



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas
Instituto Nacional de Câncer

**Caracterização da via dos Interferons
e a via da proteína p53 em linhagens de células
tumoriais expostas ao dano genotóxico**

Daniele Blasquez Olmedo

Rio de Janeiro
Junho de 2005



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas
Instituto Nacional de Câncer

**Caracterização da via dos Interferons
e a via da proteína p53 em linhagens de células
tumoriais expostas ao dano genotóxico**

Daniele Blasquez Olmedo

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal
do Rio de Janeiro para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Morfológicas.**

Rio de Janeiro
Junho de 2005

Ficha Catalográfica

Olmedo, Daniele Blasquez

Caracterização da via dos Interferons e a via da proteína p53 em linhagens de células tumorais expostas ao dano genotóxico. Daniele Blasquez Olmedo. Rio de Janeiro, ICB/UFRJ,2005.

Xiv, 104p.:il.

Orientador: Dr. Carlos Gil Ferreira

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Ciências Morfológicas, 2005.

1.IFNs. 2.GBP-2. 3.Dano genotóxico. 4.p53.

I. Ferreira, C.G. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas
Instituto Nacional de Câncer

**Caracterização da via dos Interferons
e a via da proteína p53 em linhagens de células
tumorais expostas ao dano genotóxico**

Daniele Blasquez Olmedo

Orientador: Dr. Carlos Gil Ferreira

Aprovada pela banca examinadora:

Prof. Dra. Márcia Cury El-Cheikh

Profa. Dra. Adriana C. Bonomo

Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Prof. Dr. Marcello André Barciski

Rio de Janeiro

Junho de 2005

Grandes realizações são possíveis
quando se dá atenção
aos pequenos começos” (*Lao Tse*).

À minha família e à minha filha,
Beatriz.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Dr. Carlos Gil Ferreira**, por ter me recebido no Serviço de Pesquisa Clínica do INCA, pelo apoio e incentivo, pelas discussões e contribuições na minha formação, e pela credibilidade depositada em mim;

À minha orientadora **Dra. Denise Peixoto Guimarães**, pela dedicação, carinho, pelas discussões, pela assistência, pela confiança depositada em mim e por contribuir na minha formação;

Às amigas **Elizangela Rangel Pontes** e **Fernanda Costas** pelo apoio, participação e paciência nos momentos mais difíceis;

Às amigas **Isabel Nóbrega**, **Ana Carolina Nobre de Mello** e **Mariana Lemos Duarte** pela importante participação e contribuição no trabalho, e também pela paciência;

Aos amigos **João de Séllos**, **Isabele Small**, **Giuliana Morales** e **Marcos Pinho**, pela grande contribuição com suas dúvidas e sugestões durante as discussões em grupo;

Ao amigo **Leonardo Augusto Karam** pelo incentivo, pelo carinho e pela ajuda;

Ao **Dr. José A. Morgado Diaz** e seu aluno **Marcelo Neves Tanaka** da Divisão de Biologia Celular do INCA, pela importante colaboração e auxílio no trabalho com microscopia eletrônica;

A minha **mãe** e meus irmãos, **Marcos e Patrícia**, pela torcida incondicional e por toda força durante a realização dessa tese;

Ao meu **marido** e **sogros** pelo suporte e apoio para minha dedicação integral no curto período de realização dessa tese;

Aos colegas da **Farmacologia**, pela receptividade e contribuição;

Aos membros da **Banca Examinadora** pelo aceite do convite para avaliar esse trabalho;

À todos amigos do **INCA**, que contribuíram para o meu amadurecimento científico;

Ao **Ministério da Saúde**, **FAF** e ao **INCA**, pelo fundamental apoio financeiro;

Ao **Dr. Marcello André Barcinski**, pela confiança e apoio durante a fase de transição entre os projetos e pela contribuição na revisão dessa tese;

Ao **Dr. João Paulo Viola** e **Dra. Adriana Bonomo** pelas importantes sugestões para melhoria do projeto;

Aos **coordenadores** do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, pela permissão à todas as mudanças ocorridas durante o tempo de realização da tese;

À **todos** que eu esqueci mas que contribuíram de alguma forma para a realização dessa tese de mestrado.

Lista de Figuras

Figura 1: Os pilares do processo de carcinogênese;	03
Figura 2: Progressão do ciclo celular regulada pelos diferentes complexos ciclinas/CDKs;	07
Figura 3: Via de ativação de IRF-1 pelos IFNs;	12
Figura 4: Os três domínios funcionais da proteína p53 humana;	16
Figura 5: Proteína p53 ("core domain") ligada ao DNA;	17
Figura 6: Sinais que permitem a ativação da proteína p53;	19
Figura 7: Ativação da via dos IFNs nas linhagens MCF-7 e TE-7 após exposição ao IFN α por diferentes intervalos de tempo;	35
Figura 8: Quantificação de morte celular nas linhagens MCF-7 e TE-7 após a exposição ao IFN α ;	37
Figura 9: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 após a exposição ao IFN α ;	38
Figura 10: Análise do ciclo celular na linhagem TE-7 após a exposição ao IFN α ;	39
Figura 11: Resposta citotóxica às drogas quimioterápicas das linhagens tumorais;	40
Figura 12: Indução de GBP-2 nas linhagens MCF-7 e HCT116 expostas ao dano ao DNA induzido pela doxorrubicina;	44
Figura 13: Indução de GBP-2 nas células MCF-7 expostas a diferentes concentrações de doxorrubicina;	45
Figura 14: Aumento da proteína IRF-1 nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA;	47
Figura 15: Análise da expressão da proteína p53 nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA;	48
Figura 16: Indução de <i>p21waf1/cip1</i> nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA;	50
Figura 17: Correlação temporal entre as cinéticas de ativação da p53 e de indução de <i>p21waf1/cip1</i> ;	52
Figura 18: Correlação temporal entre as cinéticas de ativação da via da p53 e de indução de <i>gbp-2</i> ;	53
Figura 19: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 após o dano ao DNA;	54
Figura 20: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 após o dano ao DNA;	55
Figura 21: Análise do ciclo celular na linhagem HCT116 após o dano ao DNA;	56

Figura 22: Análise do ciclo celular na linhagem HCT116 após o dano ao DNA;	57
Figura 23: Análise da fase sub-G1 das linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA;	58
Figura 24: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 exposta a concentrações crescentes de doxorubicina;	59
Figura 25: Análise morfológica de morte celular após o dano genotóxico;	61
Figura 26: Hipóteses da indução de <i>gfp-2</i> após o dano genotóxico;	68

Lista de Tabelas

Tabela I: As sequências ISREs dentro do promotor de genes dos IFNs e de genes induzidos pelos IFNs;	05
Tabela II: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação gênica;	30
Tabela III: Condições padronizadas para RT-PCR duplex;	30
Tabela IV: Resposta citotóxica às drogas quimioterápicas das linhagens tumorais;	41
Tabela V: Fator de resistência às drogas quimioterápicas das linhagens celulares	41

Lista de Siglas e Abreviaturas

A,C,G,T - adenina, citosina, guanina, timina
APC - adenomatous polyposis coli
BRCA - proteína do câncer de mama
BSA - albumina de soro fetal bovino
CDC - proteína da divisão do ciclo celular
CDK - quinase dependente de ciclina
CKI - Inibidores de quinases dependente de ciclina
cDNA - DNA complementar
CHK - proteína quinase do ponto de checagem
CIP - proteína que interage com CDK
COX - ciclooxigenase
DEPC - dietilpirocarboneto
DMEM - meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTPs - desoxinucleosídeo trifosfato
dsDNA-PK - proteína quinase ativada por dupla fita de DNA
DTT - dithiothreitol
E2F - Fator endotelial
EBV - vírus Epstein-Barr
ECMV - encephalomyocarditis vírus
EDTA - ácido etilodiamino teracético
FACS - análise por citometria de fluxo
FADD - proteína associada a Fas com domínio de morte
GADD45 - proteína induzida ao dano ao DNA e parada do ciclo
GAF - fator ativado por interferon gama
GAS - sequência ativada por interferon gama
GBP - Proteína ligadora de guanilato
GDP - guanosina difosfato
GMP - guanosina monofosfato
GTP - guanosina trifosfato

HEPES - N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
HPV - Papilomavírus humano
HSP - proteína de choque térmico
ICE - enzima convertora de interleucina 1b
IRF - Fator regulatório de interferon
IRFEs - elementos dos fatores regulatórios de interferons
ISGs- genes estimulados pelos interferons
ISGF3 - fator 3 de genes estimulados por inteferon
MPF - fator promotor de mitose
ORC - proteína do complexo de reconhecimento de origem
p14 ARF - proteína com fase de leitura alternativa 14
PCR - reação em cadeia da polimerase
RB – proteína do retinoblastoma
RNA - ácido ribonucléico
RT - transcriptase reversa ou transcrição reversa
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SV40 - vírus de símio tipo 40
TNF α - fator α de necrose tumoral
TNFR - receptor de fator de necrose tumoral
TP53 - proteína tumoral de 53kDa
TRADD - proteína associada ao receptor de TNF com domínio de morte
UV – ultravioleta
VSV - Vírus Vesicular de Estomatite
WAF - fragmento ativado por p53 selvagem

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Siglas e Abreviaturas	xii
Resumo	xvi
Abstract	xvii
I. INTRODUÇÃO	01
I.1. Carcinogênese	02
I.2. Os interferons e a conexão com o câncer	04
I.2.1. Via de sinalização dos IFNs	04
I.2.2. Resposta antiproliferativa dos IFNs através da regulação do ciclo celular	06
I.2.3. Resposta antiproliferativa dos IFNs mediada pela apoptose	08
I.2.4. Uso terapêutico dos IFNs em tumores sólidos	10
I.3. IRF-1 e seu papel no controle da proliferação celular	11
I.3.1. Características gerais	11
I.3.2. Regulação e via de ativação de IRF-1	12
I.3.3. O papel de IRF-1 em diferentes respostas celulares	14
I.4. <i>Gbp-2</i> : um gene-alvo de IRF-1	15
I.5. <i>TP53</i> : Um importante gene supressor de tumor	16
I.5.1. Descrição do gene e da proteína	16
I.5.2. Regulação e função	18
I.5.3. p53 e a participação nas respostas celulares após o dano ao DNA	20
I.6. Cooperação entre a via dos IFNs e a via supressora de tumor de p53	21
II. OBJETIVOS	22
III. MATERIAIS E MÉTODOS	24
III.1 - Cultura de células	25
III.2 – Drogas	25

III.3 - Ensaio de citotoxicidade	26
III.4 - Preparação dos extratos celulares	27
III.5 - Extração de proteínas	27
III.6 - Quantificação de proteínas	28
III.7 - Extração de RNA	29
III.8 - RT-PCR duplex	29
III.9 - Imunodeteção de proteínas: “Western blot”	31
III.10 - Citometria de fluxo: quantificação de morte celular e análise do ciclo celular	32
III.11 - Microscopia Eletrônica	32
IV. RESULTADOS	31
IV.1. Ativação da via dos interferons nas linhagens MCF-7 e TE-7.	35
IV.2. Sensibilidade das diferentes linhagens tumorais às drogas quimioterápicas.	40
IV.3. Indução do gene regulado pelos IFNs <i>gbp-2</i> nas linhagens MCF-7 e HCT116 expostas ao dano genotóxico.	43
IV.4. Indução do fator de transcrição da via dos IFNs após o dano ao DNA.	46
IV.5. Ativação da via da proteína p53 nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 expostas ao dano genotóxico.	48
IV.5.1. Indução de <i>p21waf1/cip1</i> nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 expostas à doxorrubicina.	49
IV.6. Correlação temporal entre as cinéticas de ativação da p53 e de indução de <i>p21waf1/cip1</i> e de <i>gbp-2</i> .	51
IV.7. Respostas celulares induzidas nas linhagens expostas ao dano genotóxico.	53
V. DISCUSSÃO	62
VI. CONCLUSÕES	70
VII. PERSPECTIVAS	72
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Resumo

O gene *gbp-2* codifica uma proteína com função biológica pouco estudada, é altamente expresso após a indução de IFN γ e requer o fator de transcrição IRF-1 para sua indução. A regulação positiva de *gbp-2* dependente da ativação da proteína supressora de tumor p53 foi recentemente descrita em uma linhagem de carcinoma de esôfago que expressa uma proteína mutante p53 termo-sensível. A ativação da proteína p53 por sinais de estresse, como dano ao DNA, induz genes que participam da parada do ciclo celular e apoptose. Nesse contexto, os principais objetivos dessa tese foram: (i) verificar a indução de *gbp-2* após a ativação de p53 pelo dano genotóxico; (ii) correlacionar sua eventual indução com a ativação de IRF-1; (iii) correlacionar a indução de *gbp-2* e de sua proteína com as respostas celulares após o dano ao DNA. Nessa tese, pela primeira vez foi demonstrado que o gene *gbp-2* é induzido pelo dano genotóxico; essa indução correlacionou-se com a presença da proteína p53 selvagem em linhagens tumorais; o aumento de expressão de IRF-1 não foi suficiente para a indução de *gbp-2* após o dano ao DNA; nas linhagens celulares nas quais houve a indução de *gbp-2* a resposta predominante foi a de parada do ciclo celular. O estudo da relação entre a via dos IFNs e da p53 pode trazer importantes implicações do papel dos IFNs durante a carcinogênese.

Abstract

The gene *gbp-2* codes for a protein with an unknown biological function. Gbp-2 is highly expressed after the induction by IFN γ and requires the transcription factor IRF-1. Recently, the positive p53-dependent regulation of *gbp-2* was described in an esophageal cell line, which expresses a temperature-sensitive mutant p53. The activation of p53 by stress signal such as DNA damage is known to induce genes involved in cell cycle arrest and apoptosis. Within this context, the main objectives of this study were: (i) to evaluate *gbp-2* induction upon p53 activation by genotoxic damage; (ii) to establish a correlation of an eventual *gbp-2* induction with IRF-1 activation; (iii) to correlate *gbp-2* induction with cellular response to DNA damage. In this study, it was demonstrated for the first time that *gbp-2* may be induced by genotoxic effect and also that the induction occurred in p53wt cell lines. Furthermore it was demonstrated that an increase in the expression of IRF-1 was not sufficient to induce *gbp-2* following DNA damage. In addition, within the cell lines at which a *gbp-2* induction was observed the preferential response was arrest of cell cycle progression. The study of the correlation between IFN and p53 pathways may reveal important implications for the understanding of the role of IFN during carcinogenesis.

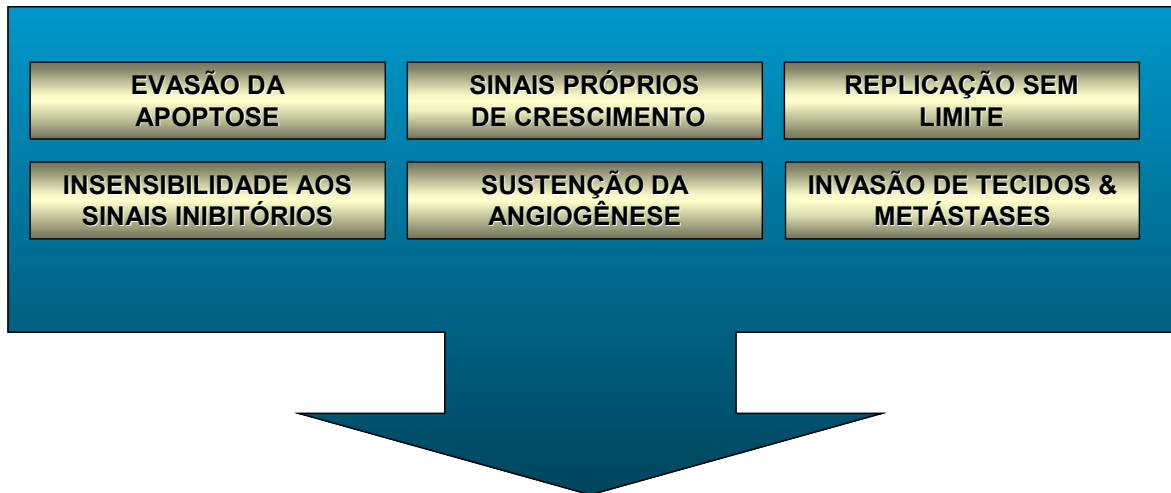
I. INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

I.1. Carcinogênese

O controle da proliferação celular é determinante para o crescimento normal e diferenciação celular. A transformação de uma célula normal em uma célula maligna é conseqüência do aparecimento de uma ou mais alterações genéticas, e/ou de eventos epigenéticos em genes que codificam proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular e da apoptose, ou que sejam responsáveis pela interação célula-célula. A mutação ou deleção em genes supressores de tumor e oncogenes são freqüentemente encontradas nos diferentes tipos de tumor, e irão comprometer as condições fisiológicas normais de diferenciação celular, levando a atual definição do câncer como uma doença fundamentalmente de base genética. Essa definição foi bem exemplificada no modelo descrito por Fearon and Vogelstein, no qual o acúmulo de diversas alterações genéticas (*apc*, *cox-2*, e *β-catenina*) acompanha a progressão do adenoma ao carcinoma no câncer de cólon (Fearon e Vogelstein, 1990).

O acúmulo de alterações genéticas permitirá aos clones de células malignas uma maior capacidade de sobrevivência e vantagem adaptativa sobre as células normais. A expansão clonal é um passo importante para que essas células consigam não apenas seu estabelecimento regional mas o alcance de regiões mais distantes. Hanahan e Weinberg definiram seis principais alterações fisiológicas necessárias para a transformação de uma célula normal à uma célula tumoral e que garantem o sucesso do processo de malignização: a auto-suficiência em fatores de crescimento, a insensibilidade aos fatores inibitórios, a evasão à apoptose, a replicação sem limite, a angiogênese sustentada e a invasão tecidual local e à distância (Hanahan e Weinberg, 2000) (**Figura 1**).



Expansão Clonal das células malignas

Figura 1: Os pilares do processo de carcinogênese: as seis principais alterações necessárias para que haja sucesso no início e progressão do câncer (Adaptado de Hanahan, D. e Weinberg, A., 2000).

Nesse contexto, o processo da carcinogênese da maioria dos tumores sólidos é extremamente complexo por resultar da alteração de não apenas uma, mas de diversas vias de sinalização celular que normalmente cooperam para alcançar uma mesma resposta fisiológica (Vogelstein e Kinzler, 2004). Acredita-se que para uma melhor compreensão da carcinogênese nesses tumores seja fundamental o conhecimento do nível de cooperação e as interações entre as diferentes vias celulares, e dessa forma, seja possível a atuação mais direcionada no controle do início e da progressão desses tumores. Essa introdução abordará, de modo sucinto, duas vias celulares que estão implicadas no processo da carcinogênese e parecem cooperar em diferentes níveis: a via dos interferons (IFNs) e a via da proteína p53.

I.2. Os interferons e a conexão com o câncer

I.2.1. Via de sinalização dos interferons

Os interferons são citocinas normalmente produzidas durante a defesa do hospedeiro contra infecções virais. São dois os tipos de interferons conhecidos, do Tipo I ($\text{IFN}\alpha$ e β , predominantemente) e do Tipo II ($\text{IFN}\gamma$). Os interferons alfa ($\text{IFN}\alpha$) e beta ($\text{IFN}\beta$) são produzidos por várias células em resposta à infecção viral, dupla-fita de RNA ou outros estímulos, enquanto o interferon gama ($\text{IFN}\gamma$) é frequentemente produzido por linfócitos T e células “natural killer” (NK) após o reconhecimento de antígenos e mitógenos específicos (Stark *et al.*, 1998).

A resposta aos IFNs é iniciada através do reconhecimento dos mesmos pelos seus receptores específicos culminando na ativação transcricional de um número variado de genes. A ativação dos resíduos de tirosina dos receptores do Tipo I (IFNAR1 e 2) e do Tipo II (IFNGR1 e IFNGR2) é seguida pela fosforilação dos membros da família das “Janus kinases” (JAK) e “Signal Transducer and Activator of Transcription” (STAT). As JAKs ativadas são capazes de fosforilar as STATs, que formam homo ou heterodímeros e são translocadas para o núcleo. Os homodímeros ligam-se a uma região consenso 5’TTNCNNAA3’ denominada GAS (“Gamma Activated Sequence”) e os heterodímeros STAT1/STAT2 ligam-se a um terceiro fator p48/IRF-9, formando o complexo ISGF3 (“IFN-Stimulated gene Factor 3”) que por sua vez se ligará à sequência 5’AGTTTCNNTTTCNC/T3’ conhecida como ISRE (“IFN-Stimulated Regulatory Elements”). Essas sequências podem ser encontradas nos genes dos IFNs, ou nos genes regulados pelos interferons (ISGs-“interferons stimulated genes”) cujos produtos serão os principais responsáveis pelas diferentes respostas biológicas mediadas por essas citocinas (Wong *et al.*, 2002) (**Tabela 1**).

Tabela I: As seqüências ISREs dentro do promotor de genes dos IFNs e de genes induzidos pelos IFNs (adaptada de Tanaka, N., Taniguchi,t., e Harada, H., 1998)

ISRE consenso	A/GNGAAANNGAAACT
Gene	Seqüência
<i>ifnβ</i>	G A AAA C T GAAA G G G A GAA G T GAAA G T
<i>ifnα</i>	G A AAA T G GAAA G T
2'5' <i>oas</i>	A GGGAA – C GAAA CCA
<i>pkr^*</i>	G GGAAA A C GAAA CAG
<i>gbp</i>	A T GAAA C T GAAA GTA

2'5' A, 2'5' oligoadenilato sintetase; PKR, proteína quinase dependente de dupla fita de RNA; GBP, proteína ligadora de guanilato. *Seqüência de PKR de camundongo.

Apesar de conhecidos pela capacidade de interferir na replicação viral de células tratadas, os IFNs também são conhecidos pela capacidade de induzir uma resposta imunomodulatória, de diferenciação celular, anti-angiogênica e antiproliferativa (Stark *et al.*, 1998). Ainda não se sabe o exato mecanismo de ação dos IFNs (α , β e γ) no processo da carcinogênese, porém alguns produtos de genes regulados pelos IFNs (ISGs) que foram, originalmente caracterizados na resposta antiviral apresentam também atividade antiproliferativa pela indução de duas principais respostas celulares: a de parada do ciclo celular e de indução da apoptose (Chawla-Sarkar *et al.*, 2003). A atividade antiproliferativa pode ocorrer de forma direta ou indireta (Grander *et al.*, 1997). Os efeitos indiretos envolvem a modulação da resposta imune ou a inibição da vascularização celular (efeitos anti-angiogênicos), e os efeitos diretos envolvem o desencadeamento de respostas de defesa celular, representada principalmente pela indução da apoptose. Certas proteínas agem como mediadoras transcricionais de ISGs e são os principais fatores da indução da resposta antiproliferativa como a proteína quinase PKR (“double stranded RNA activated protein kinase”), STAT-1, RNase L ativada e proteínas

da família das IRFs (“Interferon regulatory Factor”) como IRF-1, IRF-3 e IRF-8/ICSBP (Harada *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2002). Essas proteínas, freqüentemente, tem sua atividade inibida durante o processo tumorigênico seja por alterações em nível gênico ou modificações pós-transducionais (Pitha, 2000). A inibição dessas proteínas durante a carcinogênese pode ocorrer ainda, pela ligação à oncoproteínas virais como por exemplo a ligação da oncoproteína E6 do HPV a IRF-3 (Ronco *et al.*, 1998) ou pela síntese de análogos a estes fatores, como a vIRF produzido pelo vírus KS HSV (Gao *et al.*, 1997).

I.2.2. Resposta antiproliferativa dos IFNs através da regulação do ciclo celular

O ciclo celular constitui um processo irreversível e dinâmico controlado por sinais intracelulares e extracelulares os quais permitem que todo o DNA contido na célula-mãe seja replicado sem erros durante a fase S (síntese) e segregado à duas células filhas durante a fase M (mitose), com a garantia de fidelidade de todo material genético (Molinari, 2000). Entre as fases S e M, existem intervalos (“Gaps”) denominados G1, anterior à fase S e G2 anterior à fase M. O controle da expressão gênica e da atividade das proteínas envolvidas na sinalização do início e término de cada uma das fases é de extrema importância para que uma fase comece apenas quando a anterior estiver concluída. Devido à complexidade e à irreversibilidade da replicação celular, existem pontos de checagem (“checkpoints”) que dão suporte ao prosseguimento correto das diferentes fases do ciclo celular. Alguns desses “checkpoints”, nas fases G1, S e M já encontram-se bem definidos e são caracterizados pela inibição ou amplificação de alguns genes e pela fosforilação e/ou aumento da degradação proteolítica de algumas proteínas (Krek, 1998). Os principais reguladores do ciclo celular são complexos heterodímeros compostos por ciclinas e CDKs (“Cyclin Dependent Kinases”) que são regulados pelos seus inibidores (CDKIs-“Cyclin Dependent Kinase Inhibitors”)(Sherr e Roberts, 1999) e tem a sua expressão bastante variável durante o ciclo celular (Sherr, 1994). O balanço da formação, ativação e

degradação periódica desses complexos garante a progressão correta do ciclo celular (Figura 2).

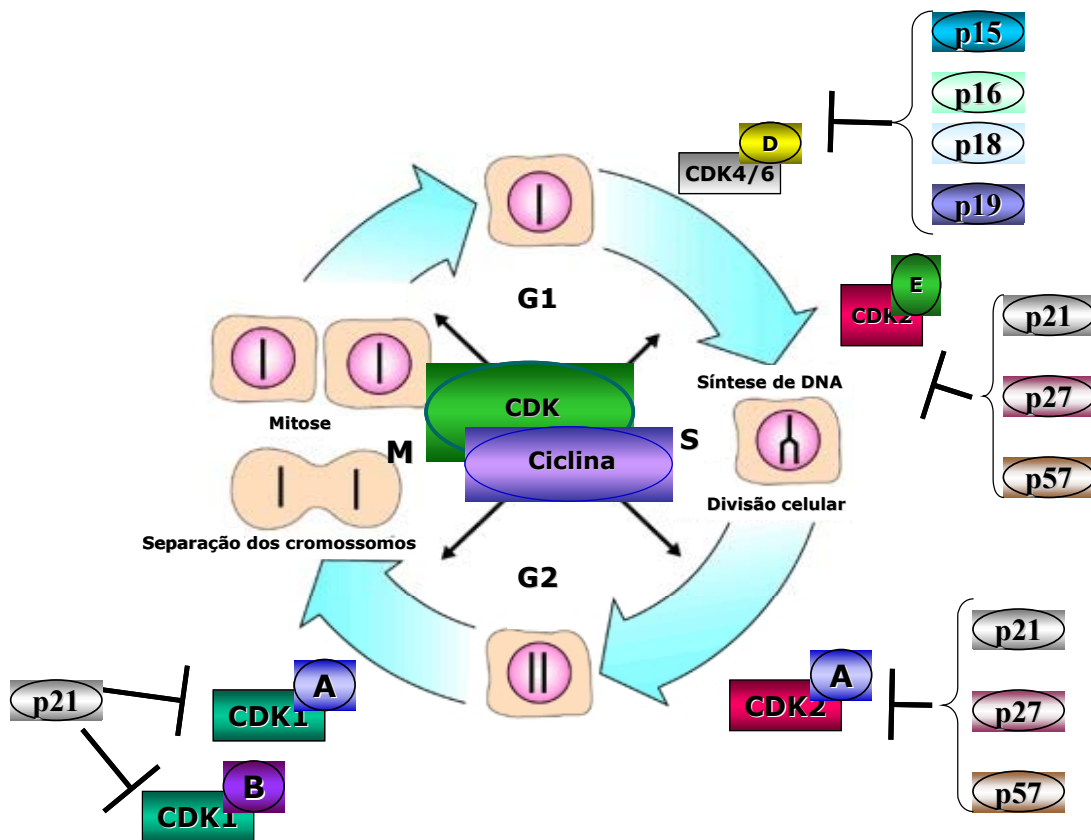


Figura 2: Progressão do ciclo celular regulada pelos diferentes complexos ciclinas/CDKs. Os complexos ciclinas/CDKs são negativamente controlados pelos inibidores quinase dependente de ciclina (CDKIs), controlando a progressão do ciclo celular durante os intervalos de transição (G1 e G2), das fases de síntese (S) e da mitose (M). (Adaptado de Guimarães,D.P., 2003).

Os produtos de genes regulados pelos IFNs são capazes de interferir em todas as fases do ciclo celular através do bloqueio no intervalo G1/S ou pelo atraso na progressão do intervalo G2/M (Balkwill e Taylor-Papadimitriou, 1978; Qin *et al.*, 1997; Vannucchi *et al.*, 2000). A parada do ciclo celular em G1/S após o estímulo pelos IFNs é marcada principalmente pela indução de *p21waf1/cip1* impedindo a fosforilação da proteína RB através da inibição do complexo Ciclina E/CDK2 (Subramaniam *et al.*, 1998). O gene *p21waf1/cip1* é induzido por diferentes fatores de transcrição regulados pelos IFNs tais como

IRF-1 (Pamment *et al.*, 2002), IRF-5 (Barnes *et al.*, 2003) e STAT1 (Chin *et al.*, 1996). A proteína supressora de tumor RB pode ter sua atividade modulada também pelo IFN α (Kumar e Atlas, 1992) que regula negativamente a Ciclina D3 impedindo sua fosforilação. A proteína RB quando hipofosforilada forma um complexo com o fator de transcrição E2F-1 e inibe a atividade transcricional de genes cujos produtos são essenciais para o início e progressão da fase S, como Ciclina A, Ciclina E, CDC2A, proteínas de ORC, CDC6 e Timidilato sintase (Helin, 1998).

Os mecanismos que levam à parada do ciclo celular em G2/M pelos IFNs, ainda são pouco claros. Sabe-se que para que as células possam progredir para a fase de mitose é necessário o aumento da atividade do complexo Ciclina B/CDK1 (CDC2), também conhecido como MPF (“mitosis promoting factor”)(Pines, 1999) que é dependente da disponibilidade de Ciclina B e da defosforilação de CDK1 pelas fosfatases CDC25B e CDC25C (Draetta e Eckstein, 1997). IFN γ foi capaz de induzir a parada do ciclo em G2/M em células tumorais de mesotelioma humano e esse evento mostrou-se independente da expressão de *p21waf1/cip1* e de *p27kip1* sendo relacionado à inibição de outras CDKs (Jaurand, MC.,2001).

1.2.3. Resposta antiproliferativa dos IFNs mediada pela apoptose

Os IFNs podem ser citotóxicos às células tumorais pela capacidade de induzir a apoptose que ocorre independentemente da indução da parada do ciclo celular. A apoptose induzida pelos IFNs ocorre não apenas pela via mitocondrial, através da liberação de citocromo *c* e/ou pela alteração do potencial de membrana mitocondrial, mas também pela via dos receptores de morte através da sinalização FADD/caspase-8 (Thyrell *et al.*, 2002; Chawla-Sarkar *et al.*, 2003).

A morte celular programada ou apoptose é um processo comum e altamente conservado com um importante papel no controle de muitos processos fisiológicos normais como o desenvolvimento embrionário, regulação do sistema imune e a manutenção da homeostase celular (Alenzi e Warrens, 2003; Meier *et al.*, 2000; Lowe and Lin, 2000). A insensibilidade aos estímulos apoptóticos é uma das seis alterações fisiológicas presentes no

fenótipo tumoral e o mecanismo molecular pelo qual ela pode ser desencadeada vem sendo amplamente estudado para melhor compreensão da carcinogênese e das respostas terapêuticas encontradas em tumores sólidos (Makin e Hickman, 2000). Uma série de sinais extracelulares como a depleção de fatores de crescimento, hipóxia, radiação e perda de interações da célula-célula, são responsáveis pela ativação da resposta apoptótica e por isso a indução da via dos IFNs, assim como a de outras vias celulares podem levar a ativação das mesmas proteínas que serão importantes para execução da apoptose (Alenzi e Warrens, 2003).

A ativação da cascata de proteases cisteína aspartato-específicas, as caspases (Ashkenazi e Dixit, 1998), é o mecanismo molecular efetor comum as duas vias de morte celular. A indução da morte celular programada pela via dos receptores de morte ocorre através da interação dos receptores de morte a seus respectivos ligantes como TNF α ("tumor necrosis factor- α "), FAS-ligante/CD95 ou TRAIL ("TNF-related apoptosis-inducing ligand"). Estes orientam a trimerização dos receptores de morte na fração extracelular e permitem a formação na porção intracelular de uma base denominada domínio da morte DD ("death domain"). As moléculas adaptadoras como TRADD e FADD transduzem o sinal e ativam a caspase sinalizadora, caspase 8, resultando na ativação final das caspases efetoras 3 e 7. A indução de morte pela via mitocondrial inicia pelo aumento da expressão de BAX ou BAK, liberação de citocromo c e interação deste com APAF-1 ("apoptotic proteinase-activating factor 1") (Li *et al.*, 1997). A progressão dessa via ocorre pela ativação da Caspase-9, culminando na ativação das mesmas caspases efetoras.

Acredita-se que a indução da apoptose pelos IFNs ocorre tardiamente (>48 horas de tratamento)(Chawla-Sarkar *et al.*, 2001), indicando o envolvimento de efetores intermediários que irão induzir genes pró-apoptóticos e promover a resposta citotóxica. Alguns dos efetores intermediários são: a proteína quinase PKR ("double stranded RNA activated protein kinase") capaz de induzir Fas/FasL e inibir a síntese de proteínas pela regulação negativa de eIF α (" α -subunit of eukaryotic translation initiator factor 2")(Gil e Esteban, 2000; Jagus *et al.*, 1999); STAT-1 que induz a transcrição de ISGs e proteínas com função pró-apoptótica da família das IRFs como IRF-1, IRF-3 e IRF-8 (Wong *et al.*,

2002; Taniguchi et al., 2001); a proteína pró-apoptótica e supressora de tumor PML (“promyelocytic leukemia”) localizada no núcleo, no nucleoplasma e nos corpos nucleares (NBs) capaz de modular a atividade da p53 (Takahashi et al., 2004; Bernardi et al., 2004); e CD95/APO1, um potente indutor de apoptose que pode ser regulado positivamente pelos Tipos I e II dos IFNs (Conte et al., 2003; Ashkenazi e Dixit, 1998). Alguns genes pró-apoptóticos são regulados pelos IFNs como Bak, 2’ 5’ OAS e XAF-1 (Chawla-Sarkar et al., 2003). A ativação da proteína pro-apoptótica e supressora de tumor IRF-1 leva a indução dos genes *caspases-8*, *caspases-7* e *fas-L* (Taniguchi et al., 1997) e regula negativamente genes anti-apoptóticos como o gene *survivin* (Tamura et al., 1997). Existem fortes evidências da alteração em tumores de genes que podem ser regulados pelos IFNs e que são de extrema importância para indução da apoptose (ex. *irf-1*, *PI-3 quinase*, *ras* e *TP53*) (Hollstein et al., 1991; Taniguchi et al., 1997; Haus, 2000). As alterações encontradas em proteínas como IRF-1 e PKR em tumores são algumas das evidências da participação da via dos IFNs no processo da carcinogênese (Haus, 2000).

I.2.4. Uso terapêutico dos IFNs em tumores sólidos

A insensibilidade à apoptose contribui para a resistência encontrada no tratamento com quimioterápicos e possivelmente naquela encontrada no tratamento com os IFNs. O uso dos IFNs no tratamento de diferentes tipos de tumor é bastante variado (Mahmutovic e Beslagic, 2004). Algumas neoplasias demonstram resistência parcial ou completa como o câncer de mama e o de esôfago, enquanto outras apresentam uma resposta positiva ao tratamento como os melanomas (Buzaid, 2004), câncer hepático (Lok, 2004), renal (Amato, 2005; Papageorgiou et al., 2004) ou de bexiga (Papageorgiou et al., 2004).

O comprometimento da via de transdução de sinais de JAK/STAT provavelmente contribui para a resistência ao tratamento de alguns tumores com IFNs (Tracey, 2002). A ineficiência na resposta dos IFNs em alguns tumores também pode estar relacionada a presença de alterações genéticas em *locus* onde estão localizados genes dos IFNs ou induzidos pelos IFNs. A deleção ou a perda de heterozigose (LOH) no cromossomo 5, região onde

encontra-se localizado o gene *irf-1* é encontrada em algumas neoplasias, tais como hepáticas, gástricas e esofágicas. Os membros da família dos IRFs tem um importante papel biológico na proliferação celular e sua expressão forçada normalmente é capaz de perturbar o crescimento e a diferenciação celular, podendo ser os principais responsáveis pela falha ou sucesso da resposta antitumoral dos IFNs (Tanaka e Taniguchi, 2000).

I.3. IRF-1 e seu papel no controle da proliferação celular

I.3.1. Características gerais

O gene *irf-1* (NM_002198) está localizado no cromossomo 5q31.1, é composto por 10 exons, sendo a região codante do exon 2 ao 10 (Harada *et al.*, 1994). A estrutura gênica apresenta uma região altamente conservada nos exons 5 e 6. A região promotora apresenta um CAAT box, é rica em sequências GC e possui sítios de ligação para fatores de transcrição conhecidos, como Sp1 e NF κ B, além de uma sequência GAS que é ativada por IFN γ , seu mais potente indutor.

A proteína IRF-1 possui uma sequência de 325 aminoácidos e peso molecular de 51kDa e atua como um fator de transcrição capaz de se ligar aos elementos de diversos genes regulados pelos IFNs tanto do Tipo I quanto do Tipo II. IRF-1 integra uma família de fatores regulatórios de interferons (IRFs) que incluem outros importantes membros: IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-8/ICSBP e IRF-9/ISGF3 γ /p48. Esses IRFs apresentam grande homologia no domínio de ligação ao DNA na porção N-terminal contendo 115 aminoácidos (Tanaka e Taniguchi, 2000). O motivo consenso de ligação ao DNA encontrado nos fatores de transcrição da família das IRFs, é caracterizado pela sequência G(A)AAA^G/C^T/C GAAA^G/C^T/C conhecido como as IRF-Es (“interferon regulatory factors elements”). IRF-1 possui um domínio de ativação C-terminal que não demonstra nenhuma homologia com qualquer outro membro da sua família (Harada *et al.*, 1994), o que sugere a sua participação em outras vias de sinalização celular. IRF-1 foi o primeiro fator de transcrição da família das IRFs descrito e até o momento é o melhor caracterizado. Além do seu papel antiproliferativo na resposta antiviral, IRF-1

vem ganhando destaque pelo seu importante papel na via de supressão tumoral (Taniguchi *et al.*, 1997).

I.3.2. Regulação e via de ativação de IRF-1

Irf-1 normalmente é expresso em baixos níveis em vários tipos celulares diferenciados. Tanto o mRNA quanto a sua proteína são muito instáveis, e sua proteína apresenta a meia vida curta de 30 minutos. *Irf-1* pode ser induzido por várias citocinas como Interferons α , β e γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, hormônios como prolactina, GM-CSF e LIF (Taniguchi *et al.*, 2001) através da ligação do complexo homodimérico STAT1(GAF/AAF) à sequência GAS presente em seu promotor ou através da ligação de fatores de transcrição como NF κ B (Miettinen *et al.*, 2000). A formação do complexo homodimérico de STAT1 (GAF/AAF) e sua fosforilação, induzidas após ativação do receptor homólogo dos interferons (Jak1, Jak2 e Tyr2) permitirá a indução de diversos genes-alvo de IRF-1 (Wong *et al.*, 2002; Suk *et al.*, 2001) (**Figura 2**). Após a indução de sua transcrição a proteína super-expressa é degradada por ubiquitinação (Nakagawa e Yokosawa, 2000).

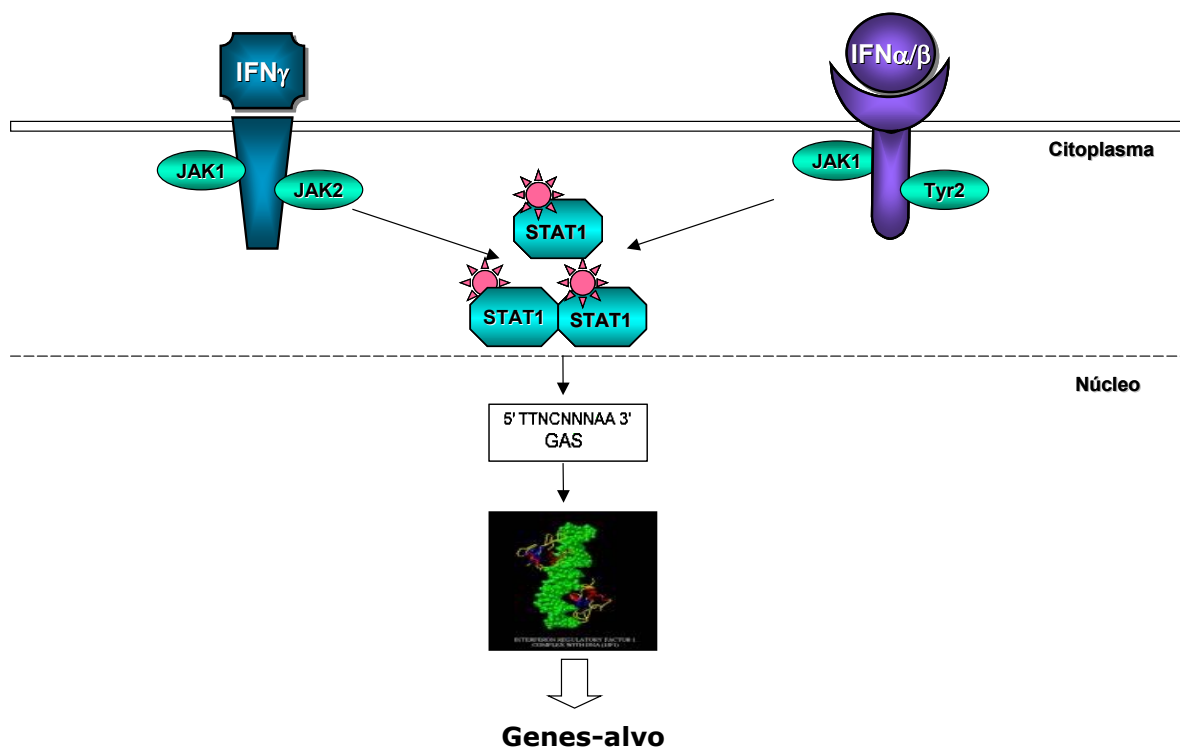


Figura 3: Via de ativação de IRF-1 pelos IFNs.

A regulação negativa da atividade de IRF-1 ocorre através da competição com IRF-2 pela ligação às sequências ISREs. A proteína de IRF-2 é mais estável e acumula em níveis mais altos do que IRF-1 possuindo uma meia-vida longa de 8 horas em contraste com a meia-vida de 30 min de IRF-1 (Tanaka e Taniguchi, 2000). Acredita-se que o equilíbrio entre a expressão de IRF-1 e IRF-2 seja um evento crítico para o controle do crescimento celular (Taniguchi, 1995). Outro fator capaz de atuar como regulador negativo da atividade de IRF-1 é ICSBP/IRF-8 (“interferon consensus sequences binding protein”), e isso ocorre pela repressão transcricional de genes que contém as ISREs em seu promotor (Kirchhoff *et al.*, 2000). IRF-8 é induzido em células hematopoiéticas apenas pelo IFN γ e pode interagir com IRF-1 (heterodimerização) mantendo a homeostase celular. Além destes, a nucleofosmina (NPM) (Kondo *et al.*, 1997), um possível fator de junção dos ribossomos e freqüentemente induzido em células leucêmicas, é capaz de se ligar a IRF-1 inibindo sua função (Zhang *et al.*, 1989).

1.3.3. O papel de IRF-1 em diferentes respostas celulares

Diversos estudos vem demonstrando o potencial antiproliferativo de IRF-1. IRF-1 induz a transcrição de genes que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular (*p21waf1/cip1*, *cdk 2*) (Pamment *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 1996) e apoptose (*ice*, *bak*, *caspase-8*, *caspase-7*, *fas-L* e *survivin*) (Tamura *et al.*, 1997).

As primeiras evidências que sugeriram o papel de IRF-1 no ciclo celular surgiram durante as observações feitas por Harada e colaboradores na variação da expressão de *irf-1* em cultura de células submetidas ao estresse pela ausência de fatores de crescimento. As células paradas no ciclo celular tiveram um notável aumento da expressão de *irf-1* que foi rapidamente revertido pela reintrodução de soro na cultura celular (Harada *et al.*, 1993; Taniguchi *et al.*, 1997). Em outro estudo, fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) deficientes para IRF1 (IRF-1^{-/-}) demonstraram uma incapacidade de parada durante o ciclo celular após o dano causado por irradiação, um fenótipo semelhante ao observado em MEFs deficientes para p53 (p53^{-/-}) (Donehower *et al.*, 1992). Esses mesmos fibroblastos, na presença

de um oncogene ativado como *c-Ha-ras*, foram incapazes de sofrer apoptose (Tanaka *et al.*, 1994). Além disso, MEFs IRF-1^{-/-} são susceptíveis ao desenvolvimento de tumores na presença do oncogene *c-Ha-ras* (Tanaka *et al.*, 1994).

O envolvimento de IRF-1 na apoptose, por outro lado, foi melhor demonstrado quando em linfócitos T, conhecidos pela grande suscetibilidade à apoptose induzida após o dano ao DNA, essa resposta foi alcançada por um mecanismo independente de p53 e dependente de IRF-1 (Tamura *et al.*, 1995). Além disso, em linfócitos T ativados por mitógenos após o dano ao DNA, a indução do gene pró-apoptótico *ice* (“Interleukine-1beta converting enzyme”) (Tamura *et al.*, 1997) ocorre pela proteína IRF-1. IRF-1 também é capaz de induzir a apoptose pela indução de genes pró-apoptóticos, como *bak*, e inibição de anti-apoptóticos, como *survivin* (Pizzoferrato *et al.*, 2004).

Deleções e perdas inteiras do cromossomo 5 são freqüentes principalmente em síndromes pré-leucêmicas agudas (MDS-“myelodysplastic syndrome”) (Green *et al.*, 1999). A deleção dessa região onde está localizado o gene *irf-1* também é encontrada em tumores sólidos, como os gástricos e os esofágicos (Peralta *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 1996; Nozawa *et al.*, 1998).

1.4. *Gbp-2* : gene-alvo de IRF-1

Gbp-2 (NM_004120) é o gene mais expresso após a indução por IFN γ e sua indução é dependente de IRF-1 (Gorbacheva *et al.*, 2002; Tnani e Bayard, 1999) e da ativação de PKR (Kumar *et al.*, 1997). Esse gene codifica uma proteína pertencente a família das GBPs com função GTPase capaz de se ligar a GTP, GDP e GMP e catalizar a hidrólise de GTP a ambos GDP e GMP (Neun *et al.*, 1996). Algumas GTPases de baixo peso molecular, incluindo as da família RAS e as da família RAB, diferem das de alto peso molecular por não hidrolizar GTP a GMP. As GTPases em geral, tem um importante papel na proliferação celular, diferenciação, nas vias de transdução de sinal e transporte de proteínas intracelulares, e por isso são alvos de alterações genéticas durante o processo da carcinogênese. Por exemplo, mutações em *ras* são freqüentemente encontradas em diferentes tumores. As GBPs, em especial, são uma família de GTPases de alto peso molecular, 65 a 67kDa, altamente

induzidas na resposta antiviral dos hospedeiros (Asundi *et al.*, 1994). As GBPs tem apenas dois motivos identificados: um sítio de ligação ao nucleotídeo guanina e um sítio de CaaX box em seu promotor necessário para as modificações pós-transducionais de isoprenilação que ocorre em quase todos os membros, exceto em GBP-1, onde ocorre farnesilação (Strehlow *et al.*, 1994; Prakash *et al.*, 2000). Acredita-se que a modificação pós-transducional da proteína por isoprenilação, ocorre para permitir o aumento da hidrofobicidade, o direcionamento correto da sua localização intracelular e a mediação de interações proteína-proteína (Casey, 1995; Guenzi *et al.*, 2001).

Pouco se sabe sobre a função biológica das GBPs mas alguns estudos sugerem que GBP-1, o membro melhor estudado da família da GBPs, tenha papel antiproliferativo nas células endoteliais independente de sua função GTPase e dependente do estímulo por citocinas (Guenzi *et al.*, 2003). A atividade antiviral através da inibição de VSV (“Vesicular Stomatitis Vírus”) e da replicação de EMCV (“encephalomyocarditis vírus”) foi relacionada à expressão de mGBP-2, e assim como a de GBP-1 também ocorreu independente da sua atividade GTPase (Carter *et al.*, 2005).

Recentemente foi demonstrada a indução de *gpb-2* dependente da ativação da proteína p53 em uma linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1 que expressa uma proteína p53 mutante e termossensível, apresentando a substituição de uma valina por metionina na posição 272 (p53^{V272M}) (Guimaraes *et al.*, 2004, submetido à publicação). Essa linhagem celular é considerada um modelo interessante para se explorar os aspectos funcionais da proteína p53 pois a uma temperatura permissiva de 32°C, a proteína p53^{V272M} readquire sua conformação selvagem e é capaz de ligar-se às seqüências específicas de DNA de seus genes-alvo.

Nesse estudo, a análise do perfil de expressão gênica realizada pela técnica de “macroarray” (Clontech,#7851-1) em TE-1 submetida às duas condições de temperaturas (32°C e 37°C, permissiva e não permissiva, respectivamente), permitiu verificar a indução ou inibição de um número variado de genes envolvidos na via de sinalização dos IFNs a 32°C, quando a proteína p53 está ativa, incluindo *gpb-2*. Posteriormente, a dependência da proteína p53 para a indução de *gpb-2* foi confirmada pelos ensaios de silenciamento por “RNA interference” de *TP53* nas células TE-1 a 32°C. Nesse

estudo, foi visto também pelos ensaios de co-imunoprecipitação que a 32°C houve um aumento do complexo formado pela proteína p53 e IRF-1, e que a indução de GBP-2 nessa linhagem poderia ocorrer pela possível cooperação entre esses dois fatores transcrição. A ativação de IRF-1 nas células TE-1 a 32°C somada a ausência de uma seqüência consenso de p53 na região promotora das GBPs e os demais resultados, indicaram que a dependência da proteína p53 na indução de GBP-2 ocorre provavelmente, de forma indireta via o fator de transcrição IRF-1.

1.5. TP53: Um importante gene supressor de tumor

1.5.1. Descrição do gene e da proteína

O *TP53* (NM_000546) encontra-se localizado no cromossomo 17 na posição 17p13.1 (Guimaraes e Hainaut, 2002). Este gene contém 11 éxons, com extensão de 20 kilobases dos quais o primeiro exon (213pb) localizado a 8-10Kb do segundo, não é codificante. A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53kDa (Hainaut e Hollstein, 2000) contendo três importantes regiões: a região N-terminal consistuída de um domínio de transativação e um domínio SH3 (“Src-homology 3-like”); um domínio central onde se liga ao DNA; e a região C-terminal, com um domínio regulatório e um domínio de tetramerização (**Figura 4**).

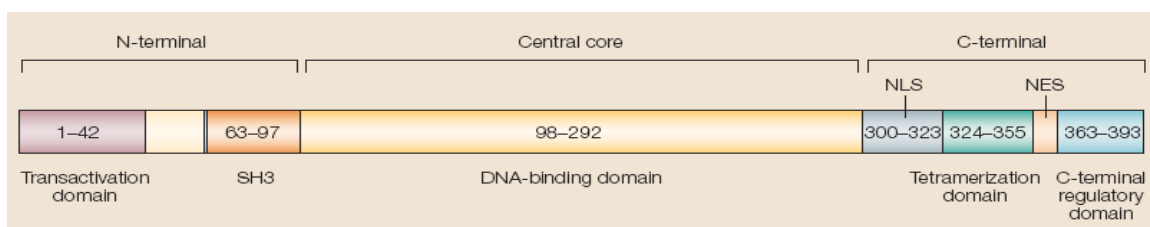


Figura 4: Os três domínios funcionais da proteína p53 humana. (Retirado de Bode e Dong, 2004).

A primeira região é necessária para atividade de transativação e interação com vários fatores de transcrição, acetiltransferases e MDM2 ubiquitina ligase; a segunda é o domínio responsável pela ligação às sequências consenso específicas do DNA (5-RRRC (A/T)(T/A)GYYY-#, onde R é uma purina e Y é uma pirimidina (**Figura 5**); a região C-terminal é a que contém os sinais de localização nuclear e de transporte. O domínio central é responsável pela sua atuação como fator de transcrição, controlando de forma positiva ou negativa a expressão de diversos genes-alvo (*p21waf1/cip1*, *bax*, *mdm-2*, *puma*, *noxa*, etc.) (Hainaut e Hollstein, 2000). As proteínas codificadas por esses genes são responsáveis pelas principais funções atribuídas a proteína p53 tais como a indução da parada do ciclo celular, a indução da apoptose, e da diferenciação celular.

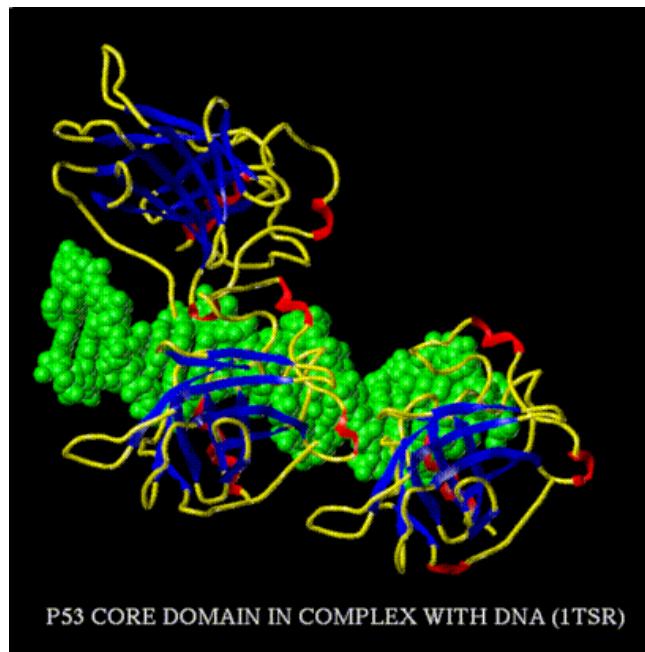


Figura 5: Proteína p53 (“core domain”) ligada ao DNA (Retirado de <http://qibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/image/dna-protein/finger/finger.html>).

A proteína p53 faz parte de uma família de fatores de transcrição, onde dois outros membros já foram descritos, *TP63* e *TP73*. Apesar da grande homologia estrutural, as proteínas p53, p63 e p73 possuem diferenças funcionais (Levrero *et al.*, 2000). Diferente de p53, a proteína p73 raramente encontra-se mutada em neoplasias e seu papel na tumorigênese humana ainda é motivo de controvérsias. *TP63* não é um gene supressor tumoral clássico e sua proteína é essencial para a manutenção de células precursoras em vários tecidos epiteliais (Nylander *et al.*, 2002; Signoretti *et al.*, 2000). A função biológica como supressor de tumor clássico foi relacionada ao gene *TP53* que, quando ausente em camundongos, permite o aparecimento de tumores espontâneos (Donehower *et al.*, 1992). Apesar de importante para o controle do crescimento celular nesses camundongos, esse estudo demonstra que a p53 não é essencialmente necessária para o desenvolvimento embrionário.

1.5.2. Regulação e função

A proteína p53 é expressa em níveis reduzidos com meia vida curta de 30 minutos e rapidamente degradada através da ubiquitinação mediada pela via proteassoma 26S. MDM-2 funciona como regulador negativo de p53 agindo como uma E3 ubiquitina ligase (Oren *et al.*, 2002) e seu gene *mdm-2* é um alvo transcricional de p53, mantendo assim um sistema de “feedback” negativo entre as proteína p53 e MDM2 (Flores e Sobrevia, 2000). Diversos sinais podem levar a desrepressão da proteína e seu acúmulo, ocasionados principalmente pelas modificações pós-transducionais (Meek, 1994; Bode e Dong, 2004). Esses sinais podem incluir estresses de origem genotóxica, causado por lesões provenientes de erros durante a replicação do DNA ou da exposição a agentes danosos ao DNA como γ -irradiação, UV ou agentes quimioterápicos; de origem oncogênica causado pela ativação constitutiva de componentes da cascata de sinalização de crescimento levando a ativação principalmente de p14ARF, ou de origem não genotóxica decorrente da depleção de ribonucleotídeos ou hipóxia (Vogelstein *et al.*, 2000; Guimaraes e Hainaut, 2002) (**Figura 6**).

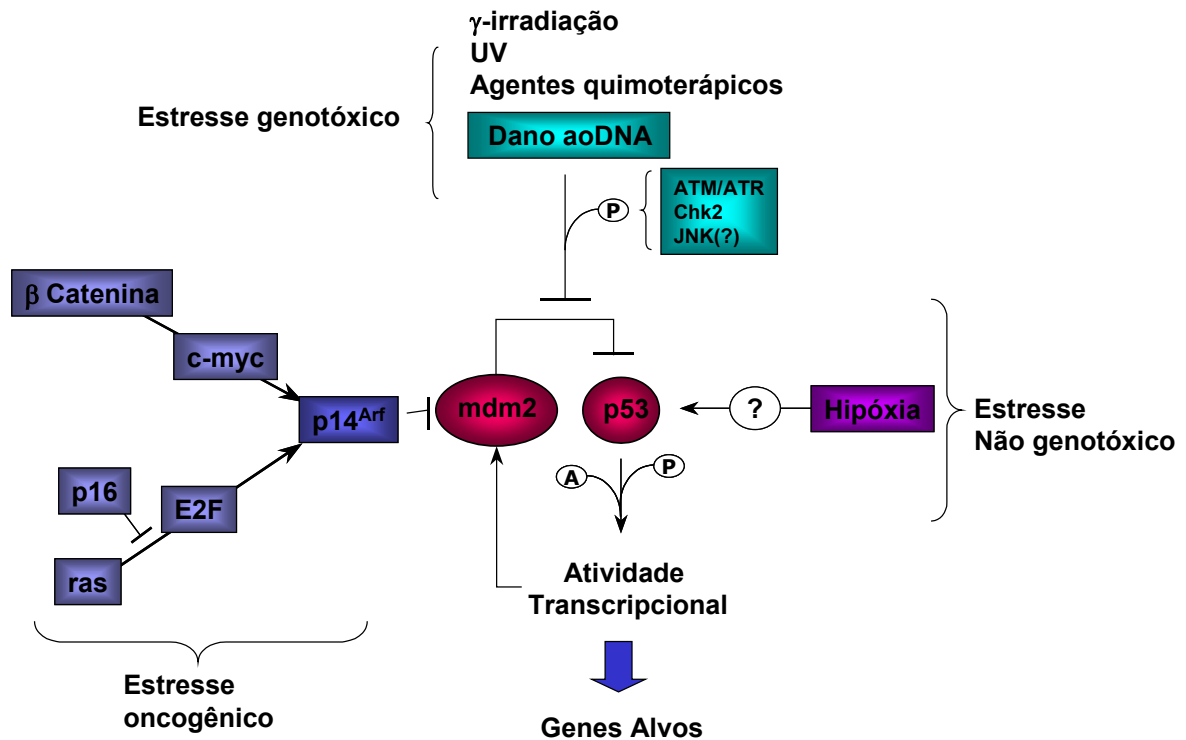


Figura 6: Sinais que permitem a ativação da proteína p53. A desrepressão do complexo da proteína p53-MDM2 ocorre por diferentes sinais, tendo como consequência o aumento da atividade transcricional da p53 (Adaptado de Guimarães, D.P., 2002).

A inativação da proteína p53 pode ocorrer por mutação no seu gene, ou pela ligação a oncoproteínas virais como de IE84 (Citomegalovírus), SV40-T (vírus SV40) (Kohli e Jorgensen, 1999), E6 (HPV) (Massimi *et al.*, 1999), EBNA-5 (EBV) (Khurshid *et al.*, 1998) e HBx (vírus da hepatite B) (Lin *et al.*, 2004). A sua inativação contribui para a perda de regulação da divisão celular, aumento da proliferação e instabilidade genômica. Normalmente as mutações no gene *TP53* são de sentido trocado, e frequentemente encontradas no domínio de ligação ao DNA, alterando a função normal de sua proteína. Algumas permitem o aumento da meia vida da proteína, que passa a ser acumulada no núcleo das células, observado nas análises de muitos tecidos tumorais (Guimaraes e Hainaut, 2002).

1.5.3. p53 e sua participação em respostas induzidas após o dano ao DNA

As células que recebem um estímulo para se dividir param nos “checkpoints” para verificar os erros durante a replicação do DNA e impedir o prosseguimento incorreto do ciclo celular. Quebras nas duplas fitas do DNA ocorrem durante todo o processo de divisão celular e são altamente tóxicas para célula porém estão freqüentemente sendo reparadas por diferentes vias. Alguns estímulos podem ser responsáveis pela indução de quebras no DNA como agentes genotóxicos, irradiação UV ou γ -irradiação. Os defeitos em mecanismos de reparo do DNA levam às alterações genéticas como deleções, mutações, inserções, causando grande instabilidade cromossômica que é freqüentemente encontrada durante o processo da carcinogênese (Janus *et al.*, 1999).

Após o dano ao DNA algumas quinases podem ser ativadas e responsáveis pela fosforilação da proteína p53, como a ATM (Jongmans *et al.*, 1996), dsDNA-PK (“double stranded DNA-activated protein kinase”), CDK1 (p34/CDC2), caseína quinase I e II e a Jun N-terminal quinase (JNK) (Miyakoda *et al.*, 2002). A proteína p53 pode ser fosforilada *in vivo* em múltiplos resíduos de serina e treonina sendo os resíduos 15,18 e 20, os principais alvos de sua fosforilação (Guimaraes e Hainaut, 2002; Hainaut e Hollstein, 2000). Uma vez fosforilada p53 se acumula e irá atuar em diferentes processos como a regulação do ciclo celular e indução da apoptose, além de participar dos mecanismos de reparo do DNA (Tanaka *et al.*, 2000).

A participação de p53 na parada do ciclo celular após o dano ao DNA se dá principalmente pela indução de *p21waf1/cip1* (Waldman *et al.*, 1995) que conhecidamente está envolvido na parada em G1/S. O papel da p53 ativada na parada do ciclo celular em G2/M pode ocorrer através da indução de 14-3-3 σ e conseqüente inibição da defosforilação do complexo CiclinaB/CDK1 por dois mecanismos (Hermeking *et al.*, 1997). No primeiro 14-3-3 σ passa interagir com as quinases CHK1/CHK2 e transporta-as do núcleo para o citosol, impedindo a ativação de CDC25C, responsável pela defosforilação de ciclina B/CDK1; e no

segundo, 14-3-3 σ se liga diretamente a CDK1 e transloca a mesma ativamente para o citosol (Wang *et al.*, 1999).

A ativação da p53 após o dano ao DNA resulta também na indução da apoptose, que ocorre através da transativação de genes como *puma*, *noxa*, *bax*, *fas/cd95* ou regulação de DR5 (Hickman *et al.*, 2002).

A inativação de genes envolvidos na resposta ao dano ao DNA está relacionado à predisposição a vários tipos de câncer e/ou desordens genéticas. Dentre os genes afetados *TP53* é o melhor conhecido e encontra-se inativado em 50% de todos os tumores humanos (Hollstein *et al.*, 1991).

1.6. Cooperação entre a via dos IFNs e a via supressora de tumor de p53

A indução transcricional do gene *TP53* por IFN α e IFN β , durante a resposta viral, foi recentemente demonstrada por Takaoka *et al* e ocorreu através da ligação do complexo heterotrimérico ISGF3 na sequência ISRE da região promotora de *TP53*. Apesar da indução de p53 não ter sido tão forte quanto as dos genes induzidos por IFNs, como *2'-5' oligoadenilatosintetase (oas)*, este estudo sugere a participação da p53 na defesa antiviral do hospedeiro pela cooperação entre IFN α/β e p53 (Takaoka *et al.*, 2003).

Outro estudo que demonstrou a cooperação entre a via dos IFNs e p53, foi o de Tanaka *et al* (Tanaka *et al.*, 1996), onde após o dano ao DNA, a indução de *p21waf1/cip1* foi dependente tanto de p53 como de IRF-1. Esses achados foram posteriormente confirmados pelo ensaio de atividade com luciferase, em células de carcinoma colorretal HCT116 (p53 $^{-/-}$), quando co-transfectadas com cDNA de p53 e IRF-1 (Pamment *et al.*, 2002).

Um terceiro trabalho, já citado anteriormente, realizado por Guimarães *et al*, corroborou a existência da cooperação entre a via dos IFNs e a proteína p53 através da indução de *gbp-2* dependente de p53 e foi a base para os estudos desenvolvidos nessa tese.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

A proteína p53 assim como o fator de transcrição regulado pelos IFNs, IRF-1, são fundamentais para a regulação da proliferação celular após diferentes estímulos. Durante o processo da carcinogênese os genes que codificam proteínas que atuam na regulação do ciclo celular e da apoptose são alvos importantes de alterações genéticas. Dessa forma, a identificação de genes-alvo ou de novas vias de sinalização celular que possam interagir e ser ativadas pela proteína supressora de tumor p53 seria fundamental, não apenas para o entendimento do seu complexo mecanismo de inibição do crescimento celular tumoral, mas também para a eventual descoberta de novos alvos moleculares para tratamentos antitumorais e de novos marcadores de fatores prognósticos.

A indução de *gbp-2* pela proteína p53 ativada demonstrada por Guimarães *et al* (Guimaraes *et al.*, 2004, submetido à publicação), foi a base para postularmos a hipótese de interação entre a proteína p53 e a via dos IFNs no sentido de uma eventual existência da indução do gene *gbp-2* por outros estímulos que não apenas os capazes de ativar a via dos IFNs.

Nesse contexto, os principais objetivos desse trabalho são:

- ❖ Investigar a eventual indução de *gbp-2* após o dano genotóxico;
- ❖ Investigar a participação das proteínas IRF-1 e p53 na eventual indução de *gbp-2* após o dano genotóxico;
- ❖ Correlacionar a eventual indução de *gbp-2* com as respostas celulares de apoptose e de parada do ciclo celular;

III- MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Cultura de células

Foi utilizada nessa tese a linhagem celular tumoral de adenocarcinoma de esôfago TE-7, cedida pelo Dr. Pierre Hainaut (IARC, França) caracterizada anteriormente por não expressar níveis detectáveis da proteína p53 devido à provável alteração transcricional (Barnas *et al.*, 1997). Essa linhagem foi mantida em cultura a 37°C em meio RPMI 1640 c/ L-Glutamina, 25mm HEPES (SIGMA - Bio Sciences) suplementado com soro fetal bovino (Gibco, Prailey, UK) a 10%, termo-inativado, penicilina a 50u/ml e estreptomicina a 50 µg/ml (GibcoBRL, Prailey, UK), em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Além desta, outras duas linhagens foram utilizadas: MCF-7 (ATCC, HTB-22) e HCT116 (ATCC, CCL-247) ambas expressando p53 selvagem. A linhagem celular MCF-7 é uma linhagem de adenocarcinoma de mama e foi cedida pelo Dr. Carlos Gil Ferreira (INCA) e a linhagem celular HCT116 é uma linhagem de carcinoma colorretal e foi cedida pelo Dr. Bruno Lourenço Dias (INCA). Ambas foram mantidas em cultura a 37°C em meio DMEM (Dulbeco's modified Eagle's medium - Gibco BRL, Life technology, Breda, The Netherlands) suplementado com soro fetal bovino (Gibco, Prailey, UK) a 10%, termo-inativado, penicilina a 50u/ml e estreptomicina a 50 ug/ml (GibcoBRL, Prailey, UK), em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As linhagens celulares foram freqüentemente monitoradas quanto a presença de Micoplasma, seguindo o protocolo do Kit "VenorGeM® Mycoplasma Detection" (Sigma-Aldrich Co).

III.2. Drogas

As drogas quimioterápicas usadas para indução do dano ao DNA foram doxorubicina (Europharma, Sverige AB, Lote 48375B) e o etoposide (Blausiegel Ind.e Com.Ltda, Lote IETE01404). Ambas as drogas quimioterápicas foram cedidas, gentilmente, pelo Serviço de Quimioterapia do Instituto Nacional de

Câncer (INCA) nas concentrações de 2,5mg/ml e 20mg/ml, respectivamente. As soluções-estoque foram preparadas, sempre protegidas da luz, nas concentrações de 200 μ M para doxorubicina e 2mM para etoposide, através da diluição das mesmas em solução salina (PBS) e o armazenamento feito a – 20°C até a utilização nos experimentos, não excedendo 3 meses.

A doxorubicina (DOXO) e o etoposide (VP16) são potentes agentes antineoplásicos sendo a primeira utilizada com frequência no tratamento de tumores sólidos, como câncer de mama e câncer esôfago-gástrico, e a segunda utilizada no tratamento de câncer de pulmão, estômago e endométrio (Glisson and Ross, 1987). Esses agentes são da classe das antraciclinas e epipodofilotoxinas e são conhecidas por formarem ligações intermediárias covalentes entre o DNA e a topoisomerase II α , impedindo a religação de DNA clivado e enovelamento correto e conseqüentes quebras na dupla fita do DNA.

A droga imunomodulatória Interferon alfa (Sintética SA, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 5000U/ μ l foi cedida pelo Dr. Carlos Gil, e ressuspensa em diluente próprio protegida da luz e armazenada à 4°C por no máximo um mês.

III.3. Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando o MTT[3-([4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide] Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Para cada experimento de citotoxicidade, concentrações decrescentes das drogas quimioterápicas foram preparadas e diluídas a partir de uma solução-estoque, variando entre 100mM a 10pM para doxorubicina, e de 1mM a 100pM para etoposide. Após contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, utilizando azul de Tripán (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) uma suspensão, de 10.000 células/100 μ l de meio por cada poço foi mantida em cultura na placa ELISA de 96 poços. Após 24 horas, as drogas foram adicionadas em cada poço em 8 diferentes concentrações e mantidas em cultura por 72 horas. Após esse período, 20 μ l de uma solução de 5mg/ml de MTT foi adicionado a cada poço e incubado por 4 horas a 37°C, protegida da luz. As placas foram então, centrifugadas a

1200rpm, por 5 min a 4°C e o meio cuidadosamente descartado. Em seguida, os cristais de formazan, produtos do metabolismo celular do MTT por células viáveis, foram dissolvidos em 100µl de DMSO [dimethylsulfoxide] (ACROS Organics, Geel, Belgium) para leitura imediata e a absorbância lida no comprimento de onda de 538nm, utilizando o Spectra Max (SOFTmax PRO-Life Sciences). Os valores da absorbância foram expressos em percentual das médias em relação ao controle não-tratado. A inibição de 50% (IC50) e 80% (IC80) do crescimento celular foi calculada pelo programa Origin 4.1. Os valores de IC50 e IC80 representam a média de 3 experimentos (Ferreira *et al.*, 2000; Tolis *et al.*, 1999).

III.4. Preparação dos extratos celulares

As células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 75cm² em um número correspondente a 30% de confluência. Após 24 horas, as linhagens foram expostas às concentrações referentes ao IC₈₀ de Doxorrubicina, ou à concentração de 1000U/ml de IFN α por diferentes intervalos de tempo (3, 6 e 24hs) ou à γ -irradiação (5Gy) nos intervalos de 30 min, 1, 2 e 3 horas. As células foram coletadas após tripsinização e os “pellets” celulares foram utilizados tanto para extração de RNA quanto para extração de proteínas.

III.5. Extração de proteínas

A extração de proteínas totais foi obtida a partir da lise celular com solução de tampão EMSA B (EDTA 0,2mM, HEPES 20mM, NaCl 10mM, DTT1mM, MgCl₂ 1,5mM, Triton 0,1%, Glicerol 20%) contendo 15% de concentração de um coquetel de inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche). A cada “pellet” celular foram adicionados 50 µl de tampão EMSA Buffer B, homogeneizado, incubado por 30 minutos e centrifugado por 15 minutos a 13000rpm a 4°C. O sobrenadante, contendo o extrato protéico foi recuperado e armazenado a -80°C (North *et al.*, 2002).

III.6. Quantificação de proteínas

Para determinar as concentrações de proteínas em cada extrato celular, foi utilizado o método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Bio-Rad Laboratories) seguindo as instruções do fabricante. A leitura colorimétrica das amostras, foi realizada em placas de ELISA no comprimento de onda de 595nm no SPECTRAmax Microplate Spectrophotometer (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Os valores da absorbância foram calculados pelo programa SOFTmax PRO (Life Sciences), tendo como parâmetro os valores de absorbância contidos em uma curva padrão construída com BSA a 0,01%, em uma faixa de concentração que variava de 0,5µg à 10µg. A concentração protéica, dada em µg/µl foi obtida a partir da média das absorbâncias das amostras em duplicata.

III.7. Extração de RNA total

Para a extração de RNA, os “pellets” celulares foram imediatamente ressuspensos e homogeneizados em 1ml do reagente Trizol (Gibco-BRL, Grand Island, NY) mantendo a integridade do RNA. A extração seguiu-se da adição de 200µl de clorofórmio e centrifugação a 13000 rpm a 4°C, permitindo o isolamento da fase aquosa contendo RNA o qual foi precipitado e lavado com isopropanol e etanol a 75%, respectivamente. O “pellet” de RNA foi ressuspenso em 20µl de água tratada com DEPC (“Diethyl pyrocarbonate”) livre da atividade de RNases, e armazenado a -80°C. A quantificação de RNA foi determinada pela leitura de absorbância (λ 260) no espectrofotômetro (DU 640, Beckman Instruments) e a concentração de RNA obtida em µg/µl.

III.8. RT-PCR duplex

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foram utilizados 4 μ g de RNA total. A reação foi catalisada pela enzima transcriptase reversa “SuperScript TM II reverse transcriptase” (Invitrogen, USA) utilizando-se como “primer” o oligo (dT) na concentração de 0,5 μ g por reação (Promega Corporation).

Após a síntese, o cDNA foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase duplex (PCR-duplex) utilizando dois pares de oligonucleotídeos projetados à partir das sequências gênicas disponibilizadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) (Tabela II). Foi realizado a amplificação de mais de um gene por reação para corrigir qualquer variação presente na quantidade de cDNA entre as amostras, utilizando como controle interno a amplificação do gene constitutivo *gapdh* (Thellin *et al.*, 1999). Em cada reação foram utilizados 2.5U da Taq DNA polimerase, 1X o tampão da enzima Taq DNA polimerase, 200 μ M de dNTPs (Invitrogen, USA), 2,0 μ M de MgCl₂ e 0,1-0,8 μ M de oligonucleotídeos. Os programas do RT-PCR duplex foram realizados no termociclador PTC-100 (MJ. Research, Alameda, CA, EUA) iniciando-se com a desnaturação das amostras a 94°C por 3 minutos, seguida de 30-35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°-58°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 30 segundos. Os produtos do RT-PCR duplex foram separados e visualizados pela eletroforese em um gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10mg/ml). Os tamanhos dos fragmentos amplificados obtidos foram de 457pb (*gapdh*), 353pb (*gbp-2*), 184pb (*irf-1*) e 174pb (*p21waf1/cip1*). A otimização da RT-PCR duplex objetivou a amplificação gênica ainda na fase exponencial da reação e foi obtida pela variação no número de ciclos, na temperatura de anelamento e na relação entre as concentrações dos oligonucleotídeos utilizados em cada reação (Tabela III).

Tabela II – Sequências dos oligonucleotídeos para amplificação gênica.

Gene (“Accession Number”)	Sequências senso e anti-senso
<i>p21waf1/cip1</i> (NM_00389)	5' ccctaggctgtgctcacttc3' 5' ggaaaggggggtgaatttc3' .
<i>irf-1</i> (NM_002198)	5' agctcagctgtgcgagtgtga3' 5' tagctgctgtggatcatcagg3'
<i>gbp-2</i> (NM_004120)	5' gctattgcccactatgaaca3' 5' tccttggcacctggtag3'
<i>gapdh</i> (NM_002046)	5' tctcatggttcacacccatgacgaacatg3' 5' aagaagatgcggctgactgtcgagccacat3'

Tabela III – Condições padronizadas para RT-PCR duplex.

Gene	Ciclos	Temperatura de anelamento	*Oligo senso	*Oligo anti-senso	Oligo <i>gapdh</i> senso	Oligo <i>gapdh</i> anti-senso
<i>p21waf1/cip1</i>	35	55°C	0,8µM	0,8µM	0,2µM	0,2µM
<i>gbp-2</i>	30	58°C	0,8µM	0,8µM	0,1µM	0,1µM
<i>irf-1</i>	30	58°C	0,8µM	0,8µM	0,2µM	0,2µM

*oligonucleotídeo referente ao gene analisado por RT-PCR duplex.

III.9. Imunodeteção de proteínas (“Western Blot”)

Quantidades de 25 a 40µg de proteínas totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 8-12% e transferidas para membranas de PVDF (difluoreto de polivinilideno) (Roche, Mannheim, Germany). Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 hora em solução salina de PBS 1X suplementada com leite desnatado desidratado a 5% e Triton-X a 0,05%. Para a imunodeteção, diferentes anticorpos relacionados à via de sinalização dos interferons (IFNs) e à via de sinalização da proteína p53 foram utilizados: anti-p53 em uma diluição de 1:3000

(DO7, DAKO Cytomation), anti-p21WAF1/CIP1 em diluição 1:250 (C-19, Santa Cruz, Biotechnology), anti-IRF-1 em diluição 1:250 (C-20, Santa Cruz, Biotechnology), anti-GBP-2 em diluição 1:200 (N-17, Santa Cruz, Biotechnology) e anti-actina em diluição 1:500 (C-2, Santa Cruz, Biotechnology). Após 1 h de incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com PBS-T (10mM Tris-HCL pH 8.0; 0.15 M NaCl; 0.1% Triton-X), e em seguida incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase (anti-rabbit/ HRP-P0448, anti-goat/ HRP-P0449 e anti-mouse/ HRP-P0447, DAKO Cytomation). A detecção da expressão protéica foi realizada pela reação com reagente ECL ou ECL Plus (ECL Western Blotting detection reagents – Amersham Biosciences), seguida da exposição da membrana a um filme auto-radiográfico (Kodak - Hyperfilm™) e revelação na processadora Kodak X-OMAT 2000. O reagente ECL Plus foi utilizado para detecção da expressão apenas da proteína GBP-2 com o objetivo de maior sensibilidade devido a expressão reduzida dessa proteína quando comparada com as demais analisadas. A equivalência das quantidades de proteína depositadas de cada amostra foi analisada usando a expressão de actina como controle.

III.10. Citometria de fluxo: quantificação de morte celular e análise do ciclo celular

As linhagens celulares foram expostas ao tratamento com Interferon α , ou γ -irradiação ou doxorrubicina por 48 horas e em seguida preparadas para as análises por citometria de fluxo. Após os respectivos tratamentos as células foram coletadas por tripsinização, centrifugadas à 1200 rpm por 5 minutos e o “pellet” celular lavado em solução salina tamponada de fosfato (PBS) a 4°C. A contagem celular foi realizada por meio de leitura microscópica em câmera de Neubauer (Brand) e pela metodologia de exclusão com azul de Tripán (“Trypan Blue” - Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, T-6146). A partir de cada “pellet” celular foram separadas 1×10^6 células para marcação com iodeto de propídeo (PI) contido em tampão (0,1% citrato de sódio 1%, 5mg de iodeto de propídeo (PI), 1mg/ml RNase e 0,1% TritonX-100, PBS1X) (Nicoletti *et al.*, 1991) ou 5×10^5

células para marcação dupla com Anexina-V conjugada a FITC (Fluoresceína-Immunotech, Marseille, France) e 7AAD (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA).

A aquisição dos dados foi feita pela contagem de 5000 eventos celulares pelo FACScalibur e a análise feita através do programa CELLQuest (Becton Dickinson, MountView, CA). As diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas a partir da correlação entre o número de células em cada fase e seu conteúdo de DNA e a morte celular a partir do DNA hipodiploide marcado com PI contido na fase sub-G1 (Tolis *et al.*, 1999). O percentual de células em apoptose e a distribuição nas fases do ciclo celular foram calculados a partir da relação entre células tratadas e não tratadas.

III.11. Microscopia eletrônica

Para a observação de corpos apoptóticos pela microscopia eletrônica foram utilizados cortes ultrafinos das células expostas aos diferentes tratamentos. As amostras foram removidas e separadas da garrafa de cultura pela tripisinização, lavadas com PBS 1X por três vezes consecutivas e centrifugadas a 1200 rpm, em temperatura ambiente. Em seguida foram pré-fixadas em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 1%, 2mM de CaCl₂ e sacarose 8% em tampão cacodilato 0,1M pH7,2) por 15 minutos a temperatura ambiente. A lavagem das células pré-fixadas foi feita em solução de Karnovsky com PBS 1X três vezes consecutivas, centrifugando em seguida a 1200 rpm por 5 minutos. Para pós-fixação foi utilizado OsO₄ a 2% e ferrocianeto de potássio a 1,6%, na proporção 1:1 e incubados por 5 minutos sempre protegidos da luz. Decorrido esse tempo as células foram lavadas e fixadas com PBS1X por mais três vezes, centrifugando por 5 minutos a 1200 rpm. Após retirada do sobrenadante, os “pellets” celulares foram cortados e desidratados por incubações consecutivas por 10 minutos em acetona 30, 50, 70, 90% e 100% seguidas de centrifugações a 3000 rpm exceto em 90 e 100% de acetona, onde a centrifugação chegou a 13000 rpm. Após a desidratação a inclusão foi feita gradativamente pela incubação dos pellets em resina EPON (Eletron Microscopy Sciences, Washingt,

USA, Pennsylvania, 19034, Embedding kit), primeiro com acetona super-seca 100% por 12 horas e depois com EPON puro por 8 horas. A polimerização dos “pellets” em resina decorreu da incubação por 72 horas na estufa a 60°C e foi seguida de cortes ultra-finos de 50 a 100nm em ultramicrótomo (Reicher Ultracut E) com navalha de diamante (Drukker, The Netherlands). Estes foram colocados em telinhas de microscopia eletrônica, constando as secções em acetato de uranila 3% por 15 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos. As telinhas foram lavadas através da imersão (20 vezes) em água destilada, repetindo-se o procedimento por três vezes. Os cortes foram examinados no Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 900) na Divisão de Biologia Celular (INCA).

IV.RESULTADOS

IV.RESULTADOS

IV.1. Ativação da via dos interferons nas linhagens MCF-7 e TE-7

Com o objetivo de avaliar a integridade da via dos IFNs nas linhagens estudadas, as culturas de MCF-7 e TE-7 foram expostas à 1000U de IFN α , e em seguida, a indução de dois genes regulados pelos IFNs e de interesse no nosso estudo, *irf-1* e *gbp-2* foi avaliada por RT-PCR duplex. Tanto a indução transcricional dos genes *irf-1* e *gbp-2* quanto o aumento da expressão de suas respectivas proteínas foram observados em ambas as linhagens (Figura 7A e 7B). Esses resultados indicaram que a via dos IFNs nessas linhagens é funcional e capaz de induzir a transcrição dos ISGs.

Em seguida, foram realizadas por citometria de fluxo, a quantificação de morte e análise do ciclo celular para determinar a resposta celular após ativação da via dos IFNs. Quando comparadas com o controle, não foram observadas indução de apoptose (Figura 8) ou de parada do ciclo celular (Figuras 9 e 10) nas duas linhagens celulares expostas ao tratamento com IFN α . Deve-se ressaltar que embora a via que leva a indução de *irf-1* e *gbp-2* pelos IFNs nessas linhagens esteja íntegra, os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstraram que não houve modificação no número relativo das subpopulações nas diferentes fases do ciclo celular após o tratamento isolado com 1000U/ml de IFN α no período de 48 horas, sugerindo a possível ausência de uma resposta anitiproliferativa nas linhagens estudadas.

Uma vez caracterizada a integridade da via que leva a indução de *irf-1* e *gbp-2* pelos IFNs nessas linhagens celulares, os próximos experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a indução dos mesmos genes após um estímulo genotóxico.

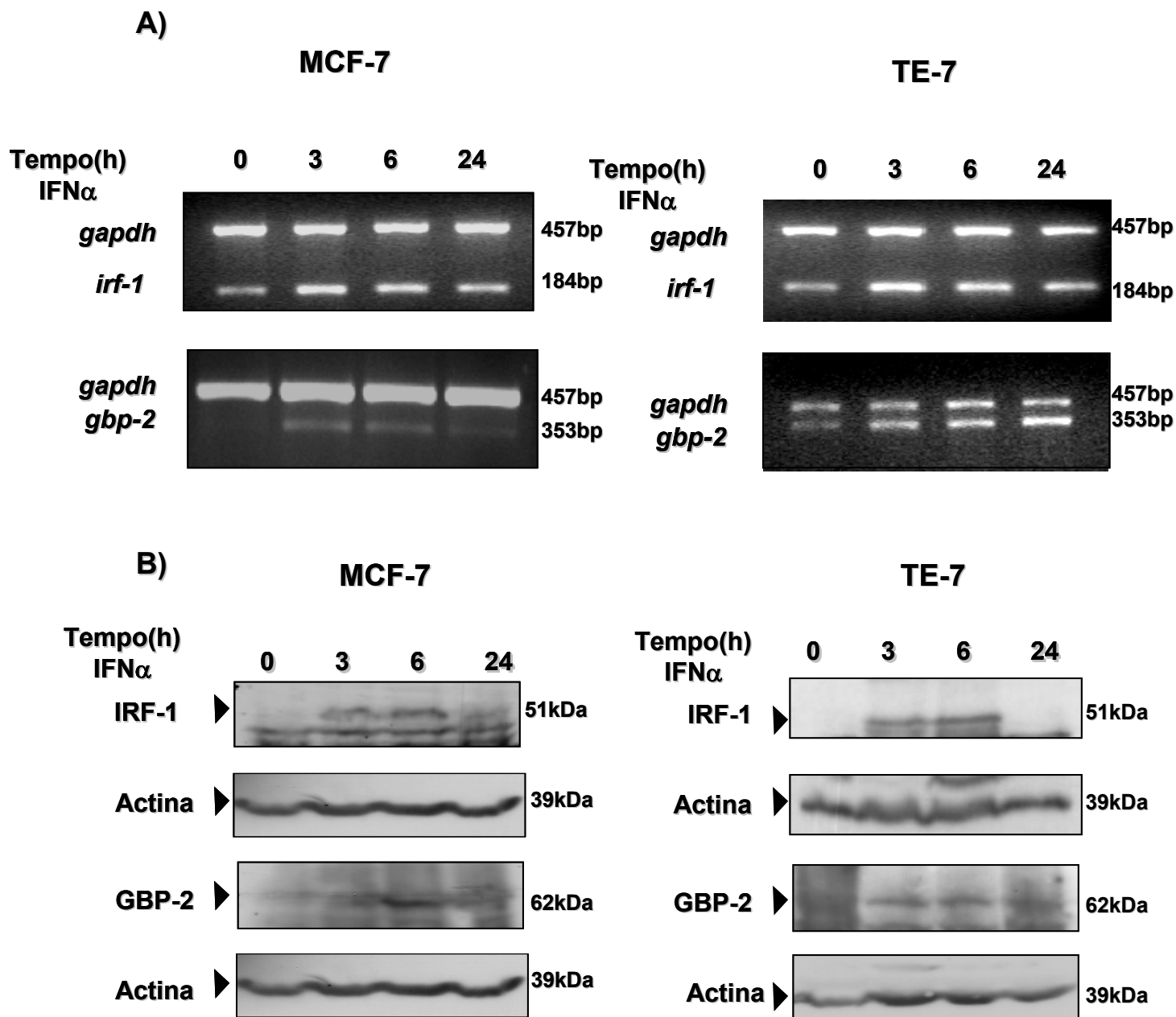


Figura 7: Ativação da via dos IFNs nas linhagens MCF-7 e TE-7 após exposição ao IFN α por diferentes intervalos de tempo. (A) Análise de expressão gênica por RT-PCR duplex dos genes *irf-1* (184pb) e *gbp-2* (353pb) utilizando como controle interno a expressão do gene *gapdh* (357pb). (B) Análise da expressão protéica por “Western Blot” de IRF-1 (51Kda) e de GBP-2 (62Kda) utilizando como controle a expressão da proteína Actina (39kda). Foram usadas 40 μ g de proteínas do extrato total, separadas em SDS-PAGE a 8% e as proteínas detectadas pelo reagente ECL (IRF-1) e ECL Plus (GBP-2). Resultados representativos da média de três experimentos independentes.

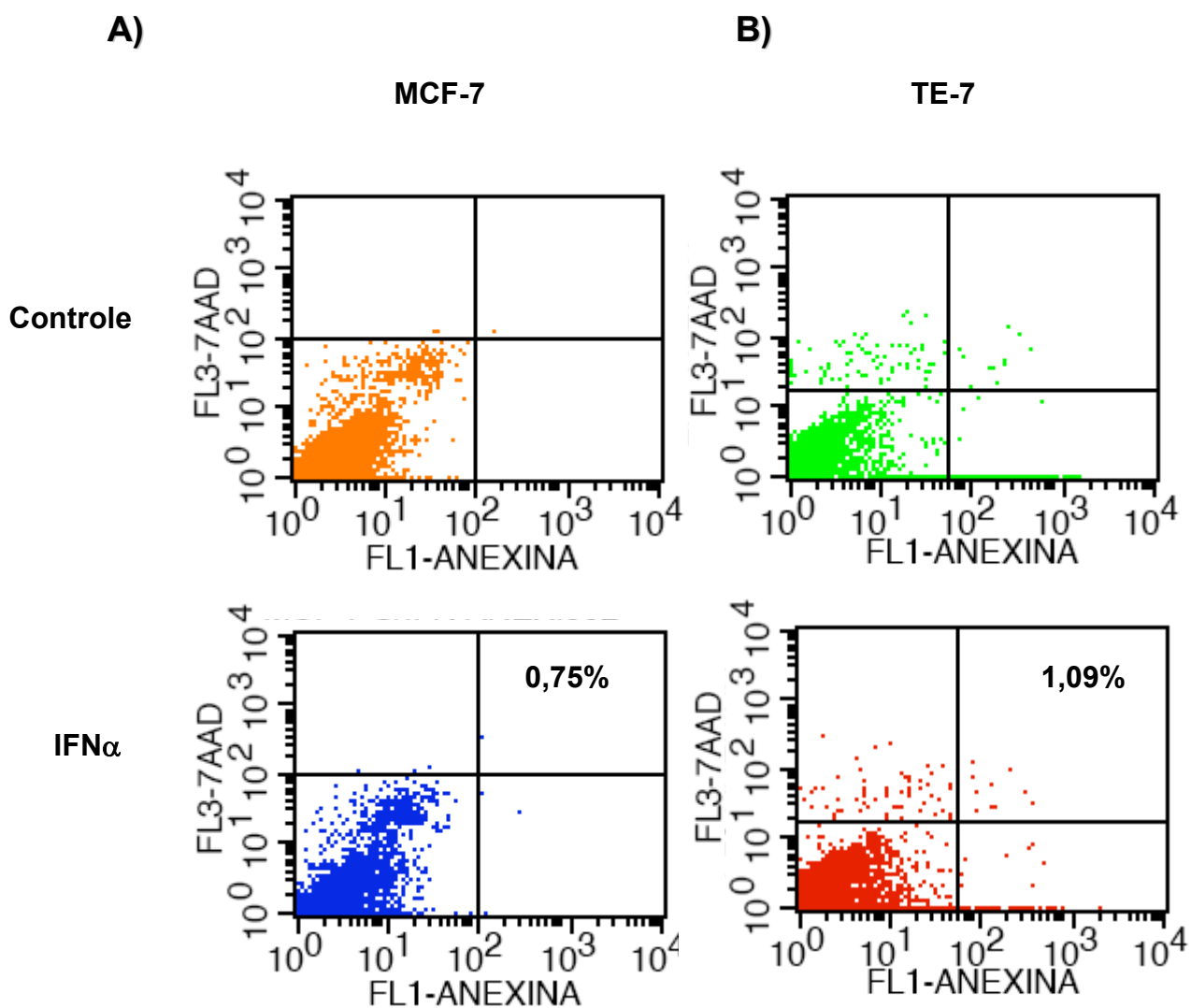
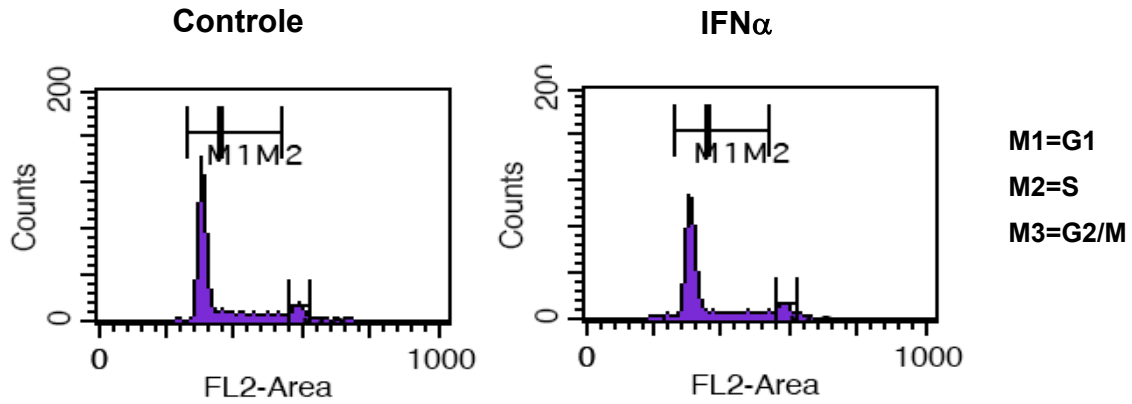


Figura 8: Quantificação de morte celular nas linhagens MCF-7 e TE-7 após a exposição ao IFN α . Células das linhagens MCF-7 (A) e TE-7 (B) foram expostas a 1000U/ml de IFN α por 48 horas e, em seguida marcadas duplamente com Anexina-V e 7AAD para análise de apoptose por citometria de fluxo. Os valores de 0,75% e 1,09% foram obtidos através da diferença dos valores referentes à quantificação de apoptose das células tratadas pelos valores de quantificação das células não-tratadas (controle) das linhagens MCF-7 e TE-7, respectivamente.

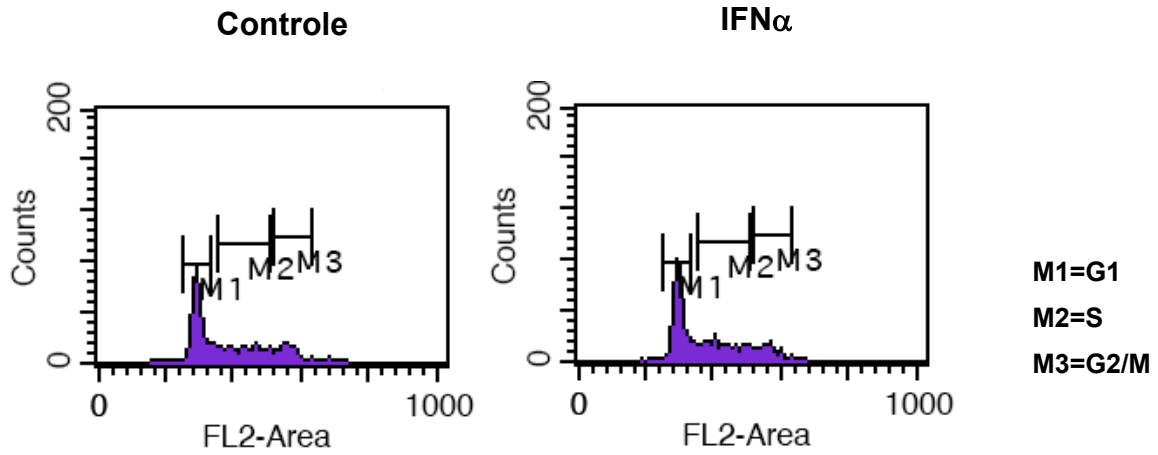
MCF-7



Fases do ciclo celular	% Controle	% tratadas (IFN α)
G1	66,60	69,92
S	10,83	10,26
G2/M	18,36	14,95

Figura 9: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 após a exposição ao IFN α . A análise de ciclo celular foi realizada em MCF-7 (A) após a marcação do conteúdo do DNA celular com iodeto de propídeo (PI). Os valores demonstrados na tabela referem-se ao percentual de células tratadas (IFN α) e não tratadas (controle) em cada uma das fases do ciclo celular.

TE-7



Fases do ciclo celular	% Controle	% tratadas (IFN α)
G1	48,22	50,01
S	14,16	12,89
G2/M	29,45	29,82

Figura 10: Análise do ciclo celular na linhagem TE-7 após a exposição ao IFN α . A análise de ciclo celular foi realizada TE-7 (A) após a marcação do conteúdo do DNA celular com iodeto de propídeo (PI). Os valores demonstrados na tabela referem-se ao percentual de células tratadas (IFN α) e não tratadas (controle) em cada uma das fases do ciclo celular.

IV.2. Sensibilidade das diferentes linhagens tumorais às drogas quimioterápicas

Para a utilização de uma concentração ideal e que pudesse ser comparada às doses clinicamente utilizadas das drogas quimioterápicas, doxorrubicina e etoposídeo, a sensibilidade às drogas das linhagens celulares foi avaliada através do ensaio de citotoxicidade (MTT). Foram então obtidos os valores necessários para a inibição de 50 e 80% do crescimento celular (IC₅₀ e IC₈₀) (Tabela IV e Figura 11).

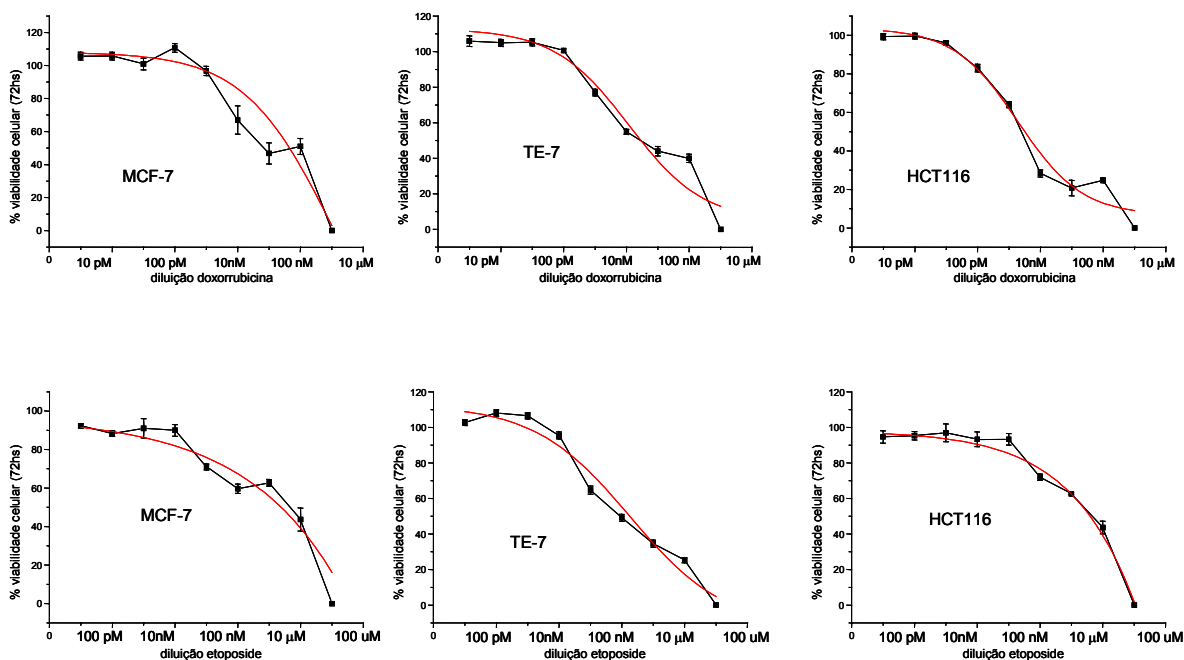


Figura 11: Resposta citotóxica às drogas quimioterápicas das linhagens tumorais. A sensibilidade das linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 expostas à doxorrubicina e ao etoposídeo por 72 horas, em intervalos de concentrações de 10pM-10uM e 100pM-100uM respectivamente, foram analisadas pelo ensaio de MTT. Os gráficos foram construídos, utilizando o programa estatístico Origin 4.1, a partir dos valores referentes ao percentual da média de absorvância das células tratadas em cada uma das concentrações, em relação à média de absorvância das células não-tratadas (controle). A partir de cada gráfico foram obtidos os valores de IC₅₀ e IC₈₀ para cada uma das drogas, representados na tabela. IV Os valores de IC₅₀ e IC₈₀ foram conseguidos a partir da média de três experimentos independentes com desvio padrão que não ultrapassou 24%.

Tabela IV: Resposta citotóxica às drogas quimioterápicas das linhagens tumorais

Linhagens tumorais	IC50 / IC80 (μM)	
	DOXO	VP16
MCF-7	0,05 / 0,16	0,80 / 1,26
TE-7	0,16 / 1,02	0,71 / 4,80
HCT116	0,24 / 0,59	5,18 / 80,83

Tabela V: Fator de resistência às drogas quimioterápicas das linhagens celulares

Drogas	Fator de resistência ¹		
	MCF-7	TE-7	HCT116
DOXO	1	3,20	4,80
VP16	1,12	1	7,29

¹ O fator de resistência foi calculado através da razão entre os valores de IC50 das linhagens mais resistentes e o das linhagens mais sensíveis. Os valores de IC50 das linhagens MCF-7 e TE-7 foram denominadores da razão em relação à doxorubicina e etoposide, respectivamente.

Comparando os valores de IC50, a linhagem celular de câncer de mama MCF-7 foi a que apresentou maior sensibilidade à droga quimioterápica doxorubicina (DOXO) com um IC50 de 0,05 μM , enquanto a linhagem de adenocarcinoma de esôfago TE-7 foi a mais sensível ao etoposide (VP16), apresentando a concentração do IC50 de 0,71 μM . Essas linhagens foram, por isso, utilizadas como parâmetro para determinar a resistência relativa entre as três linhagens tumorais (Tabela V). Em relação à Doxorubicina, a linhagem TE-7 foi 3,2 vezes mais resistente do que a MCF-7, enquanto a linhagem de carcinoma colorretal

HCT116 foi 4,8 vezes mais resistente. E, em relação ao etoposide, a linhagem MCF-7 foi 1,2 vezes, enquanto a HCT116 foi 7,3 vezes mais resistente do que a TE-7. Embora as linhagens celulares mostraram-se sensíveis às duas drogas quimioterápicas, houve uma maior sensibilidade a doxorrubicina do que ao etoposide e dessa forma, a indução do dano genotóxico foi realizado preferencialmente utilizando a droga doxorrubicina.

Após obter as concentrações de IC50 e IC80 da droga indutora de dano ao DNA para cada linhagem celular, foi avaliada a ativação molecular das duas vias celulares de interesse: a via dos IFNs e a via da proteína p53 após o estresse genotóxico.

IV.3. Indução do gene regulado pelos IFNs, *gpb-2*, nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 expostas ao estímulo genotóxico

Tendo reconhecido a viabilidade de indução de genes presentes na via dos IFNs em MCF-7 e em TE-7, buscou-se responder a principal pergunta do estudo: avaliar a eventual indução de *gpb-2* após o dano ao DNA. Para isso, foi analisada por RT-PCR duplex e “Western Blot” a indução tempo-dependente de GBP-2 nas linhagens expostas à doxorrubicina. O aumento da expressão gênica de *gpb-2* nos tempos de 3 e 6 horas foi observado, retornando ao seu nível basal no tempo de 24 horas após exposição ao tratamento das células MCF-7 (Figura 12A). A indução gênica foi acompanhada pelo aumento correspondente da expressão da proteína na mesma cinética temporal (Figura 12B). Em contraste, a indução de *gpb-2* ou o aumento da expressão de sua proteína GBP-2 não foram observadas nas células TE-7, a qual sabidamente, não expressa a proteína p53 (Figura 12C e D).

Com o objetivo de confirmar esses resultados em uma outra linhagem celular p53 selvagem, foi analisada também a indução de *gpb-2* nas células de carcinoma colorretal HCT116 expostas a doxorrubicina. Corroborando com os resultados obtidos na linhagem MCF-7, a indução transcricional de *gpb-2* foi vista e acompanhada do aumento da expressão de sua proteína GBP-2, porém predominando dessa vez, no tempo de 3 horas de exposição ao estímulo

genotóxico (Figura 12E e F). Uma vez confirmada a indução tempo-dependente de *gbp-2* após o dano genotóxico, foi investigado se, em MCF-7, ocorria também dose-dependente. Para isso foram utilizadas concentrações crescentes de doxorubicina, variando entre 0,16 μ M e 5,00 μ M. Tanto em nível de expressão gênica quanto em nível de expressão protéica houve um aumento progressivo de *gbp-2* a medida em que se aumentava a concentração da droga (Figura 13).

Esses resultados indicam que após um estímulo carcinogênico como o de dano ao DNA a indução de *GBP-2* pode ocorrer em linhagens p53 selvagem.

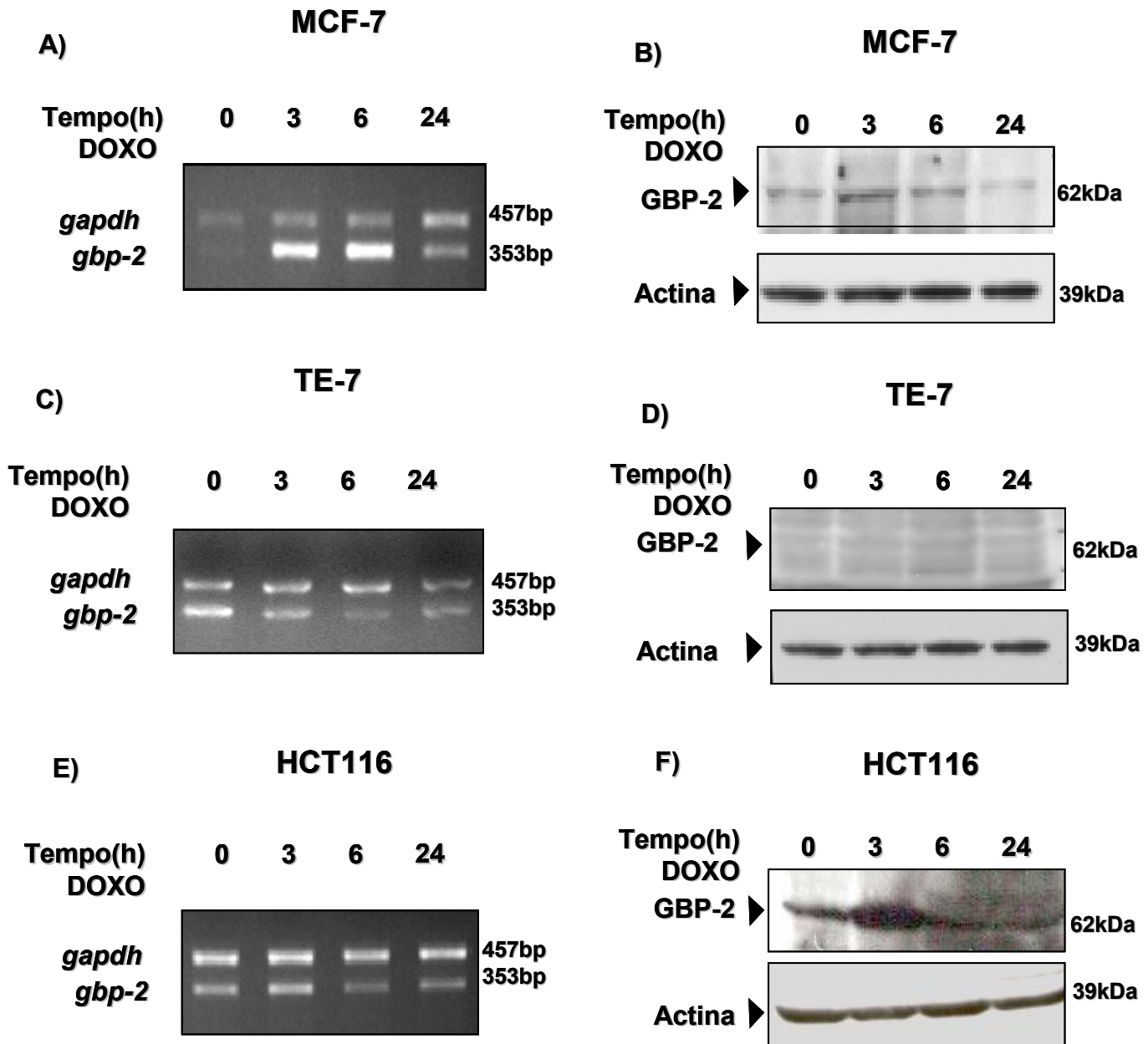


Figura 12: Indução de GBP-2 nas linhagens MCF-7 e HCT116 expostas ao dano genotóxico induzido pela doxorrubicina. Exposição por 24 horas de MCF-7, TE-7 e HCT116 a 0,16 μ M, 1,02 μ M e 0,59 μ M de doxorrubicina (DOXO), respectivamente. Análise de expressão gênica por RT-PCR duplex de *gbp-2* (353bp) utilizando como controle interno o gene *gapdh* (457bp) nas células MCF-7 (A), TE-7 (C) e HCT116 (D). A análise de expressão protéica de GBP-2 (62kDa) e de Actina (39kDa), como controle, foi realizada após a separação de 40 μ g de proteínas totais de MCF-7 (B), TE-7 (D) e HCT116 (F) pela corrida em SDS-PAGE a 10%. O reagente ECL Plus foi utilizado para a detecção das proteínas. Resultados representativos da média de três experimentos independentes.

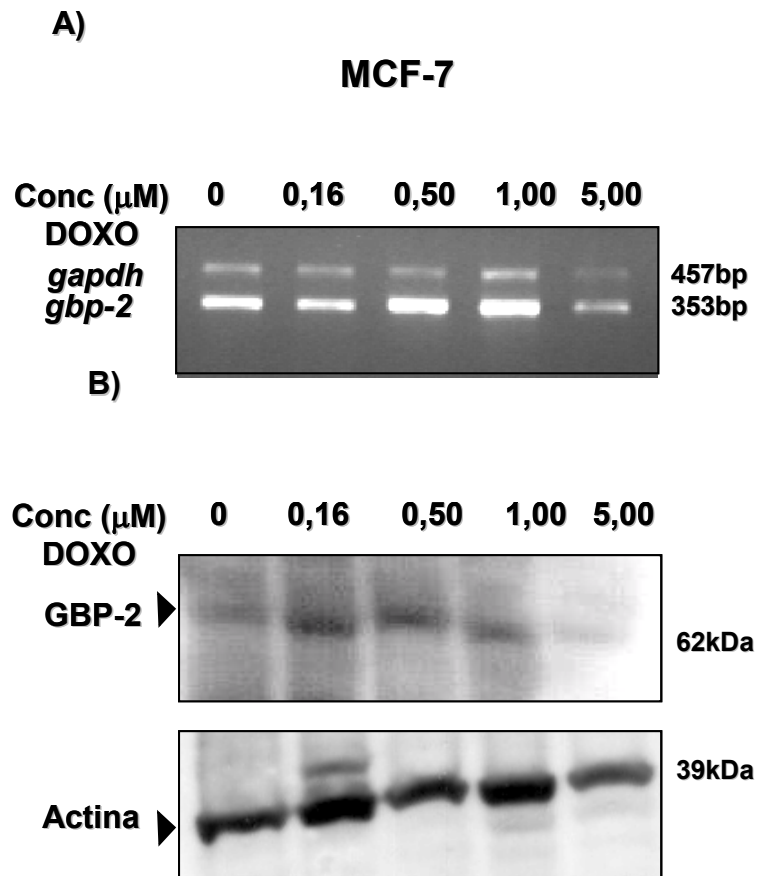


Figura 13: Indução de GBP-2 nas células em MCF-7 expostas a diferentes concentrações de doxorubicina. (A) Análise de expressão por RT-PCR duplex do gene *gbp-2* (353pb) utilizando a expressão gênica de *gapdh* (457bp) como controle interno nas células expostas à doxorubicina (0,16/ 0,50/ 1,00/ 5,00μM). (B) Análise da expressão da proteína de GBP-2 (62kDa), usando a expressão de actina (39kDa) como controle, após 24 horas de tratamento com as mesmas concentrações de doxorubicina utilizadas para análise de expressão gênica. Após a separação de 40μg de proteínas totais em SDS-PAGE a 10% foi realizado a detecção das proteínas com ECL Plus e ECL, respectivamente.

IV.4. Indução do fator de transcrição da via dos IFNs após o dano ao DNA

A participação do fator de transcrição IRF-1 na indução de *gbp-2* na via de sinalização dos IFNs é bem estabelecida. Dessa forma, foi investigada nesse trabalho a participação desse fator na indução de *gbp-2* após o dano ao DNA.

Para avaliar se a indução de *gbp-2* estava acompanhada pela ativação de IRF-1, a análise da expressão gênica por RT-PCR duplex e da expressão protéica por “Western blot” foi realizada nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116, após exposições à concentrações equivalentes ao IC80 de doxorrubicina. O aumento transcricional de *irf-1* após o dano genotóxico não foi observado em nenhuma das linhagens tumorais avaliadas (MCF-7, TE-7 e HCT116) (Figura 14A, C e E). Em contraste, houve aumento da expressão da proteína IRF-1 em todas as linhagens nos tempos de 3 e 6 horas após o dano ao DNA (Figura 14B, D e F). Ressaltando ainda mais o contraste na linhagem TE-7 além de não ter havido indução transcricional do gene *irf-1* ainda ocorreu uma regulação negativa do seu mRNA. Esses resultados sugerem que a ativação de IRF-1 após o dano ao DNA poderia ocorrer por modificações pós-transducionais e que em TE-7 essa ativação não foi suficiente para a indução de *gbp-2*.

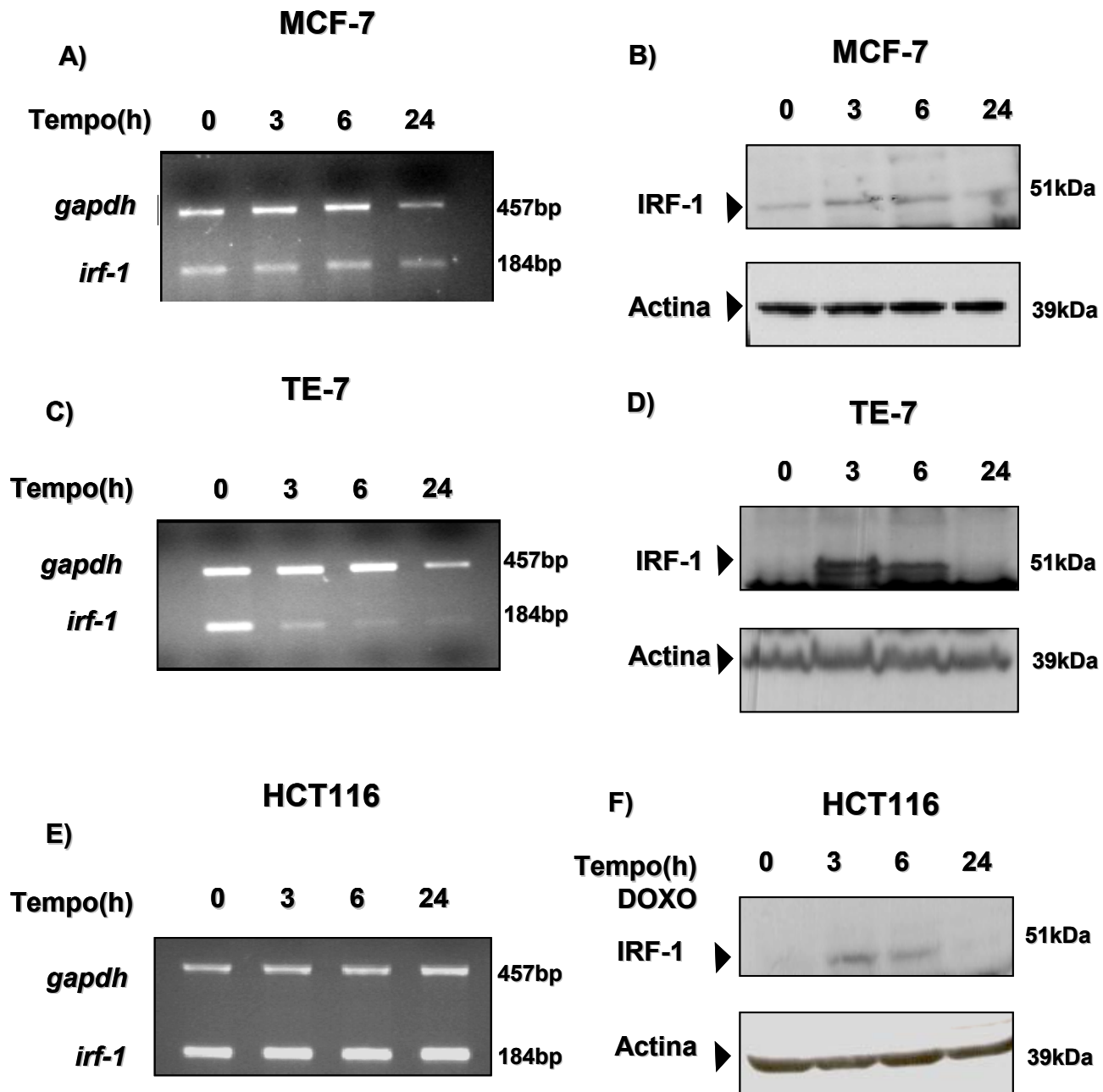


Figura 14: Aumento da proteína IRF-1 nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA. Análise de expressão gênica de *irf-1* (184pb) por RT-PCR duplex utilizando como controle interno a expressão do gene *gapdh* (457bp) em MCF-7 (A), TE-7 (C) e HCT116 (E) expostas à doxorrubicina (IC80) após 3, 6 e 24 horas de tratamento. Análise da expressão da proteína IRF-1 (51kDa) usando a expressão de actina (39kDa) como controle, nas mesmas condições de tratamento. Separação de 30µg proteínas totais em SDS-PAGE 10% e detecção realizada pela reação com ECL.

IV.5. Ativação da via da proteína p53 nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 expostas ao dano genotóxico

A indução de *gfp-2* nos estudos de Guimarães *et al*, sugeriram um papel positivo na regulação de *gfp-2* pela proteína p53^(V272M) ativada. Com objetivo de investigar a participação da ativação de p53 selvagem na indução de *gfp-2* após estímulo genotóxico, as análises de expressão de p53 por “Western Blot” em MCF-7, TE-7 e HCT116 foram realizadas nos mesmos tempos em que a expressão de GBP-2 e IRF-1 foram analisadas. O aumento da expressão da proteína p53 foi visto apenas nas linhagens que expressavam a p53 selvagem.

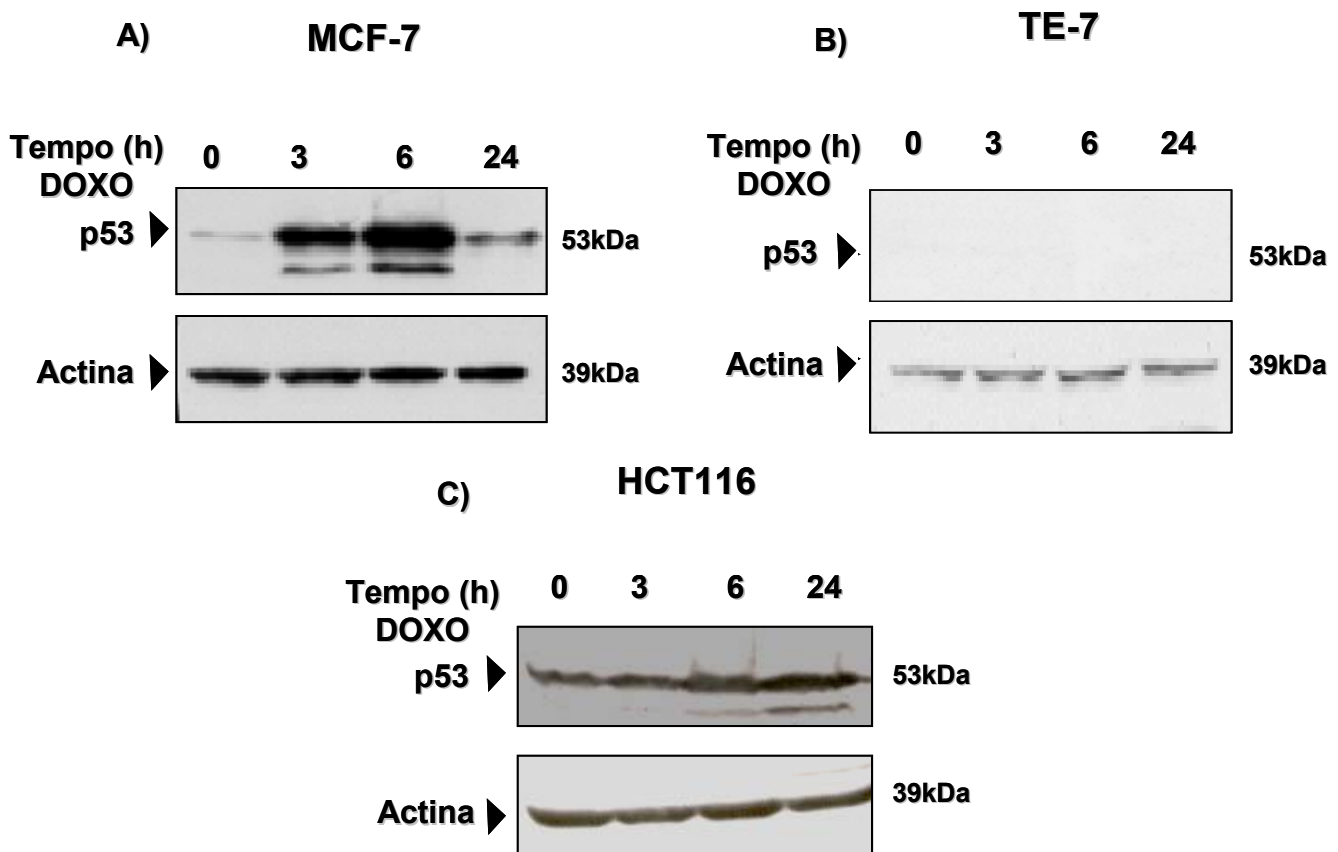


Figura 15: Análise da expressão da proteína p53 nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA. As análises de expressão protéica por “Western blot de p53 (53kDa) e Actina (39kDa), usada como controle, foram realizadas após a separação de 25µg de proteínas totais provenientes do tratamento com o IC80 de doxorubicina de MCF-7 (A), TE-7 (B) e HCT116 (C) após 3, 6, e 24 horas. As proteínas foram separadas pela corrida em gel de SDS-PAGE 10% e detectadas pelo reagente ECL.

Em MCF-7, o aumento foi observado nos tempos de 3 e 6 horas após o efeito genotóxico da doxorrubicina retornando ao seu nível basal no tempo de 24 horas (Figura 15A). Nas células TE-7, foi notada a ausência da expressão da proteína p53 tanto a nível basal, quanto após o estímulo genotóxico (Figura 15B). E na linhagem HCT116, o aumento progressivo da expressão da p53 foi observado nos tempos 3, 6 e 24 horas seguidos do dano ao DNA (Figura 15C). Esses resultados em conjunto aos anteriores indicam que a indução de GBP-2 ocorreria nas linhagens nas quais houve um aumento de expressão da p53.

IV.5.1 Indução de *p21waf1/cip1* nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após exposição à doxorrubicina

Uma vez observada o aumento de expressão da p53 em MCF-7 e em HCT116, e a sua ausência completa em TE-7 após o tratamento com doxorrubicina, a ativação da via da proteína p53 após o dano ao DNA foi avaliada, através da correlação entre o aumento da expressão da p53 e a indução de um dos seus genes-alvo *p21waf1/cip1*. Como visto na Figura 16, a indução de *p21waf1/cip1* acompanhada do aumento de expressão de sua proteína foi evidenciada em ambas as linhagens celulares que expressavam a p53 selvagem, MCF-7 e HCT116 bem como na linhagem TE-7.

As cinéticas de indução de *p21waf1/cip1* tanto em MCF-7 quanto em HCT116 foram semelhantes sendo observado um aumento progressivo da expressão nos tempos de 3, 6 e 24 horas de exposição ao dano genotóxico. Em contraste, o aumento da expressão observada em TE-7, ocorreu nos intervalos de 3 e 6 horas de exposição. Esses resultados analisados em conjunto com os anteriores, sugerem que a indução de *p21waf1/cip1* em MCF-7 e HCT116 podem estar relacionadas à ativação da proteína p53 e que em TE-7 ocorreria como resultado da ativação de outro fator de transcrição.

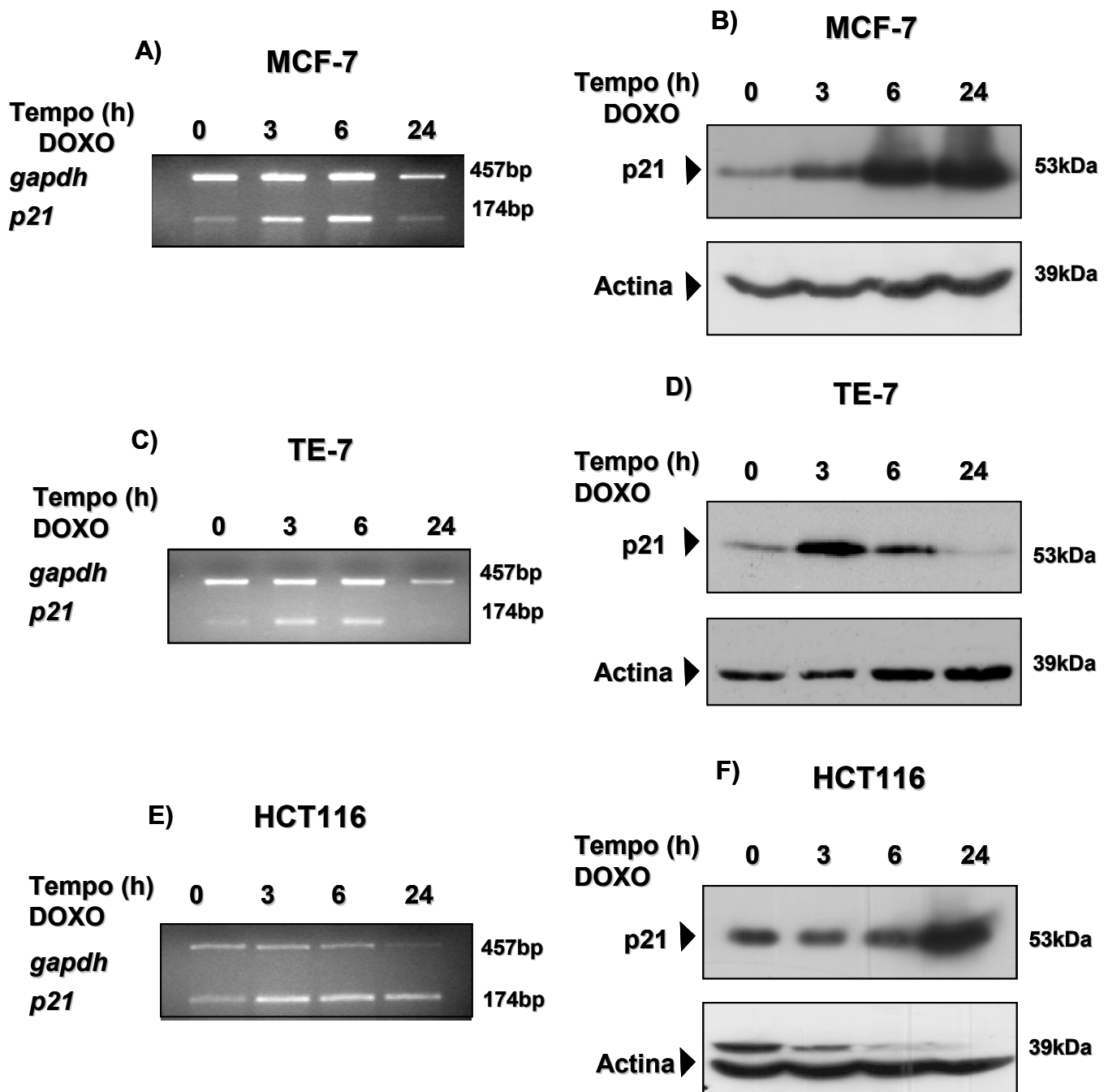


Figura 16: Indução de *p21waf1/cip1* nas linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA. Análise da expressão gênica de *p21waf1/cip1* (174bp) por RT-PCR duplex utilizando *gapdh* (457bp) como controle interno nas linhagens MCF-7 (A) TE-7 (C), e HCT116 (E) tratadas com o IC80 de doxorrubicina. A análise da expressão protéica da p21WAF1/CIP1 (21kDa) e de Actina (39kDa) usada como controle foi realizada após separação de 30µg de proteínas totais de MCF-7 (B), de TE-7 (D) e de HCT116 (F) em gel SDS-PAGE a 12%. A detecção das proteínas foi realizada pelo reagente ECL.

IV.6. Correlação temporal entre as cinéticas de ativação da proteína p53 e a indução de *p21waf1/cip1* e de *gbp-2*

Visto que a existência de indução de *gbp-2* após o estímulo genotóxico fora apenas observada nas linhagens as quais expressavam a proteína p53 selvagem, buscou-se avaliar a eventual existência da relação temporal entre o aumento da atividade da p53 e a indução de *gbp-2*. Nesse contexto, foi usado como comparativo, a correlação entre as cinéticas de ativação da p53 e de indução de *p21waf1/cip1* nas células MCF-7. A análise das cinéticas de indução de p21WAF1/CIP1 e de GBP-2 foi realizada por RT-PCR duplex e “Western Blot” após exposição das células MCF-7 a dois agentes genotóxicos: doxorrubicina ou γ -irradiação nos tempos de 30min, 1, 2 e 3 horas.

O aumento da expressão da p53 foi observado após 1 hora de tratamento com a droga quimioterápica e seguido pela indução de *p21waf1/cip1* (Figura 17A e B). A correlação temporal entre a cinética de ativação da p53 e indução do gene-alvo *p21waf1/cip1*, foi vista nas análises realizadas após o estímulo de dano ao DNA causado por γ -irradiação, porém com a resposta de ativação da p53 ocorrendo mais precocemente, após 30 min (Figura 17C e D). Da mesma forma, observamos que a ativação da proteína p53 pode preceder a cinética de indução do gene *gbp-2* após ambos os estímulos de dano ao DNA, ocorrida à 1 hora de exposição ao tratamento com doxorrubicina e à 30 min de exposição à γ -irradiação (Figura 18A e B).

Esses resultados sugerem a possível participação da p53 selvagem ativada na expressão de *gbp-2*. após diferentes estímulos genotóxicos na linhagem MCF-7.

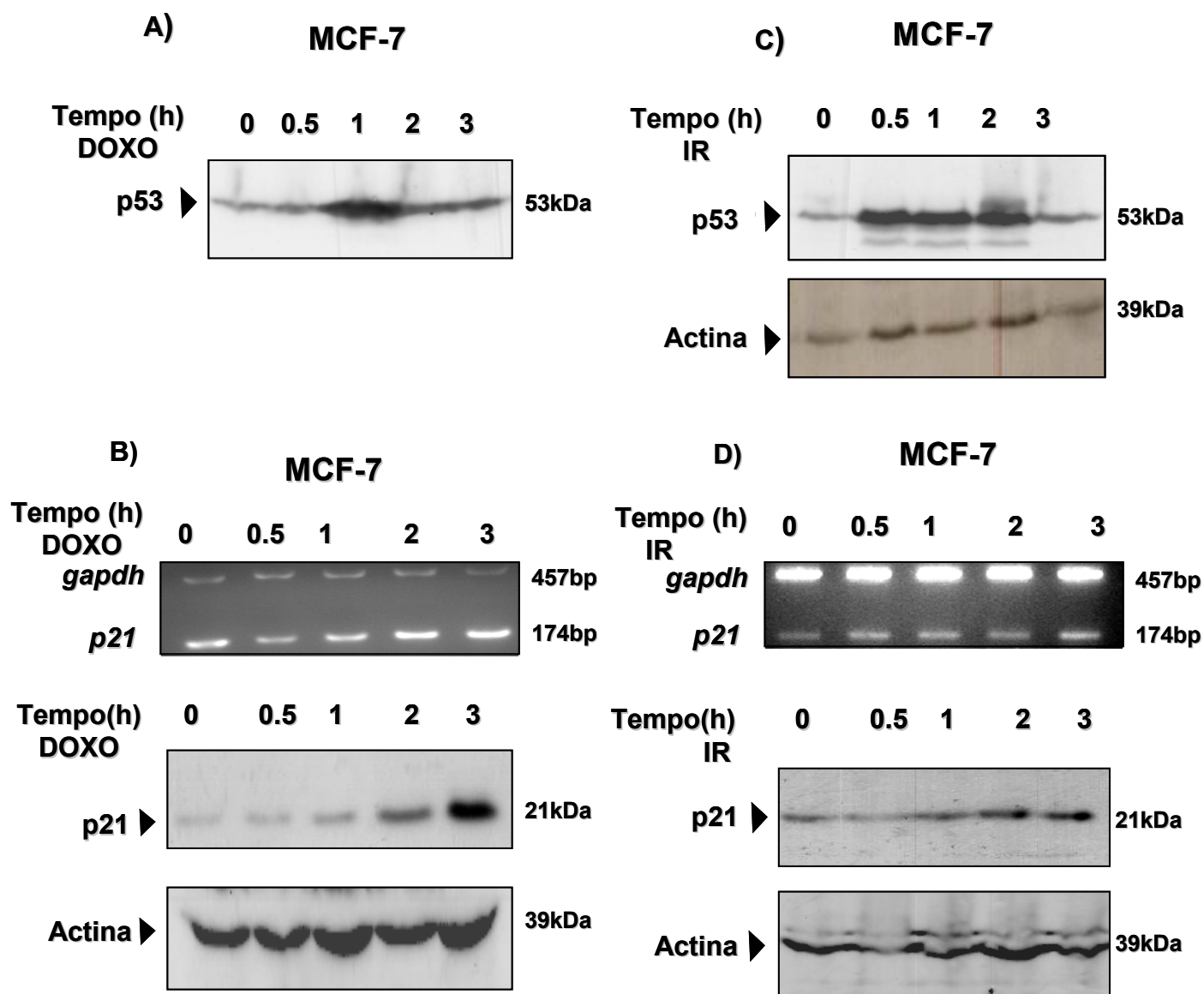


Figura 17: Correlação temporal entre as cinéticas de ativação da p53 e de indução de *p21waf1/cip1*. A análise da expressão de p53 (53kDa) por “western blot” a partir de 25µg de proteínas totais em gel SDS-PAGE 10% foi realizada na linhagem MCF-7 exposta a 0,16µM de doxorrubicina (Doxo) (A) ou a 5Gy de γ -irradiação (IR) (C). Nas mesmas condições de tratamento foram realizadas a análise da expressão gênica de *p21waf1/cip1* (174bp) por RT-PCR duplex, utilizando *gapdh* (457bp) como controle interno e da sua proteína (21kDa) por “Western Blot”, utilizando a expressão de actina (39kDa) como controle (B e D). As proteínas foram detectadas pelo reagente ECL.

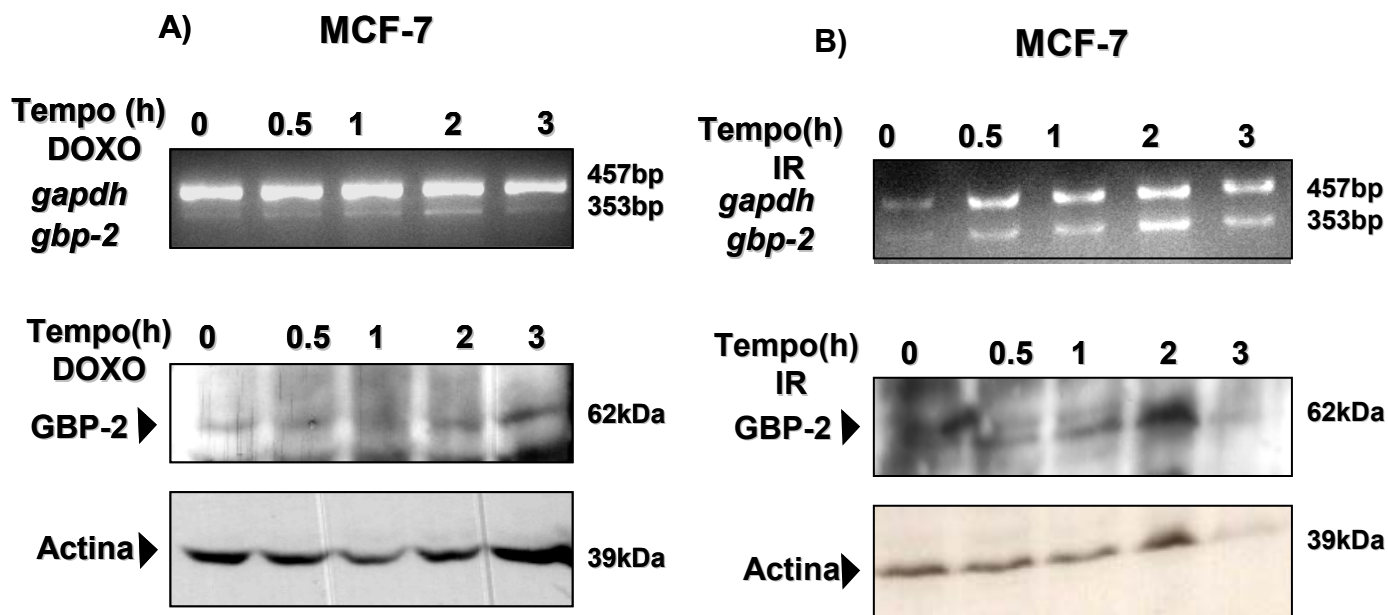


Figura 18: Correlação temporal entre as cinéticas de ativação da via da p53 e de indução de *gbp-2*. A análise da expressão gênica e protéica de GBP-2 foram realizadas após exposição da linhagem MCF-7 a 0,16 μ M de doxorubicina (Doxo) (A) ou a 5Gy de γ -irradiação (IR) (B). A análise da expressão gênica de *gbp-2* (353bp) por RT-PCR duplex foi realizada utilizando *gapdh* (457bp) como controle interno. Foi realizada a análise da expressão protéica de GBP-2 (62kDa) por “western blot” a partir de 40 μ g de proteínas totais em SDS-PAGE a 10% e a detecção das proteínas realizada pelo reagente ECL e ECL Plus, conforme descrito em materiais e métodos.

IV.7. Respostas celulares induzidas nas linhagens expostas ao dano genotóxico

Uma vez analisada a expressão dos fatores de transcrição p53 e IRF-1 e dos genes-alvo *p21waf1/cip1* e *gbp-2* nas diferentes linhagens tumorais, foi investigada por citometria de fluxo e microscopia eletrônica, a resposta celular após estímulo genotóxico induzido por doxorubicina ou por γ -irradiação.

Após 48 horas de tratamento quimioterápico, a parada do ciclo celular, na transição G2/M, foi observada em ambas as linhagens (MCF-7 e HCT116) (Figura 19 e 21). No entanto, após o dano induzido por γ -irradiação na linhagem HCT116 foi visto o acúmulo de células na transição G2/M, enquanto, que na linhagem

MCF-7 houve o acúmulo de células na transição G1/S (Figura 20 e 22). O reduzido percentual de células HCT116 e MCF-7 na fase sub-G1, comparados com o das células TE-7 (Figura 23) indicaram uma resposta predominante de parada do ciclo celular após o dano ao DNA nas linhagens que expressavam p53 selvagem. A resposta celular de parada do ciclo em G2/M nas células em MCF-7, manteve-se apesar do aumento de concentração de doxorubicina em até 10 vezes ($1\mu\text{M}$) o valor da concentração ideal para o seu tratamento ($0,16\mu\text{M}$)(Figura 24).

MCF-7

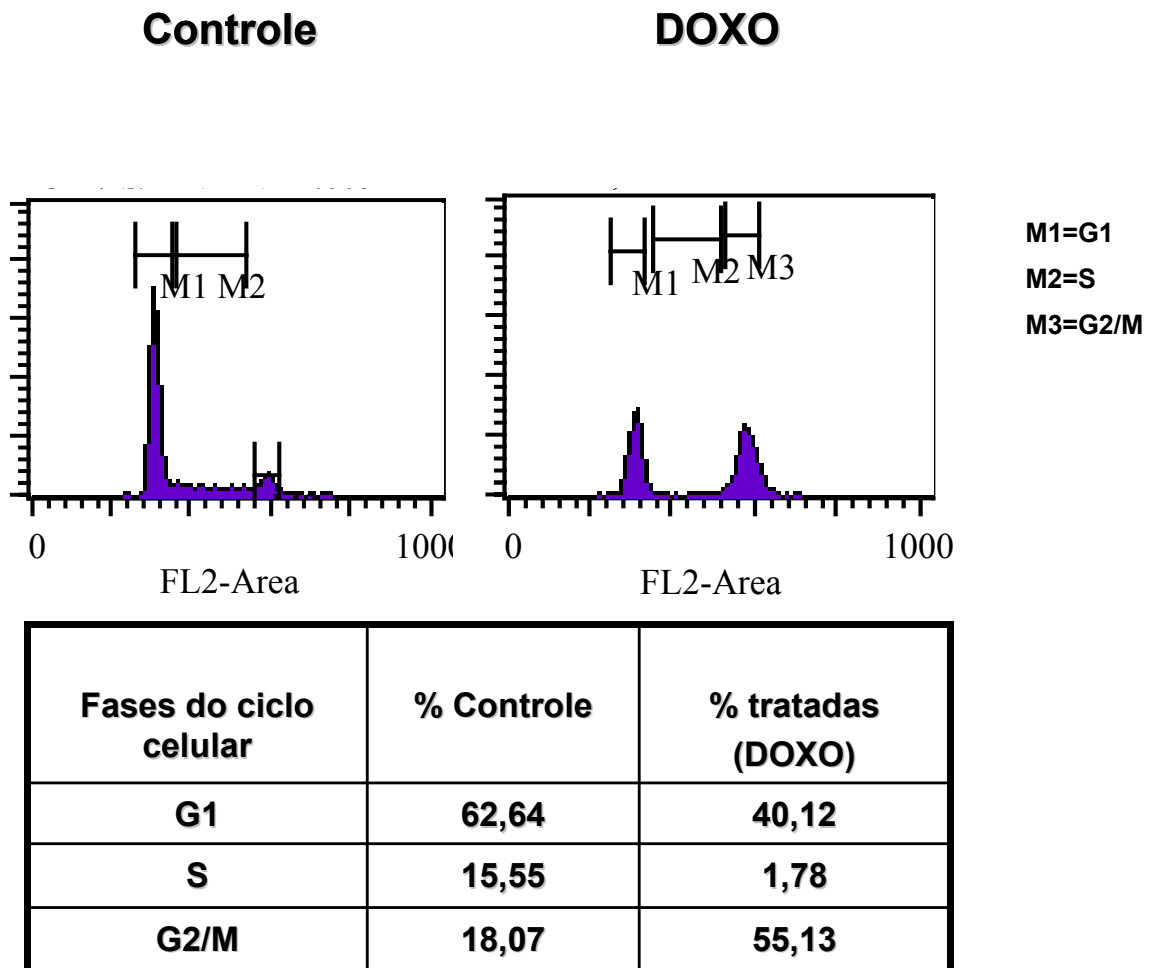
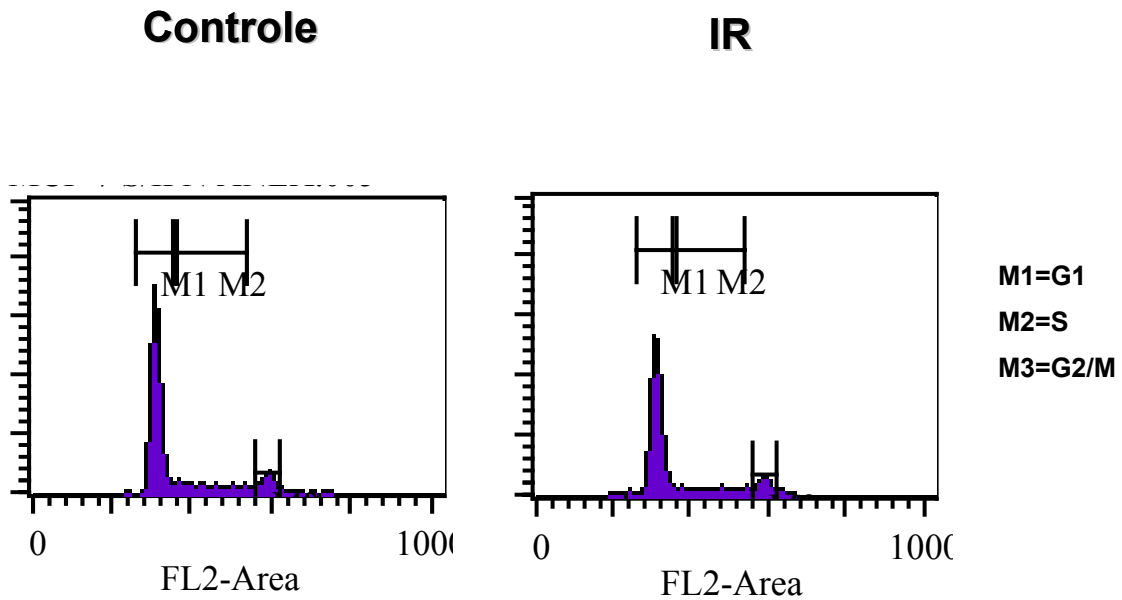


Figura 19: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 após o dano ao DNA. A análise de ciclo celular foi realizada na linhagem celular MCF-7 após tratamento com $0,16\mu\text{M}$ de doxorubicina (DOXO) por 48 horas. Os valores demonstrados na tabela referem-se ao percentual de células tratadas e de não tratadas (controle) em cada uma das fases do ciclo celular.

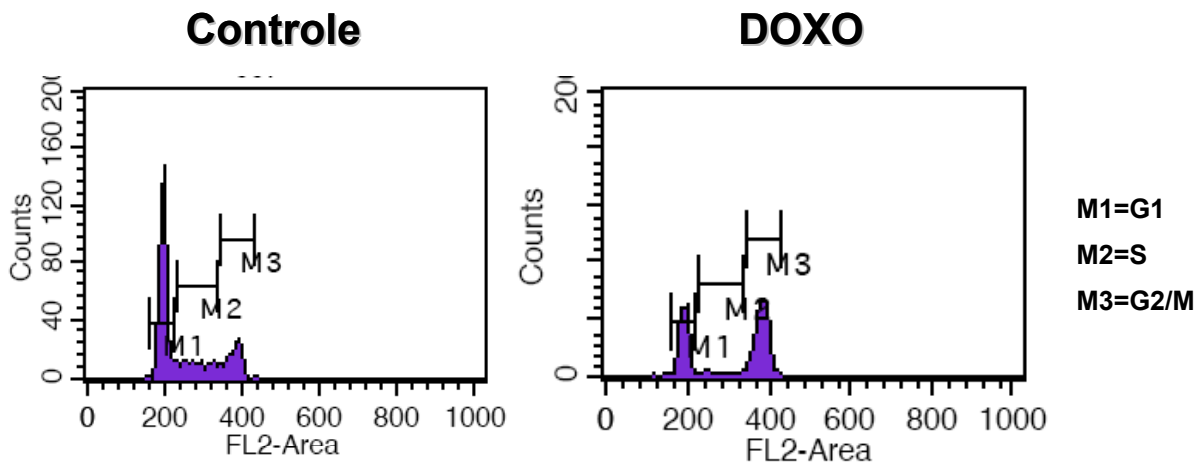
MCF-7



Fases do ciclo celular	% Controle	% tratadas (IR)
G1	61,85	72,79
S	17,95	8,16
G2/M	17,81	17,68

Figura 20: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 após o dano ao DNA. A análise de ciclo celular foi realizada na linhagem celular MCF-7 após tratamento com 5 Gy de γ -irradiação (IR) por 48 horas. Os valores demonstrados na tabela referem-se ao percentual de células tratadas e de não tratadas (controle) em cada uma das fases do ciclo celular.

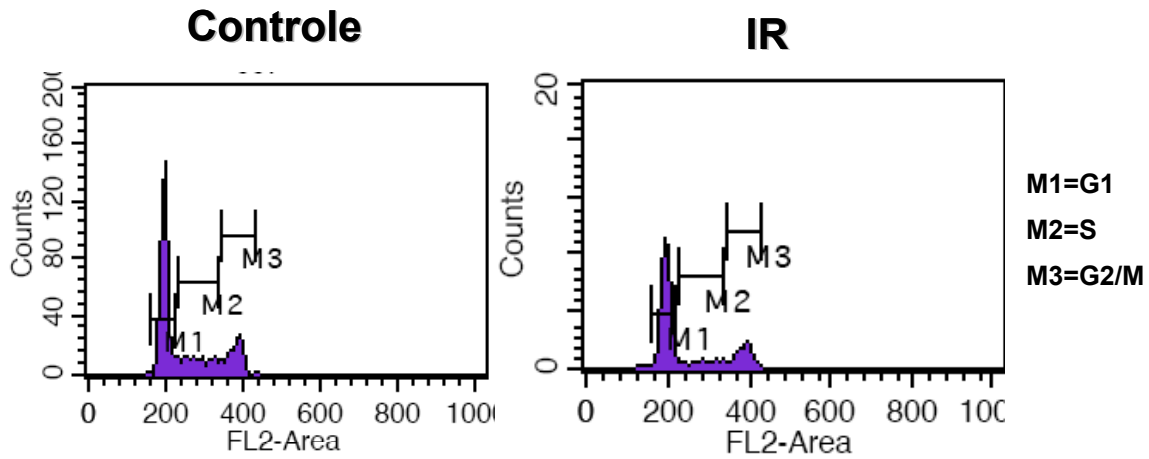
HCT116



Fases do ciclo celular	% Controle	% tratadas (DOXO)
G1	66,20	10,75
S	13,33	13,87
G2/M	15,89	68,85

Figura 21: Análise do ciclo celular na linhagem HCT116 após o dano ao DNA. A análise de ciclo celular foi realizada na linhagem celular HCT116 após tratamento com 0,59 μ M de doxorrubicina (DOXO) por 48 horas. Os valores demonstrados nas tabela refere-se ao percentual de células tratadas e de não tratadas (controle) em cada uma das fases do ciclo celular.

HCT116



Fases do ciclo celular	% Controle	% tratadas (IR)
G1	71,17	52,95
S	10,75	7,90
G2/M	17,15	32,50

Figura 22: Análise do ciclo celular na linhagem HCT116 após o dano ao DNA. A análise de ciclo celular foi realizada na linhagem celular HCT116 após tratamento com 5 Gy de γ -irradiação (IR) por 48 horas. Os valores demonstrados na tabela referem-se ao percentual de células tratadas e de não tratadas (controle) em cada uma das fases do ciclo celular.

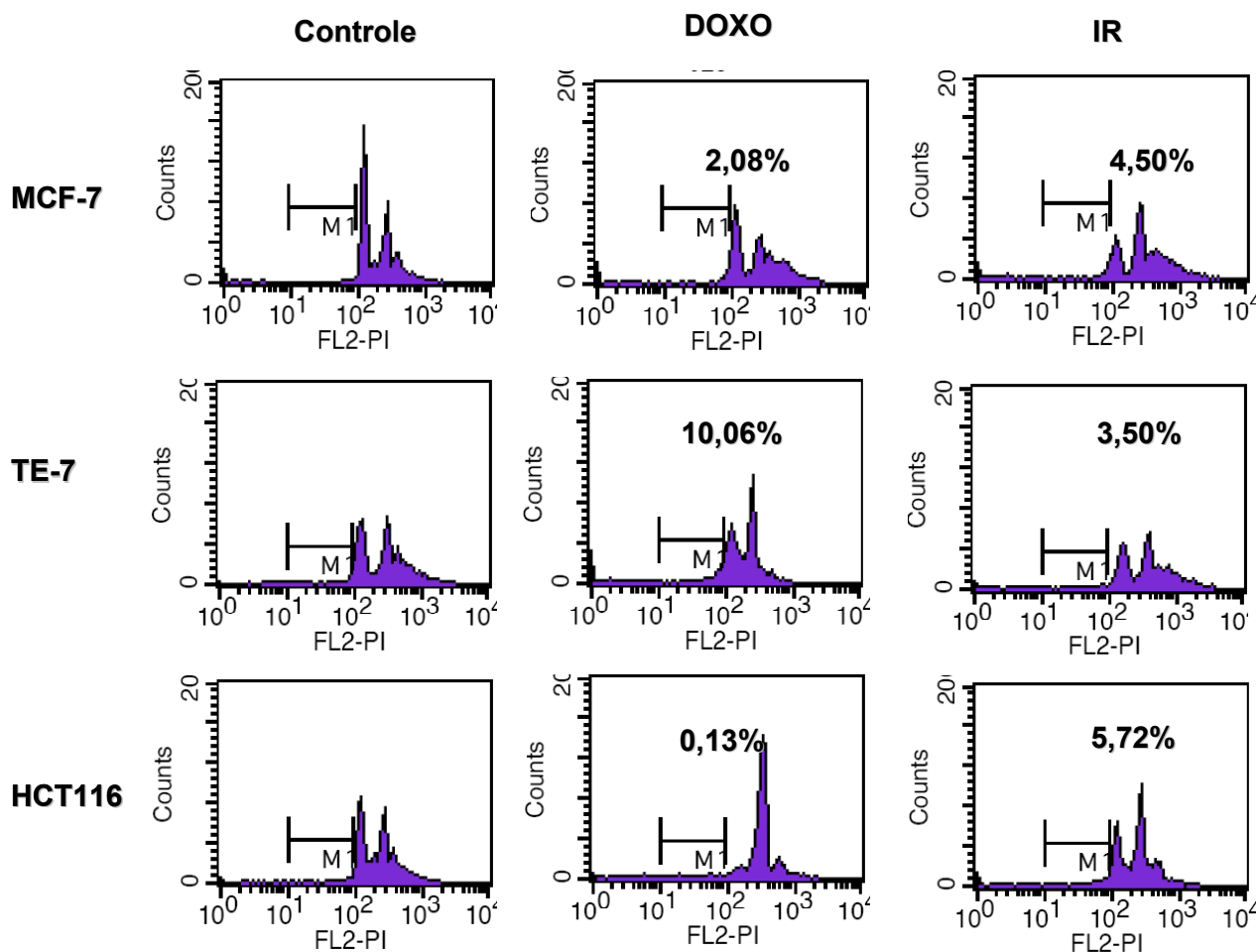
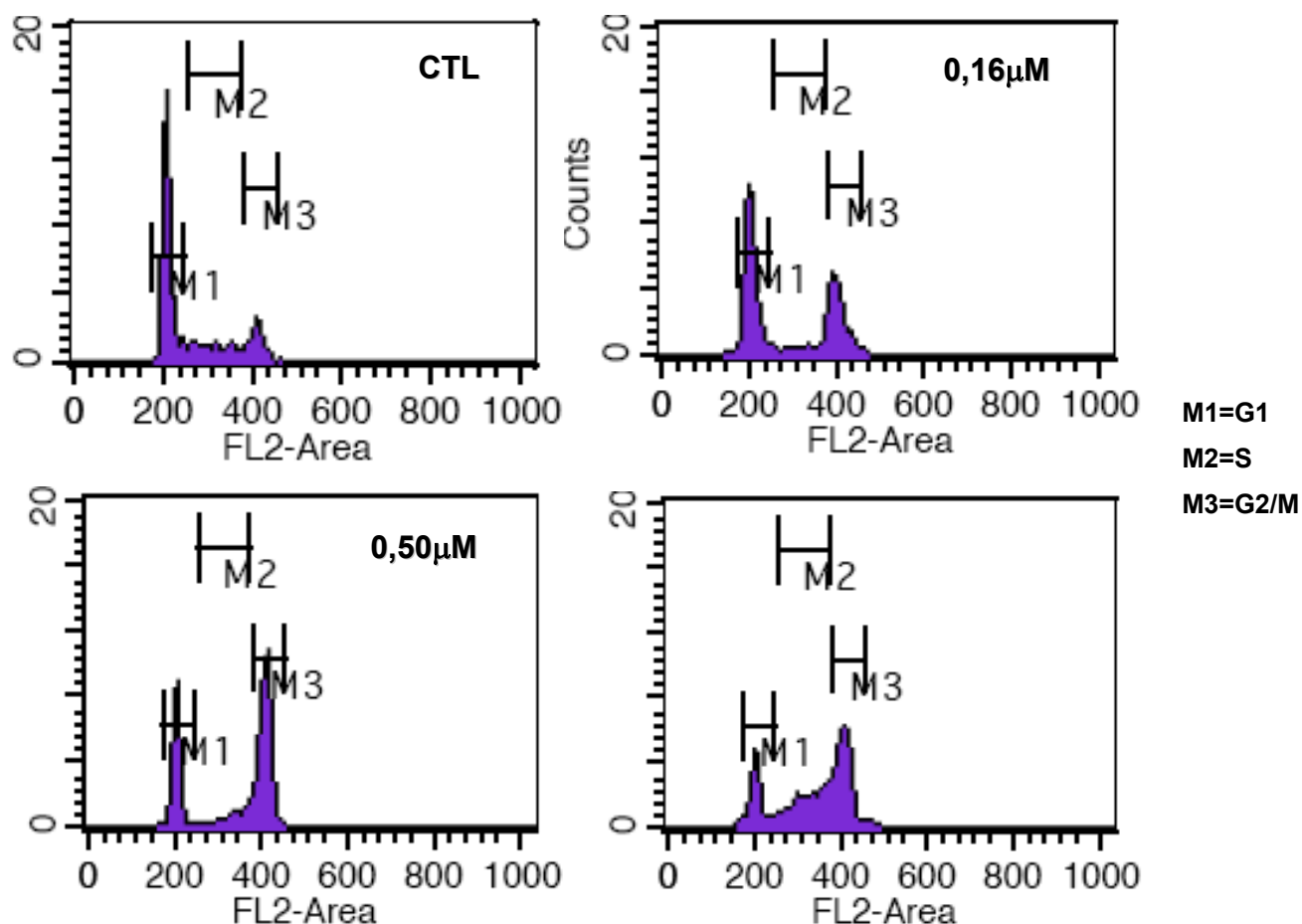


Figura 23: Análise da fase sub-G1 das linhagens MCF-7, TE-7 e HCT116 após o dano ao DNA. As análises foram feitas por citometria de fluxo após 48 horas de exposição das células MCF-7, TE-7 e HCT116 aos tratamentos com 0,16uM, 0,59uM e 1,02uM de doxorrubicina (DOXO) respectivamente ou com 5 Gy de γ -irradiação (IR).



Fases do ciclo celular	% Controle	% tratadas à 0,16μM	% tratadas à 0,50μM	% tratadas à 1,00μM
G1	66,44	57,51	28,33	18,38
S	16,88	7,24	7,59	33,34
G2/M	14,55	29,57	61,64	42,40

Figura 24: Análise do ciclo celular na linhagem MCF-7 exposta a concentrações crescentes de doxorubicina. A distribuição de células em cada fase do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo após 48 horas de exposição das células MCF-7 a 0,16/ 0,50/1,00uM de doxorubicina (DOXO). Os valores demonstrados na tabela referem-se ao percentual de células tratadas e de não tratadas (controle) em cada uma das fases do ciclo celular.

Para confirmar se os resultados da quantificação das células em sub-G1 após os diferentes estímulos genotóxicos eram representativos da resposta celular de morte por apoptose, foram analisadas as características morfológicas das linhagens MCF-7 e TE-7 após 48 horas de ambos os tratamentos. A ausência de corpos apoptóticos nas análises de micrografia eletrônica das células MCF-7 confirmou a ausência da resposta apoptótica após o dano ao DNA induzido tanto por doxorubicina como por γ -irradiação (Figura 25). A presença de corpos apoptóticos, condensação da cromatina e intensa formação de brotamentos na membrana plasmática das células de TE-7 expostas a ambos os tratamentos caracterizaram a resposta celular por apoptose e confirmaram os resultados encontrados pela citometria de fluxo.

As diferenças na ativação de respostas celulares encontradas nas linhagens tumorais podem estar relacionadas as diferenças dos mecanismos moleculares ativados após o dano ao DNA.

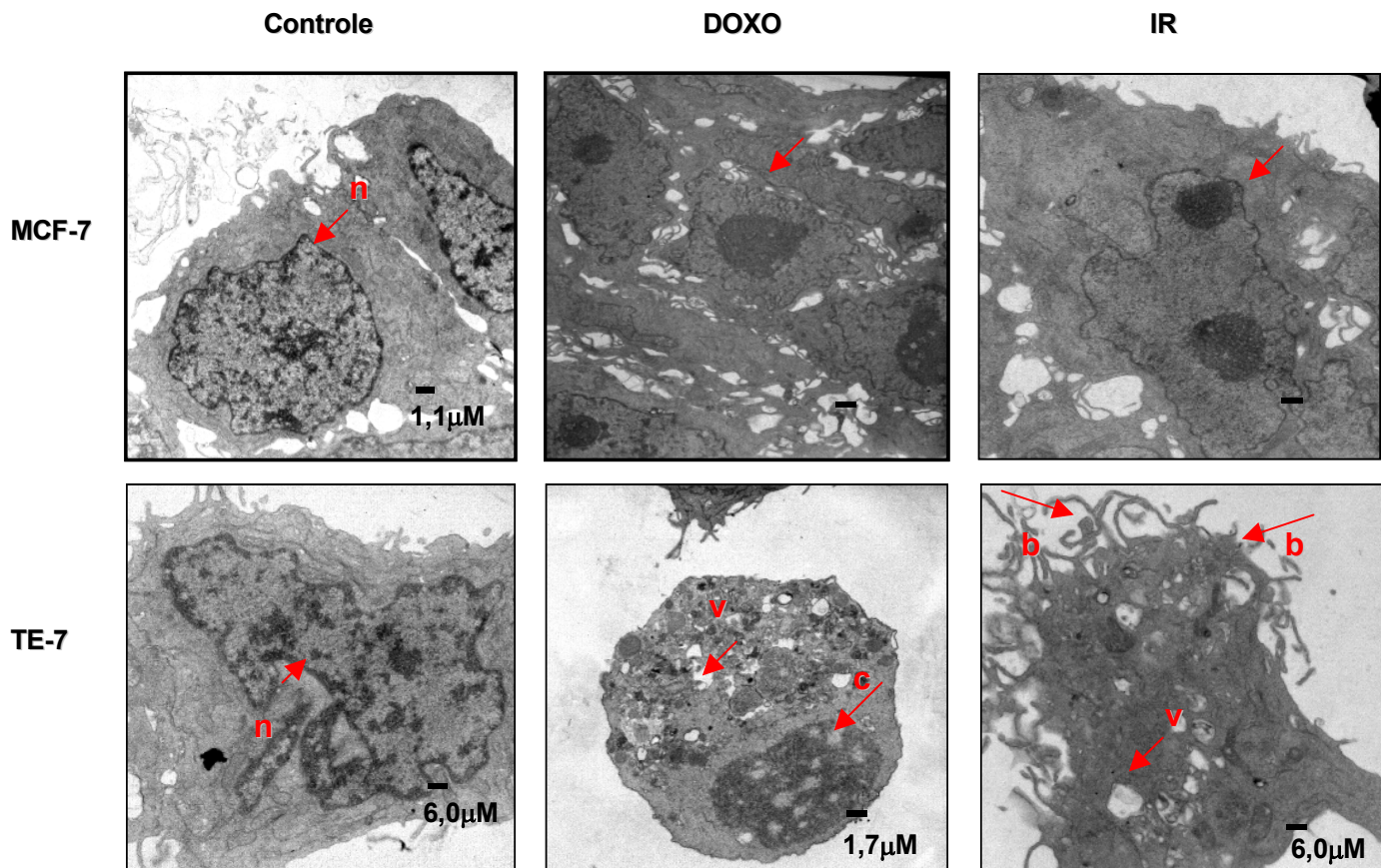


Figura 25: Análise morfológica de morte celular após o dano genotóxico. As linhagens MCF-7 e TE-7 foram expostas por 48 horas aos tratamentos com doxorubicina (0,16 μ M e 1,02 μ M, respectivamente) e com γ -irradiação (5Gy), fixadas em resina e analisadas em ultramicrografia pela microscopia eletrônica de transmissão. As setas indicam o núcleo aumentado (n), vacúolos apoptóticos (v), cromatina fragmentada (c) e intensa formação de “blebbing” na membrana plasmática (b). As figuras são representativas de uma amostragem de células contidas em pelo menos 3 ultramicrografias diferentes.

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Interferons são citocinas capazes de desencadear diferentes respostas celulares, incluindo a resposta imunomodulatória, pró-inflamatória, e antiproliferativa (Stark *et al.*, 1998).

A regulação positiva dos genes regulados pela via dos IFNs, incluindo o gene *gbp-2*, em um painel de genes induzidos após a ativação da proteína p53, no estudo de Guimarães *et al.* (submetido à publicação), sugeriu a cooperação entre duas importantes vias celulares: a via dos IFNs, originalmente descrita na defesa contra infecções virais, e a via da proteína p53, amplamente reconhecida pela sua atuação na supressão tumoral. A indução de *gbp-2* após ativação da p53 levantou alguns questionamentos: (i) se esse gene é induzido pela p53, será que ele estaria induzido após os estímulos normalmente iniciadores do processo da carcinogênese como o dano genotóxico? (ii) GBP-2 seria uma proteína de defesa a qualquer tipo de estímulo carcinogênico, seja ele biológico ou genotóxico? Nessa tese, o principal foco da investigação foi o de avaliar se *gbp2* seria induzido pelo estímulo genotóxico após ativação da via supressora tumoral da proteína p53.

A importância da proteína p53 no processo da carcinogênese já é bem conhecida e pode ser evidenciada pela alta frequência de mutações encontradas no gene *TP53* em diferentes tipos de câncer (Hollstein *et al.*, 1991). A proteína p53 tem um papel fundamental nas vias que controlam o crescimento celular e por isso é ativada por estímulos de diversas origens (Takaoka *et al.*, 2003; Guimaraes e Hainaut, 2002; Komarova *et al.*, 2005). Para o início do processo tumoral, a célula precisa escapar dos mecanismos de controle do crescimento celular e acumular alterações genéticas que afetem a regulação dos principais processos celulares como ciclo celular, a apoptose ou a angiogênese (Fearon e Vogelstein, 1990) e por esse motivo é compreensível encontrar na carcinogênese de diversos tumores, uma regulação negativa anterior ou posterior à via de ativação da p53, ou no mesmo nível, de proteínas que cooperem com a p53 na indução comum de determinados genes-alvo (Hainaut e Hollstein, 2000; Hollstein *et al.*, 1991).

Os resultados aqui encontrados demonstraram que a indução de *gbp-2* ocorre não apenas após o estímulo pelos IFNs (Figura 7) mas também após o estímulo genotóxico, em uma direção tanto tempo quanto dose-dependente (Figura 12 e 13). Além disso, a indução da GBP-2 ocorreu em linhagens que expressam uma proteína p53 selvagem e com diferente “background” genético.

A ativação da via de sinalização após o estímulo com IFNs é explicada pela presença de seus receptores específicos em quase todos os tipos celulares dos diferentes tecidos (Parmar e Plataniotis, 2003). Os resultados da regulação da expressão gênica de *irf-1* e de *gbp-2* pelos IFNs traduziram a existência de uma via de sinalização dos IFNs íntegra nas linhagens estudadas.

Por outro lado, a indução de *gbp-2* após o estímulo genotóxico ainda não havia sido previamente demonstrada na literatura. Nos resultados apresentados nessa dissertação, a indução de *gbp-2*, nas linhagens MCF-7 e HCT116, após o dano ao DNA correlacionou-se temporalmente com o aumento de expressão da proteína IRF-1. No entanto na linhagem TE-7 o acúmulo de IRF-1 após o dano ao DNA não foi suficiente para a indução de *gbp-2* (Figura 7 e 14). A diminuição da degradação e aumento da meia vida da proteína IRF-1, sem a correlação com o aumento da expressão gênica após o estímulo genotóxico já haviam sido anteriormente sugeridas por Pamment *et al*, e são mediadas pela proteína quinase ATM (Pamment, J., *et al* 2002). Esse mecanismo de ativação pós-transducional pode ser uma das hipóteses da ativação de IRF-1 após o dano ao DNA nas linhagens estudadas nesse trabalho.

De forma interessante, na linhagem TE-7 houve uma regulação transcricional negativa de *irf-1* após o estímulo de dano ao DNA. Para investigar o mecanismo pelo qual isso ocorre outras análises deverão ser realizadas.

Esses primeiros resultados indicam que a indução de *gbp-2*, após o dano genotóxico não é resultado apenas da ativação transcricional de IRF-1 e provavelmente requer um ou mais fatores de transcrição diferentemente do que ocorre após o estímulo pelos IFNs (Gorbacheva *et al.*, 2002). Mas qual ou quais os possíveis fatores que participariam ou cooperariam com IRF-1 para a indução de *gbp-2* após o estímulo carcinogênico? Baseado nisso o objetivo subsequente foi o de tentar correlacionar a indução de *gbp-2* em MCF-7 com a ativação de

p53, uma vez que, como citado anteriormente, p53 e IRF-1 cooperam para indução de *p21waf1/cip1* (Tanaka *et al.*, 1996). O aumento da atividade transcricional da proteína p53 em MCF-7 foi sugerido pelo aumento da expressão da p53 após o tratamento com doxorubicina seguida pela indução de seu gene-alvo, *p21waf1/cip1* (Figura 15,16 e 17). De forma interessante, *p21waf1/cip1* também foi induzido na linhagem TE-7 deficiente na expressão da p53, mas de forma diferente da indução que ocorreu nas linhagens que expressavam p53. Esse fato pode ser explicado pela existência, já anteriormente descrita, de outros fatores de transcrição responsáveis pela indução de *p21waf1/cip1* como STAT1, IRF-1 e IRF-5 (Mori *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Chin *et al.*, 1996; Coccia *et al.*, 1999). A correlação entre o aumento da atividade da p53 e a indução de *gbp-2* também foi observada pela cinética temporal de ativação da p53 e de indução de *gbp-2* em MCF-7. Esses resultados sugeriram que a proteína p53 ativada em MCF-7, assim como visto em TE-1, também pode participar da indução de *gbp-2* (Guimaraes *et al.*, 2004, submetido à publicação). Porém para melhor confirmação desses dados e determinação do mecanismo pelo qual a p53 induziria *gbp-2* são necessários estudos adicionais.

Dentre as possibilidades de participação da p53 na indução de *gbp-2*, nós questionamos a possível interação dessa proteína com outros fatores, tais como IRF-1. Resultados prévios de ensaios de co-imunoprecipitação mostraram que a formação e aumento do complexo p53-IRF-1 ocorreram após ativação da primeira (Guimaraes *et al.*, 2004, submetido à publicação). A possibilidade de ligação direta ao DNA da proteína p53 na região promotora de *gbp-2* é questionável pois ainda não existem relatos na literatura.

Os estudos de interação entre as diferentes proteínas da via dos IFNs e a via supressora de tumor da p53 vem ganhando destaque ultimamente, pois sugerem a estreita comunicação existente entre ambas as vias celulares. Parte dessas proteínas pode modular a atividade da p53 na apoptose como PML (Bernardi *et al.*, 2004; de Stanchina *et al.*, 2004; Pearson e Pelicci, 2001; Gottifredi e Prives, 2001), PKR (Cuddihy *et al.*, 1999; Yeung e Lau, 1998) e STAT1 (Townsend *et al.*, 2004), e outras na parada do ciclo celular como IRF-1 (Tanaka *et al.*, 1996) e IRF-5 (Barnes *et al.*, 2003). A participação da p53 nas diferentes respostas celulares é

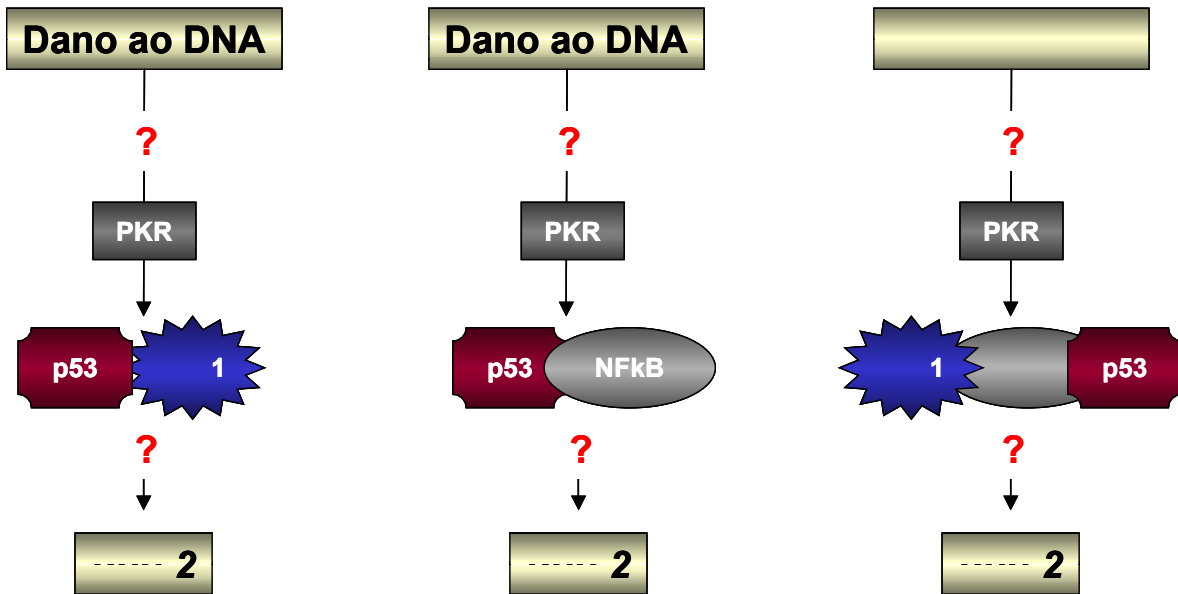
mediada pelo controle transcricional de diferentes grupos de genes. Baseado nesse fato, foi investigado o tipo de resposta celular nas linhagens estudadas que mostraram diferentes expressões gênicas. Foram observadas diferentes respostas celulares nas linhagens. Tanto em MCF-7 e quanto em HCT116 houve predominância na resposta de parada do ciclo celular (Figura 20 a 24); em contraste, em TE-7 houve uma importante resposta de morte celular por apoptose confirmada pelas alterações morfológicas vistas por micrografia eletrônica (Figura 24 e 25). As diferenças nas respostas celulares após o dano ao DNA podem ser explicadas pelas diferentes origens histológicas das linhagens e conseqüente diferenças em seus "background" genético. A construção de modelos isogênicos a partir dessas linhagens poderiam ajudar a determinar melhor a participação de *gpb-2*, da p53 e da IRF-1 nas respostas celulares.

O estímulo pelo IFN α , diferentemente do estímulo genotóxico não causou nenhum efeito na resposta celular das linhagens MCF-7 e TE-7 (Figuras 8, 9 e 10). Na concentração utilizada em nossos experimentos, apesar de suficiente para a indução de genes e proteínas reguladas pelos IFNs, IFN α não foi capaz de induzir nem a parada do ciclo celular, nem a apoptose. A apoptose induzida pelos IFNs, descrita na literatura, tem sido relacionada, entre outros, à ativação da cascata das caspases culminando na clivagem da caspase 3 (Thyrell *et al.*, 2002). Dessa forma, a ausência de apoptose, em MCF-7, encontrada em nossos resultados após o tratamento com IFN α pode estar relacionada, em parte, à ausência da expressão de caspase 3 encontrada no "background" genético dessa linhagem (Kurokawa *et al.*, 1999). Além disso, os resultados negativos referente ao efeito antiproliferativo induzido pelo IFN α podem estar relacionados à concentração e ao tempo de exposição utilizados em nossos experimentos. Alguns estudos descritos na literatura relatam a indução de apoptose após exposição de MCF-7 aos IFNs em concentrações ou intervalos de tempo maiores (Tiwari *et al.*, 1991; Lindner e Borden, 1997). Concentrações semelhantes à nossa ou inferiores somente são capazes de induzir a apoptose nessa linhagem quando associada aos agentes quimioterápicos.

O real papel das GBPs durante a carcinogênese não foi investigado nessa tese, mas alguns dados da literatura sugerem que essas proteínas possam ter função pró ou anti-carcinogênica, e isso está possivelmente relacionado aos diferentes fatores de transcrição já descritos na indução desses genes. GBP-2 exerce atividade antiviral independente da sua atividade de GTPase (Carter *et al.*, 2005). Por outro lado, o aumento da expressão de mGBP2 em fibroblastos NIH3T3 induziu a proliferação (Gorbacheva *et al.*, 2002). Ainda, GBP-1, um outro membro da família das GBPs, exerce atividade anti-angiogênica em células endoteliais estimuladas por citocinas inflamatórias (Guenzi *et al.*, 2001) e permitiu que algumas especulações fossem feitas quanto às variedades de respostas que estão relacionadas às citocinas e diferentes fatores de transcrição associados. Nesse contexto, além da participação de IRF-1 e p53 sugerido por esse estudo na indução das GBPs, um outro fator de transcrição vem sendo implicado. Na região promotora de GBP-1 foi encontrado um motivo de ligação para o fator de transcrição NFkB próximo à sequência ISRE (Naschberger *et al.*, 2004). NFkB normalmente está envolvido em respostas inflamatórias e na indução de genes regulados por essa resposta como *cox-2* (Gately, 2000), mas também pode estar envolvido em respostas de dano ao DNA (Piret *et al.*, 1999). Alguns trabalhos sugerem a participação de NFkB e p53 na resposta após o dano genotóxico ou não genotóxico (Royds *et al.*, 1998; Hellin *et al.*, 2000). A atividade de NFkB, assim como a de IRF-1 pode ser modulada pela quinase PKR e a regulação de genes que são induzidos por IRF-1 e NFkB, como *gbp-2* e *mhcI* é dependente da atividade de PKR após o estímulo com IFN γ (Kumar *et al.*, 1997; Kirchhoff *et al.*, 1995). A ativação de PKR é uma importante reguladora da síntese de proteínas induzida pelos IFNs ou pelo dano genotóxico e a síntese de proteínas correlaciona-se inversamente com a atividade de PKR em tumores (Jagus *et al.*, 1999). Cada vez mais trabalhos vem surgindo tentando entender seu papel durante a carcinogênese. PKR interage com p53 *in vivo* e *in vitro* e essa interação parece ser dependente da conformação selvagem de p53 (Cuddihy *et al.*, 1999). Após o dano ao DNA induzido pela adriamicina (doxorrubicina) e por γ -irradiação, PKR pode interagir com p53 e levar a sua fosforilação no resíduo de serina 18

(Cuddihy *et al.*, 1999). Ainda, PKR participou da mesma via de ativação de p53 após o dano ao DNA, uma vez que em células deficientes para PKR foi vista a incapacidade de transativação genes dependentes de p53 (*mdm2* e *p21waf1/cip1*) (Yeung e Lau, 1998; Cuddihy *et al.*, 1999).

No presente estudo, a ausência de indução de *gbp-2* em TE-7, após o dano genotóxico, apesar da ativação de IRF-1, sugeriu que para a sua indução outros co-fatores são necessários. Esse dado somado às diferentes regulações e interações proteína-proteína entre as vias celulares e a proteína p53 citadas anteriormente, permitem a postulação de três hipóteses sobre os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na indução de *gbp-2* após o dano genotóxico: a) seria necessária apenas a cooperação entre os fatores p53 e IRF-1, sendo a atividade de IRF-1 modulada por PKR; b) IRF-1 não participaria da indução de *gbp-2* após o dano e outro fator como NFkB interage com p53, sendo modulado também por PKR; c) ou seria necessária a ativação de um terceiro fator, tal como NFkB na formação do complexo p53-IRF-1, para ativar a transcrição de *gbp-2* após o dano (Figura 26).



O efeito antiproliferativo das citocinas é alvo de muito interesse para o controle do crescimento de células tumorais, porém o uso dos IFNs no tratamento antitumoral não corresponde às expectativas no tratamento de vários tumores sólidos, despertando ainda muitas dúvidas quanto ao papel desempenhado pela ativação da via dos IFNs no processo da carcinogênese (Maemura *et al.*, 1999). A ineficiência do tratamento com os IFNs podem ser resultado do caráter ambíguo da resposta dos mesmos, induzindo proteínas que tem efeitos pró- e antiproliferativos. Além disso, pode ser o resultado do comprometimento da via de sinalização dos IFNs. A continuação dos esforços para a caracterizar a participação das proteínas reguladas pelos IFNs e suas funções bem como possíveis interações celulares durante o estímulo de dano ao DNA, é fundamental para a compreensão do complexo mecanismo molecular envolvido na carcinogênese.

VI. CONCLUSÕES

VI.CONCLUSÕES

Este trabalho nos permitiu concluir que:

- ❖ Os genes regulados pelos interferons foram induzidos nas linhagens de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de adenocarcinoma de esôfago (TE-7) após exposição ao IFN α . Entretanto esse tratamento no tempo de 48 horas não promoveu nenhuma alteração celular nas subpopulações das linhagens estudadas.

- ❖ gene *gbp-2* foi induzido por estímulos que são capazes de ativar tanto a via dos IFNs quanto as vias envolvidas na resposta ao dano genotóxico. A indução após estímulo genotóxico ocorreu tanto de forma tempo quanto dose-dependente e apenas nas linhagens que expressavam a p53 selvagem, havendo correlação temporal entre a ativação do fator de transcrição p53 e a indução de *gbp-2*. A ativação de IRF-1 na ausência de p53 não foi suficiente para a indução de GBP-2 na linhagem TE-7.

- ❖ As linhagens tumorais que apresentaram ativação da via da proteína p53 e indução de *gbp-2*, tiveram uma resposta celular preferencial de parada do ciclo celular.

VII. PERSPECTIVAS

VII. PERSPECTIVAS

As perspectivas podem ser divididas em duas principais etapas: a primeira refere-se à investigação do mecanismo molecular através de estudos em linhagens e, a segunda à investigação da relevância de GBP-2 na progressão tumoral.

A perspectiva imediata desse estudo é o da construção de modelos isogênicos para determinar qual o nível de participação da ativação de IRF-1 na indução de *gbp-2*. A presença de um dominante negativo de IRF-1 na linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 em um estudo recente, possibilitou o silenciamento da expressão de IRF-1 através da competição com sua proteína selvagem e a diminuição da resposta apoptótica induzida por IRF-1, assim como a indução de seus genes-alvo. Dessa forma, a construção de uma transfecção estável com o dominante negativo de IRF-1 em MCF-7 é uma das possibilidades e já está em andamento . Em estudos futuros, a investigação da expressão de PKR e NFkB podem trazer informações válidas quanto a participação desses fatores nas respostas induzidas pelo dano genotóxico e na indução de *gbp-2*.

O estudo clínico envolvendo pacientes com câncer de esôfago, está em andamento e visa a correlação entre os dados clínicos e histopatológicos, a análise molecular de GBP-2 e de IRF-1 e as alterações genéticas no gene *TP53*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alenzi,F.Q. e Warrens,A.N. (2003). Cellular and molecular themes in apoptosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 115, 563-574.

Amato,R.J. (2005). Renal cell carcinoma: review of novel single-agent therapeutics and combination regimens. *Ann. Oncol.* 16, 7-15.

Ashkenazi,A. e Dixit,V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Asundi,V.K., Stahl,R.C., Showalter,L., Conner,K.J., and Carey,D.J. (1994). Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1217, 257-265.

Balkwill,F. e Taylor-Papadimitriou,J. (1978). Interferon affects both G1 and S+G2 in cells stimulated from quiescence to growth. *Nature* 274, 798-800.

Barnas,C., Martel-Planche,G., Furukawa,Y., Hollstein,M., Montesano,R., and Hainaut,P. (1997). Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. *Int. J. Cancer* 71, 79-87.

Barnes,B.J., Kellum,M.J., Pinder,K.E., Frisancho,J.A., and Pitha,P.M. (2003). Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res.* 63, 6424-6431.

Bernardi,R., Scaglioni,P.P., Bergmann,S., Horn,H.F., Vousden,K.H., and Pandolfi,P.P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 6, 665-672.

Bode,A.M. e Dong,Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 793-805.

Buzaid,A.C. (2004). Management of metastatic cutaneous melanoma. *Oncology (Huntingt)* 18, 1443-1450.

Carter,C.C., Gorbacheva,V.Y., and Vestal,D.J. (2005). Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch. Virol.*

Casey,P.J. (1995). Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 161-166.

Chawla-Sarkar,M., Leaman,D.W., and Borden,E.C. (2001). Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 7, 1821-1831.

Chawla-Sarkar,M., Lindner,D.J., Liu,Y.F., Williams,B.R., Sen,G.C., Silverman,R.H., and Borden,E.C. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis.* 8, 237-249.

Chin,Y.E., Kitagawa,M., Su,W.C., You,Z.H., Iwamoto,Y., and Fu,X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.

Coccia,E.M., Del Russo,N., Stellacci,E., Orsatti,R., Benedetti,E., Marziali,G., Hiscott,J., and Battistini,A. (1999). Activation and repression of the 2-5A synthetase and p21 gene promoters by IRF-1 and IRF-2. *Oncogene* 18, 2129-2137.

Conte,E., Manzella,L., Zeuner,A., Cocchiaro,G., Conticello,C., Zammataro,L., Messina,C.G., De Maria,R., and Messina,A. (2003). Involvement of interferon regulatory factor-1 in monocyte CD95 expression and CD95-mediated apoptosis. *Cell Death. Differ.* 10, 615-617.

Cuddihy,A.R., Li,S., Tam,N.W., Wong,A.H., Taya,Y., Abraham,N., Bell,J.C., and Koromilas,A.E. (1999). Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol. Cell Biol.* 19, 2475-2484.

Cuddihy,A.R., Wong,A.H., Tam,N.W., Li,S., and Koromilas,A.E. (1999). The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* 18, 2690-2702.

de Stanchina,E., Querido,E., Narita,M., Davuluri,R.V., Pandolfi,P.P., Ferbeyre,G., and Lowe,S.W. (2004). PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol. Cell* 13, 523-535.

Deppert,W. (1999). [The tumor suppressor p53: "guardian of our genomes"]. *Med. Monatsschr. Pharm.* 22, 166-173.

Donehower,L.A., Harvey,M., Slagle,B.L., McArthur,M.J., Montgomery,C.A., Jr., Butel,J.S., and Bradley,A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Draetta,G. e Eckstein,J. (1997). Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 1332, M53-M63.

Fearon,E.R. e Vogelstein,B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Ferreira,C.G., Tolis,C., Span,S.W., Peters,G.J., van Lopik,T., Kummer,A.J., Pinedo,H.M., and Giaccone,G. (2000). Drug-induced apoptosis in lung cancer cells is not mediated by the Fas/FasL (CD95/APO1) signaling pathway. *Clin. Cancer Res.* 6, 203-212.

Flores,C. e Sobrevia,L. (2000). [Tumorigenesis and mdm2 protein]. *Rev. Med. Chil.* 128, 539-546.

Gao,S.J., Boshoff,C., Jayachandra,S., Weiss,R.A., Chang,Y., and Moore,P.S. (1997). KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene which inhibits the interferon signaling pathway. *Oncogene* 15, 1979-1985.

Gately,S. (2000). The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 19-27.

Gil,J. e Esteban,M. (2000). The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* 19, 3665-3674.

Glisson,B.S. e Ross,W.E. (1987). DNA topoisomerase II: a primer on the enzyme and its unique role as a multidrug target in cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* 32, 89-106.

Gorbacheva,V.Y., Lindner,D., Sen,G.C., e Vestal,D.J. (2002). The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 277, 6080-6087.

Gottifredi,V. e Prives,C. (2001). P53 and PML: new partners in tumor suppression. *Trends Cell Biol.* 11, 184-187.

Grander,D., Sangfelt,O., and Erickson,S. (1997). How does interferon exert its cell growth inhibitory effect? *Eur. J. Haematol.* 59, 129-135.

Green,W.B., Slovak,M.L., Chen,I.M., Pallavicini,M., Hecht,J.L., and Willman,C.L. (1999). Lack of IRF-1 expression in acute promyelocytic leukemia and in a subset of acute myeloid leukemias with del(5)(q31). *Leukemia* 13, 1960-1971.

Guenzi,E., Topolt,K., Cornali,E., Lubeseder-Martellato,C., Jorg,A., Matzen,K., Zietz,C., Kremmer,E., Nappi,F., Schwemmle,M., Hohenadl,C., Barillari,G., Tschachler,E., Monini,P., Ensoli,B., and Sturzl,M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* 20, 5568-5577.

Guenzi,E., Topolt,K., Lubeseder-Martellato,C., Jorg,A., Naschberger,E., Benelli,R., Albini,A., and Sturzl,M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* 22, 3772-3782.

Guimaraes,D.P., De Moraes,E., Barnas,C., Gallo,C., and Hainaut,P. (2004). Regulation of the interferon-inducible Guanylate Binding Protein (GBP)-2 by p53 in an oesophageal carcinoma cell line. *Exp. Cell Res.* , *submitted*.

Guimaraes,D.P. e Hainaut,P. (2002). TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 84, 83-93.

Hainaut,P. e Hollstein,M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.* 77, 81-137.

Hanahan,D. e Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Harada,H., Kitagawa,M., Tanaka,N., Yamamoto,H., Harada,K., Ishihara,M., and Taniguchi,T. (1993). Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 259, 971-974.

Harada,H., Takahashi,E., Itoh,S., Harada,K., Hori,T.A., and Taniguchi,T. (1994). Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol. Cell Biol.* 14, 1500-1509.

Harada,H., Taniguchi,T., and Tanaka,N. (1998). The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. *Biochimie* 80, 641-650.

Haus,O. (2000). The genes of interferons and interferon-related factors: localization and relationships with chromosome aberrations in cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 48, 95-100.

Helin,K. (1998). Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 28-35.

Hellin,A.C., Bentires-Alj,M., Verlaet,M., Benoit,V., Gielen,J., Bours,V., and Merville,M.P. (2000). Roles of nuclear factor-kappaB, p53, and p21/WAF1 in daunomycin-induced cell cycle arrest and apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 870-878.

Hermeking,H., Lengauer,C., Polyak,K., He,T.C., Zhang,L., Thiagalingam,S., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1, 3-11.

Hickman,E.S., Moroni,M.C., and Helin,K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 60-66.

Hollstein,M., Sidransky,D., Vogelstein,B., and Harris,C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.

Issa,J.P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 988-993.

Jagus,R., Joshi,B., and Barber,G.N. (1999). PKR, apoptosis and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 123-138.

Janus,F., Albrechtsen,N., Dornreiter,I., Wiesmuller,L., Grosse,F., and Deppert,W. (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 12-27.

Jongmans,W., Artuso,M., Vuillaume,M., Bresil,H., Jackson,S.P., and Hall,J. (1996). The role of Ataxia telangiectasia and the DNA-dependent protein kinase in the p53-mediated cellular response to ionising radiation. *Oncogene* 13, 1133-1138.

Khurshid,A., Kazuya,N., Hanae,I., and Manabu,I. (1998). Infection of human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) and p53 expression in human esophageal carcinoma. *J. Pak. Med. Assoc.* 48, 138-142.

Kim,E.J., Park,C.H., Park,J.S., and Um,S.J. (2003). Functional dissection of the transactivation domain of interferon regulatory factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 253-259.

Kirchhoff,S., Koromilas,A.E., Schaper,F., Grashoff,M., Sonenberg,N., and Hauser,H. (1995). IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR. *Oncogene* 11, 439-445.

Kirchhoff,S., Oumard,A., Nourbakhsh,M., Levi,B.Z., and Hauser,H. (2000). Interplay between repressing and activating domains defines the transcriptional activity of IRF-1. *Eur. J. Biochem.* 267, 6753-6761.

Kohli,M. e Jorgensen,T.J. (1999). The influence of SV40 immortalization of human fibroblasts on p53-dependent radiation responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 168-176.

Komarova,E.A., Krivokrysenko,V., Wang,K., Neznanov,N., Chernov,M.V., Komarov,P.G., Brennan,M.L., Golovkina,T.V., Rokhlin,O., Kuprash,D.V., Nedospasov,S.A., Hazen,S.R., Feinstein,E., and Gudkov,A.V. (2005). p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *FASEB J.*

Kondo,T., Minamino,N., Nagamura-Inoue,T., Matsumoto,M., Taniguchi,T., and Tanaka,N. (1997). Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15, 1275-1281.

Krek,W. (1998). Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 36-42.

Kumar,A., Yang,Y.L., Flati,V., Der,S., Kadereit,S., Deb,A., Haque,J., Reis,L., Weissmann,C., and Williams,B.R. (1997). Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *EMBO J.* 16, 406-416.

Kumar,R. e Atlas,I. (1992). Interferon alpha induces the expression of retinoblastoma gene product in human Burkitt lymphoma Daudi cells: role in growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 6599-6603.

Kurokawa,H., Nishio,K., Fukumoto,H., Tomonari,A., Suzuki,T., and Saijo,N. (1999). Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 6, 33-37.

Levrero,M., De,L., V, Costanzo,A., Gong,J., Wang,J.Y., and Melino,G. (2000). The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 10), 1661-1670.

Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Lin,J., Zhu,M.H., Qu,J.H., Li,F.M., and Ni,C.R. (2004). [Effects of hepatitis B virus X gene on p21(WAF1) expression through p53-dependent and p53-independent pathways]. *Ai. Zheng.* 23, 749-755.

Lindner,D.J. and Borden,E.C. (1997). Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer* 71, 456-461.

Lok,A.S. (2004). Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127, S303-S309.

Lowe,S.W. e Lin,A.W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-495.

Maemura,M., Iino,Y., Horiguchi,J., Takei,H., Horii,Y., Koibuchi,Y., Yokoe,T., Takeyoshi,I., Ohwada,S., and Morishita,Y. (1999). Effects of interferon-alpha on cellular proliferation and adhesion of breast carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 6, 557-561.

Mahmutovic,S. e Beslagic,E. (2004). Significance of the interferon (IFN) in the therapy. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 4, 42-44.

Makin,G. e Hickman,J.A. (2000). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res.* 301, 143-152.

Massimi,P., Pim,D., Bertoli,C., Bouvard,V., and Banks,L. (1999). Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 18, 7748-7754.

Meek,D.W. (1994). Post-translational modification of p53. *Semin. Cancer Biol.* 5, 203-210.

Meier,P., Finch,A., and Evan,G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.

Miettinen,M., Lehtonen,A., Julkunen,I., and Matikainen,S. (2000). Lactobacilli and Streptococci activate NF-kappa B and STAT signaling pathways in human macrophages. *J. Immunol.* *164*, 3733-3740.

Miyakoda,M., Suzuki,K., Kodama,S., and Watanabe,M. (2002). Activation of ATM and phosphorylation of p53 by heat shock. *Oncogene* *21*, 1090-1096.

Molinari,M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* *33*, 261-274.

Mori,T., Anazawa,Y., Iizumi,M., Fukuda,S., Nakamura,Y., and Arakawa,H. (2002). Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* *21*, 2914-2918.

Nakagawa,K e Yokosawa,H. (2000). Degradation of transcription factor IRF-1 by the ubiquitin-proteasome pathway. The C-terminal region governs the protein stability. *Eur. J. Biochem.* *267*, 1680-1686.

Naschberger,E., Werner,T., Vicente,A.B., Guenzi,E., Topolt,K., Leubert,R., Lubeseder-Martellato,C., Nelson,P.J., and Sturzl,M. (2004). Nuclear factor-kappaB motif and interferon-alpha-stimulated response element co-operate in the activation of guanylate-binding protein-1 expression by inflammatory cytokines in endothelial cells. *Biochem. J.* *379*, 409-420.

Neun,R., Richter,M.F., Staeheli,P., and Schwemmle,M. (1996). GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett.* *390*, 69-72.

Nicoletti,I., Migliorati,G., Pagliacci,M.C., Grignani,F., and Riccardi,C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* *139*, 271-279.

North,S., Pluquet,O., Maurici,D., El Ghissassi,F., and Hainaut,P. (2002). Restoration of wild-type conformation and activity of a temperature-sensitive mutant of p53 (p53(V272M)) by the cytoprotective aminothiols WR1065 in the esophageal cancer cell line TE-1. *Mol. Carcinog.* *33*, 181-188.

Nozawa,H., Oda,E., Ueda,S., Tamura,G., Maesawa,C., Muto,T., Taniguchi,T., and Tanaka,N. (1998). Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer. *Int. J. Cancer* *77*, 522-527.

Nylander,K., Vojtesek,B., Nenutil,R., Lindgren,B., Roos,G., Zhanxiang,W., Sjostrom,B., Dahlqvist,A., and Coates,P.J. (2002). Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J. Pathol.* *198*, 417-427.

Oren,M., Damalas,A., Gottlieb,T., Michael,D., Taplick,J., Leal,J.F., Maya,R., Moas,M., Seger,R., Taya,Y., and Ben Ze'Ev,A. (2002). Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *973*, 374-383.

Pamment,J., Ramsay,E., Kelleher,M., Dornan,D., and Ball,K.L. (2002). Regulation of the IRF-1 tumour modifier during the response to genotoxic stress involves an ATM-dependent signalling pathway. *Oncogene* *21*, 7776-7785.

Papageorgiou,A., Lashinger,L., Millikan,R., Grossman,H.B., Benedict,W., Dinney,C.P., and McConkey,D.J. (2004). Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in interferon-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 8973-8979.

Parmar,S. e Plataniias,L.C. (2003). Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr. Opin. Oncol.* *15*, 431-439.

Pearson,M. e Pelicci,P.G. (2001). PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence. *Oncogene* *20*, 7250-7256.

Peralta,R.C., Casson,A.G., Wang,R.N., Keshavjee,S., Redston,M., and Bapat,B. (1998). Distinct regions of frequent loss of heterozygosity of chromosome 5p and 5q in human esophageal cancer. *Int. J. Cancer* *78*, 600-605.

Pines,J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* *1*, E73-E79.

Piret,B., Schoonbroodt,S., and Piette,J. (1999). The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage. *Oncogene* *18*, 2261-2271.

Pitha,P.M. (2000). Introduction: interferon's connection to cancer. *Semin. Cancer Biol.* *10*, 69-72.

Pizzoferrato,E., Liu,Y., Gambotto,A., Armstrong,M.J., Stang,M.T., Gooding,W.E., Alber,S.M., Shand,S.H., Watkins,S.C., Storkus,W.J., and Yim,J.H. (2004). Ectopic expression of interferon regulatory factor-1 promotes human breast cancer cell death and results in reduced expression of survivin. *Cancer Res.* *64*, 8381-8388.

Prakash,B., Praefcke,G.J., Renault,L., Wittinghofer,A., and Herrmann,C. (2000). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* 403, 567-571.

Qin,X.Q., Runkel,L., Deck,C., DeDios,C., and Barsoum,J. (1997). Interferon-beta induces S phase accumulation selectively in human transformed cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 355-367.

Rogozinska-Szczepka,J., Utracka-Hutka,B., Grzybowska,E., Maka,B., Nowicka,E., Smok-Ragankiewicz,A., Zientek,H., Steffen,J., and Wojciechowska-Lacka,A. (2004). BRCA1 and BRCA2 mutations as prognostic factors in bilateral breast cancer patients. *Ann. Oncol.* 15, 1373-1376.

Ronco,L.V., Karpova,A.Y., Vidal,M., and Howley,P.M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 12, 2061-2072.

Royds,J.A., Dower,S.K., Qwarnstrom,E.E., and Lewis,C.E. (1998). Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *Mol. Pathol.* 51, 55-61.

Sherr,C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555.

Sherr,C.J. e Roberts,J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.

Signoretti,S., Waltregny,D., Dilks,J., Isaac,B., Lin,D., Garraway,L., Yang,A., Montironi,R., McKeon,F., and Loda,M. (2000). p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am. J. Pathol.* 157, 1769-1775.

Stark,G.R., Kerr,I.M., Williams,B.R., Silverman,R.H., and Schreiber,R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.

Strehlow,I., Lohmann-Matthes,M.L., and Decker,T. (1994). The interferon-inducible GBP1 gene: structure and mapping to human chromosome 1. *Gene* 144, 295-299.

Stuart,E.T., Haffner,R., Oren,M., and Gruss,P. (1995). Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* 14, 5638-5645.

Subramaniam,P.S., Cruz,P.E., Hobeika,A.C., and Johnson,H.M. (1998). Type I interferon induction of the Cdk-inhibitor p21WAF1 is accompanied by ordered G1 arrest, differentiation and apoptosis of the Daudi B-cell line. *Oncogene* 16, 1885-1890.

Suk,K., Kim,S., Kim,Y.H., Kim,K.A., Chang,I., Yagita,H., Shong,M., and Lee,M.S. (2001). IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J. Immunol.* *166*, 4481-4489.

Takahashi,Y., Lallemand-Breitenbach,V., Zhu,J., and de The,H. (2004). PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* *23*, 2819-2824.

Takaoka,A., Hayakawa,S., Yanai,H., Stoiber,D., Negishi,H., Kikuchi,H., Sasaki,S., Imai,K., Shibue,T., Honda,K., and Taniguchi,T. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* *424*, 516-523.

Tamura,G., Ogasawara,S., Nishizuka,S., Sakata,K., Maesawa,C., Suzuki,Y., Terashima,M., Saito,K., and Satodate,R. (1996). Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Cancer Res.* *56*, 612-615.

Tamura,T., Ishihara,M., Lamphier,M.S., Tanaka,N., Oishi,I., Aizawa,S., Matsuyama,T., Mak,T.W., Taki,S., and Taniguchi,T. (1995). An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature* *376*, 596-599.

Tamura,T., Ishihara,M., Lamphier,M.S., Tanaka,N., Oishi,I., Aizawa,S., Matsuyama,T., Mak,T.W., Taki,S., and Taniguchi,T. (1997). DNA damage-induced apoptosis and Ice gene induction in mitogenically activated T lymphocytes require IRF-1. *Leukemia* *11 Suppl 3*, 439-440.

Tanaka,H., Arakawa,H., Yamaguchi,T., Shiraishi,K., Fukuda,S., Matsui,K., Takei,Y., and Nakamura,Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* *404*, 42-49.

Tanaka,N., Ishihara,M., Kitagawa,M., Harada,H., Kimura,T., Matsuyama,T., Lamphier,M.S., Aizawa,S., Mak,T.W., and Taniguchi,T. (1994). Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* *77*, 829-839.

Tanaka,N., Ishihara,M., Lamphier,M.S., Nozawa,H., Matsuyama,T., Mak,T.W., Aizawa,S., Tokino,T., Oren,M., and Taniguchi,T. (1996). Cooperation of the

tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* 382, 816-818.

Tanaka,N. e Taniguchi,T. (2000). The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 10, 73-81.

Taniguchi,T. (1995). IRF-1 and IRF-2 as regulators of the interferon system and cell growth. *Indian J. Biochem. Biophys.* 32, 235-239.

Taniguchi,T., Lamphier,M.S., and Tanaka,N. (1997). IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1333, M9-17.

Taniguchi,T., Ogasawara,K., Takaoka,A., and Tanaka,N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 623-655.

Thellin,O., Zorzi,W., Lakaye,B., De Borman,B., Coumans,B., Hennen,G., Grisar,T., Igout,A., and Heinen,E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75, 291-295.

Thyrell,L., Erickson,S., Zhivotovsky,B., Pokrovskaja,K., Sangfelt,O., Castro,J., Einhorn,S., and Grander,D. (2002). Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21, 1251-1262.

Tiwari,R.K., Wong,G.Y., Liu,J., Miller,D., and Osborne,M.P. (1991). Augmentation of cytotoxicity using combinations of interferons (types I and II), tumor necrosis factor-alpha, and tamoxifen in MCF-7 cells. *Cancer Lett.* 61, 45-52.

Tnani,M. e Bayard,B.A. (1999). Evidence for IRF-1-dependent gene expression deficiency in interferon unresponsive HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 59-72.

Tolis,C., Peters,G.J., Ferreira,C.G., Pinedo,H.M., and Giaccone,G. (1999). Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* 35, 796-807.

Townsend,P.A., Scarabelli,T.M., Davidson,S.M., Knight,R.A., Latchman,D.S., and Stephanou,A. (2004). STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 5811-5820.

Vannucchi,S., Percario,Z.A., Chiantore,M.V., Matarrese,P., Chelbi-Alix,M.K., Fagioli,M., Pelicci,P.G., Malorni,W., Fiorucci,G., Romeo,G., and Affabris,E. (2000).

Interferon-beta induces S phase slowing via up-regulated expression of PML in squamous carcinoma cells. *Oncogene* 19, 5041-5053.

Vogelstein,B. e Kinzler,K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 10, 789-799.

Vogelstein,B., Lane,D., and Levine,A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.

Waldman,T., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 55, 5187-5190.

Wang,X.W., Zhan,Q., Coursen,J.D., Khan,M.A., Kontny,H.U., Yu,L., Hollander,M.C., O'Connor,P.M., Fornace,A.J., Jr., and Harris,C.C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3706-3711.

Wong,L.H., Sim,H., Chatterjee-Kishore,M., Hatzinisiriou,I., Devenish,R.J., Stark,G., and Ralph,S.J. (2002). Isolation and characterization of a human STAT1 gene regulatory element. Inducibility by interferon (IFN) types I and II and role of IFN regulatory factor-1. *J. Biol. Chem.* 277, 19408-19417.

Yeung,M.C. e Lau,A.S. (1998b). Tumor suppressor p53 as a component of the tumor necrosis factor-induced, protein kinase PKR-mediated apoptotic pathway in human promonocytic U937 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 25198-25202.

Zhang,X.X., Thomis,D.C., and Samuel,C.E. (1989). Isolation and characterization of a molecular cDNA clone of a human mRNA from interferon-treated cells encoding nucleolar protein B23, numatrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 176-184.