

# O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose - Carcinogênese

## *The involvement of genes and proteins in apoptosis - Carcinogenesis regulation*

Ana Bárbara M. Delfino<sup>1</sup>, Emandes Campos Barreto<sup>1</sup>, Edejar Teixeira da Silva Jr.<sup>1</sup>, Renato Gonçalves de Mendonça<sup>1</sup>, Maria Helena Ornellas<sup>2</sup>

### Resumo

A apoptose é um fator importante em muitos processos biológicos normais, tais como a embriogênese, o desenvolvimento do sistema imune, a maturação e a diferenciação celular. Em situações patológicas, a apoptose parece estar implicada na imunodeficiência, resistência a drogas e carcinogênese. Sabe-se que a carcinogênese envolve alterações genéticas cumulativas em oncogenes e genes supressores de tumor. Dessa forma, o prognóstico de cada tumor humano parece depender do equilíbrio entre os diversos genes, sendo previsível que um conhecimento mais profundo da cooperação e antagonismo entre esses genes possa fornecer num futuro próximo informações clinicamente relevantes. Nós revisamos alguns dos mais recentes progressos a respeito de genes envolvidos na apoptose e nos cânceres humanos (p53, bcl-2, c-myc, fas-APO-1, mdm-1) e suas implicações clínicas.

**Palavras-chaves:** apoptose; oncogenes; genes supressores de tumor; carcinogênese

### Abstract

Apoptosis is an important feature in many normal biological process, such as embryogenesis, development of the immune system, cell maturation and differentiation. In occurrence of diseases, apoptosis seems to be involved in immunodeficiency, drug resistance and carcinogenesis. It is well known that carcinogenesis involves cumulative genetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes. Therefore the prognosis of each human tumor seems to be dependent on several genes, and it is foreseeable that a deeper knowledge on the co-operation and antagonism the these genes could provide, in the future, clinically relevant informations. We review some of the most recent developments concerning the genes involved in apoptosis and human cancers (p53, bcl-2, c-myc, fas-APO-1, mdm-1) and their clinical implications.

**Key words:** apoptosis; oncogenes; tumor suppressor genes; carcinogenesis

1 - Acadêmicos do 4º ano de Medicina - Hospital Universitário Pedro Ernesto - FCM - UERJ; 2 - Professora Adjunta da Disciplina de Patologia Geral - FCM - UERJ e Pesquisadora - INCA.

Endereço para correspondência: Ana Bárbara M. Delfino - Rua Latino Coelho, 103 - Penha - 21070-720 - Rio de Janeiro - RJ.

## Introdução

A morte celular programada foi observada há cerca de 40 anos e inicialmente foi chamada de necrose de redução. Este tipo de morte celular é complementar à mitose na regulação da proliferação celular animal. Devido a seu importante papel cinético, este fenômeno recebeu, em 1971, o nome de "Apoptosis", termo sugerido pelo professor de grego James Cormack da Universidade de Aberdeen (Escócia). A palavra *apoptosis* é usada na Grécia para descrever a queda de pétalas de flores ou folhas de árvores. Wyllie e Curie gostaram da sugestão, e para demonstrar claramente a derivação propuseram que o acento tônico ficasse na penúltima sílaba, e portanto, a segunda metade da palavra seria pronunciada como "ptosis" (com p mudo) que vem da mesma origem de "cair", e já era usada para descrever a queda da pálpebra superior<sup>(1)</sup>. A apoptose é um tipo de morte celular que se diferencia da necrose por fatores bioquímicos e ultra-estruturais. É caracterizada pela redução no tamanho da célula, "blebbing" de membrana, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e do DNA e perda da integridade da membrana plasmática. Células de fibrossarcoma de camundongos, anucleadas com Citocalasina-b, apresentam todas as características morfológicas da apoptose quando tratadas com menadiona (uma quinina oxidante) ou com anticorpos anti-APO1. Isto sugere que a fragmentação do DNA não é indispensável e nem o único passo necessário para que ocorra a morte celular programada. Entretanto, testes com outros fatores que induzem a apoptose necessitam ser realizados em células anucleadas para conclusões mais definidas<sup>(2)</sup>.

A apoptose está envolvida em processos fisiológicos e patológicos. No sistema imune, ela desempenha um importante papel na deleção clonal de células T auto-reativas no timo e na seleção de linfócitos no sangue periférico<sup>(2, 3)</sup>. No sistema nervoso, elimina neurônios que falharam em formar conexões sinápticas. Atua também no desenvolvimento embrionário, na atrofia de tecidos dependentes de hormônios e na renovação celular<sup>(4, 5)</sup>. Em determinadas infecções virais, como a SIDA, está associada à imunodeficiência<sup>(6)</sup>. Anormalidades nos níveis fisiológicos da apoptose desencadeiam doenças: a sua inibição gera hiperplasia ou auto-imunidade, enquanto a exacerbação ocasiona doenças

degenerativas<sup>(7)</sup>. Além disso, parece modular a resistência tumoral a drogas quimioterápicas<sup>(8, 9)</sup>.

O processo de apoptose é constituído de três etapas: indução, sinalização ou disparo e execução. A indução pode ser iniciada por citocinas, hormônios, toxinas, agentes físicos, retirada de fatores de crescimento e outros. O dano ao DNA é um importante mecanismo indutor. Cabe ressaltar que não existe um fator capaz de iniciar a apoptose em todos os tipos de células, sendo a sinalização tecido-específica. Os executores incluem a protease e outros fatores provavelmente situados no citoplasma, dada à capacidade dos citoplastos anucleados de sofrerem apoptose<sup>(10)</sup>.

A transformação tecidual reflete um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Sendo assim, a perda da apoptose, por si só, é, relevante na carcinogênese. A sua perfeita compreensão, bem como a de seus mecanismos reguladores, permitiria o estabelecimento de uma terapêutica tumoral mais eficiente<sup>(11, 12)</sup>.

Neste artigo, revisamos a atuação isolada e conjunta de genes na regulação da apoptose considerando-se as suas implicações clínicas.

## P53

O gene p53, situado no braço curto do cromossomo 17, foi identificado primariamente como oncogene em 1979. Posteriormente, percebeu-se que ele só teria esta função quando mutado<sup>(13)</sup>. Não possui função essencial no desenvolvimento normal, sendo extremamente importante na carcinogênese<sup>(14, 15)</sup>.

Foi demonstrado em 1989 que através de sua fosfoproteína, o p53 poderia regular negativamente o crescimento celular, quando na forma selvagem<sup>(13, 16-19)</sup>. Este gene inibe a proliferação de células com lesão no DNA de duas formas: parando o ciclo celular e induzindo a apoptose. Ao parar o crescimento celular na fase G1, ele permite à célula restaurar a integridade do seu genoma. Entretanto, danos irreversíveis exigem a eliminação das células acometidas<sup>(17, 19)</sup>.

A ligação dos tetrâmeros de p53 ao DNA promove a codificação da proteína p21, que inibe as quinases dependentes de ciclinas.

Conseqüentemente, não há fosforilação das proteínas Rb, havendo seqüestro de certos fatores de transcrição. Além disso, a proteína p21 se liga diretamente ao antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA), indispensável à replicação do DNA. Outros genes regulados pelo p53 podem afetar a síntese de DNA (GADD45), modular a resposta a agentes terapêuticos (MDR-1) e à angiogênese<sup>(16, 19, 20)</sup>.

Na ausência de estímulos ao crescimento ou após lesão ao DNA, o p53 induz à desintegração enzimática dos cromossomos pelo processo de morte celular. Ocorre elevação nos níveis do fator BAX, cuja ação é indutora da apoptose e inibição da síntese da proteína bcl-2, inibidora da apoptose,<sup>(13, 19)</sup> (Figura 1). Ratos com involução do epitélio mamário apresentam maior expressão da proteína p53, assim como o epitélio prostático de ratos castrados. A IL-6 e o TGF- $\beta$  inibem a sua expressão, enquanto drogas citotóxicas não parecem modificá-la<sup>(13, 21)</sup>.

Considerando-se a carcinogênese como um processo complexo envolvendo múltiplos genes, mutações no gene p53 seriam importantes neste processo por ocasionarem um aumento na população celular e maior instabilidade genética<sup>(19, 22)</sup>. Entre 30% e 70% dos tumores malignos de qualquer órgão ou

tipo histológico demonstram uma mutação pontual em um dos alelos do p53 e perda do outro. Tais mutações derivam tanto de processos celulares normais como da ação direta de fatores ambientais (fumo, poluição, dieta etc.), sendo a importância relativa de cada um variável e neoplasia-específica<sup>(9)</sup>. A determinação do tempo de surgimento da alteração é difícil, sendo, por vezes, um evento precoce na oncogênese. Algumas lesões pré-malignas, como displasias brônquicas e certos adenomas colônicos, já possuem modificações no p53. Em outros tumores, no entanto, estas alterações assumem importância na promoção<sup>(12, 23, 24)</sup>.

Nos cânceres de mama, alterações no gene p53 relacionam-se à maior agressividade. Estudos citogenéticos mostram maior proporção de aberrações cromossômicas nestes tumores, sendo verificadas com frequência ampliações nos oncogenes erbB-2 e Her-2-neu. São neoplasias mais avançadas, de histologia medular, sem receptores hormonais e com alta taxa de proliferação celular<sup>(22, 25-27)</sup>. Displasias pulmonares, que precedem neoplasias em 2-15 anos, demonstram alterações no p53. Inclusive a detecção de anticorpos específicos ocorre antes da detecção tumoral por métodos convencionais. Contudo ainda não foi determinado se os níveis de anticorpos variam na evolução, de-

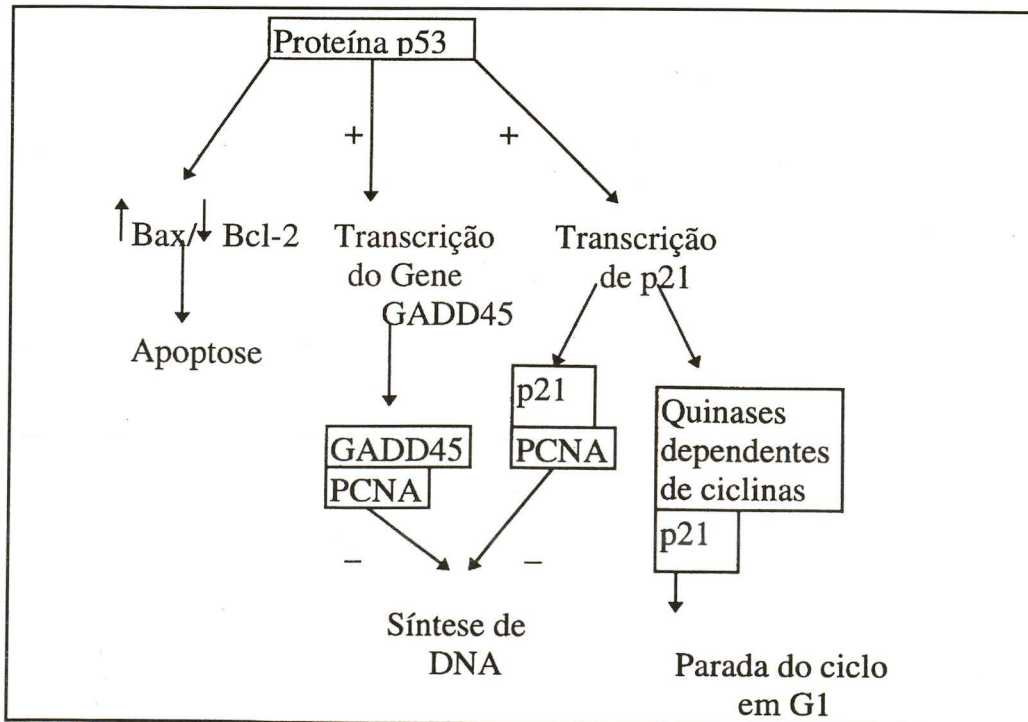


Figura 1 - Resumo da modulação do ciclo celular e indução à apoptose pelo gene p53<sup>(19)</sup>.

saparecem com a remissão completa ou aumentam com a recorrência. A sua dosagem sérica representa uma ferramenta eficaz na detecção precoce das recidivas<sup>(12, 20, 24)</sup>. A imunorreatividade ao p53 é diretamente proporcional ao grau de displasia nos carcinomas colorretais. Trabalhos imunohistoquímicos concluem que há maior positividade dentre os adenocarcinomas invasivos, ao contrário da mucosa normal. Aliado a isto, os adenomas Flat, de curso clínico mais agressivo que os tubulares e exofíticos, demonstram 50% de positividade para o p53<sup>(23, 28)</sup>. A presença de anticorpos contra p53 no soro de pacientes guarda relação com o prognóstico: menor diferenciação, tipo Flat e invasão dos vasos sanguíneos<sup>(28, 29)</sup>. Resultados semelhantes são encontrados nos adenocarcinomas gástricos<sup>(30)</sup>.

A análise, pelo método de PCR, de carcinomas de células transicionais da bexiga revela uma incidência muito mais elevada de mutações do p53 nos tipos invasivos e pouco diferenciados<sup>(31, 32)</sup>. A incidência é baixa nos carcinomas superficiais e bem diferenciados, sendo maior nos tumores que invadem a musculatura. Mesmo dentre os superficiais, os que possuem mutações apresentam maior probabilidade de recorrência. Assim, exigem acompanhamento mais estrito após o tratamento inicial<sup>(33-35)</sup>. As anormalidades no p53 são determinantes de mau prognóstico nos cânceres genitais femininos<sup>(36-39)</sup>. A sua presença nos carcinomas escamosos da vulva reflete a positividade para linfonodos e progressão neoplásica<sup>(37)</sup>. Nos adenocarcinomas de endométrio, elas estão associadas a estágios avançados da doença, à pouca diferenciação, ausência de receptores para progesterona e ao carcinoma papilar seroso. Nestes casos, o p53 parece ser o mais importante indicador de sobrevida<sup>(38)</sup>.

A introdução de p53 selvagem no carcinoma colônico de humanos resulta em apoptose<sup>(40)</sup>. A resistência à terapêutica anticâncer geralmente é consequência direta da inativação do gene p53. Na verdade, ele não é essencial para a execução da apoptose, mas representa um mecanismo de disparo eficiente, determinando o sucesso ou fracasso da terapia. Células com mutações são mais propensas a escapar da quimioterapia, predominando nas recidivas<sup>(15, 39)</sup>. É provável que tam-

bém exista uma correlação entre a radiosensibilidade e a função deste gene. O p53 mutante diminui a parada em G1 após a radiação, dessa forma aumentando a resistência à radioterapia<sup>(39, 41)</sup>.

O proto-oncogene bcl-2, gene 2 do linfoma e da leucemia de células B, foi identificado em 1984 como consequência de seu envolvimento na translocação cromossomal t<sup>(14, 18)</sup>, que ocorre frequentemente em linfomas foliculares não-Hodgkin e leucemias de células B. Esta translocação justapõe o gene bcl-2 ao locus de uma imunoglobulina de cadeia pesada (IgH) no cromossomo 14. Desta fusão resulta a elevação dos níveis do bcl-2<sup>(42)</sup>.

A exata localização celular do bcl-2 é ainda controversa. O bcl-2 tem sido localizado em diferentes sítios, incluindo a membrana interna mitocondrial<sup>(43)</sup>, a superfície interna da membrana plasmática<sup>(44)</sup> e o retículo endoplasmático perinuclear<sup>(45)</sup>. O bcl-2 codifica uma proteína citoplasmática de 26 kda associada à membrana. Ela difere dos produtos de outros proto-oncogenes por funcionar aumentando a sobrevivência de células, ao invés de promover seu crescimento. O aumento da sobrevivência dessas células é atribuído à capacidade do bcl-2 bloquear a apoptose<sup>(43, 45)</sup>. A inibição da apoptose pelo bcl-2 pode ocorrer em qualquer estágio do ciclo celular, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão definidos.

Com a localização da proteína bcl-2 na mitocôndria, foi sugerido que ela poderia proteger as células da morte celular programada por alterar a função mitocondrial<sup>(43, 46)</sup>. No entanto, foi demonstrado que o bcl-2 evita a apoptose em células sem o DNA mitocondrial<sup>(47)</sup>. O fato da supressão da fragmentação do DNA pela superexpressão do bcl-2 estar associada a níveis reduzidos de cálcio citosólico e nível elevado de cálcio mitocondrial sugere que bcl-2 possa estar envolvido no controle da distribuição do cálcio intracelular<sup>(48)</sup>. Considerando-se o aumento da fragilidade da membrana nuclear um evento inicial em células que sofrem apoptose, é possível que a localização da proteína bcl-2 na membrana perinuclear possa inibir esse aumento da fragilidade, prevenindo as etapas que o sucedem e evitando a morte celular<sup>(45)</sup>.

O bcl-2 exerce uma função antioxidante, através da inibição da peroxidação lipídica<sup>(49)</sup>. Todavia, estudos vêm mostrando que não ocorre inibição da apoptose em células reativas de oxigênio (EROS). Sugere-se que embora as EROS possam ativar a morte celular, elas não são essenciais. Como o bcl-2 protege as células contra a apoptose por vias independentes das EROS, é possível que elas sejam geradas durante o processo, e que o bcl-2 iniba a sua síntese apenas pelo bloqueio à morte celular<sup>(50-52)</sup>.

Um esquema proposto para explicar a função do bcl-2 como um gene bloqueador da apoptose surge da associação entre os produtos do bcl-2 e dos genes intimamente relacionados Bax, Bcl-x1, Bcl-xs, Bad e Bar (Figura 2). Todos esses genes pertencem a uma família cujo protótipo é o bcl-2, apresentando seqüências homólogas às dele, particularmente nos domínios BH1 e BH2. Contudo, enquanto o bcl-2 e o bcl-x1 protegem as células da apoptose induzida por uma variedade de agentes, bax, bcl-xs, bad e bar são, por si só, indutores da apoptose. Uma complexa interação entre os produtos codificados por estes genes ocorre em nível nuclear, com formação de homodímeros ou heterodímeros entre as diferentes proteínas. A probabilidade de formação de homo- ou heterodímeros entre os vários membros da família depende da concentração relativa de cada proteína, e o predomínio de uma ou outra combinação dessas proteínas eventualmente decide o destino da célula: entrar em apoptose ou ser protegida dela<sup>(53-56)</sup>. Uma outra proteína, a Bag, não apresenta homologia ao bcl-2, mas também pode interagir e cooperar com ela na proteção das células contra a morte celular programada<sup>(53)</sup>.

A expressão do bcl-2 já foi observada numa grande variedade de tecidos normais que demonstram longa viabilidade, como os neurônios, e em outros tecidos que sofrem auto-renovação por mecanismos envolvendo a apoptose, tais como o epitélio colônico<sup>(3)</sup> e a pele<sup>(46)</sup>. No entanto, não há dúvidas sobre a importância do gene bcl-2 na gênese e no desenvolvimento do câncer humano. Devido à sua função de prevenir a apoptose, acredita-se que tal efeito seria fundamental em estágios iniciais da transformação causada por oncogenes dominantes ativados. Níveis elevados de expressão do bcl-2 foram veri-

	Bcl-2	Bcl-x1	Bcl-xs	Hd
BAX	A	A	?	A
BAD	S	A	X	X
BAK	X	A	X	X
BAG	S	?	?	?
Hd	S	S	A	

Figura 2 - Resultados da formação de homo- ou heterodímeros entre os diferentes membros da família bcl-2. A indica apoptose; S indica sobrevivência; X denota casos onde não há formação de dímeros. Hd significa homodímeros. Os casos onde a possível formação de dímeros não foi investigada estão marcados por ?<sup>(53)</sup>.

ficados em neoplasias renais, tais como carcinoma de células transicionais, carcinomas papilares e tumor de Wilms (nefroblastoma). Resultados semelhantes foram encontrados em áreas displásicas adjacentes a estes tumores<sup>(3, 57, 58)</sup>. Em regiões da mucosa gástrica que apresentavam metaplasia intestinal, lesão precursora de adenocarcinomas gástricos, foi observada uma expressão aberrante do gene bcl-2<sup>(59)</sup>. Este achado está de acordo com os resultados de outro estudo, que indicaram ser o bcl-2 predominantemente expresso nos estágios iniciais do desenvolvimento de carcinomas gástricos<sup>(60)</sup>. Reforça-se a teoria de que o bcl-2 contribui para transformação neoplásica por permitir que as células sobrevivam até que outros oncogenes sinérgicos tornem-se ativos, resultando no desenvolvimento de fenótipos mais malignos.

O exame de frações de nucleoproteínas isoladas do núcleo de leucócitos de pacientes com leucemia mielóide crônica correlacionou a presença de grandes quantidades dos genes bcl-2, p53 e c-abl com o caráter progressivo da doença<sup>(61)</sup>. Por outro lado, a presença de elevados níveis de bcl-2 na leucemia linfoblástica aguda da infância não representa um pior prognóstico<sup>(62)</sup>. Uma justificativa para esta paradoxal observação surge a partir de trabalhos realizados com pacientes portadores de leucemia linfóide crônica - B. Nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de bcl-2 e p53 entre os pacientes com doença, progressiva ou não. Contudo, o nível de RNAm Bax foi comparativamente maior em células de pacientes com doença não-progressiva<sup>(63)</sup>. Esta observação sugere que a análise da expressão

do gene *bcl-2*, o isolado, pode ser insuficiente para determinação da sobrevivência e progressão clínica.

Recentes experimentos relatam uma nova função para a IL-5: a indução da apoptose em células da leucemia linfóide crônica, sendo esta função desempenhada por uma via independente do *bcl-2*<sup>(64)</sup>. Alguns autores sugerem que o mecanismo de inibição da apoptose mediada pelo INF- $\alpha$ , diferente daquele exercido pela IL-4<sup>(65)</sup> e TGF- $\beta$ 1<sup>(66)</sup>, não depende da expressão do *bcl-2*<sup>(67)</sup>. Estes resultados apontam para a existência de múltiplos mecanismos intracelulares independentes na apoptose, alguns dos quais podem ser prevenidos pelo *bcl-2*, outros, não são afetados por este gene. Alternativamente, essas vias adicionais parecem envolver proteínas que, diferentemente, regulam a função do *bcl-2*. Em apoio a esta hipótese, foi demonstrado recentemente que os produtos do gene *bcl-xl* podem atuar como reguladores dominantes da morte celular apoptótica, regulando uma ou mais vias dependentes do *bcl-2*<sup>(54)</sup>.

Muitos cânceres humanos tomam-se amplamente resistentes aos efeitos da quimio- e radioterapia. A modulação da apoptose pelo *bcl-2* tem um importante papel no desenvolvimento da resistência tumoral. Altos níveis de expressão do *bcl-2* parecem estar envolvidos na resistência celular ao TNF<sup>(68)</sup>. A proteção contra agentes quimioterápicos proporcionada pelo *bcl-2* define um novo tipo de resistência a drogas, no qual os altos níveis de *bcl-2* não as impedem de penetrar nas células, atingir seus alvos bioquímicos ou de induzir danos ao DNA e outras moléculas. Na realidade, o que *bcl-2* faz é prevenir a tradução dos danos induzidos pela droga em sinais para a morte celular<sup>(55)</sup>. Experimentos utilizando inibidores da enzima timidilato sintase também depõem contra a modulação de mecanismos clássicos de resistência pelo *bcl-2*<sup>(69)</sup>. Embora os mecanismos exatos pelos quais os altos níveis de *bcl-2* previnem a apoptose continuem desconhecidos, foi demonstrado que o gene supressor de tumor *p53* pode funcionar como um repressor transcripcional do *bcl-2* e como ativador do gene *Bax*<sup>(70)</sup>. Danos ao DNA são responsáveis por elevações dos níveis do *p53*. Dessa forma, acredita-se que os altos níveis da proteína *bcl-2* encontrados em alguns cânceres neutralizaria a proteína *bax*, que é produzida em res-

posta a danos ao DNA, com manutenção da razão *bcl-2/bax* numa faixa compatível com a sobrevivência celular, apesar dos sinais para a apoptose iniciados pela droga<sup>(55)</sup>. O *bcl-2*, por sua vez, desvia a atividade do *p53* de indução da apoptose para indução de parada de crescimento, sendo identificado como um modificador da função do *p53*<sup>(71)</sup>.

A importância que os genes da família *bcl-2* têm no controle da apoptose e da resposta tumoral à quimio- e radioterapia sugere que estes genes e suas proteínas definem um conjunto de alvos que poderiam ser explorados na tentativa de aperfeiçoar a terapêutica antitumoral atualmente disponível. A expressão forçada do *bcl-2* em células da medula óssea, através de técnicas de transferência gênica, pode promover um resgate da mielossupressão induzida pela quimioterapia<sup>(72)</sup>. Outras abordagens terapêuticas já foram propostas: 1) utilização de diversos fatores de crescimento, citocinas, etc. com o objetivo de alterar a proporção entre proteínas pró e antiapoptóticas, no sentido de tornar as células tumorais mais sensíveis à apoptose induzida por drogas quimioterápicas e radiação<sup>(70)</sup>; 2) uso de oligonucleotídeos direcionados contra o RNAm do *bcl-2* e outros genes antiapoptóticos; 3) agentes farmacológicos que atuem na interação proteína-proteína e proteína-DNA, ambas importantes para função dos genes relacionados ao *bcl-2*<sup>(55)</sup>. Embora estas abordagens necessitem de uma investigação intensa, a descoberta de genes homólogos ao *bcl-2* permitirá que futuras terapias tumorais não sejam direcionadas ao ciclo de divisão celular, mas aos reguladores da morte celular programada.

### C-MYC

O proto-oncogene *c-myc* é um conhecido fator transcripcional que age regulando a expressão de genes necessários para a progressão do ciclo celular<sup>(73)</sup>. O produto de *myc* é uma fosfoproteína nuclear com características marcantes de fatores transcripcionais, como os domínios de interação proteína-proteína: Helix-loop-helix (HLH) e Leucine zipper (LZ)<sup>(74)</sup>.

Durante a fase G1 do ciclo celular, a expressão do *myc* está sob o controle do gene supressor de tumor RB, de ciclinas e antígenos virais<sup>(46)</sup>. Esta hipótese encontra apoio

na homologia estrutural e funcional existente entre c-myc e a proteína adenoviral E1A. Esta proteína associa-se com a proteína RB, liberando-a de sua ligação com o fator transcricional E2F<sup>(75)</sup>. Genes como o c-myc contêm sítios similares ao sítio de reconhecimento do E2F em seus promotores, e estes sítios parecem ser importantes para a ativação transcricional desses genes<sup>(76)</sup>.

Nos últimos anos, diversas evidências têm apontado o c-myc como um importante fator de apoptose em vários sistemas. No entanto, os alvos transcricionais modulados pelo c-myc permanecem indefinidos. A porção carboxi-terminal das proteínas da família myc tem sido implicada na interação com outra proteína HLH-LZ, denominada Max. Uma consequência desta associação é o aumento da afinidade com que essas proteínas se ligam ao DNA<sup>(74)</sup>. Contudo, já foi demonstrado que os complexos max-max e max-myc possuem atividades transcricionais distintas<sup>(77)</sup> (Figura 3).

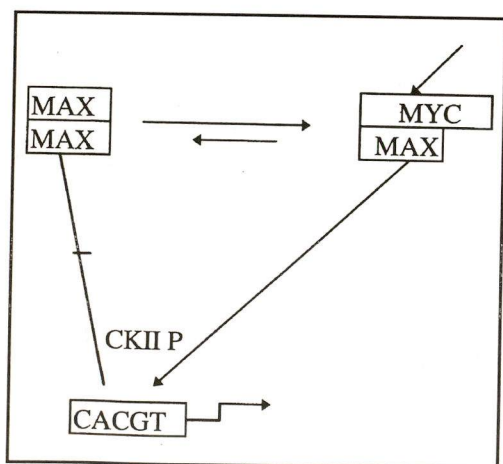


Figura 3 - Homodímeros de Max inibem, enquanto heterodímeros Myc-Max ativam a transcrição. A elevada expressão de Max direciona formação de homodímeros repressores. Por outro lado, a superexpressão de c-Myc eleva os níveis de heterodímeros ativadores. A ligação dos homodímeros Max ao DNA é modulada negativamente pela fosforilação destes<sup>(77)</sup>.

Um possível mediador da apoptose induzida pelo c-myc é o gene da Ornitina Descarboxilase (ODC). Foi proposto que a atividade da enzima ODC induzida pelo gene c-myc resultaria na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que por sua vez levariam à morte celular. No entanto, a comparação direta das taxas de morte celular entre

clones de c-myc e de ODC demonstrou que a apoptose por c-myc envolve vias dependente e independente da ODC<sup>(73, 78)</sup>. Foi sugerido que o bcl-2 poderia bloquear a apoptose por prevenir os danos celulares provocados por essas ERO<sup>(79)</sup>.

Recentemente, a proteína Yin-Yang-1 (YY-1) foi descoberta como reguladora transcricional de muitos genes, incluindo o c-fos, c-myc e N-ras<sup>(80)</sup>. O c-myc é capaz de inibir ambas as funções, do YY-1, a repressora e a ativadora o que sugere que uma das vias pelas quais o c-myc age é modular a atividade do YY-1<sup>(81)</sup>.

O c-myc está envolvido na apoptose de hibridomas de células T ativados<sup>(82)</sup>. A presença da proteína c-myc em extratos nucleares de células sensíveis ao TNF- $\alpha$  sugere que a predisposição à morte celular é induzida por myc<sup>(80)</sup>. Por outro lado, sinais proliferativos foram induzidos pelo c-myc em células resistentes ao TNF- $\alpha$ <sup>(68)</sup>. A superexpressão do c-myc tem um efeito negativo sobre a modulação do p53 e da ciclina D1 no início do ciclo celular<sup>(83)</sup>, enquanto tem efeito positivo sobre as ciclinas A e E. Assim, a elevada expressão do c-myc é capaz de superar a parada de crescimento em G1/S causada pelo p53, bem como neutralizar o efeito da quinase dependente da ciclina D1<sup>(46, 75)</sup>. As duas consequências aparentemente paradoxais da inapropriada expressão do c-myc são a progressão do ciclo celular e a ativação da apoptose. Condições que estimulam uma parada do crescimento em G1 inibem todos os genes que promovem progressão do ciclo celular, incluindo o c-myc. No entanto, se o c-myc é o único gene que permanece ativo nas células cujo crescimento foi interrompido, a presença de sinais contraditórios é reconhecida como uma mutação pela célula afetada, resultando em ativação da apoptose<sup>(73)</sup>. Esta afirmativa é apoiada pelo fato da expressão forçada de c-myc em células progenitoras mielóides só resultar em apoptose, quando estas sofrem uma interrupção em seu crescimento, provocada pela IL-3 ou Eritropoetina<sup>(84)</sup>. Dessa forma, a expressão desregulada do gene c-myc é insuficiente para permitir a expansão clonal de uma célula mutante. Nesse sentido, é necessária a existência de mutações que inibam a morte celular. Na verdade, foi demonstrado que a expressão forçada de bcl-2 em

fibroblastos suprime a apoptose induzida pelo c-myc sem afetar sua função mitogênica<sup>(85)</sup>. Essa associação funcional entre o c-myc e o bcl-2 neutraliza a função do p53, impedindo a sua atuação como guardião do genoma<sup>(86)</sup>. Este achado proporciona um novo mecanismo de cooperação entre oncogenes, sendo de grande importância na carcinogênese e na evolução da resistência tumoral a drogas.

A amplificação do c-myc é uma alteração genética freqüente no câncer, contribuindo para sua progressão. Os mecanismos de amplificação não são completamente conhecidos. É provável que a mutação do gene p53 possa proporcionar à célula maior capacidade de amplificação. Elevados níveis do c-myc são mais freqüentes em cânceres de mama com linfonodos positivos. Contudo não houve nenhuma correlação entre a amplificação e outros fatores clínico-patológicos, como receptores hormonais, tamanho do tumor, ploidia e outros<sup>(87, 88)</sup>. Em tumores de bexiga, a superexpressão do c-myc tem sido implicada como um provável indicador de invasividade<sup>(89)</sup>.

### Fas-APO-1

O antígeno Fas/APO-1 é uma proteína transmembrana pertencente à família dos receptores para o fator de crescimento neural/TNF- $\alpha$ , possuindo a capacidade de, quando ligado ao anticorpo específico, induzir a apoptose, possivelmente através de uma via das quinases dependentes de ciclinas<sup>(10)</sup>. Em condições normais, este antígeno é encontrado em fibroblastos, células mielóides e linfócitos<sup>(90-92)</sup>. A sua expressão é extremamente variável nos tumores malignos. Alguns, como o carcinoma broncogênico, apresentam um padrão Fas/APO-1 - negativo, enquanto carcinomas de mama e neoplasias de células B são geralmente positivos. No caso dos cânceres colorretais, ocorre uma heterogeneidade, existindo os padrões positivo, fracamente positivo ou negativo<sup>(91, 92)</sup>.

A distribuição quantitativa do Fas/APO-1 nas células pode ser modulada por citocinas, como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , as quais aumentam sua expressão. Os gliomas malignos humanos possuem Fas/APO-1 e sofrem apoptose quando submetidos ao anticorpo específico (Fas/APO-1ab). Citocinas, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 2, IL-1 e IL-8, aumen-

tam a sensibilidade ao Fas/APO-1ab, sendo responsáveis pela maior expressão do antígeno em gliomas malignos<sup>(92)</sup>. Sabe-se que a morte celular programada pode ser inibida pela dexametasona, favorecendo ainda mais a carcinogênese.

A resistência ao Fas/APO-1ab foi observada em algumas células malignas linfóides e da glia<sup>(91, 92)</sup>. Foi relatada uma proliferação de certas linhagens celulares após a morte, mediada pelo Fas/APO-1ab. A causa deste fenômeno pode ser um efeito indireto da seleção de células resistentes, com exacerbação de sua atividade mitótica. Para uma compreensão adequada de outros efeitos, há necessidade de se conhecer a cascata intracelular ativada pelo antígeno Fas/APO-1, bem como a sua regulação. É importante ressaltar que a resistência ao Fas/APO-1ab independe da expressão do gene bcl-2<sup>(91)</sup>.

No caso dos gliomas malignos, o prognóstico e o tratamento dos pacientes são dificultados. Entretanto, a imunoterapia com a utilização do Fas/APO-1ab traz uma possibilidade de tratamento mais eficaz, já que a resistência de clones tumorais poderia ser vencida pela combinação com citocinas sensibilizadoras, e a seletividade do tratamento seria conferida pela ausência do antígeno considerado no parênquima cerebral normal<sup>(90-92)</sup>.

### MDR-1 e MDR-2 (glicoproteína-p)

As proteínas codificadas pelos genes MDR-1 e MDR-2 são denominadas, em conjunto, glicoproteínas-p. O produto do gene MDR-2 é pouco conhecido. Todavia a glicoproteína-p derivada do MDR-1 é bastante estudada<sup>(8, 93)</sup>. A sua expressão é regulada pelo gene p53<sup>(15, 19)</sup>. Trata-se de uma proteína de membrana com expressão variada nos diferentes tecidos corpóreos. Há tecidos em que a expressão é alta, como nas adrenais; intermediária (intestinos e trato urinário), e baixa (linforreticular)<sup>(8, 93)</sup>.

Tecidos neoplásicos de alguns órgãos apresentam um aumento na expressão da glicoproteína-p. Aproximadamente 70% dos carcinomas colônicos demonstram, assim como certas condições pré-neoplásicas (retocolite ulcerativa) e 70% dos cólons displásicos e inflamados<sup>(8)</sup>.



Experimentalmente se verificou que proteínas p53 mutantes podem induzir à transcrição do gene MDR-1. Uma vez que a expressão aumentada está relacionada à multiresistência a drogas, provavelmente mutações no p53 induziram à resistência à quimioterapia<sup>(15)</sup>. O mecanismo evolutivo é o transporte transmembrana dependente de energia, com expulsão das drogas citotóxicas que penetraram na célula<sup>(8, 19)</sup>. Após o início da quimioterapia, ocorre uma elevação rápida na expressão da glicoproteína-P, sendo esta a responsável pela resistência conferida. Cabe enfatizar que, nos tumores humanos, as mutações no p53 não se correlacionam com altos níveis de glicoproteína-P. Portanto a resistência nas mutações do p53 resulta de mecanismos independentes do MDR-1<sup>(8, 15, 19)</sup>.

### Interação genética na modulação da apoptose

Considerar cada gene como protagonista isolado na apoptose é negligenciar a importante interação e convergência das diversas vias que a regulam. Da ação conjunta dos genes resulta uma maior ou menor propensão à morte celular programada.

Mutações em oncogenes, como o E1A e o Ras, podem sensibilizar as células à apoptose dependente do p53, resultando na maior taxa de apoptose observada nos tumores, quando comparados aos tecidos normais. Outras alterações, entretanto, acabam por aumentar a resistência à terapêutica<sup>(15)</sup>.

Como mencionado anteriormente, o p53 funciona como repressor transcricional do bcl-2 e como ativador do gene bax. Todavia, estudos com imunoblotting e imunohistoquímica mostram elevação do bcl-2 e redução nos níveis de bax, simultaneamente, em apenas alguns tecidos. Parece que o p53 não é o único fator regulador da expressão destes genes, sendo a sua função tecido-específica. O bcl-2, por sua vez, parece inibir a função do p53 por mecanismos indiretos, já que se localizam em compartimentos celulares distintos. Além disso, o bcl-2 não diminui os níveis da proteína p53 ou altera sua localização nuclear<sup>(71)</sup>.

A expressão desregulada do c-myc, na vigência de integridade do p53 ou de condições limitantes ao crescimento celular, in-

duz à apoptose<sup>(10, 85)</sup>. Contudo, alterações no bcl-2 aumentam a sobrevivência dessas células, permitindo a sua expansão e evolução oncogênica.

Existem vários genes relacionados ao bcl-2, todos implicados na apoptose. As concentrações relativas das várias proteínas codificadas por estes genes determinam o destino da célula<sup>(53)</sup>. Atualmente se verificou que a dosagem dos níveis do bcl-2 isoladamente não prevê a evolução do tumor.

A carcinogênese é um processo evolutivo complexo, facilitado por uma maior instabilidade genética. Conseqüentemente, o comportamento dos tumores é dependente da cooperação e antagonismo dos vários genes associados. Um conhecimento mais profundo a respeito da interação destes genes na regulação da apoptose promoverá uma abordagem mais eficaz e consciente das neoplasias humanas.

---

### Referências Bibliográficas

1. Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. - Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
2. Schultze-Osthoff, K.; Walczak, H.; Droge, W.; Krammer, P.H. - Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol*, 127: 15-19, 1994.
3. Chandler, D.; El-Naggar, A.K.; Brisbay, S.; Redline, R.W.; Mc Donnell, T.J. - Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. *Hum Pathol*, 25(8): 789-796, 1994.
4. Robbins, et al. - Pathologic basis of disease. Quinta edição: 17-21, 1994.
5. Robertson, L.E.; Huang, P.; Keating, M.J.; Plunkett, W. - Apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Bull*, 46(2): 130-134, 1994.
6. Pantaleo, G.; Graziosi, C.; Fauci, A.S. - The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 328(5): 327-334, 1993.

7. Meyn, R.W.; Milas, L.; Stephens, C. - Programmed cell death in normal development and disease. *Cancer Bull*, 46: 120-124, 1994.
8. Saclarides, T.J.; Jakate, S.M.; Coon, J.S. et al. - Variable expression of P-glycoprotein in normal, inflamed, and dysplastic areas in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*, 35(8): 747-751, 1992.
9. Su, I-J.; Cheng, A-L; Tsai, T-F; Lay, J-D - Retinoic acid-induced apoptosis and regression of a refractory Epstein-Barr-virus-containing T cell lymphoma expressing multidrug-resistance phenotypes. *Br J Haemat*, 85: 826-828, 1993.
10. Green, D.R.; Martin, S.J. - The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol*, 7: 694-703, 1995.
11. De Vinci, A.; Geido, E.; Infusini, E.; Giaretti, W. - Neuroblastoma cell apoptosis induced by the synthetic retinoid n-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Int J Cancer*, 59: 474-476, 1994.
12. Schulte-Hermann, R.; Bursch, W.; Grasl-Kraupp, B.; Török, L.; Ellinger, A.; Müllauer, L. - Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol Lett*, 82/83: 143-148, 1995.
13. Donehower, L.A. - Tumor suppressor gene p53 and apoptosis. *Cancer Bull*, 46: 161-166, 1994.
14. Macleod, K.F.; Sherry, N.; Hennen, G. et al. - p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Gen Dev*, 9: 935-944, 1995.
15. Lowe, S.W. - Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol*, 7: 547-553, 1995.
16. Jonathan, D. Oliner - The role of p53 in cancer development. *Scientific Am Science & Med*, Sept-Oct: 16-25, 1994.
17. Symonds, H.; Krau, L.; Remington, L. et al. - p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78: 703-711, 1994.
18. Lowe, S.W.; Jacks, T.; Housman, D.E.; Ruley, H.E. - Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 2069-2070, 1994.
19. Sidransky, D.; Hollstein, M. - Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med*, 47: 285-301, 1996.
20. Reeve, J.G.; Xiong, J.; Morgan, J.; Bleehen, N.M. - Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance. *Br J Cancer*, 73: 1193-1200, 1996.
21. Rasbridge, S.A.; Gillett, C.E.; Seymour, A.M. et al. - The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. *Br J Cancer*, 70: 335-341, 1994.
22. Eyfjörd, J.E.; Thorlacius, S.; Steinarsdóttir, M.; Valgardsdóttir, R.; Ögmundsdóttir, H.M.; Anamthawat-Jonsson, K. - p53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. *Cancer Res*, 55: 646-665, 1995.
23. Rubio, C.A.; Rodensjö, M. - p53 overexpression in flat serrated adenomas and flat tubular adenomas of the colorectal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol*, 121: 571-576, 1995.
24. Schlichtholz, B.; Tredaniel, J.; Lubin, R.; Zalchan, G.; Hirsch, A.; Soussi, T. - Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br J Cancer*, 69: 809-816, 1994.
25. Seshadri, R.; Leong, A.S.Y.; McCaul, K.; Firgaira, F.A.; Setlur, V.; Horsfall, D.J. - Relationship between p53 gene abnormalities and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)*, 69: 135-141, 1996.
26. Peyrat, J-P.; Bonnetterre, J.; Lubin, R.; Vanlemmens, L.; Fournier, J. - Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for colore-

- gional breast cancer. *Lancet*, 345: 621-22, 1995.
27. Ozbun, M.A.; Butel, J.S. - Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis. *Adv Cancer Res*, 66: 71-141, 1995.
  28. Williams, N.S. - Colorectal cancer 1996; 2-7.
  29. Houbiers, J.G.A.; Van-der Burg, S.H.; Van de Watering, L.M.G. et al. - Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer*, 72: 637-641, 1995.
  30. Uchino, S.; Tsuda, H.; Noguchi, M. et al - Frequent loss of heterozygosity at DCC locus in gastric cancers. *Cancer Res*, 52: 3099-3102, 1992.
  31. Fujimoto, K.; Yamada, Y.; Okajima, E. et al. - Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res*, 52: 1393-1398, 1992.
  32. Glick, S.H.; Howell, L.P.; Deverewhite, R.W. - Relationship of p53 and bcl-2 to prognosis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 155: 1754-1757, 1996.
  33. Yoshimura, I.; Kudoh, J.; Saito, S.; Tazaki, H.; Shimizu, N. - p53 gene mutation in recurrent superficial bladder cancer. *J Urol*, 153: 1711-1715, 1995.
  34. Nakopoulou, L.; Constantinides, C.; Papandropoulos, J. et al. - Evaluation of overexpression of p53 tumor suppressor protein in superficial and invasive transitional cell bladder cancer: comparison with DNA ploidy. *Urology*, 46(3): 334-40, 1995.
  35. Têtu, B.; Fradet, Y.; Allard, P.; Veilleux, C.; Roberge, N.; Bernard, P. - Prevalence and clinical significance of Her-2/neu, p53 and Rb expression in primary superficial bladder cancer. *J Urol*, 155: 1784-1788, 1996.
  36. Kurvinen, K.; Syrjänen, K.; Syrjänen, S. - p53 and bcl-2 proteins as prognostic markers in human papillomavirus-associated cervical lesions. *J Clin Oncol*, 14(7): 2120-2130, 1996.
  37. Pilotti, S.; D'amato, L.; Della Torre, G. et al. - Papillomavirus, p53 alteration and primary carcinoma of the vulva. *Diag Mol Pathol*, 4(4): 239-248, 1995.
  38. Rose, P.G. - Endometrial carcinoma. *N Engl J Med*, 335(9): 640-648, 1996.
  39. Neubauer, A.; Thiede, C.; Huhn, D.; Wittig, B. - p53 and induction of apoptosis as a target for anticancer therapy. *Leukemia*, 10(suppl. 3): S2-S4, 1996.
  40. Shaw, P.; Bovey, R.; Tardy, S.; Sahli, R.; Sordat, B.; Costa, J. - Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 4495-4499, 1992.
  41. Siles, E.; Villalobos, M.; Valenzuela, M.T. et al. - Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br J Cancer*, 73: 581-588, 1996.
  42. Lu, Q-L; Abel, P.; Foster, C.S.; Lalani, E-N. - Bcl-2: Role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol*, 27(2): 102-109, 1996.
  43. Hockenbery, D.; Nuñez, G.; Millman, C.; Schreiber, R.D.; Korsmeyer, S.J. - Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348: 334-336, 1990.
  44. Chen-Levy, Z.; Nourse, J.; Cleary, M.L. - The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24 kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14-18) translocation. *Mol Cell Biol*, 9: 701-710, 1989.
  45. Alnemri, E.S.; Robertson, N.M.; Fernandes, T.F.; Croce, C.M.; Litwack, G. - Overexpressed full-length human bcl-2 extends the survival of baculovirus-infected Sf9 insect cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 7295-7299, 1992.
  46. Chiarugi, V.; Ruggiero, M. - Role of three cancer "master genes" p53, bcl-2 and c-myc

- on the apoptotic process. *Tumori*, 82: 205-209, 1996.
47. Jacobson, M.D.; Burne, J.F.; King, M.P.; Miyashita, T.; Reed, J.C.; Raff, M.C. - Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, 361: 365-368, 1993.
  48. Baffy, G.; Miyashita, T.; Williamson Jr.; Reed, J.C. - Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3(IL-3) from an IL-3 dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*, 268: 6511-6519, 1993.
  49. Hockenbery, D.M.; Oltvai, Z.N.; Yin X-M.; Milliman, C.L.; Korsmeyer, S.J. - Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *50II*, 75: 241-251, 1993.
  50. Jacobson, M.D.; Raff, M.C. - Programmed cell death and bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*, 374: 814-816, 1995.
  51. Shimizu, S.; Eguchi, Y.; Kosaka, H.; Kamiike, W.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. - Prevention of hypoxia-induced cell death by bcl-2 and bcl-xl. *Nature*, 374: 811-813, 1995.
  52. Wachsman, J.T. - The beneficial effects of dietary restriction: reduced oxidative damage and enhanced apoptosis. *Mut Res*, 350: 25-34, 1996.
  53. Kernohan, N.M.; Cox, L.S. - Regulation of apoptosis by Bcl-2 and its related proteins: immunochemical challenges and therapeutic implications. *J Pathol*, 179: 1-3, 1996.
  54. Boise, L.H.; González-García, M.; Postema, C.E. et al. - Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominator regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74: 597-608, 1994.
  55. Reed, J.C. - Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol*, 7: 541-546, 1995.
  56. 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*, 74: 609-619, 1993.
  57. Furihata, M.; Sonobe, H.; Ohtsuki, Y. et al. - Detection of p53 and bcl-2 protein in carcinoma of the renal pelvis and ureter including dysplasia. *J Pathol*, 178: 133-139, 1996.
  58. Tomita, Y.; Bilim, V.; Kawasaki, T. et al. - Frequent expression of bcl-2 in renal-cell carcinomas carrying wild-type p53. *Int J Cancer*, 66: 322-325, 1996.
  59. Saegusa, M.; Takano, Y.; Okayasu, I. - Bcl-2 expression and its association with cell kinetics in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 121: 357-363, 1995.
  60. Saegusa, M.; Takano, Y.; Kamata, Y.; Okayasu, I. - Bcl-2 expression and allelic loss of the p53 gene in gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122: 427-432, 1996.
  61. Nicolson, N.L.; Talpaz, M.; Nicolson, G.L. - Chromatin nucleoprotein complexes containing tightly bound c-abl, p53 and bcl-2 gene sequences: correlation with progression of chronic myelogenous leukemia. *Gene*, 169: 173-178, 1996.
  62. Coustan-Smith, E.; Kitanaka, A.; Pui, C-H. et al. - Clinical relevance of bcl-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 3(1): 1140-1146, 1996.
  63. Aguilar-Santelises, M.; Rottenberg, M.E.; Lewin, N.; Mellstedt, H.; Jondal, M. - Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)*, 69: 114-119, 1996.
  64. Mainou-Fowler, T.; Craig, V.A.; Coplestone, J.A.; Hamon, M.D.; Prentice, A.G. - Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression, and is inhi-

- bited by IL-4. *Blood*, 84(7): 2297-2304, 1994.
65. Panayiotidis, P.; Ganeshaguru, K.; Jabbar, S.A.B.; Hoffbrand, A.V. - Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*, 85: 439-445, 1993.
  66. Selvakumaran, M.; Lin, H-K; Sjin, R.T.T.; Reed, J.C.; Liebermann, D.A.; Hoffman, B. - The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc, and bcl-2 modulate transforming growth factor  $\beta$ 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biol*, 14(4): 2352-2360, 1994.
  67. Chaouchi, N.; Wallon, C.; Taieb, J. et al. - Interferon- $\alpha$ -mediated prevention of in vitro apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells: Role of bcl-2 and c-myc. *Clin Immunol Immunopathol*, 73(2): 197-204, 1994.
  68. Fernandez, A.; Honnavara, N.; Ananthaswamy, N. - Molecular basis for tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Cancer Bull*, 46(5): 153-160, 1994.
  69. Fisher, T.C.; Milner, A.E.; Gregory, C.D. et al. - Bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res*, 53: 3321-3326, 1993.
  70. Reed, J.C. - Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer: *Toxicol Lett*, 82/83: 155-158, 1995.
  71. Chiou, S-K; Rao, L.; White, E. - Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol*, 14(4): 2556-2563, 1994.
  72. Kondo, S.; Yin, D.; Takeuchi, J.; Morimura, T.; Oda, Y.; Kikuchi, H. - Bcl-2 gene enables rescue from in vitro myelosuppression (bone marrow cell death) induced by chemotherapy. *Br J Cancer*, 70: 421-426, 1994.
  73. Cleveland, J.L.; Askew, D.S.; Packham, G. - Myc-mediated apoptosis in myeloid progenitor cells. *Cancer Bull*, 46(2): 167-172, 1994.
  74. Blackwood, E.M.; Eisenman, R.N. - Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with myc. *Science*, 251: 1211-1217, 1991.
  75. Jansen-Dürr, P.; Meichle, A.; Steiner, P. et al. - Differential modulation of cyclin gene expression by myc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 3685-3689, 1993.
  76. Shirodkar, S.; Ewen, M.; Decaprio, J.A.; Morgan, J.; Livingston, D.M. - The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell*, 68: 157-166, 1992.
  77. Kretzner, L.; Blackwood, E.M.; Eisenman, R.N. - Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature*, 359: 426-428, 1992.
  78. Packham, G.; Cleveland, J.L. - Ornithine Decarboxylase is a mediator of c-myc-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 14(9): 5741-5747, 1994.
  79. Bissonnette, R.P.; Echeverri, F.; Mahboubi, A.; Green, D.R. - Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*, 359: 552-554, 1992.
  80. Janicke, R.U.; Lee, F.H.H.; Porter, A.G. - Nuclear c-myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells. *Mol Cell Biol*, 14(9): 5661-5670, 1994.
  81. Shrivastava, A.; Saleque, S.; Kalpara, G.V.; Artandi, S.; Goff, S.P.; Calame, K. - Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-myc. *Science*, 262: 1889-1892, 1993.
  82. Shi, Y.; Glynn, J.M.; Guilbert, L.J.; Cotter, T.G.; Bissonnette, R.P.; Green, D.R. - Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, 257: 212-214, 1992.
  83. Philipp, A.; Schneider, A.; Väsrik, I. et al. - Repression of cyclin D1: a novel function

- of Myc. *Mol Cell Biol*, 16(6): 4032-4043, 1994.
84. Askew, D.S.; Ihle, J.N.; Cleveland, J.L. - Activation of apoptosis associated with enforced Myc expression in myeloid progenitor cells is dominant to the suppression of apoptosis by interleukin-3 or erythropoietin. *Blood*, 82(7): 2079-2087, 1993.
85. Fanidi, A.; Harrington, E.A.; Evan, G.I. - Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*, 359: 554-556, 1992.
86. Ryan, J.J.; Danish, R.; Gottlieb, C.A.; Clarke, M.F. - p53 induces apoptosis in G1 in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*, 13: 711-719, 1993.
87. Lönn, U.; Lönn, S.; Stenkvist, B. - Prognostic value of erb-B2 and myc amplification in breast cancer imprints. *Cancer*, 75(11): 2681-2687, 1995.
88. Ito, I.; Yoshimoto, M.; Iwase, T. et al. - Association of genetic alterations on chromosome 17 and loss of hormone receptors in breast cancer. *Br J Cancer*, 71: 438-441, 1995.
89. Kubota, Y.; Miyamoto, H.; Noguchi, S. et al. - The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor- $\beta$ 1 gene expression in human bladder cancer. *J Urol*, 154: 371-374, 1995.
90. Trauth, B.C.; Klas, C.; Peters, A.M.J. et al. - Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245: 301-304, 1989.
91. Owen-Schaub, L. - Fas/APO-1: A cell surface protein mediating apoptosis. *Cancer Bull*, 46(2): 141-145, 1994.
92. Weller, M.; Frei, K.; Groscurth, P.; Kramer, P.H.; Yonekawa, Y.; Fontana, A. - Anti-Fas antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cell. *J Clin Invest*, 94: 954-964, 1994.
93. Hsu, B.; Marin, M.C.; Brisbay, S.; Mc Connell, K.; Mc Donnell, T.J. - Expression of bcl-2 gene confers multidrug resistance to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Bull*, 46(2): 125-129, 1994.