p21, survivina e SMAC/Diablo) e a densidade óptica da β-actina 3, 8, 24 e 48 horas após a exposição. O controle refere-se a linhagem sem tratamento. **B.** Bandas obtidas para as proteínas alvo e β-actina 3, 8, 24 e 48 horas após a exposição à radiação gama. O símbolo + indica o controle positivo da reação de *Western blotting* para p53 e p21, a linhagem A549 (p53 selvagem) tratada com cisplatina. Os dados são representativos de dois experimentos independentes reproduzíveis. C, controle.

#### **4.4. Análise da funcionalidade das proteínas transportadoras Pgp e MRP1**

O ensaio de efluxo de rodamina-123, não caracterizou a presença da atividade das proteínas Pgp e MRP em nenhuma das duas linhagens, como observado na figura 36 A-B.

Observa-se que não houve deslocamento da curva de fluorescência referente ao tubo com rodamina-123 + ciclosporina, indicando que não há presença dessas bombas de efluxo que transportam ativamente a rodamina-123 para o exterior das células.



**Figura 36-** Ensaio de extrusão de rodamina-123 e modulação pela ciclosporina nas linhagens Daudi (A) e Raji (B).

A tabela 8 resume os resultados encontrados nas duas linhagens celulares.

**Tabela 8-** Síntese dos resultados observados no estudo.

Agente citotóxico	Linhagem Celular							
	Daudi				Raji			
	VP-16	DOX	CDDP	IR	VP-16	DOX	CDDP	IR
<b>Expressão de proteína</b>								
p53	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
p21	-	-	-	-	>	>	>	-
Survivina	>	>	>	>	>	>	>	>
SMAC/Diablo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<
<b>DL<sub>50</sub> (µM)</b>	25	2,5	20	—	0,625	0,2	15	—
<b>% apoptose (com DL<sub>50</sub>)</b>								
3 horas	2,87	n.r.	0,34	1,38	1,63	n.r.	1,08	2,29
8 horas	4,71	n.r.	0,46	2,71	12	n.r.	0,5	15,28
24 horas	6,7	n.r.	5,53	5,47	16,49	n.r.	9,88	48,22
48 horas	26,29	n.r.	28,43	25,26	56,04	n.r.	63,92	74,16
<b>Parada do ciclo celular</b>								
Parada em G1/S	não	n.r.	não	não	não	n.r.	não	não
Parada em G2/M	não	n.r.	não	sim	não	n.r.	não	não

-: negativo; n.a.: não alterada; n.r.: não realizada; >: aumento da expressão; < diminuição da expressão; IR: radiação gama

*Nota<sup>1</sup>*: n.a. indica que há positividade para expressão da proteína, embora ela não tenha se alterado de forma importante após a exposição aos agentes.

## 5. DISCUSSÃO

Na literatura científica um número incalculável de estudos têm sido publicados visando o entendimento da patogênese e resposta ao tratamento do câncer. Em geral esses estudos têm perguntas específicas que se relacionam a mecanismos ainda não completamente elucidados e utilizam modelos experimentais que exploram transfecção de mutantes em linhagens celulares com fenótipo *null*, ensaios de transfecção com vetores, camundongos *knockout* para um ou mais genes e, mais recentemente, ensaios utilizando RNA de interferência (LANG et al, 2004; WEISZ et al, 2004; BLANDINO et al, 1999; LANG et al, 2004; BOSSI et al, 2006).

A capacidade de uma célula ser imortalizada *in vivo* é multifatorial, embora um evento genético inicial afetando um gene supressor de tumor ou um gene que regula a proliferação celular possa ocorrer. Durante o processo de transformação maligna de uma célula, outros eventos ocorrem e adicionam vantagem à sua sobrevivência, através da subversão de mecanismos que controlam a morte celular e/ou regulam a estabilidade genômica (KOPNIN, 2000).

Como paradigma o LB é um exemplo de tumor em que após um evento inicial – a translocação 8;14 ou suas variantes que levam à expressão constitutiva da proteína c-Myc – ocorrem outros eventos com frequência variável (HECHT & ASTER, 2000; LINDSTROM & WIMAN, 2002). Estes eventos podem ser diferentes e determinar variados comportamentos das células com relação à agressividade do tumor e resposta ao tratamento. A escolha das linhagens Raji e Daudi no presente estudo foi determinada pelos fenótipos distintos tanto em relação ao tipo de mutação da proteína p53 (FARRELL, 1991; GAIDANO, 1991), quanto ao *status* da proteína pró-apoptótica Bax, também diferente nas duas linhagens. Enquanto a linhagem Raji não apresenta mutação no gene *bax*, a linhagem Daudi tem uma mutação localizada em um resíduo conservado do domínio funcional BH1 (G→ T, nucleotídeo 323) (GUTIERREZ, 1999). Como contraponto essas linhagens expressam a proteína survivina, um achado já descrito em linfomas de alto grau e em diversos tipos de câncer (AMBROSINI et al, 1997).

É conhecido que mutações no gene *TP53* estão associadas com a gênese de tumores, já que esse gene encontra-se mutado na maioria dos cânceres humanos. As mutações da p53 mais frequentemente associadas com tumores são mutações *missense* localizadas no sítio de ligação ao DNA da proteína. Essas mutações podem levar a um acúmulo da proteína mutante

com a perda das funções supressoras de tumor da proteína p53 selvagem (MENENDEZ et al, 2006). Entretanto, a alta frequência de mutações *missense* e os altos níveis de expressão da proteína p53 mutante no câncer levaram a suposição de que algumas mutantes da p53 adquiriam novas funções (“ganho de função”) que contribuíam para o desenvolvimento e progressão do câncer. Esse “ganho de função” poderia ocorrer devido a alteração de interações da p53 mutada com proteínas que se associam a p53 levando a transativação de genes que geralmente não são regulados pela p53 (MENENDEZ et al, 2006; BOSSI et al, 2006).

A maioria dos estudos que analisaram “ganho de função” da p53 empregaram sistemas artificiais em que mutantes da p53 são introduzidas em linhagens celulares *null*. Em virtude da utilização destes sistemas, o conceito de que mutantes da p53 são pro-oncogênicas tem sido questionado (VOUSDEN & PRIVES, 2005). São escassos na literatura estudos que exploram um contexto mais fisiológico, como linhagens celulares que expressam endogenamente a forma mutada da proteína p53. Portanto, o presente estudo visou explorar o entendimento da resposta ao tratamento no LB através da utilização de linhagens tipo celular-específico, ou seja, que possuem um evento inicial em comum, mas que apresentam diferentes mutações do gene *TP53*, e também correlacionar essas mutações com a resposta a diferentes tipos de agentes empregados no tratamento do LB visto a diferença descrita quanto ao *status* do gene *Bax* (GUTIERREZ, 1999).

As linhagens celulares utilizadas no nosso estudo, Raji e Daudi têm 2 mutações distintas descritas no gene *TP53* que são discordantes como referido na seção “Metodologia”. Este achado discordante nos direcionou a elucidar essa informação através do seqüenciamento dos éxons onde foram descritos as 2 mutações para cada linhagem (IARC). Nossos resultados confirmaram a presença da mutação no códon 213, éxon 6, na linhagem Raji como mostra o seqüenciamento de ambas as fitas. Com relação à mutação descrita no códon 234, éxon 7, o seqüenciamento foi inconclusivo. A mutação foi encontrada apenas na fita anti-senso, como mostrado no eletroferograma na figura 12, na seção “Resultados”, dessa forma há necessidade de clonar o fragmento gerado na amplificação desta região para obtenção de um eletroferograma sem artefatos e/ou perda de informação.

De forma surpreendente, a mutação originalmente observada na linhagem Daudi no códon 213, éxon 6, que ocasiona um códon de parada, não foi encontrada no nosso seqüenciamento, nas duas fitas, informação que foi confirmada em uma segunda amplificação

e novo seqüenciamento. O mesmo foi observado para a mutação descrita no códon 266 do éxon 8 porém, neste caso, a mutação não foi visualizada em uma das fitas, em 2 seqüenciamentos, havendo necessidade de clonar a região para confirmar esta informação.

Apesar de não ter sido possível esclarecer o sítio exato da mutação da linhagem Daudi que possivelmente está localizado nas regiões ainda não seqüenciadas, e investigar a segunda mutação da linhagem Raji, a análise do cariótipo das duas linhagens afasta a possibilidade de identificação equivocada das mesmas. A observação mais simples do cariótipo das duas linhagens mostra que são derivadas de pacientes do sexo masculino, como descrito originalmente, e apresentam a translocação t(8;14). Com relação às outras alterações descritas recentemente na Raji por cariótipo espectral (KARPOVA et al, 2005), foi confirmado na nossa análise por bandeamento G a presença de hiperdiploidia (84-92 cromossomos) e diversas alterações como add (4) (q35), der(14) e der (4), também relatadas por esses autores.

Um estudo recente onde foi realizado cariótipo espectral em 10 linhagens derivadas do LB, inclusive da linhagem Daudi, mostrou alterações cariotípicas nesta linhagem que foram observadas em nossa análise por bandeamento G. Estas alterações foram: der (2) e ganho do cromossomo 7 (+7). Neste estudo, o ganho do cromossomo 7 também foi observado na linhagem Ramos que é derivada de um paciente com LB esporádico e é negativa para EBV (KARPOVA et. al, 2006), e nas linhagens Namalwa e Mutu III que apresentavam outras alterações cariotípicas não observadas na Daudi. A deleção 17p e ganho 1q estava presente na linhagem Namalwa. A linhagem Mutu III apresentava ganho do cromossomo 20 (+ 20), e é derivada de um paciente do sexo feminino. Desta forma a análise comparativa do cariótipo das linhagens do nosso estudo permitiu a identificação de sua origem. Ainda reforçando a identidade da linhagem Daudi do nosso estudo, o mesmo estudo de Karpova e cols (2006) analisou a indução de apoptose com o quimioterápico VP16 sendo observado um perfil de resistência idêntico ao perfil observado em nossas análises.

Anteriormente foi relatado que diferentes mutações do gene *TP53* podem mudar o perfil dos genes ativados pela p53, assim como a intensidade de transativação e que, em última análise, essas alterações levariam a diferentes respostas biológicas (MENENDEZ et al, 2006). Além disso, as correlações do *status* da p53 com prognóstico e resposta a terapia mostraram que mutações da p53 estão correlacionadas a um pior prognóstico e resposta à terapia em vários tumores (KLUMB et al, 2003; LOWE, 1995; HAMADA et al, 1996). Com base nisso, avaliamos as diferenças de resposta das linhagens celulares Daudi e Raji, em

relação à sensibilidade a alguns quimioterápicos utilizados no tratamento do LB (PATTE et al, 2007a; PATTE et al, 2001)

Nossos resultados mostraram maior resistência da linhagem Daudi, em relação a Raji, a todos os quimioterápicos testados (doxorrubicina, etoposídeo e cisplatina). Além disso, ao serem expostas à 5Gy de radiação gama, a linhagem Raji apresentou índices de células em apoptose (inicial + tardia) consideravelmente maiores do que a Daudi. Ao observarmos as concentrações de cada droga que geraram um efeito semelhante (redução de 50% de viabilidade celular em 48 horas, DL<sub>50</sub>) observamos diferenças acentuadas nas DL<sub>50</sub> de DOX e VP-16 entre as duas linhagens, como observado a partir da tabela 5 na seção “Resultados”. Entretanto com o uso de CDDP esse efeito não foi observado (Tabela 5). Dessa forma mostramos que a presença de alguns tipos de mutantes da p53 pode aumentar a resistência a agentes anti-tumorais, de uma forma dependente do tipo de mutação e do tipo do quimioterápico usado. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por outros pesquisadores onde células *p53-null* da linhagem celular H1299 derivada de carcinoma de pulmão foram transfectadas com diferentes mutantes da p53 e apresentaram maior ou menor refratariedade aos efeitos citotóxicos de VP-16 e CDDP dependendo do tipo de mutação e da identidade de droga testada (BLANDINO et al, 1999).

A diferença de resistência atribuída ao *status* da proteína p53 pode ser explicada pelo fato de que nem todas as mutações da p53 geram efeitos semelhantes sobre a função da proteína. Cada mutação danifica a estrutura da proteína de uma forma específica, levando a várias conseqüências funcionais. Estudos iniciais mostravam que mutantes da p53 perdiam sua função de transativação dos genes alvo, mas posteriormente, foi mostrado que diferentes mutantes da p53 ainda mantinham algumas de suas funções. A perda da função da proteína p53 selvagem pode ocorrer, por exemplo, em alguns casos onde há heterozigidade da proteína pela associação da p53 mutada com a p53 selvagem formando um hetero-tetrâmero que faz com que a proteína selvagem assuma uma conformação mutada ou inativa. (DEARTH et al, 2007; SIGAL & ROTTER, 2000).

Diversas classificações para mutantes da p53 foram propostas. Uma classificação simplificada divide as mutações da p53 em duas classes. Mutações de classe I ocorrem em áreas de contato do DNA no *loop* L3 ou próximo ao motivo *loop-sheet-helix* (p.ex. resíduos 248R e 273R). Já as mutações classe II, como 175R, por exemplo, ocorrem em áreas importantes para a estabilidade conformacional da proteína p53, como o *loop* L2 e a região de

ligação de zinco e levam a alterações conformacionais na proteína. Entretanto, essa categorização não leva em consideração o fato de que pode haver alguma variação do grau de dobramento entre as mutantes e que algumas mutantes de contato também podem sofrer alterações estruturais (SIGAL & ROTTER, 2000). Foi relatado ainda que apenas a caracterização estrutural pode não ser suficiente para prever as consequências biológicas de uma mutação da p53 e algumas mutantes ainda tem capacidade de transativar promotores de alta afinidade, como o promotor do gene *p21<sup>Waf-1/Cip-1</sup>*, mas não tem capacidade de transativar promotores de menor afinidade, como *bax* (MARTIN et al, 2002). Estudos *in vivo* são portanto essenciais para esclarecer as consequências das mutações da p53 dentro de um contexto fisiológico.

Para testar a hipótese de que as mutantes da p53 do nosso estudo possuem características funcionais diferentes em relação a transativação de genes alvo, como *p21<sup>Waf-1/Cip-1</sup>* e habilidade de induzir apoptose e bloqueio do ciclo celular, experimentos foram realizados analisando a expressão das proteínas p53 e p21, assim como índice de células em apoptose e na fase G1/S do ciclo celular após exposição aos quimioterápicos ou radiação gama. A radiação gama, embora não seja utilizada nos protocolos de tratamento do LB, foi selecionada neste estudo por ser um agente cujo mecanismo de ação é mediado pela p53 (GIACCIA & KASTAN, 1998; VOGELSTEIN et al, 2000).

No nosso estudo, a expressão basal da p53 difere entre as linhagens provavelmente como uma consequência do tipo de mutação observada, o que pode causar estabilização da proteína. A linhagem Raji possui alta expressão basal de p53, enquanto a Daudi não apresenta expressão. Entretanto, ao serem induzidas com agentes genotóxicos nenhuma das duas linhagens alterou de forma importante o perfil de expressão da proteína p53, como seria esperado, por exemplo, no caso da proteína p53 selvagem funcional. Em contrapartida, na linhagem Raji foi observado aumento da proteína p21, codificada por um gene *downstream* da p53 que atua no controle da transição de G1/S do ciclo celular. Este aumento ocorreu com quimioterápicos, principalmente até 8 horas após indução, e após esse tempo, os níveis da proteína foram diminuindo.

Além disso, ambas as linhagens apresentaram capacidade de induzir apoptose tanto pelos quimioterápicos quanto pela radiação gama, embora em intensidades diferentes, como observado através de uma avaliação quantitativa na qual foi observado que na Daudi a indução de apoptose ocorreu em escala muito inferior àquela ocorrida na Raji sob as mesmas

condições como, por exemplo, pela indução de apoptose com a utilização de 5Gy de raios gama. Após 48 horas, aproximadamente 80% das células da Raji já estavam comprometidas no processo apoptótico induzido pela radiação, enquanto apenas 20% das células da Daudi encontravam-se em apoptose no mesmo momento. Esses dados mostram uma resistência consideravelmente maior da linhagem Daudi em relação à Raji, como já mostrado pelos ensaios de viabilidade celular, embora ambas as linhagens apresentem capacidade de indução de apoptose.

A cisplatina induziu apoptose nas duas linhagens de uma forma semelhante já que a concentração do fármaco usada para os experimentos de indução de apoptose não diferiram muito entre as linhagens, ao contrário do que ocorreu com os outros quimioterápicos. Vale ressaltar que a cisplatina pode induzir duas vias paralelas de resposta de morte, uma dependente da p53 e uma dependente da p73, ambas envolvidas em respostas de dano ao DNA (WADE & ALLDAY, 2000).

Os resultados obtidos na Raji, onde houve aumento da expressão da p21 e indução de apoptose podem estar relacionados aos heterocomplexos de p53 endógenos formados entre as formas mutantes e selvagens da proteína (Raji é heterozigota para a mutação do éxon 213) que podem não ter perdido a capacidade de se ligar ao DNA e, portanto, transativar genes alvo. Por outro lado, já foi mostrado que a apoptose dependente da p53 nem sempre ocorre por mecanismos dependentes da transativação de genes alvo, sugerindo uma importância para a apoptose dependente da p53, e independente de transativação (KAKUDO et al, 2005). Kakudo e cols (2005) demonstraram recentemente que algumas mutantes da p53 são “supertrans” na sua capacidade de induzir apoptose, enquanto outras mutantes são totalmente não funcionais.

A modulação da localização dos receptores de morte para ativação da caspase 8, assim como, um efeito direto da p53 na mitocôndria vêm sendo propostos como mecanismos de indução de apoptose independente da transativação (CHIPUK et al, 2003). O caminho pelo qual a p53 promove a apoptose, além de envolver a regulação transcricional de genes alvo, também envolve uma ativação independente de transativação e esta função possivelmente difere em diferentes tipos celulares (BENCHIMOL, 2001). A apoptose dependente da p53 é mediada via Apaf-1/caspase-9 e envolve a liberação do citocromo *c* da mitocôndria. No entanto, como a p53 promove a liberação do citocromo *c* para ativar a caspase permanece ainda uma questão controversa. Alguns genes relacionados à apoptose como *Bax*, *Noxa*,

*CD95 (Fas/APO-1)*, *PUMA* e outros, contêm elementos responsivos à p53. Um fator transcricional como a p53 tem muitos alvos, e muitos desses alvos podem ser co-dependentes de outros fatores transcricionais, como é o caso da regulação do *Bax* pela p53 que requer a cooperação do cofator Sp1 (THORNBORROW & MANFREDI, 2001).

Além disso, a transativação do gene *p21<sup>Waf-1/Cip-1</sup>* foi descrita como ocorrendo independentemente da p53 como mostrado em um estudo onde ocorreu parada do ciclo celular dependente de p21, mas independente de p53 (AGUERO et al, 2005). A mutação da p53 presente na Daudi, por sua vez, não apresenta capacidade de induzir transcrição de p21, mas preserva habilidade de induzir apoptose, ainda que em pequena escala. Esses dados corroboram a hipótese de ter ocorrido apoptose dependente de p53 e independente de transativação.

Uma observação instigante foi o aumento da expressão da proteína p21 na Raji não acompanhada de parada do ciclo celular no *checkpoint* G1/S, como seria esperado já que a proteína p21 está envolvida nesse contexto. Isso pode ser devido à inativação da p21, que dessa forma não seria capaz de realizar a parada do ciclo celular, como mostrado anteriormente em células F9 de teratocarcinoma que possuem p53 selvagem e, portanto, funcional. Após indução com radiação gama dessas células, foi observado acúmulo de proteína p53 selvagem com conseqüente acúmulo de transcritos de RNAm da p21. Entretanto não houve parada do ciclo celular em G1/S, pois a proteína p21 não estava ativa devido a sua degradação proteossômica (MALASHICHEVA et al, 2000). Cenário semelhante foi observado em células de fibroblasto embrionário de rato transformadas pelos oncogenes E1A + cHa-ras que possuem p53 selvagem e capacidade de transativar *p21<sup>Waf-1/Cip-1</sup>* após estímulo com radiação ionizante. Entretanto, não foi observada parada em G1/S, provavelmente devido à interação da p21 com as proteínas E1A, o que levou a inativação dessa proteína (BULAVIN et al, 1999).

A habilidade da p53 de induzir a parada em G1/S é mediada por genes não envolvidos no controle da apoptose (*p21<sup>Waf-1/Cip-1</sup>*, *gadd45* e *14-3-3 $\sigma$* ). Até hoje não está claro porque algumas células com p53 selvagem sofrem apoptose em resposta a ativação da p53 enquanto outras, sofrem parada do ciclo celular. Por exemplo, fibroblastos normais sofrem parada em G1 em resposta ao dano ao DNA enquanto fibroblastos em proliferação sofrem apoptose dependente da p53 (HERMEKING & EICK, 1994). Um modelo proposto é que o nível de p53 determina se a célula vai sofrer parada no ciclo (níveis baixos), ou apoptose (níveis altos)

(BENCHIMOL, 2001). No entanto, este modelo simplificado não elucidada a capacidade da p53 de ativar diretamente a mitocôndria e determinar apoptose. Existe evidência do papel da p53 citoplasmática na indução da apoptose. Recentemente, foi demonstrado que a p53 pode ativar a proteína Bax permitindo a permeabilização da mitocôndria e apoptose. Em paralelo, a p53 pode liberar proteínas pró-apoptóticas seqüestradas pela Bcl-x<sub>L</sub> (Bid), possibilitando a ativação indireta da proteína Bax. Estes dados sugerem funções citoplasmáticas da p53 análogas ao domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas (CHIPUK & GREEN, 2004; CHIPUK et al, 2004).

Podemos concluir a partir dos resultados de indução de apoptose e parada do ciclo celular que as mutantes da p53 do estudo apresentam capacidade de indução de apoptose, embora sua atividade de parada do ciclo celular em G1/S após agentes que causam dano ao DNA esteja prejudicada. Esses resultados são consistentes com trabalhos anteriores que mostram que as funções da p53 de induzir parada do ciclo celular e de induzir apoptose são dissociadas (DELIA et al, 1997; ROWAN et al, 1996; RYAN & VOUSDEN, 1998).

Um mecanismo de resistência adicional como a presença de bombas de efluxo funcionais mediadas por proteínas da família ABC também poderia explicar em parte a maior resistência da linhagem Daudi aos quimioterápicos, embora não explicasse a maior resistência à radiação ionizante. Entretanto, ao testarmos a funcionalidade de bombas de efluxo das proteínas Pgp e MRP pelo teste de extrusão de Rho-123 não encontramos atividade de bombas de efluxo, o que corrobora os indícios de que a divergência das respostas entre as linhagens em relação à indução de apoptose e resistência aos agentes citotóxicos utilizados no estudo são causadas na sua maior parte pelas diferentes mutações do gene *TP53*, que conferem funcionalidades variadas às proteínas codificadas.

Por outro lado, sabe-se que o mecanismo de resistência as drogas é multifatorial e pode também estar relacionado a defeitos nas vias da apoptose por mutações ou diferentes formas de *splicing* de proteínas da cascata de apoptose, resultando em proteínas com diferentes funções. (GUTIERREZ et al, 1999; TRÖGER et al, 2007).

O gene que codifica a proteína anti-apoptótica survivina foi mostrado como sendo um gene que é reprimido pela p53 em linhagens celulares com p53 selvagem (HOFFMAN et al, 2002; NAKANO et al, 2005). Foi relatado ainda que o acúmulo da p53 selvagem leva a repressão do promotor do gene da survivina, com conseqüente redução da expressão da proteína em diversos tipos celulares de forma independente da progressão do ciclo celular, e

também, que a super-expressão de survivina em células que estão sofrendo apoptose mediada pela p53 causa resistência à apoptose. Dessa forma, foi sugerido que a survivina tem um papel relevante na via de indução de apoptose mediada pela p53 (MIRZA et al, 2002).

Para avaliar o papel da survivina no contexto da resistência à DOX, VP-16, CDDP e radiação gama, em relação às mutações da p53 nas duas linhagens selecionadas em nosso estudo, a expressão de survivina foi analisada por *Western blotting* antes e após o tratamento com esses agentes genotóxicos.

Foi observado que na linhagem Daudi a radiação gama causou parada do ciclo celular no *checkpoint* G2/M, com baixos índices de apoptose e super-expressão de survivina. Já os quimioterápicos, VP-16 e CDDP também causaram aumento dos níveis de survivina, entretanto, nas concentrações utilizadas, não foi observada parada do ciclo celular em G2/M e o percentual de células em apoptose observado também foi baixo, embora ocorresse apoptose em algum grau, atingindo um máximo de aproximadamente 20% das células em apoptose em 48 horas.

Já na linhagem Raji após tratamento com os quimioterápicos VP-16 e CDDP, os níveis aumentados de expressão de survivina observados não se correlacionaram com parada do ciclo celular (não ocorreu parada em G2/M), mas se correlacionaram com indução de apoptose em grande extensão (aproximadamente 55-75% das células em apoptose após 48 horas de tratamento). A radiação gama também teve efeito diverso daquele observado com os quimioterápicos VP-16 e CDDP sobre essa linhagem. Os níveis de survivina após o tratamento oscilaram durante os tempos analisados após a exposição à radiação, mas não sofreram aumento importante em relação ao controle sem tratamento, e da mesma maneira que a ocorrida com as drogas não houve parada em G2/M e percentuais altos de células em apoptose foram observados.

O tratamento com DOX também causou aumento dos níveis de survivina, em ambas as linhagens, entretanto nosso estudo não testou os níveis de apoptose e parada do ciclo celular em G2/M induzidos com essa droga. Essas análises não foram possíveis em virtude desse quimioterápico emitir fluorescência que é detectada pelo citômetro de fluxo no mesmo canal que é utilizado pelo iodeto de propídeo, reagente usado tanto para os experimentos de detecção de apoptose e análise do ciclo celular. Dessa forma, nas concentrações utilizadas no nosso estudo, a fluorescência emitida interferiu com os resultados dificultando uma análise precisa dos dados.

Nossos resultados na linhagem Daudi vão de encontro a dados mostrando que a p53 mutada não causa o mesmo efeito repressor sobre a survivina que a p53 selvagem, e sugerem que a perda da função normal de p53 em células tumorais pode contribuir para perda da regulação da survivina e resistência a agentes que causam dano ao DNA. Em um estudo realizado por Zhou e colaboradores (2002), células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) apresentando p53 selvagem, ao serem induzidas com DOX, apresentaram acúmulo de p53 com conseqüente regulação negativa da survivina, e apoptose. Já o tratamento de células apresentando p53 mutada causou uma regulação positiva da survivina, com parada do ciclo celular em G2/M, sem indução de apoptose. Por outro lado, em células *null* para a p53 houve parada do ciclo celular em G2/M, mas a expressão de survivina não se alterou e as células sofreram apoptose limitada.

Outros trabalhos recentes reforçam a hipótese de que a survivina é regulada positivamente em células com p53 mutada e que sua expressão confere um fenótipo de resistência às drogas e à radiação, e que estratégias de inibição de survivina (por exemplo usando siRNA), torna essas células mais sensíveis à quimioterapia (YONESAKA et al, 2006; SAH et al, 2006).

A correlação de aumento da expressão de survivina com altos índices de apoptose na linhagem Raji foi inesperada. Entretanto, a survivina possui diferentes variantes de *splicing* e foi sugerido que a expressão dessas variantes seria regulada de forma diferente. Zhu e colaboradores (2004) mostraram que uma das formas da p53 induzir apoptose em células de leucemia mielóide crônica é através da regulação diferenciada da survivina e suas variantes e que a variante survivina-2B é uma isoforma pró-apoptótica que tem sua expressão regulada pela p53. Dessa forma, na Raji poderia estar ocorrendo uma super-expressão de uma variante da survivina com características pró-apoptóticas, ao invés da forma selvagem anti-apoptótica, explicando os altos índices de apoptose observados. Esse dado também sugere que a mutante da p53 presente nessa linhagem, mantém algumas funções da proteína selvagem já que a regulação positiva de formas pró-apoptóticas da survivina foi vista ocorrendo em células com p53 selvagem. Esses dados, em conjunto com os resultados apresentados no presente estudo sugerem que dentro do contexto da resistência às drogas, a p53 mutada age também através da regulação da survivina.

Recentemente foi sugerido por Song e colaboradores (2003) que a interação entre survivina e SMAC/Diablo ocorre *in vitro* e *in vivo* e que o resultado dessa interação contribui

para a função inibitória da survivina durante a apoptose induzida pelo Taxol em células HeLa derivadas de câncer de colo uterino. O mecanismo proposto por esse grupo para o efeito de inibição da apoptose realizado pela survivina seria que a interação entre a survivina e a SMAC/Diablo liberada da mitocôndria, reduziria o antagonismo da SMAC/Diablo pela XIAP. Dessa forma, a proteína XIAP livre poderia interagir diretamente com as caspases, bloqueando a morte celular. Em outro estudo foi verificado que SMAC/Diablo atua na via mitocondrial de indução de apoptose em células de carcinoma de ovário, entretanto, a survivina não inibiu os efeitos pró-apoptóticos de SMAC/Diablo nessas células (MCNEISH et al, 2005).

A análise da expressão de SMAC/Diablo por *Western blotting* após a utilização dos agentes citotóxicos nas linhagens do nosso estudo foi realizada para avaliar a expressão dessa proteína e correlacioná-la com a expressão de survivina. Não foram observadas alterações significativas na expressão de SMAC/Diablo com nenhum dos tratamentos utilizados nas duas linhagens do estudo, exceto Raji induzida com radiação ionizante, que teve os níveis de SMAC/Diablo diminuídos. Como respaldo às nossas observações, recentemente foi relatado que a linhagem Raji é deficiente na liberação de SMAC/Diablo possivelmente devido à falta de ativação de caspases mediada pelo citocromo *c* (HANSEN et al, 2006). Além disso, foi ainda verificado que a falha na formação do apoptossomo e ativação das caspases pelo citocromo *c* nessa linhagem pode ser causada pela falta de expressão citosólica de Apaf-1, por seqüestro dessa proteína para membrana citoplasmática, sugerindo um modelo em que células com um nível reduzido de Apaf-1 são objeto de regulação da apoptose dependente de citocromo *c* pelas IAPs endógenas (SUN et al, 2005; SUN et al, 2007). Nossos resultados indicam que a linhagem Daudi pode apresentar um mecanismo semelhante ao observado na Raji em relação à liberação de SMAC/Diablo, já que foram observados resultados semelhantes para as duas linhagens quanto à expressão da proteína.

No presente estudo demonstramos que diferentes respostas a agentes citotóxicos podem estar associadas às diferentes mutações do gene *TP53* em células derivadas de pacientes com LB, que atuam conferindo *status* funcional diferenciado às proteínas codificadas. Essa relação da p53 mutada com a resistência pode ser causada por alterações nas vias apoptóticas mediadas pela p53, tanto por alterações na transativação de genes alvo da p53, manutenção ou perda da capacidade de induzir apoptose independente de transativação, assim como, através da interação da p53 mutada com survivina.

Estudos adicionais com o objetivo de analisar o papel das mutações do gene *bax* e expressão de outras IAPs, como XIAP, assim como a inibição da expressão de survivina nessas linhagens podem auxiliar a esclarecer os resultados obtidos no presente estudo. A utilização de linhagens celulares derivadas do LB e outros tumores com diferentes mutações da p53 poderá, no futuro, com emprego de metodologias mais sofisticadas de investigação, permitir uma maior compreensão dos mecanismos relacionados ao ganho de função da proteína p53, além possibilitar o estudo da interface e sinergismo de outras alterações genéticas que ocorrem durante o desenvolvimento do LB em menor proporção, mas que podem contribuir para resistência ao tratamento nesse tumor.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi observada diferença de sensibilidade aos quimioterápicos DOX, CDDP e VP-16 e à radiação gama entre as linhagens Daudi e Raji derivadas do Linfoma de Burkitt;
- ✓ A linhagem Daudi apresentou maior resistência do que a Raji a todos os agentes testados, resistência esta relacionada ao tipo de mutação presente nesta linhagem;
- ✓ Após tratamento com os agentes citotóxicos, não foi observado aumento da expressão de p53 nas duas linhagens, e na Raji houve aumento de expressão da p21 com todos os agentes testados, exceto, com radiação gama;
- ✓ Não foi observada parada do ciclo celular na fase G1/S correlacionada com aumento de p21 sugerindo possível mecanismo de inativação de p21 na linhagem Raji.
- ✓ A radiação ionizante causou parada do ciclo celular na fase G2/M na linhagem Daudi reforçando a hipótese da existência de outros mecanismos de controle deste *checkpoint* do ciclo celular;
- ✓ Os níveis de survivina aumentaram após tratamento mostrando que a super-expressão de survivina em células com p53 mutada pode ser um fator que leva a resistência a apoptose;
- ✓ Níveis de survivina correlacionados a um alto percentual de apoptose foram observados na Raji sugerindo que pode estar ocorrendo a expressão diferenciada de variantes de *splicing* da survivina pela p53.
- ✓ Os níveis de SMAC/Diablo não sofreram alterações significativas após exposição das células das linhagens aos diferentes agentes citotóxicos provavelmente devido a falta de Apaf-1 citosólica que gera uma falha na ativação das caspases mediada

pelo citocromo *c*.

- ✓ Pôde ser observada diferença na funcionalidade da proteína p53 mutada em relação à indução de apoptose nas duas linhagens celulares indicando a possibilidade de indução da apoptose independente da transativação, principalmente na linhagem Raji.
- ✓ As funções de transativação de genes alvo de controle do *checkpoint* G1/M e indução de apoptose parecem estar dissociadas nas mutantes da p53 das linhagens do estudo.
- ✓ Diferentes mutações do gene *TP53* podem conferir *status* funcional diferente às mutantes.
- ✓ A sensibilidade à terapia em células de Linfoma de Burkitt com diferentes mutações do gene *TP53* é dependente do tipo de mutação e do tipo de agente citotóxico utilizado.
- ✓ A utilização de linhagens celulares com mutantes da p53 endógenas pode auxiliar a elucidar mecanismos de resistência no Linfoma de Burkitt em um contexto mais fisiológico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUERO, M.F.; FACCHINETTI, M.; SHELEG, Z.; SENDEROWICZ, A.M. Phenoxodiol, a novel isoflavone, induces G1 arrest by specific loss in cyclin-dependent kinase 2 activity by p53-independent induction of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. **Cancer Res**, v. 65, n. 8, p. 3364-3373, 2005.
- ALONI-GRINSTEIN, R.; SCHWARTZ, D.; ROTTER, L.V. Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma-irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa light chain gene expression. **EMBO J**, v. 14, n. 7, p. 1392-1401, 1995.
- AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, v. 3, n. 8, p. 917-921, 1997.
- ARAÚJO, I.; FOSS, H.D.; BITTENCOURT, A.; HUMMEL, M.; DEMEL, G.; MENDONÇA, N.; HERBST, H.; STEIN, H. Expression of Epstein-Barr virus-gene products in Burkitt's lymphoma in Northeast Brazil. **Blood**, v. 87, n. 12, p. 5279-5286, 1996.
- BAMFORD, S.; DAWSON, E.; FORBES, S.; CLEMENTS, J.; PETTETT, R.; DOGAN, A.; FLANAGAN, A.; TEAGUE, J.; FUTREAL, P.A.; STRATTON, M.R.; WOOSTER, R. The COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer) database and website. **Br J Cancer**, v. 91 n. 2, p. 355-358, 2004.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BATES, S.; VOUSDEN, K.H. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. **Curr Opin Genet Dev**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 1996.
- BEN DAVID, Y.; PRIDEAUX, V.R.; CHOW, V.; BENCHIMOL, S.; BERNSTEIN, A. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. **Oncogene**, v. 3, n. 2, p. 179-185, 1988.
- BENCHIMOL, S. p53-dependent pathways of apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 8, n. 11, p. 1049-1051, 2001.
- BENCHIMOL, S.; LAMB, P.; CRAWFORD, L.V.; SHEER, D.; SHOWS, T.B.; BRUNS, G.A.; PEACOCK, J. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. **Somat Cell Mol Genet**, v. 11, n. 5, p. 505-510, 1985.
- BLANDINO, G.; LEVINE, A.J.; OREN, M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. **Oncogene**, v. 18, n. 2, p. 477-485, 1999.
- BOSSI, G.; LAPI, E.; STRANO, S.; RINALDO, C.; BLANDINO, G.; SACCHI, A. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 304-309, 2006.
- BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). **Oncol Rep**, v. 10, n. 6, p. 1663-1682, 2003.
- BRABEC V, KASPARKOVA J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug Resist Updat**, v. 8, n. 3, p. 131-46, 2005.
- BULAVIN, D.V.; TARAROVA, N.D.; AKSENOV, N.D.; POSPELOV, V.A.; POSPELOVA, T.V. Dereglulation of p53/p21Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHa-ras transformed cells after gamma-irradiation. **Oncogene**. v. 18, n. 41, p. 5611-5679, 1999.
- BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in African children. **Br J Surg**, v. 46, n. 197, p. 218-223, 1958.

BURKITT, D.; O'CONOR, G. T. Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. **Cancer**, v. 14, p. 258-269, 1961.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **J Mol Endocrinol**, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.

BYKOV, V.J.; ISSAEVA, N.; SHILOV, A.; HULTCRANTZ, M.; PUGACHEVA, E.; CHUMAKOV, P.; BERGMAN, J.; WIMAN, K.G.; SELIVANOVA, G. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. **Nat Med**, v. 8, n. 3, p. 282-288, 2002.

CAPELLO, D.; CARBONE, A.; PASTORE, C.; GLOGHINI, A.; SAGLIO, G.; GAIDANO, G. Point mutations of the *BCL-6* gene in Burkitt's lymphoma. **Br J Haematol**, v. 99, p. 168-70, 1997.

CARON DE FROMENTEL, C.; SOUSSI, T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 1992.

CAVALCANTI, G.B, DA CUNHA VASCONCELOS, F.; PINTO DE FARIA, G.; SCHEINER, M.A.; DE ALMEIDA DOBBIN, J.; KLUMB, C.E.; MAIA, R.C. Coexpression of p53 protein and MDR functional phenotype in leukemias: the predominant association in chronic myeloid leukemia. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2004.

CHARVIN, G.; BENSIMON, D.; CROQUETTE, V. Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 17, p. 9820-9825, 2003.

CHEN P.L.; CHEN Y.M.; BOOKSTEIN R.; LEE W.H. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1576-1580, 1990.

CHÈNE, P. The role of tetramerization in p53 function. **Oncogene**, v. 20, n. 21, p. 2611-2617, 2001.

CHIPUK, J.E.; GREEN, D.R. Cytoplasmic p53: bax and forward. **Cell Cycle**, v. 3, n. 4, p. 429-431, 2004.

CHIPUK, J.E.; KUWANA, T.; BOUCHIER-HAYES, L.; DROIN, N.M.; NEWMAYER, D.D.; SCHULER, M.; GREEN, D.R. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. **Science**, v. 303, n. 5660, p. 1010-1014, 2004.

CHIPUK, J.E.; MAURER, U.; GREEN, D.R.; SCHULER, M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. **Cancer Cell**, v. 4, n. 5, p. 371-381, 2003.

CHOW, V.; BEN-DAVID, Y.; BERNSTEIN, A.; BENCHIMOL, S.; MOWAT, M. Multistage Friend erythroleukemia: independent origin of tumor clones with normal or rearranged p53 cellular oncogenes. **J Virol**, v. 61, n. 9, p. 2777-2781, 1987.

CHOW, V.T.; QUEK, H.H.; TOCK, E.P. Alternative splicing of the p53 tumor suppressor gene in the Molt-4 T-lymphoblastic leukemia cell line. **Cancer Lett**, v. 73, n. 2-3, p. 141-148, 1993.

CINTI, C.; LEONCINI, L.; NYONGO, A.; FERRARI, F.; LAZZI, S.; BELLAN, C.; VATTI, R.; ZAMPARELLI, A.; CEVENINI, G.; TOSI, G.M.; CLAUDIO, P.P.; MARALDI, N.M.; TOSI, P.; GIORDANO, A. Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene *RB2/p130* identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. **Am J Pathol**, v. 156, n. 3, p. 751-760, 2000.

CLODI, K.; KLICHE, K.O.; ZHAO, S.; WEIDNER, D.; SCHENK, T.; CONSOLI, U.; JIANG, S.; SNELL, V.; ANDREEFF, M. Cell-surface exposure of phosphatidylserine correlates with the stage of fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and expression of apoptosis-regulating genes. **Cytometry**, v. 40, n. 1, p. 19-25, 2000.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647-656, 2002.

CROOK, N.E.; CLEM, R.J.; MILLER, L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. **J Virol**, v. 67, n. 4, p. 2168-2174, 1993.

DAVE, S.S.; FU, K.; WRIGHT, G.W.; LAM, L.T.; KLUIN, P.; BOERMA, E.J.; GREINER, T.C.; WEISENBURGER, D.D.; ROSENWALD, A.; OTT, G.; MÜLLER-HERMELINK, H.K.; GASCOYNE, R.D.; DELABIE, J.; RIMSZA, L.M.; BRAZIEL, R.M.; GROGAN, T.M.; CAMPO, E.; JAFFE, E.S.; DAVE, B.J.; SANGER, W.; BAST, M.; VOSE, J.M.; ARMITAGE, J.O.; CONNORS, J.M.; SMELAND, E.B.; KVALOY, S.; HOLTE, H.; FISHER, R.I.; MILLER, T.P.; MONTSERRAT, E.; WILSON, W.H.; BAHL, M.; ZHAO, H.; YANG, L.; POWELL, J.; SIMON, R.; CHAN, W.C.; STAUDT, L.M. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. **N Engl J Med**, v. 354, n. 23, p. 2431-2442, 2006.

DEARTH, L.R.; QIAN, H.; WANG, T.; BARONI, T.E.; ZENG, J.; CHEN, S.W.; YI, S.Y.; BRACHMANN, R.K. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 2, p. 289-298, 2007.

DELIA, D.; GOI, K.; MIZUTANI, S.; YAMADA, T.; AIELLO, A.; FONTANELLA, E.; LAMORTE, G.; IWATA, S.; ISHIOKA, C.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; PIEROTTI, M.A. Dissociation between cell cycle arrest and apoptosis can occur in Li-Fraumeni cells heterozygous for p53 gene mutations. **Oncogene**, v. 14, n. 18, p. 2137-2147, 1997.

DENG, X.; GAO, F.; FLAGG, T.; ANDERSON, J.; MAY, W.S. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 12, p. 4421-4434, 2006.

DSMZ (GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES): banco de dados. Disponível em: <[http://www.dsmz.de/human\\_and\\_animal\\_cell\\_lines/info.php?dsmz\\_nr=319&term=raji&highlight](http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=319&term=raji&highlight)>=> e <[http://www.dsmz.de/human\\_and\\_animal\\_cell\\_lines/info.php?dsmz\\_nr=78&term=daudi&highlight](http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=78&term=daudi&highlight)>. Acesso em 13 jun. 2007.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 33-42, 2000.

DULIC, V.; KAUFMANN, W.K.; WILSON, S.J.; TLSTY, T.D.; LEES, E.; HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J.; REED, S.I. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 1013-1023, 1994.

DYSON N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev**, v. 12, n. 15, p. 2245-2262, 1998.

EISCHEN, C.M.; WEBER, J.D.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J.; CLEVELAND, J.L. Disruption of the *ARF-Mdm2-p53* tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. **Genes Dev**, v. 13, p. 2658-2669, 1999.

EL-DEIRY, W.S. Regulation of p53 downstream genes. **Semin Cancer Biol**, v. 8, n. 5, p. 345-357, 1998.

ELIYAHU, D.; GOLDFINGER, N.; PINHASI-KIMHI, O.; SHAULSKY, G.; SKURNIK, Y.; ARAI, N.; ROTTER, V.; OREN, M. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. **Oncogene**, v. 3, p. 313-332, 1988.

ELIYAHU, D.; RAZ, A.; GRUSS, P.; GIVOL, D.; OREN, M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. **Nature**, v. 312, n. 5995, p. 646-649, 1984.

EPSTEIN, M.A.; ACHONG, B.G.; BARR, Y.M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **Lancet**, v. 15, p. 702-703, 1964.

FARRELL, P.J.; ALLAN, G.J.; SHANAHAN, F.; VOUSDEN, K.H.; CROOK, T. p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. **EMBO J**, v. 10, n. 10, p. 2879-2887, 1991.

FINLAY, C.A.; HINDS, P.W.; TAN, T.H.; ELIYAHU, D.; OREN, M.; LEVINE, A.J. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. **Mol Cell Biol**, v. 8, p. 531-539, 1988.

FUCHS, S.Y.; ADLER, V.; BUSCHMANN, T.; YIN, Z.; WU, X.; JONES, S.N.; RONAI, Z. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. **Genes Dev**, v. 12, n. 17, p. 2658-63, 1998.

GAIDANO, G.; BALLERINI, P.; GONG J.Z.; INGHIRAMI, G.; NERI, A.; NEWCOMB, E.W.; MAGRATH, I.T.; KNOWLES, D.M.; DALLA-FAVERA, R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 12, p. 5413-5417, 1991.

GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem Pharmacol**, v. 57, n. 7 p. 727-741, 1999.

GIACCIA, A.J.; KASTAN, M.B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. **Genes Dev**, v. 12, n. 19, p. 2973-2983, 1998.

GIODINI, A.; KALLIO, M.J.; WALL, N.R.; GORBSKY, G.J.; TOGNIN, S.; MARCHISIO, P.C.; SYMONS, M.; ALTIERI, D.C. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. **Cancer Res**, v. 62, n. 9, p. 2462-2467, 2002.

GUTIERREZ, M.I.; CHERNEY, B.; HUSSAIN, A.; MOSTOWSKI, H.; TOSATO, G.; MAGRATH, I.; BHATIA, K. Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-induced apoptosis. **Cancer Res**, v. 59, n. 3, p. 696-703, 1999.

HAGEMEISTER, F.B. Treatment of relapsed aggressive lymphomas: regimens with and without high-dose therapy and stem cell rescue. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 49 Supl. 1, p. 13-20, 2002.

HAINAUT, P.; VAHAKANGAS, K. p53 as a sensor of carcinogenic exposures: mechanisms of p53 protein induction and lessons from p53 gene mutations. **Pathol Biol**, v. 45, n. 10, p. 833-844, 1997.

HAMADA, M.; FUJIWARA, T.; HIZUTA, A.; GOCHI, A.; NAOMOTO, Y.; TAKAKURA, N.; TAKAHASHI, K.; ROTH, J.A.; TANAKA, N.; ORITA, K. The p53 gene is a potent determinant of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 122, n. 6, p. 360-365, 1996.

HANDE, K.R. Etoposide: Four decades of development of a Topoisomerase II Inhibitor. **Eur J Cancer**, v. 34, n. 10, p. 1514-1521, 1998.

HANSEN, T.M.; SMITH, D.J.; NAGLEY, P. Smac/DIABLO is not released from mitochondria during apoptotic signalling in cells deficient in cytochrome c. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 7, p. 1181-1189, 2006.

HECHT, J.L.; ASTER, J.C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 21, p. 3707-3721, 2000.

HERMEKING, H.; EICK, D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53 **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2091-2093, 1994.

HINDS, P.; FINLAY, C.; LEVINE, A.J. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. **J Virol**, v. 63, p. 739-746, 1989.

HO, A.; DOWDY, S.F. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 1, p. 47-52, 2002.

HO, P.K.; HAWKINS, C.J. Mammalian initiator apoptotic caspases. **FEBS J**, v. 272, n. 21, p. 5436-5453, 2005.

HOFFMAN, W.H.; BIADE, S.; ZILFOU, J.T.; CHEN, J.; MURPHY, M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. **J Biol Chem**, v. 277, n. 5, p. 3247-3257, 2002.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C.C. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n. 5015, p. 49-53, 1991.

HUMMEL, M.; BENTINK, S.; BERGER, H.; KLAPPER, W.; WESSENDORF, S.; BARTH, T.F.; BERND, H.W.; COGLIATTI, S.B.; DIERLAMM, J.; FELLER, A.C.; HANSMANN, M.L.; HARALAMBIEVA, E.; HARDER, L.; HASENCLEVER, D.; KÜHN, M.; LENZE, D.; LICHTER, P.; MARTIN-SUBERO, J.I.; MÖLLER, P.; MÜLLER-HERMELINK, H.K.; OTT, G.; PARWARESCH, R.M.; POTT, C.; ROSENWALD, A.; ROSOŁOWSKI, M.; SCHWAENEN, C.; STÜRZENHOFECKER, B.; SZCZEPANOWSKI, M.; TRAUTMANN, H.; WACKER, H.H.; SPANG, R.; LOEFFLER, M.; TRÜMPER, L.; STEIN, H.; SIEBERT, R. Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. **N Engl J Med**, v. 354, n. 23, p. 2419-2430, 2006.

IMBERT, T.F. Discovery of podophyllotoxins. **Biochimie**, v. 80, n. 3, p. 207-222, 1998.

IRMLER, M.; THOME, M.; HAHNE, M.; SCHNEIDER, P.; HOFMANN, K.; STEINER, V.; BODMER, J.L.; SCHRÖTER, M.; BURNS, K.; MATTMANN, C.; RIMOLDI, D.; FRENCH, L.E.; TSCHOPP, J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature**, v. 388, n. 6638, p. 190-195, 1997.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 87-106, 2004.

JIANG, X.; WILFORD, C.; DUENSING, S.; MUNGER, K.; JONES, G.; JONES, D. Participation of Survivin in mitotic and apoptotic activities of normal and tumor-derived cells. **J Cell Biochem**, v. 83, n. 2, p. 342-354, 2001

JIN, S.; ANTINORE, M.J.; LUNG, F.D.; DONG, X.; ZHAO, H.; FAN, F.; COLCHAGIE, A.B.; BLANCK, P.; ROLLER, P.P.; FORNACE, A.J. JR.; ZHAN, Q. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. **J Biol Chem**, v. 275, n. 22, p. 16602-16608, 2000.

JIN, S.; TONG, T.; FAN, W.; FAN, F.; ANTINORE, M.J.; ZHU, X.; MAZZACURATI, L.; LI, X.; PETRIK, K.L.; RAJASEKARAN, B.; WU, M.; ZHAN, Q. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. **Oncogene**, v. 21, n. 57, p. 8696-8704, 2002.

KAKUDO, Y.; SHIBATA, H.; OTSUKA, K.; KATO, S.; ISHIOKA, C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. **Cancer Res**, v. 65, n. 6, p. 2108-2114, 2005.

KALYANARAMAN, B.; JOSEPH, J.; KALIVENDI, S.; WANG, S.; KONOREV, E.; KOTAMRAJU, S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. **Mol Cell Biochem**, v. 234-235, n. 1-2, p. 119-24, 2002.

KARPOVA, M.B.; SCHOUMANS, J.; BLENNOW, E.; ERNBERG, I.; HENTER, J.I.; SMIRNOV, A.F.; NORDENSKJÖLD, M.; FADEEL, B. Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. **Int J Oncol**, v. 28, n. 3, p. 605-617, 2006.

KARPOVA, M.B.; SCHOUMANS, J.; ERNBERG, I.; HENTER, J.I.; NORDENSKJOLD, M.; FADEEL, B. Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line. **Leukemia**, v. 19, n. 1, p. 159-161, 2005.

KLUMB, C.E.; FURTADO, D.R.; DE RESENDE, L.M.; CARRICO, M.K.; COELHO, A.M.; DE MEIS, E.; MAIA, R.C.; RUMJANEK, F.D. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. **Eur J Haematol**, v. 71, n. 2, p. 81-90, 2003.

KLUMB, C.E.; HASSAN, R.; DE OLIVEIRA D.E.; DE RESENDE L.M.; CARRIÇO, M.K.; DE ALMEIDA DOBBIN, J.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S.; BACCHI, C.E.; MAIA, R.C. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. **Int J Cancer**, v. 108, p. 66-70, 2004a.

KLUMB, C.E.; HASSAN, R.; ZALCBERG, I.R.; RESENDE, L.M.; CARRIÇO, M.K.; MAIA, R.C. p53 protein expression does not correlate with EBV status in childhood B non-Hodgkin lymphomas. **Pediatr Blood Cancer**, v. 43, p. 115-119, 2004b.

KLUMB, C.E.; MAGLUTA, E.P.; REZENDE, L.M.; APA, A.G.; ALONSO, J.F.; MAIA, R.C. Retinoblastoma-related gene *Rb2/p130* are rarely mutated in Burkitt's lymphoma from Brazil. **Am J Hematol**, v. 82, n. 3, p. 238-239, 2007.

KOHN, K.W.; POMMIER, Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the Off-On switch of p53 in response to DNA damage. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 331, n. 3, p. 816-827, 2005.

KOPNIN, B.P. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. **Biochemistry (Mosc)**, v. 65, n. 1, p. 2-27, 2000.

KUBBUTAT, M.H.; LUDWIG, R.L.; ASHCROFT, M.; VOUSDEN, K.H. Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 10, p. 5690-5698, 1998.

KUERBITZ, S.J.; PLUNKETT, B.S.; WALSH, W.V.; KASTAN, M.B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 16, p. 7491-7495, 1992.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, n. 6221, p. 237-238, 1989.

LACASCE, A.; HOWARD, O.; LIB, S.; FISHER, D.; WENG, A.; NEUBERG, D.; SHIPP, M. Modified magrath regimens for adults with Burkitt and Burkitt-like lymphomas: preserved efficacy with decreased toxicity. **Leuk Lymphoma**, v. 45, n. 4, p. 761-767, 2004.

LANG, G.A.; IWAKUMA, T.; SUH, Y.A.; LIU, G.; RAO, V.A.; PARANT, J.M.; VALENTIN-VEJA, Y.A.; TERZIAN, T.; CALDWELL, L.C.; STRONG, L.C.; EL-NAGGAR, A.K.; LOZANO, G. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 861-872, 2004.

LEU, J.I.; DUMONT, P.; HAFEY, M.; MURPHY, M.E.; GEORGE, D.L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 5, p.443-450, 2004.

LEWIN, B. **Genes VII**. Tradução de Henrique Ferreira. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 955 p. Título Original: Genes VII.

LI, F.; AMBROSINI, G.; CHU, E.Y.; PLESCIA, J.; TOGNIN, S.; MARCHISIO, P.C.; ALTIERI, D.C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature**, v. 396, n. 6711, p. 580-584, 1998.

LI, F.; LING, X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? **J Cell Physiol**, v. 208, n. 3, p. 476-486, 2006.

LINDSTRÖM, M.S.; WIMAN, K.G. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. **Semin Cancer Biol**, v. 12, n. 5, p. 381-387, 2002.

LIU, X.; YUE, P.; KHURI, F.R.; SUN, S.Y. Decoy receptor 2 (DcR2) is a p53 target gene and regulates chemosensitivity. **Cancer Res**, v. 65, n. 20, p. 9169-9175, 2005.

LIU, X.; YUE, P.; KHURI, F.R.; SUN, S.Y. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5078-5083, 2004.

LOWE, S.W. Cancer therapy and p53. **Curr Opin Oncol**, v. 7, n. 6, p. 547-553, 1995.

LU, X.; LANE, D.P. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? **Cell**, v. 75, n. 4, p.765-778, 1993.

MACHADO, A.S.C.; COELHO, A.M.; DE RESENDE, L.M.; AMOEDO, N.D.; RUMJANECK, F.D.; KLUMB, C.E. Epstein-Barr viral load monitoring by quantitative PCR during treatment of a child with post-transplant lymphoproliferative disease. In CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2007, Salvador.

MAGRATH, I.; ADDE, M.; SHAD, A.; VENZON, D.; SEIBEL, N.; GOOTENBERG, J.; NEELY, J.; ARNDT, C.; NIEDER, M.; JAFFE, E.; WITTES, R.A.; HORAK, I.D. Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 3, p. 925-934, 1996.

MAGRATH, I.T. Clinical features and management of NHLs. In: MAGRATH, I. T. **The Non-Hodgkin's Lymphomas**. 2 ed. London: Arnold, 1997; p. 778-810.

MALASHICHEVA, A.B.; KISLYAKOVA, T.V.; AKSENOV, N.D.; OSIPOV, K.A.; POSPELOV, V.A. F9 embryonal carcinoma cells fail to stop at G1/S boundary of the cell cycle after gamma-irradiation due to p21WAF1/CIP1 degradation. **Oncogene**, v. 19, n. 34, p. 3858-3865, 2000.

MALTZMAN, W.; CZYZYK, L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. **Mol Cell Biol**, v. 4, n. 9, p. 1689-1694, 1984.

MARGALIT, O.; AMRAM, H.; AMARIGLIO, N.; SIMON, A.J.; SHAKLAI, S.; GRANOT, G.; MINSKY, N.; SHIMONI, A.; HARMELIN, A.; GIVOL, D.; SHOHAT, M.; OREN, M.; REHAVI, G. BCL6 is regulated by p53 through a response element frequently disrupted in B-cell non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1599-1607, 2006.

MARTIN, A.C.; FACCHIANO, A.M.; CUFF, A.L.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P.; THORNTON, J.M. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. **Hum Mutat**, v. 19, n. 2, p. 149-164, 2002.

MCNEISH, I.A.; LOPES, R.; BELL, S.J.; MCKAY, T.R.; FERNANDEZ, M.; LOCKLEY, M.; WHEATLEY, S.P.; LEMOINE, N.R. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. **Exp Cell Res**, v. 302, n. 1, p. 69-82, 2005.

MENENDEZ D, INGA A, RESNICK MA. The biological impact of the human master regulator p53 can be altered by mutations that change the spectrum and expression of its target genes. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 6, p. 2297-2308, 2006.

MEY, U.J.; ORLOPP, K.S.; FLIEGER, D.; STREHL, J.W.; HO, A.D.; HENSEL, M.; BOPP, C.; GORSCHLUTER, M.; WILHELM, M.; BIRKMANN, J.; KAISER, U.; NEUBAUER, A.; FLORSCHUTZ, A.; RABE, C.; HAHN, C.; GLASMACHER, A.G.; SCHMIDT-WOLF, I.G. Dexamethasone, high-dose cytarabine, and cisplatin in combination with rituximab as salvage treatment for patients with relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Invest**, v. 24, n. 6, p. 593-600, 2006.

MICHOD, D.; WIDMANN, C. DNA-damage sensitizers: Potential new therapeutical tools to improve chemotherapy. **Crit Rev Oncol Hematol**, *in press*, 2007.

MIKHAILOV, A.; COLE, R.W.; RIEDER, C.L. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. **Curr Biol**, v. 12, n. 21, p. 1797-1806, 2002.

MIRZA, A.; MCGUIRK, M.; HOCKENBERRY, T.N.; WU, Q.; ASHAR, H.; BLACK, S.; WEN, S.F.; WANG, L.; KIRSCHMEIER, P.; BISHOP, W.R.; NIELSEN, L.L.; PICKETT, C.B.; LIU, S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. **Oncogene**. v. 21, n. 17, p. 2613-2622, 2002.

MIYASHITA, T.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; WANG, H.G.; LIN, H.K.; LIEBERMANN, D.A.; HOFFMAN, B.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 9, n. 6, p. 1799-1805, 1994.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 293-299, 1995.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sci**, v. 76, n. 13, p. 1439-1453, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOWAT, M.; CHENG, A.; KIMURA, N.; BERNSTEIN, A.; BENCHIMOL, S. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. **Nature**, v. 314, n. 6012, p. 633-6, 1985.

NAKAJIMA, W.; TANAKA, N. Synergistic induction of apoptosis by p53-inducible Bcl-2 family proteins Noxa and Puma. **J Nippon Med Sch**, v. 74, n. 2, p. 148-157, 2007

NAKANO, J.; HUANG, C.L.; LIU, D.; UENO, M.; SUMITOMO, S.; YOKOMISE, H. Survivin gene expression is negatively regulated by the p53 tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. **Int J Oncol**. v. 27, n. 5, p. 1215-1221, 2005.

NIGRO, J.M.; BAKER, S.J.; PREISINGER, A.C.; JESSUP, J.M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S.H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILEE, P.; GLOVER, T.; COLLINS, F.S.; WESTON, A.; MODALI, R.; HARRIS, C.C.; VOGELSTEIN, B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**; v. 342, n. 6250, p. 705-708, 1989.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis**, v. 21 n.1 p. 3-9, 2006.

NUÑEZ, G.; BENEDICT, M.A.; HU, Y.; INOHARA, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene**. v. 17, n. 25, p. 3237-3245, 1998.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609-619, 1993.

OREN, M.; DAMALAS, A.; GOTTLIEB, T.; MICHAEL, D.; TAPLICK, J.; LEAL, J.F.; MAYA, R.; MOAS, M.; SEGER, R.; TAYA, Y.; BEN-ZE'EV, A. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. **Ann NY Acad Sci**, v. 973, p. 374-383, 2002.

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

ORY, K.; LEGROS, Y.; AUGUIN, C.; SOUSSI, T. Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. **EMBO J**, v. 13, n. 15, p. 3496-3504, 1994.

OSTER, B.; KASPERSEN, M.D.; KOFOD-OLSEN, E.; BUNDGAARD, B.; HOLLSBERG, P.J. Human herpesvirus 6B inhibits cell proliferation by a p53-independent pathway. **Clin Virol**, v. 37, Suppl. 1:S, p. 63-68, 2006.

PANDITA, T.K.; LIEBERMAN, H.B.; LIM, D.S.; DHAR, S.; ZHENG, W.; TAYA, Y.; KASTAN, M.B. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. **Oncogene**, v. 19, n. 11, p.1386-1391, 2000.

PATTE, C.; AUPERIN, A.; GERRARD, M.; MICHON, J.; PINKERTON, R.; SPOSTO, R.; WESTON, C.; RAPHAEL, M.; PERKINS, S.L.; MCCARTHY, K.; CAIRO, M.S. FAB/LMB96 International Study Committee. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2773-2780, 2007a.

PATTE, C.; AUPERIN, A.; MICHON, J.; BEHRENDT, H.; LEVERGER, G.; FRAPPAZ, D.; LUTZ, P.; COZE, C.; PEREL, Y.; RAPHAËL, M.; TERRIER-LACOMBE, M.J. Société Française d'Oncologie Pédiatrique. The Société Française d'Oncologie Pédiatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3370-3379, 2001.

PATTE, C.; RIBRAG, V.; BRUGIÈRES, L. Non Hodgkin's lymphoma in adolescents. **Bull Cancer**, v. 94, n. 4, p. 339-348, 2007b.

PETITJEAN, A.; MATHE, E.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; TAVTIGIAN, S.V.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat**, v.28, n. 6, p. 622-629, 2007.

PHAN, R.T.; DALLA-FAVERA, R. The *BCL6* proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. **Nature**, v. 432, n. 7017, p. 635-639, 2004.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **J Cell Mol Med**, v. 8, n. 4, p. 432-444, 2004.

POPESCU, N.C. & ZIMONJIC, D.B. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. **J Cell Mol Med**, v. 6, p. 151-159, 2002.

QIN, J.; LI, L. Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints. **Radiat Res**, v. 159, n. 2, p. 139-148, 2003.

REITER, A.; SCHRAPPE, M.; TIEMANN, M.; LUDWIG, W.D.; YAKISAN, E.; ZIMMERMANN, M.; MANN, G.; CHOTT, A.; EBELL, W.; KLINGEBIEL, T.; GRAF, N.; KREMENS, B.; MÜLLER-WEIHRICH, S.; PLÜSS, H.J.; ZINTL, F.; HENZE, G.; RIEHM, H. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. **Blood**, v. 94 10, p. 3294-3306, 1999.

RENES, J.; DE VRIES, E.G.; JANSEN, P.L.; MÜLLER, M. The (patho)physiological functions of the MRP family. **Drug Resist Updat**, v. 3, n. 5, p. 289-302, 2000.

ROVINSKI, B.; BENCHIMOL, S. immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. **Oncogene**, v. 2, n. 5, p. 445-452, 1988.

ROWAN, S.; LUDWIG, R.L.; HAUPT, Y.; BATES, S.; LU, X.; OREN, M.; VOUSDEN, K.H. Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. **EMBO J**, v. 15, n. 4, p. 827-838, 1996.

RUF, I.K.; RHYNE, P.W.; YANG, H.; BORZA, C.M.; HUTT-FLETCHER, L.M.; CLEVELAND, J.L.; SAMPLE, J.T. EBV regulates c-MYC, apoptosis, and tumorigenicity in Burkitt lymphoma. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 258, p. 153-160, 2001.

RYAN, K.M.; PHILLIPS, A.C.; VOUSDEN, K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 332-337, 2001.

RYAN, K.M.; VOUSDEN, K.H. Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 7, p. 3692-3698, 1998.

SAH, N.K.; KHAN, Z.; KHAN, G.J.; BISEN, P.S. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. **Cancer Lett**, v. 244, n. 2, p. 164-171, 2006.

SAH, N.K.; MUNSHI, A.; HOBBS, M.; CARTER, B.Z.; ANDREEFF, M.; MEYN, R.E. Effect of downregulation of survivin expression on radiosensitivity of human epidermoid carcinoma cells. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 66, n. 3, p. 852-859, 2006.

SALVESEN, G.S.; DUCKETT, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 6, p. 401-410, 2002.

SANCHEZ-BEATO, M.; SANCHEZ-AGUILERA, A.; PIRIS, M.A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. **Blood**, v. 101 p. 1220-1235, 2003.

SANDRI, M.I.; ISAACS, R.J.; ONGKEKO, W.M.; HARRIS, A.L.; HICKSON, I.D.; BROGGINI, M.; VIKHANSKAYA, F. p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase II alpha gene. **Nucleic Acids Res**, v. 24, n. 22, p. 4464-4470, 1996.

SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J.M.; VIERSTRA, R.D.; HOWLEY, P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495-505, 1993.

SCHIMMER, A.D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer Res**, v. 64, n. 20, p. 7183-7190, 2004.

SCORRANO, L.; KORSMEYER, S.J. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 304, n. 3, p. 437-44, 2003.

SEABRIGTH, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, v. 2, n. 7731, p. 971-972, 1971.

SHEIKH, M.S.; FORNACE, A.J. JR. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. **Leukemia**, v. 14, n. 8, p. 1509-1513, 2000.

SHVARTS, A.; BRUMMELKAMP, T.R.; SCHEEREN, F.; KOH, E.; DALEY, G.Q.; SPITS, H.; BERNARDS, R. A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative *p19(ARF)*-p53 signaling. **Genes Dev**, v. 16, p. 681-686, 2002.

SIGAL, A.; ROTTER, V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. **Cancer Res**, v. 60, n. 24, p. 6788-6793, 2000.

SILVA, K.L.; VASCONCELOS, F.C.; MARQUES-SANTOS, L.F.; KWEE, J.K.; MAIA, R.C. CPT-11-induced cell death in leukemic cells is not affected by the MDR phenotype. **Leuk Res**, v. 27, n. 3, p. 243-251, 2003.

- SLEVIN, M.L. The clinical pharmacology of etoposide. **Cancer**, v. 67, suppl. 1, p. 319-329, 1991.
- SONG, Z.; YAO, X.; WU, M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 25, p. 23130-23140, 2003.
- SRINIVASULA, S.M.; DATTA, P.; FAN, X.J.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; HUANG, Z.; ALNEMRI, E.S. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. **J Biol Chem**, v. 275, n. 46, p. 36152-36157, 2000.
- STAVROVSKAYA, A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry (Mosc)**, v. 65, n. 1, p. 95-106, 2000.
- SUN, Y.; ORRENIUS, S.; PERVAIZ, S.; FADEEL, B. Plasma membrane sequestration of apoptotic protease-activating factor-1 in human B-lymphoma cells: a novel mechanism of chemoresistance. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 4070-4077, 2005.
- SUN, Y.; OTTOSSON, A.; PERVAIZ, S.; FADEEL, B. Smac-mediated sensitization of human B-lymphoma cells to staurosporine- and lactacystin-triggered apoptosis is apoptosome-dependent. **Leukemia**, v. 21, n. 5, p. 1035-1043, 2007.
- TAFUKU, S.; MATSUDA, T.; KAWAKAMI, H.; TOMITA, M.; YAGITA, H.; MORI, N. Potential mechanism of resistance to TRAIL-induced apoptosis in Burkitt's. **Eur J Haematol**, v. 76, n. 1, p. 64-74, 2006.
- TAKAHASHI, R.; DEVERAUX, Q.; TAMM, I.; WELSH, K.; ASSA-MUNT, N.; SALVESEN, G.S.; REED, J.C. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. **J Biol Chem**, v. 273, n. 14, p. 7787-7790, 1998.
- TAMM, I.; WANG, Y.; SAUSVILLE, E.; SCUDIERO, D.A.; VIGNA, N.; OLTERS DORF, T.; REED, J.C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Res**, v. 58, n. 23, p. 5315-5320, 1998.
- TAYLOR, W.R.; STARK, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803-1815, 2001.
- THORNBORROW, E.C.; MANFREDI, J.J. The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to activate transcriptionally the human BAX promoter. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 15598-15608, 2001.
- TRÖGER, A.; SIEPERMANN, M.; MAHOTKA, C.; WETHKAMP, N.; BÜLLE, H.; LAWS, H.J.; ESCHERICH, G.; JANKA-SCHAUB, G.; GÖBEL, U.; DILLOO, D. Role of survivin splice variants in pediatric acute precursor B lymphoblastic leukemia. **Klin Padiatr**, v. 219, n. 3, p. 127-133, 2007.
- VALNET-RABIER, M.B.; CHALLIER, B.; THIEBAULT, S.; ANGININ, R.; MARGUERITTE, G.; MOUGIN, C.; KANTELIP, B.; DECONINCK, E.; CAHN, J.Y.; FEST, T. c-Flip protein expression in Burkitt's lymphomas is associated with a poor clinical outcome. **Br J Haematol**, v. 128, n. 6, p. 767-773, 2005.
- VAN DER BLIEK, A.M.; BORST, P. Multidrug resistance. **Adv Cancer Res**, v. 52, p. 165-203, 1989.
- VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.; RAMAEKERS, F.C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.
- VANASSE, G.J.; CONCANNON, P.; WILLERFORD, D.M. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. **Blood**, v. 94, n. 12, p. 3997-4010, 1999.

VASCONCELOS, F.C.; CAVALCANTI, G.B. JR.; SILVA, K.L.; DE MEIS, E.; KWEE, J.K.; RUMJANEK, V.M.; MAIA, R.C. Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. **Leuk Res**, v. 31, n. 4, p. 445-454, 2007.

VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 43-53, 2000.

VIALARD, J.F.; LACOMBE F.; BELLOC F.; PELLEGRIN J.L.; REIFFERS J. Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie. **Cancer Radiother**, v. 5, n. 2, p. 109-129, 2001.

VITOLO, U.; BOTTO, B.; CAPELLO, D.; VIVENZA, D.; ZAGONEL, V.; GLOGHINI, A.; NOVERO, D.; PARVIS, G.; CALVI, R.; ARIATTI, C.; MILAN, I.; BERTINI, M.; BOCCOMINI, C.; FREILONE, R.; PREGNO, P.; ORSUCCI, L.; PALESTRO, G.; SAGLIO, G.; CARBONE, A.; GALLO, E.; GAIDANO, G. Point mutations of the BCL-6 gene: clinical and prognostic correlation in B-diffuse large cell lymphoma. **Leukemia**, v. 16, n. 2, p. 268-675, 2002.

VOGEL, C.; KIENITZ, A.; MULLER, R.; BASTIANS, H. The mitotic spindle checkpoint is a critical determinant for topoisomerase-based chemotherapy. **J Biol Chem**, v. 280, n. 6, p. 4025-4028, 2005.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v.408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

VOUSDEN, K.H.; PRIVES, C. p53 and prognosis: new insights and further complexity. **Cell**, v. 120, n.1 p. 7-10, 2005.

VUCIĆ, V.; ISENOVIĆ, E.R.; ADŽIĆ, M.; RUZDIJIĆ, S.; RADOJČIĆ, M.B. Effects of gamma-radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU 145 human prostate cancer cells. **Braz J Med Biol Res**. v. 39, n. 2, p. 227-236, 2006.

WADE, M.; ALLDAY, M.J. Epstein-Barr virus suppresses a G(2)/M checkpoint activated by genotoxins. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 4, p. 1344-60, 2000.

WANG, Q.; ZAMBETTI, G.P.; SUTTLE, D.P. Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 1, p. 389-397, 1997.

WANG, S.; KONOREV, E.A.; KOTAMRAJU, S.; JOSEPH, J.; KALIVENDI, S.; KALYANARAMAN, B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and p53-dependent pathways. **J Biol Chem**, v. 279, n. 24, p. 25535-25543, 2004.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323-330, 1995.

WEISZ, L.; ZALCENSTEIN, A.; STAMBOLSKY, P.; COHEN, Y.; GOLDFINGER, N.; OREN, M.; ROTTER, V. Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. **Cancer Res**, v. 64, n. 22, p. 8318-832, 2004.

WERNYJ, R.P.; MORIN, P.J. Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 4-5, p. 227-232, 2004.

WOLF, M.B.; BAYNES, J.W. The anti-cancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 2, p. 267-271, 2006.

XIAO, Z.; BASTOW, K.F.; VANCE, J.R.; LEE, K.H. Antitumor agents. Part 227: Studies on novel 4'-O-demethyl-epipodophyllotoxins as antitumor agents targeting topoisomerase II. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 12, p. 3339-3344, 2004.

YONESAKA, K.; TAMURA, K.; KURATA, T.; SATOH, T.; IKEDA, M.; FUKUOKA, M.; NAKAGAWA, K. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin. **Int J Cancer**, v. 118, n. 4, p. 812-820, 2006.

ZAFFARONI, N.; PENNATI, M.; DAIDONE, M.G. Survivin as a target for new anticancer interventions. **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 2, p. 360-372, 2005.

ZAMAN, G.J.; FLENS, M.J.; VAN LEUSDEN, M.R.; DE HAAS, M.; MULDER, H.S.; LANKELMA, J.; PINEDO, H.M.; SCHEPER, R.J.; BAAS, F.; BROXTERMAN, H.J.; ET AL. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 19, p. 8822-8826, 1994.

ZHAN, Q.; CARRIER, F.; FORNACE, J.R. AJ. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 7, p. 4242-4250, 1993.

ZHOU, M.; GU, L.; LI, F.; ZHU, Y.; WOODS, W.G.; FINDLEY, H.W. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, n. 1, p. 124-131, 2002.

ZHU, N.; GU, L.; FINDLEY, H.W.; LI, F.; ZHOU, M. An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. **Oncogene**, v. 23, n. 45, p. 7545-7551, 2004.

# 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](#)