

**KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO**

**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO  
CICLO CELULAR E APOPTOSE NOS LINFOMAS NÃO-  
HODGKIN AGRESSIVOS E INFLUÊNCIA NA RESPOSTA  
AO TRATAMENTO**

**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO  
CELULAR E APOPTOSE NOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN  
AGRESSIVOS E INFLUÊNCIA NA RESPOSTA  
AO TRATAMENTO**

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,  
apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em  
Clínica Médica, área de Clínica Médica, da médica KATIA  
BORGIA BARBOSA PAGNANO.*

*01/07/2002*



*Profª. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad  
Orientadora*

**CAMPINAS**

**CAMP 2002**

2002

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

200307519

**KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO**

***AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO  
CELULAR E APOPTOSE NOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN  
AGRESSIVOS E INFLUÊNCIA NA RESPOSTA  
AO TRATAMENTO***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção  
do título de Doutor em Clínica Médica.*

***ORIENTADORA: PROFA.DRA. SARA T. O. SAAD***

***CO-ORIENTADOR: PROF.DR. JOSÉ VASSALLO***

**CAMPINAS**

**2002**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P148a Pagnano, Kátia Borgia Barbosa  
Avaliação das proteínas reguladoras do ciclo celular e apoptose nos linfomas não Hodgkin agressivos e influência na resposta ao tratamento / Kátia Borgia Barbosa Pagnano. Campinas, SP : [s.n.], 2002.  
Orientadores : Sara Terezinha Olala Saad, José Vassallo  
Tese ( Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
1. Apoptose. 2. Hodgkin, Linfoma não. 3. Prognóstico. I. Sara Terezinha Olala Saad. II. José Vassallo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP P148a
V	EX
TOMBO BC	52724
PROC.	16-124703
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/03/03
Nº CPD	

CM00180730-5

BIB ID 284962

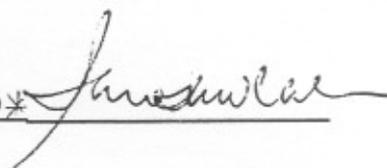
---

**Banca Examinadora da Tese de Doutorado**

**Aluno(a): KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO**

---

**Orientador(a): Profa.Dra. SARA TERESINHA OLLALA SAAD**

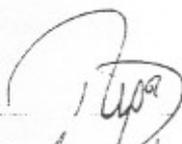


---

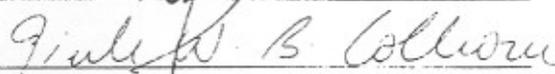
**Membros:**

---

Professor Doutor Eduardo Magalhães Rego



Professora Doutora Gisele Wally Braga Colleoni



Professora Doutora Irene Gyongyver Heidemarie Lorand-Metze



Professor Doutor Fernando Ferreira Costa



---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 01/07/2002**

---

*DEDICATÓRIA*

*Às minhas pais, Alzideia e Tereza*

*À meu marido, Ricardo*

*À meu filho, Renato*

***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, Alcides e Vera.*

*Ao meu marido Rodrigo.*

*Ao meu filho Renato.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

À Profa. Sara Teresinha Olalla Saad, a quem realmente posso chamar de orientadora, meus sinceros agradecimentos pela orientação nesta tese e nos trabalhos desenvolvidos, pelo incentivo, pelo aprendizado no campo da pesquisa em biologia molecular e sobretudo pela paciência e compreensão durante todos esses anos.

Ao Prof. José Vassallo, co-orientador desta tese, cujas sugestões foram fundamentais para realização deste trabalho.

À Profa. Irene Lorand-Metze, pelas sugestões na realização deste trabalho, além dos ensinamentos na área de onco-hematologia, cito e histologia e análise estatística, que muito contribuíram na minha formação como hematologista.

Ao Prof. Cármino Antônio de Souza, a quem devo muito do aprendizado da pesquisa clínica, além dos diversos ensinamentos do dia-a-dia na área de Onco-Hematologia.

Ao Prof. Fernando Ferreira Costa, pelo apoio na realização desta tese e pelos ensinamentos nos ambulatórios de terça.

Ao Helymar, da Comissão de Estatística da FCM, pela realização da análise estatística.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental, Glauce, Marisa, Cristiano, Fernanda, Ana, pelo auxílio nas reações imunohistoquímicas.

Aos funcionários, ex-funcionários e amigos do laboratório de Biologia Molecular, Lena, Carlos, Natasha, Tereza, Silvana Bordin, Mônica Mello, Ângela, Dulcinéia, e demais não citados, pela ajuda e paciência no aprendizado dos métodos de biologia molecular, além do agradável convívio e torcida.

Ao Marcos Damiano Silva, pela preparação das lâminas e reações imunohistoquímicas dos anticorpos Bax, Bak, Bcl-2 e Mcl-1.

Aos meus queridos e velhos amigos do Hemocentro, Aranha, Marga, Gislaine, Lupa (agora de volta), Valder, Afonso que sempre participaram de todos os bons (e maus) momentos da minha vida; e aos novos companheiros, Márcia e André.

Aos residentes e ex-residentes que acompanharam o trabalho e cuja convivência diária tornou tudo mais divertido: Ana Maria Lobo, Fabíola, Dani, Erich, Fernanda, Paulo.

Às secretárias do Hemocentro: Arlete, sempre me ajudando nas minhas dúvidas e não me deixando esquecer meus compromissos; à Nicete, sempre prestativa; à Raquel, pelas ajudas nos trabalhos.

À CNPQ pelo auxílio financeiro.

À minha família, sempre presente, pelo apoio incondicional.

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xxix
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	59
<b>PACIENTES E MÉTODOS</b> .....	63
Pacientes e amostras.....	65
Técnicas laboratoriais.....	66
Imunohistoquímica.....	67
Extração de DNA.....	72
PCR.....	75
Sequenciamento.....	75
Análise estatística.....	76
<b>RESULTADOS</b> .....	79
Expressão das proteínas p53, p21/WAF-1, Mdm2 c-Myc e PCNA nos LNH de alto grau de malignidade histológico.....	81
Correlação da expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular (p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc e PCNA) e da apoptose (Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1) com: tipo histológico, fatores prognósticos, resposta à quimioterapia, sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD).....	87
Pesquisa de mutações do gene <i>p53</i> .....	103
<b>DISCUSSÃO</b> .....	105
<b>CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>SUMMARY</b> .....	121

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>149</b>
Anexo I: Tabelas de dados clínicos.....	151
Anexo II: Publicações.....	155

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ALK	Quinase linfoma anaplásico
ARF	<i>Alternative reading frame</i>
ATM	Ataxia teleangiectasia (mutated)
CDK	Quinases Ciclina-dependentes
CHK2	<i>Check point kinase 2</i>
CSA	<i>Catalyzed signal amplification sistem</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
GADD45	<i>Growth arrest and dna damage inducible gene</i>
IPI	Índice Prognóstico Internacional
LDH	Lactato desidrogenase
LLC	Leucemia linfóide crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
NES	Sinal de exportação nuclear
P21/WAF-1	<i>Wild-type activated fragment</i>
P53CP	Proteína competidora da p53
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Reação da cadeia de polimerase
PD	Doença progressiva
RB	Retinoblastoma

RC	Remissão completa
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Rna mensageiro
RP	Remissão parcial
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SR	Sem resposta
SV40	<i>Simian vírus 40</i>
UV	Ultra-violeta

		<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1:</b>	Translocações cromossômicas nos LNH.....	37
<b>Tabela 2:</b>	Genes celulares transcricionalmente regulados pelo <i>p53</i> .....	42
<b>Tabela 3:</b>	Classificação histopatológica de 113 casos de LNH agressivos.....	66
<b>Tabela 4:</b>	Iniciadores usados no PCR do gene <i>p53</i> .....	74
<b>Tabela 5:</b>	Padronização da técnica de PCR para o gene <i>p53</i> .....	74
<b>Tabela 6:</b>	Análise imunohistoquímica de 113 casos de LNH de alto grau de malignidade histológica, com os anticorpos <i>p53</i> , <i>p21/WAF-1</i> , <i>Mdm2</i> , <i>c-Myc</i> e <i>PCNA</i> .....	82
<b>Tabela 7:</b>	LNH agressivos. Dados dos pacientes ao diagnóstico e resposta ao tratamento (n=62).....	88
<b>Tabela 8:</b>	Correlação da expressão de <i>p53</i> e <i>c-Myc</i> e <i>p53/p21WAF1 status</i> com resposta à quimioterapia nos LNH agressivos.....	89
<b>Tabela 9:</b>	Análise da sobrevida global de pacientes com LNH agressivos $\leq$ 55 anos, de acordo com a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular.....	95
<b>Tabela 10:</b>	Características clínicas de 33 pacientes com LNH difuso de grandes células B.....	97
<b>Tabela 11:</b>	Testes de associação para RC em 26 casos de LNH difuso de grandes células B.....	98
<b>Tabela 12:</b>	Análise multivariada de fatores que influenciam SG (modelo de regressão de Cox).....	99

<b>Tabela 13:</b> Análise de regressão de Cox univariada para SG em 33 pacientes com LNH difuso de grandes células B.....	100
<b>Tabela 14:</b> Resultados das reações de sequenciamento dos éxons 6 e 9.....	103

	<i>PÁG.</i>
<b>Figura 1:</b> Pontos de checagem do ciclo celular.....	39
<b>Figura 2:</b> Ciclo celular e suas relações com as ciclinas, CDKs e a proteína Rb.....	40
<b>Figura 3:</b> Conseqüências de mutações do <i>p53</i> .....	44
<b>Figura 4:</b> Mecanismo do controle da <i>p19<sup>ARF</sup></i> sobre as funções do <i>p53</i> .....	46
<b>Figura 5:</b> Controle da exportação nuclear e degradação da <i>p53</i> pela <i>Mdm2</i> .....	47
<b>Figura 6:</b> Membros da família da proteína <i>Bcl-2</i> e suas interações.....	53
<b>Figura 7:</b> Mecanismo de apoptose celular.....	55
<b>Figura 8:</b> Interrupção do ciclo celular e apoptose mediados pelo <i>p53</i> .....	57
<b>Figura 9:</b> Reação imunohistoquímica com o anticorpo <i>p53</i> .....	83
<b>Figura 10:</b> Reação imunohistoquímica com o anticorpo <i>p53</i> .....	83
<b>Figura 11:</b> Reação imunohistoquímica com o anticorpo <i>p21/WAF-1</i> .....	84
<b>Figura 12:</b> Reação imunohistoquímica com o anticorpo <i>p21/WAF-1</i> .....	84
<b>Figura 13:</b> Reação imunohistoquímica com os anticorpos <i>Mdm2</i> e <i>PCNA</i> ....	85
<b>Figura 14:</b> Reação imunohistoquímica com os anticorpos <i>Mdm2</i> e <i>PCNA</i> ....	85
<b>Figura 15A:</b> Reação imunohistoquímica com o anticorpo <i>c-Myc</i> .....	86
<b>Figura 15B:</b> Reação imunohistoquímica com o anticorpo <i>c-Myc</i> .....	86
<b>Figura 16:</b> Reação de sequenciamento do gene <i>p53</i> (LNH difuso de grandes B).....	104

	<i>PÁG.</i>
<b>Gráfico 1:</b> Sobrevida global de 61 pacientes com LNH de acordo com a expressão da p53.....	91
<b>Gráfico 2:</b> Sobrevida global de 44 pacientes com LNH de acordo com a expressão de Mdm2.....	92
<b>Gráfico 3:</b> Sobrevida global de 51 pacientes com LNH de acordo com a expressão de c-Myc.....	93
<b>Gráfico 4:</b> Sobrevida global de 59 pacientes com LNH de acordo com o <i>status</i> p53/p21/WAF1. A-p53(-)/p21/WAF-1(+) ou (-); B-p53(+)/p21/WAF-1(-); C-p53 (+)/p21/WAF1(+)......	94
<b>Gráfico 5:</b> Sobrevida global de pacientes com LNH difusos de grandes células B, de acordo com a expressão da p53.....	101
<b>Gráfico 6:</b> Sobrevida global para LNH difuso de grandes células B de acordo com a expressão da Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1.....	102



*RESUMO*

Os linfomas não-Hodgkin (LNH) agressivos constituem um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas. Os LNH difusos de grandes células B compreendem cerca de 20-25% dos LNH. O tratamento quimioterápico pode curar apenas 40-50% dos pacientes adultos com linfomas agressivos. São considerados indicadores prognósticos: idade, número de sítios extranodais, LDH, performance status e estadiamento clínico.

Além desses fatores, anormalidades das proteínas reguladoras do ciclo celular e da apoptose parecem ser um importante mecanismo de desenvolvimento de neoplasias e podem ter um papel no prognóstico dos linfomas agressivos.

A expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular, p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc e PCNA (proliferating cell nuclear antigen) foram avaliadas através da análise imunohistoquímica de biópsias de gânglio, fixadas em formol e embebidas em parafina de 113 casos de LNH de alto grau de malignidade histológica, sendo que em 62 pacientes com LNH agressivos a expressão das proteínas foi correlacionada com dados clínicos e de sobrevida. Expressão de p53, p21/WAF-1, Mdm2 e c-Myc foi observada em 17/62 (30%), 25/60 (42%), 13/44 (30%) e 39/51 (76.5%) dos casos, respectivamente. O fenótipo p53+/p21WAF-1 negativo, que é mais frequentemente encontrado nos casos com mutações do p53, foi associado com menor sobrevida global (SG), ( $P=0.04$ ) e uma menor taxa de remissão completa (RC) ( $P=0.01$ ). Expressão negativa de p53 e c-Myc foram relacionadas a uma melhor resposta à quimioterapia ( $P=0.005$  e  $0.035$ , respectivamente). A expressão de p53, c-Myc e Mdm2 foi associada a uma menor SG ( $P < 0.001$ ,  $0.05$  e  $0.037$  respectivamente), sugerindo que a expressão dessas proteínas poderia estar associada a um pior prognóstico nesses pacientes.

Além da análise da expressão da p53, pesquisamos a presença de mutações do gene p53 nos casos com hiperexpressão da proteína ( $n=17$ ). Foi possível extrair DNA de 15 casos. A amplificação dos éxons 5-9 do p53 teve êxito em 7 casos, com o achado de uma mutação de ponto no éxon 6 (Val→Glu;T→A), num paciente com hiperexpressão da p53 e expressão negativada p21/WAF-1.

Avaliamos também a expressão de proteínas reguladoras da apoptose (p53, Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1) de 33 pacientes com LNH difusos de grandes células B e analisamos a relação entre a expressão dessas proteínas com dados clínicos e resposta à quimioterapia.

Nossos resultados mostraram que a expressão da p53 foi considerada um parâmetro imunohistoquímico independente relacionado a um pior prognóstico nesses linfomas. Apesar da alta expressão observada das proteínas Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1, não foi encontrado associação com prognóstico ou resposta ao tratamento.



*INTRODUÇÃO*

Os linfomas não-Hodgkin (LNH) compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias do sistema linfóide, derivadas principalmente de células B (85-90% dos casos) e, mais raramente, de células T (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).

A incidência de LNH tem aumentado substancialmente durante as últimas décadas (DEVESA et al, 1992). Entre 1973 e 1992, houve aumento cerca de 77% para população masculina e 66% para a população feminina. A projeção dessas taxas indica que, nos próximos 15 anos, haverá um aumento na incidência de aproximadamente 55% nos homens e 79% nas mulheres (BRAY et al, 2001). Nos Estados Unidos é a quinta causa de óbitos relacionados a neoplasias (GREENLEE et al, 2001). Cerca da metade desses casos são linfomas agressivos. No entanto, somente 40% são curados com quimioterapia convencional (SHIPP et al, 1993; The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997), justificando-se a necessidade da identificação de fatores prognósticos que sejam capazes de estratificar casos de pior evolução, para que possam ser submetidos a novas abordagens terapêuticas.

Nos linfomas agressivos foram identificados alguns fatores prognósticos, como a idade ao diagnóstico, presença ou ausência de sintomas B, *performance status*, dosagem de lactato desidrogenase (LDH), número de sítios extranodais, grandes massas e doença avançada. Cinco fatores prognósticos que apresentaram significância em análise multivariada foram utilizados no cálculo do Índice Prognóstico Internacional (IPI)(SHIPP et al, 1993): *performance status* (ECOG:2-4)(CONILL, 1990), idade >60 anos, estadió clínico de Ann Arbor avançado (III/IV), dosagem da LDH (> 1 vez o normal) e > 1 sítio extranodal. O IPI é um modelo de risco desenvolvido para prever a evolução de pacientes com LNH agressivos. De acordo com o IPI, os pacientes são classificados em 4 grupos de risco, através da soma dos fatores presentes ao diagnóstico: baixo risco (0 a 1 fatores), risco baixo intermediário (2 fatores), risco alto intermediário (3 fatores) ou alto risco (4 ou 5 fatores).

Além dos fatores clínicos, características celulares e moleculares também são capazes de definir grupos de pacientes com pior prognóstico. Deste modo, várias lesões genéticas estão presentes nos LNH, como a ativação de proto-oncogenes causadas por translocações cromossômicas (*c-myc*, *bcl-2*, *bcl-6*, *bcl-10*, *bcl-1*, *NPM/ALK*) e a inativação

de genes supressores tumorais (*p53*, *p16*, *ATM*) (PASQUALUCCI & DALLA-FAVERA, 2001).

As translocações cromossômicas representam o mecanismo principal de ativação de proto-oncogenes nos LNH. São constituídas por eventos de recombinações recíprocas e balanceadas entre dois sítios cromossômicos específicos. Essas translocações são caracterizadas pela recorrência dentro de uma categoria específica clínico-patológica. As translocações mais freqüentes nos LNH estão listadas na **tabela 1**. As translocações cromossômicas contribuem para o surgimento do linfoma, porém não são suficientes para causá-lo, sendo necessárias múltiplas lesões genéticas para o processo de desenvolvimento tumoral.

A inativação de genes supressores tumorais nos LNH ocorre através de mecanismos semelhantes aos associados com outras neoplasias humanas, onde ocorre a inativação dos 2 alelos, mais freqüentemente através da deleção de um alelo e mutação do outro. Os genes supressores tumorais mais freqüentemente envolvidos na patogênese dos LNH são representados pelo *p53* (IMAMURA et al, 1994), *p16* (PYNIOL et al, 1997) e *ATM* (gene com mutação da ataxia teleangiectasia). Esse último gene produz uma proteína capaz de fosforilar e ativar o gene *p53* em resposta à lesão do DNA, causando uma interrupção na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular (BARLOW et al, 1997; BANIN et al, 1998; CANMAN et al, 1998).

Em vista do exposto, o estudo da expressão das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e apoptose, nos quais o gene *p53* tem um papel central, pode ser útil para melhor entendimento da patogênese dos LNH e determinação do prognóstico desses pacientes.

**Tabela 1:** Translocações cromossômicas nos LNH

<b>Tipo histológico</b>	<b>Translocação</b>	<b>casos afetados (%)</b>	<b>Proto-oncogenes envolvidos</b>	<b>Mecanismo de ativação do proto-oncogene</b>	<b>Função do proto-oncogene</b>
Linfoma linfoplasmocítico	t(9;14)(p13;q32)	50	<i>PAX-5</i>	Desregulação transcricional	Fator de transcrição regulador da proliferação e diferenciação de células B
Linfoma folicular	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p11;q21) t(18;22)(q21;q11)	90	<i>bcl-2</i>	Desregulação transcricional	Anti- apoptose
Linfoma de células do manto	t(11;14)(q13;q32)	70	<i>bcl-1 /cyclina D1</i>	Desregulação transcricional	Regulador do ciclo celular
Linfoma MALT	t(11;18)(q21;q21) t(1;14)(p22;q32)	50 raro	<i>API2/MLT</i> <i>bcl-10</i>	Proteína de fusão Desregulação transcricional	Anti-apoptose Anti-apoptose ?
Linfoma B de grandes células	der(3)(q27)	35	<i>bcl-6</i>	Desregulação transcricional	Repressor transcricional necessário para formação do centro germinativo
Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	80 15 5	<i>c-myc</i>	Desregulação transcricional	Fator de transcrição regulador da proliferação e crescimento celular
Linfoma anaplásico T	t(2;5)(p23;q35)	60	<i>NPM/ALK</i>	Proteína de fusão	ALK - tirosina quinase

(adaptado de PASQUALUCCI &amp; DALLA-FAVERA, 2001)

# GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E APOPTOSE

## 1. Regulação do ciclo celular

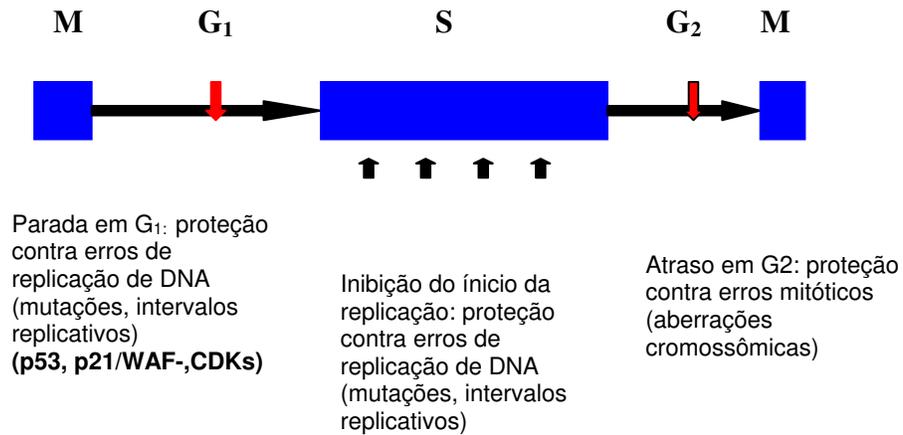
A fração de crescimento das células é determinada pela porcentagem de células que estão em progressão no ciclo celular. O ciclo celular corresponde ao intervalo entre cada divisão celular e consiste em quatro fases com duração distinta (KAUFFMAN, 1996). Durante a fase S (síntese) ocorre a replicação do DNA e durante a fase M (mitose) observa-se a separação dos cromossomos e divisão celular, gerando duas células filhas. A fase  $G_1$  (gap) é o intervalo entre o fim da mitose e o início da próxima fase S. A fase  $G_2$  é o intervalo entre o término da fase S e o início da M e a fase  $G_0$  é representada pelas células que estão quiescentes.

Os pontos de checagem do ciclo celular são posições de controle que asseguram que eventos essenciais no ciclo celular sejam completados antes de um evento subsequente. Permitem que haja tempo necessário para o reparo do DNA danificado antes da replicação e mitose. Quebras no DNA parecem induzir uma interrupção na fase  $G_1$ , adiando a progressão das células em  $G_1$  para a fase S até que o reparo seja concluído. Outros pontos de checagem podem ser observados nas células em fase S ou  $G_2$ . O ponto de checagem em  $G_2$  impede que as células lesadas entrem em mitose até que o reparo seja feito. Desse modo, garantem replicação e segregação cromossômicas sem ocorrência de mutações ou aberrações (**figura 1**).

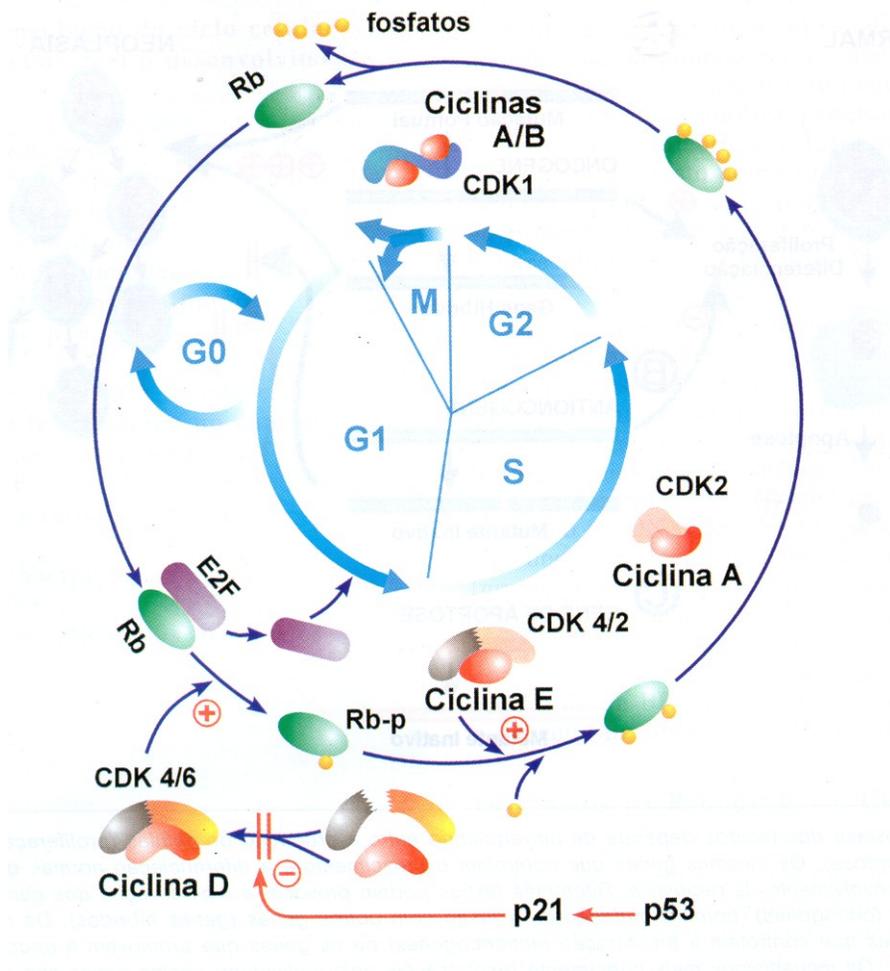
A perda de regulação de qualquer etapa do ciclo celular pode resultar no acúmulo de células com defeitos genéticos. As proteínas p53 e a p21/WAF-1, induzida pela p53, são peças fundamentais na interrupção do ciclo celular no ponto de checagem  $G_1/S$  (HARRIS et al, 1993; EL-DEIRY et al, 1993).

Quando o ciclo celular é temporariamente interrompido no ponto de checagem da transição  $G_1/S$ , as células têm duas possibilidades: progressão para a fase S ou início do processo de apoptose. A passagem para a fase S requer a ativação de enzimas, as quinases

ciclina-dependentes (CDKs), que ativam as ciclinas, necessárias para a síntese de DNA (figura 2). A proteína p21/WAF-1 é um inibidor do complexo ciclina/CDKs.



**Figura 1:** Pontos de checagem do ciclo celular em resposta à lesões do DNA (KAUFMANN & PAULES, 1996).



**Figura 2:** Ciclo celular e suas relações com as ciclinas, quinases ciclina-dependentes (CDKs) e a proteína Rb. As ciclinas combinam-se com as respectivas CDKs, ativando-as; a CDK ativada fosforila proteínas críticas para o progresso no ciclo celular. A ciclina D ativa CDK 4 e 6, que fosforilam a proteína Rb. A proteína Rb desfosforilada está ligada a vários fatores de crescimento, entre eles o E2F e à medida que vai sendo fosforilada, libera o E2F, que ativa genes relacionados com a síntese de DNA, desencadeando o ciclo de divisão celular. No final da mitose, a Rb é desfosforilada, ligando-se com o E2F e inibindo o ciclo celular. A proteína p53 induz a produção de p21/WAF-1, um inibidor do complexo ciclina D/CDK 4/6. (ZAGO & GARICOCHEA, 2001).

## 1.1. REGULAÇÃO E FUNÇÃO DA p53

O gene *p53*, localizado no cromossomo 17, foi identificado pela primeira vez em 1979, em virtude de sua associação com o vírus simiano 40 (SV40) (*simian virus 40 large T-antigen*) e sua alta expressão em tumores quimicamente induzidos ou em células espontaneamente transformadas (LINZER et al, 1979).

O *p53* age como um gene supressor tumoral, cuja função está freqüentemente comprometida nas neoplasias hematológicas e não hematológicas (NIGRO et al, 1989; WEINBERG et al, 1991; OREN et al, 1992; CESARMAN et al, 1992; NERI et al, 1993; BALDINI et al, 1994; IMAMURA et al, 1994; OLINER et al, 1994, GREENBLATT et al, 1994). As alterações genéticas do *p53* nos tumores humanos incluem perdas alélicas, mutações com troca de um aminoácido ou desvio de leitura e deleções intragênicas. Mutações do *p53* são encontradas em aproximadamente 50% das neoplasias humanas (NIGRO et al, 1989; HARRIS et al, 1993; CHANG et al, 1995), sendo a maioria delas constituída por substituições de bases, que levam à produção de uma proteína incapaz de se ligar ao DNA ou de ativar a transcrição de genes alvos (VOGELSTEIN et al, 1992; HARRIS et al, 1993). Alguns desses genes que estão sob a modulação do *p53* estão descritos na **tabela 2**.

**Tabela 2: Genes transcricionalmente regulados pelo p53**

---

<b>Ativados pelo p53</b>	
<i>Bax/Bak</i>	Indutor da apoptose (membro da família do Bcl-2)
<i>FAS/Apo1</i>	Indutor da apoptose; receptor da superfície celular
<i>Ciclina G</i>	Componente do ciclo celular
<i>GD-AIF</i>	Fator inibidor da angiogênese
<i>HIC1</i>	<i>Gene hypermetelated in cancer</i>
<i>IGF-BP3</i>	<i>IGF-binding protein, insulin growth factor pathway inhibitor</i>
<i>MCK</i>	<i>Muscle creatine kinase</i>
<i>Mdm2</i>	<i>Mouse double minute no.2 oncoprotein; regulador negativo do p53</i>
<i>p21/WAF1-CIP1</i>	<i>Wild-type activated fragment 1: ciclina-CDK e inibidor da replicação do DNA; regulador do ciclo celular</i>
Trombospondina	Inibidor da angiogênese

---

<b>Reprimidos pelo p53</b>	
<i>bcl-2</i>	Inibidor da apoptose
<i>c-myc</i>	Oncoproteína celular
<i>FGF</i>	Fibroblast growth factor
<i>c-fos</i>	Oncogene celular
<i>HSP70</i>	Heat shock protein, de 70kDa
<i>IL-6</i>	Interleucina 6; promotora da diferenciação da célula B
<i>MDR1</i>	Multi-drug resistance glycoprotein 1; transportador de membrana
<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen; fator de proliferação de DNA
<i>TK (HSV)</i>	Thymidine kinase of herpes simplex virus

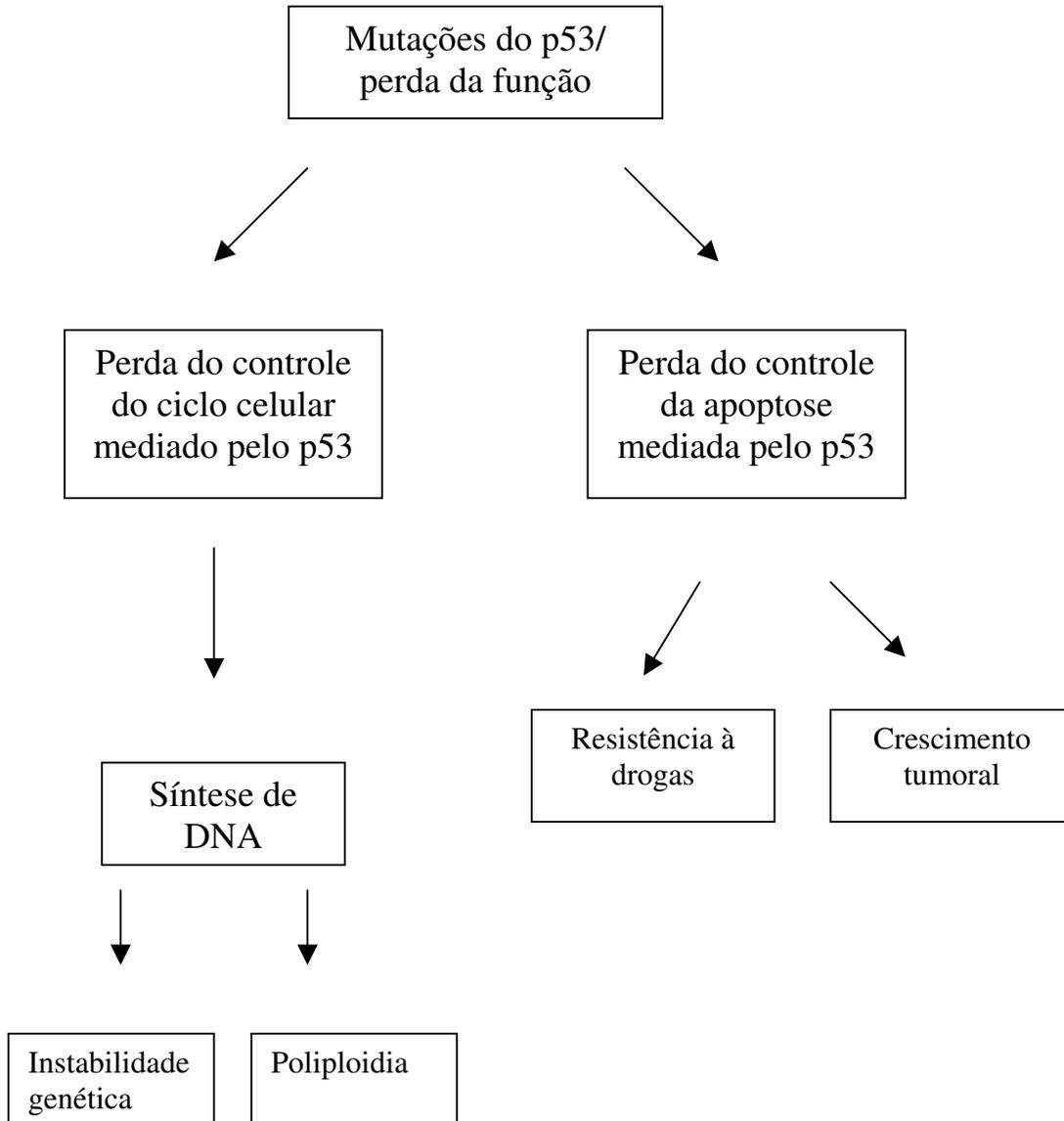
---

(VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996)

O gene *p53* codifica uma proteína de 53kD, que está envolvida na transcrição gênica, síntese, reparo de DNA e apoptose. (LEVINE et al, 1991; VOGELSTEIN et al, 1992; HARRIS et al, 1993; SACHS & LOTEM, 1993). Sua principal função é interromper a replicação celular no ponto de checagem G<sub>1</sub>/S do ciclo celular e secundariamente em G<sub>2</sub>/M (SUGRUE et al, 1997; SCHAWARTZ et al, 1997), na presença de DNA danificado por estímulos mutagênicos físicos e químicos (FORRESTER et al, 1996; CALMELS et al, 1997). A *p53* é ativada através fosforilação induzida pela CHK2, uma proteína quinase que é regulada pela ATM (HIRAO et al, 2000).

A interrupção no ciclo celular em resposta aos estímulos citotóxicos permite o reparo dos danos do DNA e é fundamental para a estabilidade genética e viabilidade de células danificadas. A progressão do ciclo celular para a fase S após lesão do DNA, como a que ocorre em células tumorais com *p53* mutante, leva à transmissão de mutações para outras células, desencadeando o processo neoplásico (VELCULESCU et al, 1996) (**Figura 3**).

Se o dano for irreparável, a *p53* ativa genes responsáveis pela apoptose, como o *bax*, que conduzirão a célula à apoptose (MYASHITA et al, 1995). A apoptose dependente do *p53* pode, portanto, modular a citotoxicidade de agentes anti-cancerosos, causando resistência clínica às drogas quimioterápicas (WILSON et al 1997). Em estudos *in vitro*, observou-se que linhagens de células com *p53* mutante apresentam menor inibição de crescimento em comparação com as células com *p53* selvagem quando tratadas com a maioria das drogas quimioterápicas (O'CONNOR et al, 1997). Células deficientes em *p53* ou que expressam Bcl-2 ou Bcl-xl também são resistentes a agentes citotóxicos (LOWE et al, 1994; FINDLEY et al, 1997).



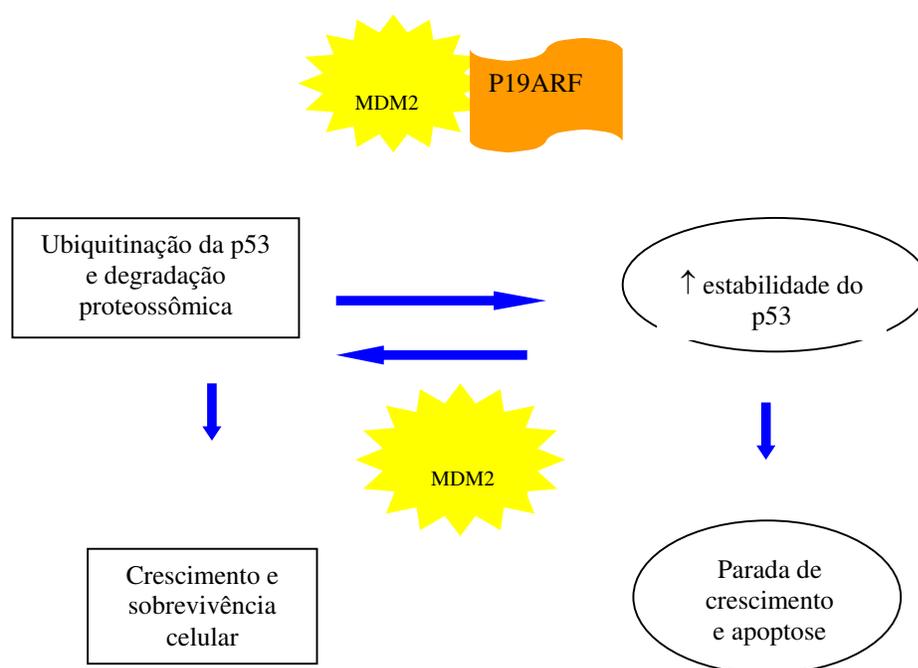
**Figura 3:** Conseqüências de mutações do *p53* e neoplasias: perda da regulação do controle do ciclo celular e apoptose, o que resulta em instabilidade genética, poliploidia, resistência aos quimioterápicos e crescimento tumoral (VELCULESCU et al, 1996).

A proteína p53 age como um fator de transcrição, ligando-se ao gene *p21/WAF-1*, um potente inibidor reversível do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>, período no qual é feito o reparo do DNA danificado (EL-DEIRY et al, 1993, 1994 e 1995; HARPER et al, 1993; SHEIK et al, 1995). A proteína p21/WAF-1 inibe a função estimuladora do ciclo celular de um complexo de proteínas (ciclina e quinase ciclina-dependentes, incluindo o produto do gene do retinoblastoma, a proteína Rb)(HARPER et al, 1993). Liga-se à maquinaria transcricional através de uma subunidade chamada TBP. A p21/WAF-1 liga-se à CDK2 e CDK4, inibindo a fosforilação da Rb, uma proteína que libera a ação de 2 fatores (E2F-DP1) que iniciam a transcrição gênica. Desta forma, há uma interrupção no ciclo celular, permitindo que o DNA danificado seja reparado. Após o reparo, há diminuição nos níveis da p53, a síntese da p21/WAF-1 é interrompida e o complexo ciclina-CDKs fosforila a Rb para liberar novamente a entrada na fase S. Deste modo, a p53 interage e modifica funcionalmente a proteína Rb, inibindo-a e aumenta a transcrição do E2F1 (fator de transcrição promotor da fase S)(**Figura 2**).

A p53 é regulada pela proteína Mdm2 através de um mecanismo de regulação negativa (WU et al, 1993). A transcrição da Mdm2 é induzida pela p53 após sua estabilização secundária à lesão do DNA. A Mdm2 se liga ao p53 e inibe sua capacidade de agir como fator de transcrição e supressor tumoral, através do bloqueio do domínio de transativação do p53, além de promover degradação da p53, através de ubiquitinação (LEVINE et al, 1995; DONEHOWER et al, 1993; PIETPOL et al, 1993; HAUPT, et al 1997; KUBBUTAT et al, 1997). Portanto, p53 e Mdm2 formam uma alça auto-reguladora, na qual a p53 limita sua própria atividade através da produção da Mdm2 (WU et al, 1993; LEVINE et al, 1999). Numa célula normal, baixos níveis de p53 inativo são mantidos pela proteína Mdm2, a qual bloqueia a atividade da p53 no núcleo e a transporta para o citoplasma para ser degradada por proteossomos citoplasmáticos (FREEDMAN & LEVINE, 1998).

Em condições normais, a Mdm2 é controlada pela proteína nucleolar p19 ARF, a qual seqüestra a Mdm2 no nucléolo após ativação da proteína c-Myc (WEBER et al, 1999; EISCHEN et al, 1999). Enquanto a ARF e a Mdm2 estão no nucléolo, a p53 age no núcleo das células. Mutações da ARF provocam a liberação da Mdm2 para o núcleo,

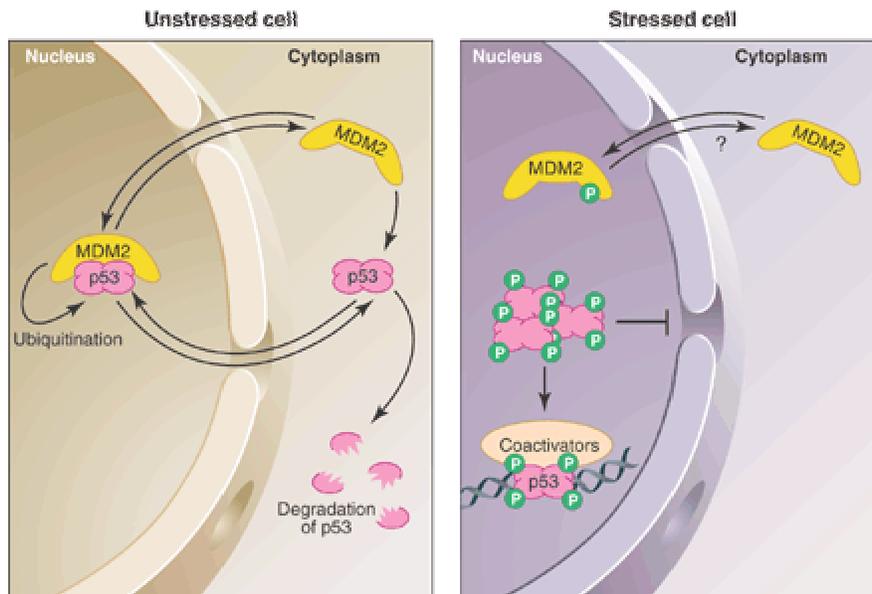
levando à degradação da p53. Portanto, a ARF é essencial no controle da ativação da p53, pois inibe a exportação nuclear da Mdm2 (POMERANTZ et al, 1998; ZHANG et al, 1998; TAO & LEVINE, 1999; KAMIJO et al, 1999; ZHANG & XIONG, 1999) (**figura 4**).



**Figura 4:** Mecanismo proposto do controle da p19<sup>ARF</sup> sobre as funções do p53.

Atualmente há 3 modelos propostos para explicar o controle da exportação nuclear da p53: a Mdm2 pode se ligar à p53 no núcleo e movê-la para o citoplasma (ROTH, 1998; TAO, 1999); a p53 pode usar um sinal de exportação nuclear (NES) localizado na sua região amino-terminal (Zhang & Xiong, 2001) ou carboxi-terminal (STOMMEL et al, 1999) para mediar sua própria exportação nuclear ou a Mdm2 poderia ubiquitinar a p53 no núcleo para promover sua exportação nuclear (GEYER et al, 2000)(**figura 5**).

Além da regulação da p53, a proteína Mdm2 também interage com o supressor tumoral Rb e com o fator de transcrição E2F (XIAO, 1995; MARTIN, 1995).



**Figura 5:** Em células não estressadas, p53 e Mdm2 circulam entre o núcleo e o citoplasma. Ao formar um complexo no núcleo, a Mdm2 ubiquitina a p53, causando sua saída do núcleo. A degradação da p53 mediada pela Mdm2 completa-se no citoplasma. Sinais de stress (tais como lesão no DNA) ativam várias quinases celulares que adicionam grupos fosfatos a diferentes aminoácidos ao p53. A modificação da conformação da p53 pela fosforilação, reduz a interação entre Mdm2 e p53, interferindo com a ubiquitinação e exportação nuclear da p53 pela Mdm2. Além disso, a fosforilação da p53 promove a interação entre p53 e coativadores transcricionais, tais como p300, mascarando os sinais de exportação nuclear da p53. (GOTTIFREDI & PRIVES, 2001).

## 1.2. ALTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR NOS LNH

Alterações das proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como p53, p21/WAF-1, Mdm2 e c-Myc, têm sido descritas nos LNH.

### **p53**

A presença de rearranjo ou deleções do braço curto do cromossomo 17(17p), onde está localizado o gene *p53*, foi observada em pacientes com LNH e relacionado com progressão rápida de doença, má resposta à quimioterapia e menor sobrevida (CABANILLAS et al, 1987; RODRIGUEZ et al, 1991). Em 1992, ICHIKAWA e colaboradores relataram pela primeira vez a presença de mutações do *p53* em LNH folicular e difuso de linhagem B, relacionado a estadios mais avançados de doença.

Mutações no *p53* ocorrem em aproximadamente 35-45% dos linfomas de Burkitt (GAIDANO et al, 1991; IMAMURA ET AL, 1994), 20-30% dos linfomas agressivos difusos de grandes células B, raramente em linfomas B indolentes e T. (IMAMURA et al, 1994; MOLLER et al, 1999). Porém, cerca de um terço dos LNH de baixo grau de malignidade histológico adquirem mutações na transformação para doença agressiva, sugerindo que o *p53* tem um importante papel na progressão de doença (GAIDANO et al, 1991; ICHICKAWA et al, 1992; LO COCO et al, 1993; SANDER et al, 1993; PROKOCIMER et al, 1994; CHANG et al, 1994; AKASAKA et al, 1996, LENS et al, 1997).

Alterações da proteína p53 podem ser detectadas através da técnica de imunohistoquímica. Mutações de ponto aumentam a meia-vida e a quantidade da proteína, permitindo a detecção por imunohistoquímica nas células tumorais. A sensibilidade da imunohistoquímica para p53 mutante é cerca de 75% (GREENBLATT et al, 1994). A detecção da p53 selvagem funcionalmente inativa também é possível por essa técnica, quando há estabilização da proteína (ligação com Mdm2, vírus, lesão do DNA por agentes genotóxicos (LANDERS et al, 1997; HALL et al, 1993)). Falsos negativos podem ocorrer, como mutações que resultam em quebra ou deleção da proteína (sem sentido ou com desvio

de leitura), pois não causam acúmulo da proteína. Esses tipos de mutações correspondem a cerca de 10% das alterações do *p53*. Portanto, a hiperexpressão da *p53* não indica necessariamente a existência de mutação no gene (ADAMSON et al, 1995; VILLUENDAS et al, 1993; CESARMAN et al, 1993; KOCIALKOWSKI et al, 1995), mas pode indicar alteração da função da proteína.

A correlação entre presença de anormalidades do gene *p53* e da proteína (mutação ou hiperexpressão) nos LNH e pior prognóstico foi observada em alguns estudos (GREINER et al, 1996; HERNANDEZ et al, 1996; ICHIKAWA et al, 1997; LENS et al, 1997; KODURO et al 1997; NAGAI et al,1998; CHEN et al, 1999; MOLLER et al, 1999; CHANG et al, 2000; GRONBAEK et al, 2000) e contestada em outros (PREUDHOMME et al, 1995; SANCHEZ et al, 1998; SAKAI et al, 1998; OSADA et al, 1999).

### **p21/WAF-1**

A expressão da p21/WAF-1 é observada em 18-27% dos LNH, com incidência maior nos linfomas CD 30+, os quais co-expressam *p53*. No entanto, mutações do *p53* não foram observadas nesses casos (CESARMAN et al, 1993). Portanto, a expressão da *p53* selvagem, associada ao acúmulo da p21/WAF-1 indica uma proteína *p53* com função normal, capaz de ativar a transcrição da p21/WAF-1 (MAESTRO et al, 1997). Mutações do *p53* foram detectadas principalmente nos casos com expressão da *p53* e ausência de expressão da p21/WAF-1. Portanto, a análise imunohistoquímica combinada dessas duas proteínas aumenta a sensibilidade do método na detecção de mutações do *p53* e é válida para identificar o estado funcional da proteína (CHILOSI et al, 1995, VILLUENDAS et al, 1997; MOLLER et al, 1999).

Aparentemente não há anormalidades estruturais do *p21/WAF-1* nos casos onde há aumento de sua expressão (MAESTRO et al, 1997). Por outro lado, deleções dos genes *p21/WAF-1* e *p16/INK4a* e perda de expressão das proteínas foram relatadas em variantes agressivas de linfomas de zona do manto (PYNIOL et al, 1997).

## **Mdm2**

O oncogene *mdm2* foi originalmente identificado em virtude de sua amplificação numa linhagem tumorigênica de camundongo (CAHILLY-SYNDER et al, 1987). Amplificação do *mdm2* está presente em vários sarcomas humanos (KHATIB et al, 1993) e resulta em hiperexpressão da proteína, que pode ser detectada por imunohistoquímica em várias neoplasias humanas, como melanomas, osteosarcomas e carcinoma renal, além de vários subtipos de LNH agressivos e muito agressivos (KAWATAMATA et al, 1996; SANCHEZ et al, 1998; MOLLER et al, 1999). Tumores que apresentam amplificação do *mdm2* geralmente contém a p53 selvagem, provavelmente estabilizada pela Mdm2 (LANDERS et al, 1997). Além da amplificação, outra anormalidade que pode ser encontrada é a presença de formas alternativas aberrantes do RNAm da Mdm2, que resultam na perda da região N-terminal, sítio de ligação com a p53, levando à hiperexpressão da p53 (BARTEL et al, 2001).

## **PCNA**

A proteína PCNA é um importante marcador de proliferação celular, correlacionando-se com outros marcadores de atividade proliferativa em linfomas, tais como Ki-67, MIB-1 e fração de fase S (PICH et al, 1994).

A PCNA é uma proteína de 29 kD envolvida na síntese de DNA e relacionada à fase S do ciclo celular. A PCNA é um componente do complexo CDK e um co-fator para a DNA polimerase (JÓNSSON et al, 1997). Adere a DNA polimerase à fita de DNA e facilita o processo de síntese de DNA durante a fase S do ciclo celular. Além disso, interage com uma série de proteínas, tais como o inibidor das ciclinas p21/WAF-1, várias ciclinas/CDKs e Gadd45. Essa última proteína liga-se ao PCNA, inibe a entrada das células na fase S e parece estimular *in vitro* a excisão dos nucleotídeos para reparo do DNA (SMITH et al, 1994). A interação de PCNA com a p21/WAF-1 inibe a capacidade do PCNA de ativar a DNA polimerase, interrompendo a síntese de DNA (**figura 8**).

## **c-Myc**

O proto-oncogene *c-myc* é um análogo celular do oncogene *v-myc*, o gene do retrovírus MC19, implicado na patogênese de tumores em aves. Está localizado no cromossomo 8q24. Esse proto-oncogene tem um papel crítico no controle da proliferação hematopoiética. A indução da Myc dirige as células da fase G<sub>0</sub> para a fase G<sub>1</sub> do ciclo celular (OBAYA et al, 1999). A proteína Myc pode agir como uma reguladora bivalente, determinando proliferação celular ou apoptose, dependendo da sua ligação com seus heterodímeros, Mad e Max. O complexo Myc/Max estimula a proliferação, enquanto o complexo Mad/Max inibe a função do Myc.

A importância da desregulação do *c-myc* pode ser observada nos linfomas de Burkitt, na qual o gene *myc* localizado no cromossomo 8 se justapõe ao *enhancer* da cadeia pesada da imunoglobulina, localizado no cromossomo 14, mais frequentemente. Essa translocação resulta em hiperfunção do *c-myc* e vantagem proliferativa importante na gênese deste linfoma.

Mutações de ponto do *c-myc* foram identificadas em alguns casos de LNH tipo MALT e em linfomas nodais, embora não fosse detectado rearranjo gênico por Southern Blot (PENG et al, 1997). Nos LNH anaplásicos CD 30 + é encontrada uma alta frequência de ativação do *c-myc* (INGHIRAMI et al, 1994).

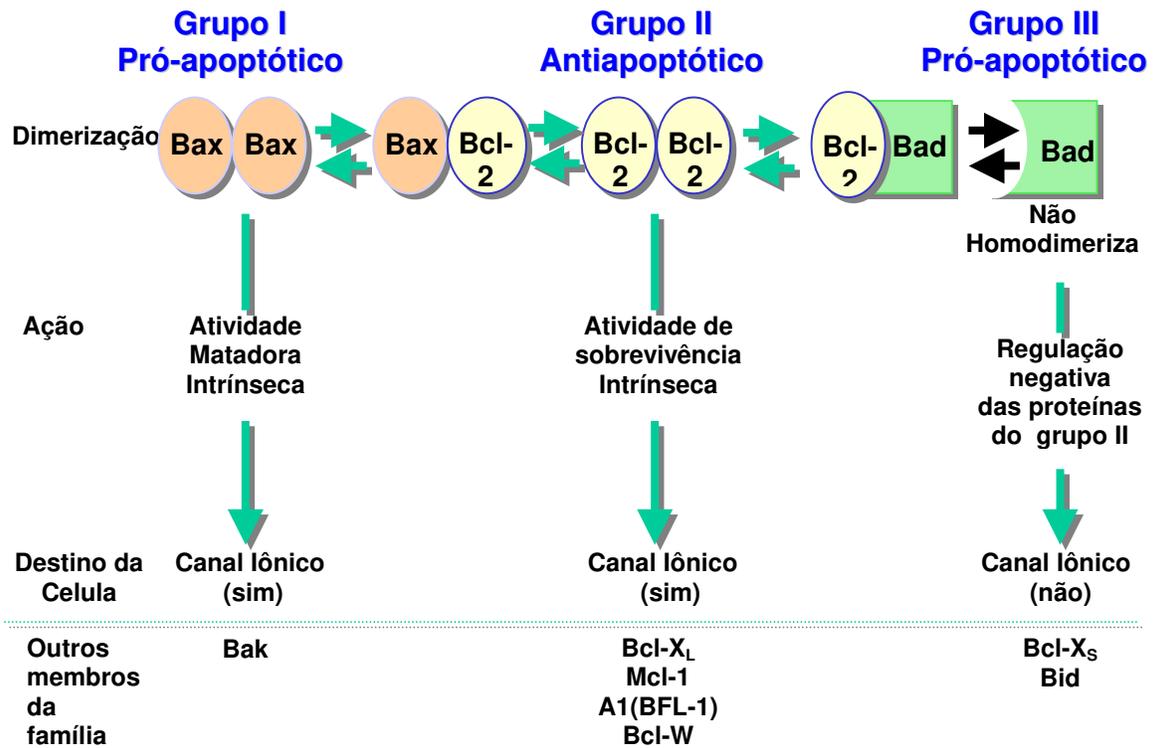
A presença de rearranjo do *c-myc* nos linfomas difusos de grandes células B ainda tem significado controverso em termos de prognóstico (LADANYI et al, 1991; VITOLO et al, 1998; KRAMER et al, 1998; KAWASAKI et al, 2001). No entanto, a expressão da proteína parece ter um impacto negativo na sobrevida (CHANG et al, 2000).

O p53 é um regulador da transcrição do *c-myc*: a p53 selvagem inibe a expressão da proteína c-Myc, induzindo apoptose. Por outro lado, a proteína c-Myc favorece a apoptose induzida pela ação citotóxica do TNF, inibindo vias anti-apoptóticas (PRENDERGAST et al, 1999).

## **2. GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DA APOPTOSE (BCL-2, BAX, BAK, MCL-1)**

O processo de apoptose visa a eliminação de células que perderam a função ou viabilidade. Envolve a ação de vários genes pró-apoptóticos e ativação de uma cadeia de enzimas que degradam o DNA (caspases)(GOTTLIEB, RA, 2001).

A família das proteínas relacionadas à Bcl-2 agem sob a forma de dímeros, ora induzindo (Bax, Bak, Bcl-xs, Bad, Bid), ora inibindo a apoptose (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) (KROEMER, 1997; HERR & DEBATIN, 2001). Essas proteínas controlam o status da permeabilidade da mitocôndria e o efluxo de íons ou proteínas, principalmente do transportador de elétrons citocromo c. As proteínas Bcl-xl e Bcl-2 inibem o efluxo de íons, enquanto que os membros pró-apoptóticos promovem o efluxo. Bad e Bid não são capazes de formar poros na membrana, mas possuem um sítio de ligação (BH3) que age removendo as proteínas pró-apoptóticas de seus parceiros antiapoptóticos, promovendo a formação de poros através da ação da proteína pró-apoptótica (figura 6).

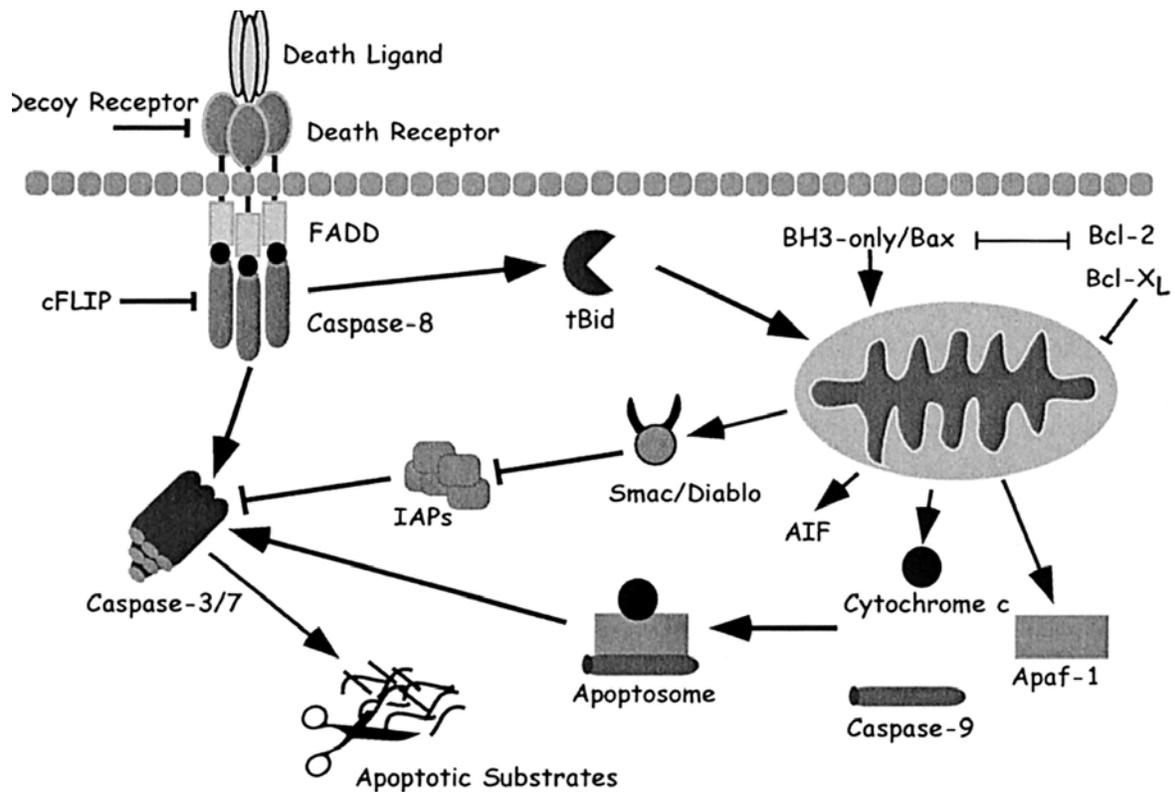


**Figura 6:** Membros da família da proteína Bcl-2 e suas interações, com indução (Bax/Bax; Mcl-1, Bak) ou inibição da apoptose (Bax/Bcl-2; Bcl-2/Bcl-2) (SILVA, 1999).

A Bcl-2 é uma oncoproteína de membrana localizada nas membranas da mitocôndria, retículo endoplasmático e envelope nuclear. Possui ação anti-apoptótica. Portanto, desregulação da expressão do *bcl-2* pode levar a sobrevivência anormal de células B com acúmulo de lesões genéticas adicionais, levando ao desenvolvimento dos linfomas.

A p53 selvagem é capaz de exercer um efeito de regulação negativa sobre a Bcl-2, promovendo apoptose (FINDLEY et al, 1997). Essa ação ocorre através da ativação da transcrição do *bax* (MYASHITA et al, 1995; YIN et al, 1997), que codifica uma proteína homóloga à Bcl-2. A Bax autodimeriza-se ou dimeriza-se com a Bcl-2 e promove apoptose quando sua produção está aumentada. As proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak também são reguladas diretamente pela p53, conforme descrito por PEARSON et al, 2000.

A Bax causa a morte celular através da formação de poros na mitocôndria, causando a liberação de citocromo c no citosol e ativação das caspases, moléculas proteolíticas que levam à fragmentação nuclear e morte celular (ROSSE et al, 1998). A proteína Bcl-2 interfere com a ativação das caspases inibindo a liberação do citocromo c (KLUCK et al, 1997; YANG et al, 1997), inibindo a apoptose (**Figura 7**).



**Figura 7:** Mecanismo de apoptose celular. O receptor de apoptose (esquerda) é acionado pela CD95, induzindo a formação de um complexo de morte celular. Esse complexo recruta, via a molécula adaptadora FADD e múltiplas moléculas de procaspase-8, que resultam na ativação da caspase-8. A apoptose via mitocôndria é controlada por membros da família Bcl-2. O estímulo de morte celular induz a liberação de citocromo c, AIF, Apaf-1 e outros fatores da mitocôndria. A associação da caspase 9, citocromo c e Apaf-1 forma o apoptossomo. A apoptose via mitocôndria e via receptor de morte convergem para a ativação de caspase-3, resultando em clivagem de substratos celulares e apoptose (HERR & DEBATIN, 2001).

Em resumo, a p53 é elemento central no controle da proliferação celular e da apoptose. A próxima figura (**figura 8**) exemplifica e resume as principais inter-relações entre as diferentes vias de indução da apoptose e controle do ciclo celular.

Em vista disto, surge o objetivo central deste trabalho, ou seja, avaliar a influência da expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular e apoptose na evolução de pacientes com linfomas não-Hodgkin agressivos.



***OBJETIVOS***

1. Avaliar a expressão das proteínas p53, p21/WAF-1, c-Myc, Mdm2 e PCNA em pacientes com linfomas não-Hodgkin de alto grau de malignidade histológico.
2. Nos pacientes com linfomas agressivos, correlacionar a expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular (p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc e PCNA) e das proteínas envolvidas com apoptose (Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1) com: tipo histológico, fatores prognósticos, resposta à quimioterapia, sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD).
3. Avaliar a presença de mutações do gene *p53* nos linfomas agressivos com hiperexpressão da proteína p53.



***PACIENTES E  
MÉTODOS***

## 1. PACIENTES E AMOSTRAS

Neste estudo retrospectivo, foram avaliadas 113 amostras de gânglios de pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de linfoma não-Hodgkin de alto grau de malignidade histológico, realizado pelo Departamento de Anatomia Patológica do HC Unicamp entre 1978 e 1997. O material foi fixado em formol e embebido em parafina. Os casos foram reclassificados de acordo com a classificação REAL (CHAN et al, 1994; HARRIS et al, 1994)(**tabela 3**) e submetidos à análise imunohistoquímica com os anticorpos anti-p53, anti-p21/WAF-1, anti-Mdm2, anti-c-Myc e anti-PCNA.

A correlação da expressão das proteínas acima citadas com fatores prognósticos, resposta à quimioterapia, sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD), foi realizada nos pacientes com linfomas agressivos que apresentavam informações clínicas suficientes. Nos LNH difusos de grandes células B, também foi avaliada a correlação entre expressão de proteínas reguladoras da apoptose (p53, Bax, Bak, Mcl-1 e Bcl-2) com fatores prognóstico e sobrevida. Pesquisa de mutação do gene *p53* foi realizada nos casos com linfomas agressivos com hiperexpressão da p53.

O estadiamento inicial dos pacientes com linfomas agressivos incluiu: história, exame físico, dosagem da lactato desidrogenase (LDH), ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada (CT) de abdome), RX e/ou CT de tórax e biópsia de medula óssea. Os pacientes foram classificados de acordo com Ann Arbor (CARBONE et al, 1971) e o Índice Prognóstico Internacional (IPI) (SHIPP et al, 1993). Pacientes com idade superior a 60 anos foram tratados com CHOP-Bleo (RODRIGUEZ et al, 1977) e os demais com esquemas de terceira geração (MACOP-B, F-MACHOP ou VACOP-B)(KLIMO et al, 1985; AMADORI et al, 1985; O'REILLY et al, 1991;). Remissão completa (RC) foi definida como normalização dos achados físicos e radiológicos, quatro semanas após o último ciclo de quimioterapia. Remissão parcial (RP) foi definida como uma redução de 50% da massa tumoral inicial. Pacientes que não preenchessem os critérios acima foram considerados não respondedores (NR).

**Tabela 3:** Classificação histopatológica dos 113 analisados e correspondência às classificações de Kiel, Working Formulation e WHO

<b>Kiel</b>	<b>Working Formulation</b>	<b>REAL</b>	<b>WHO</b>	<b>N</b>
Linfoblástico	Linfoblástico	Linfoma precursor B ou T linfoblástico	Leucemia/linfoma precursor B ou T	8
Burkitt	Burkitt	Burkitt	Leucemia/linfoma de Burkitt	15
Centroblástico	Difuso de grandes células	Difuso de grandes células B	Difuso de grandes células B	60
Anaplásico	Difuso de grandes células	Anaplásico de grandes células, CD 30+	Anaplásico de grandes células, CD 30+	7
Imunoblástico	Difuso de grandes células imunoblástico	Difuso de grandes células B	Difuso de grandes células B	12
T	Difuso misto de pequenas e grandes células	T- periférico sem especificação	T- periférico sem especificação	11

Adaptado de HIDDEMANN et al, 1996.

## 2. TÉCNICAS LABORATORIAIS

### 2.1. Imunohistoquímica

A expressão de p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc e PCNA foi determinada através de 2 técnicas: técnica de imunoperoxidase convencional (HSU et al, 1981) com algumas modificações (p53, c-Myc, PCNA) e imunohistoquímica com amplificação de sinais (CSA) (p21/WAF-1, Mdm2). As reações imunohistoquímicas para avaliação da expressão das proteínas Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1 foram realizadas pelo aluno de Mestrado Marcos Damião Alves da Silva e os detalhes da técnica imunohistoquímica utilizada estão descritas em sua tese de mestrado (SILVA, 1999).

**2.2.** Técnica de extração do DNA de tecido embebido em parafina (DNAeasy tissue kit (QIAGEN, Germany). Foi realizada extração de DNA dos blocos de parafina dos casos com linfomas agressivos que apresentaram hiperexpressão de p53.

**2.3.** Amplificação do DNA através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI et al, 1988), usando-se iniciadores dos éxons 5 a 9 do gene *p53*.

**2.4.** Purificação dos produtos do PCR (QIA quick purification kit - QIAGEN, Germany)

**2.5.** Sequenciamento direto dos produtos do PCR dos éxons 5 a 9

## **2.1. IMUNOHISTOQUÍMICA - REAGENTES**

### **Anticorpos primários:**

- p53 (clone DO-7): anticorpo monoclonal de camundongo, isotipo IgG2b, kappa (Dako, Dakopatts, Copenhagen, Denmark) , diluição 1:50
- p21/WAF-1(clone EA10): anticorpo monoclonal de camundongo, isotipo IgG1(Calbiochem, Cambridge, Massachusetts), diluição 1:150

Os anticorpos primários citados abaixo são provenientes de Santa Cruz Biotechnology, Inc., California - USA.

- c-Myc (9E10, SC-40): anticorpo monoclonal de camundongo, isotipo IgG1, diluição 1:80
- PCNA (PC10, SC-56): anticorpo monoclonal de camundongo, isotipo IgG2a, diluição 1:100
- Mdm2 (SMP14, SC-965): anticorpo monoclonal de camundongo, isotipo IgG1, diluição 1:150

- Bcl-2: IgG1 anti-proteína Bcl-2, monoclonal obtida da fusão de células de mieloma de camundongo com células esplênicas de camundongo imunizado com proteína Bcl-2 de origem humana.
- Bax: anticorpos policlonais purificados em coluna cromatográfica de afinidade contra uma porção amino terminal de proteína Bax de origem murina (reativo com proteína humana).
- Bak - anticorpo policlonal purificado por coluna de afinidade e obtido a partir da imunização de carneiros contra o peptídeo correspondente aos aminoácidos assim numerados na porção 82 a 104 da proteína de origem humana.
- Mcl-1 - anticorpo policlonal originado em coelho imunizado com um peptídeo de origem humana correspondendo aos amino-ácidos 121 - 139, e purificado por coluna de afinidade.

Anticorpo secundário (Multilink) e complexo avidina-biotina (ABC): provenientes da Dako Corporation (Dinamarca). O substrato utilizado para revelação foi a diaminobenzina (DAB), da marca SIGMA - USA.

Na técnica de imunohistoquímica com amplificação de sinais, foi utilizado o kit de amplificação CSA (Dako Catalyzed Signal Amplification (CSA) System), Dako Corporation, Carpinteria, CA

### **2.1.1. Técnica de imunoperoxidase: utilizada nas reações com os anticorpos p53, c-Myc e PCNA.**

Os cortes foram colocados em lâminas previamente silanizadas.

A desparafinização foi feita com xilol a 65°C durante 15 minutos, depois à temperatura ambiente por 10 minutos (2x); hidratação progressiva com álcool a 100% (2 minutos, 2x consecutivas), a 80% e 50% por 2 minutos.

Realizou-se o bloqueio da atividade da peroxidase endógena através da incubação dos cortes em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% e metanol durante 15 minutos, seguido de lavagem com água corrente, destilada e tampão PBS.

Em seguida, os cortes foram aquecidos em tampão citrato 0.01M pH-6.0 com o objetivo de melhorar a reatividade dos epítomos com os anticorpos. O aquecimento foi realizado em forno de microondas, na potência máxima, durante 7 minutos, 3 vezes consecutivas para o anticorpo p53 e 2 vezes para os demais anticorpos. Para o anticorpo p53 fez-se primeiro o aquecimento no microondas e posteriormente a inativação da peroxidase endógena. O excesso de tampão foi retirado e os cortes foram incubados com o anticorpo primário em câmara úmida "overnight" a 4°C.

Coloração: após retirar as lâminas da incubação com o anticorpo primário foram feitas 3 lavagens com tampão PBS de 5 minutos cada à temperatura ambiente. As lâminas foram secas com papel filtro e incubadas por 60 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário policlonal (multi-link). Em seguida, foram lavadas novamente com tampão PBS e incubadas por 40 minutos com o complexo strepto-avidina-biotina-peroxidase. Após nova lavagem em tampão PBS, foram coradas com diaminobenzidina (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 minutos).

As lâminas foram lavadas com água para retirar o excesso de DAB e foram contracoradas com hematoxilina de Mayer. A seguir, as lâminas foram desidratadas com álcool a 100% e xilol e montadas em resina sintética.

### **2.1.2. Imunohistoquímica – CSA (Mdm2 e p21/WAF-1)**

Etapas:

1. Desparafinização e hidratação idem técnica anterior.
2. Inativação da peroxidase endógena : os cortes foram cobertos com peróxido de hidrogênio por 5 minutos e lavados com água destilada.

3. Aquecimento dos cortes em tampão citrato 0.01M pH-6.0 com o objetivo de melhorar a reatividade dos epítomos com os anticorpos, em forno de microondas, potência máxima, 2 vezes consecutivas durante 7 minutos.
4. Bloqueio protéico: o excesso de líquido foi retirado com papel filtro e o soro normal (do kit) foi pingado sobre os cortes, seguido de incubação durante 5 minutos. O excesso do soro foi retirado com papel filtro.
5. O anticorpo primário foi aplicado nos cortes, seguido de incubação por 15 minutos.
6. Os cortes foram lavados 2 vezes com solução de lavagem (Tris HCL 0.05 M pH 7.6, NaCl 0.3M e 0.1% Tween 20) durante 5 minutos e 5 minutos com solução PBS. O excesso da solução foi retirado com papel filtro.
7. O anticorpo de ligação do kit foi aplicado nos cortes, seguido da repetição da etapa 6.
8. O complexo streptavidina-biotina foi aplicado nos cortes, seguido de incubação por 15 minutos e repetição da etapa 6.
9. Foi feita a aplicação do reagente de amplificação aos cortes, seguido de incubação por 15 minutos e repetição da etapa 6.
10. Aplicação da streptavidina-peroxidase, seguido de incubação por 15 minutos e repetição da etapa 6.
11. A solução com substrato cromogênico foi aplicada nos cortes histológicos seguida de incubação de 1-5 minutos e lavagem com água destilada.
12. Coloração e montagem idem técnica anterior.

### 2.1.3. Análise da reação

As células foram consideradas positivas quando um padrão de coloração distinto foi visualizado no núcleo e/ou citoplasma dependendo do anticorpo. A avaliação da expressão antigênica foi realizada de modo semiquantitativo, por três observadores, através da porcentagem de células positivas, avaliada em 5-10 campos representativos (mínimo de 1000 células tumorais) no aumento de 400X do microscópio óptico. Pontuação: 0 - negativa, 1 a 9% - +, 10% a 50% - ++, > 50%, +++.

Controles positivos e negativos foram utilizados em cada reação. Nos controles negativos aplicava-se tampão PBS ao invés do anticorpo primário ou o reagente de controle negativo, quando realizada imunohistoquímica com a técnica de amplificação de sinais (CSA).

Controles positivos:

- p53 : adenocarcinoma de mama positivo
- p21/WAF-1 e c-Myc: cólon normal
- Mdm2: carcinoma de pele ou próstata positivos
- PCNA: tonsila normal
- Bcl-2 e Mcl-1: células endoteliais
- Bax: células endoteliais e macrófagos
- Bak: células endoteliais e neutrófilos

O *status* p53/p21WAF-1 foi avaliado dividindo-se os pacientes em três grupos: grupo A - casos com ausência de expressão da p53 expressão presente ou ausente da p21/WAF-1; grupo B - expressão da p53 e ausência de expressão da p21/WAF-1 e grupo C - casos com co-expressão da p53 e p21/WAF-1

## **2.2. EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO EMBEBIDO EM PARAFINA - DNAEASY TISSUE KIT (QIAGEN, GERMANY)**

Cerca de 25 mg de tecido embebido em parafina foram cortados ou raspados com bisturi estéril e colocados dentro de um tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, estéril. Colocou-se 1200 µl de xileno, misturando-se com vórtex. Centrifugou-se a amostra 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido através de pipetagem, com o cuidado de não se remover o “pellet”. Colocou-se 1200 µl de etanol absoluto no “pellet” para remover o xileno residual. Misturou-se com vórtex, seguido de centrifugação à velocidade máxima durante cinco minutos. O etanol foi removido com pipeta. Essa etapa foi realizada novamente. O tubo de microcentrífuga foi incubado aberto em temperatura de 37° C por 10-15 minutos para evaporação do etanol.

Neste tubo, foram adicionados 180 µl de tampão ATL (tampão de lise), além de 20 µl de proteinase K. Após agitação com o vórtex, o material foi incubado a 55°C até o tecido ser completamente lisado. Misturou-se com vórtex ou no banho em agitação. O tempo de lise variou de acordo com o tecido e quantidade. O material permaneceu no banho de 1-3 h. Se não ocorresse digestão completa, adicionava-se mais proteinase K e o material era deixado "overnight" no banho.

Após a incubação, a amostra era pipetada dentro da coluna proveniente do kit. O fluido que passava pela coluna era descartado. Adicionou-se 200 µl de tampão AL à amostra. Foi feita mistura vigorosa com vórtex e incubação a 70°C durante 10 minutos. Adicionou-se 200 µl de etanol absoluto à amostra e misturou-se vigorosamente no vórtex. A mistura dessa etapa foi pipetada dentro da coluna do kit colocada num tubo de 2 ml. Realizou-se centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. Descartados o líquido e o tubo coletor. A mini-coluna foi colocada num tubo coletor novo de 2 ml e adicionou-se 500 µl de tampão AW1 (tampão de lavagem), seguido de centrifugação durante 1 minuto a 8000 rpm. Descartou-se o líquido e o tubo coletor. A mini-coluna foi colocada num tubo de 2 ml e adicionou-se tampão AW2 (tampão de lavagem), seguido de centrifugação por 3 minutos à velocidade máxima para secagem da membrana da coluna. Descartou-se o líquido e o tubo coletor. A coluna foi colocada num tubo limpo de microcentrífuga, de 1.5 ou 2ml e 100-

200 µl de tampão AE (tampão de eluição) foram pipetados dentro da coluna, diretamente na membrana. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto para eluição. A eluição foi novamente repetida conforme descrita na etapa acima, em outro tubo de 1.5 ml

### **2.3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DOS TECIDOS EMBEBIDOS EM PARAFINA PELA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), USANDO INICIADORES DOS ÉXONS 5-9**

As reações foram realizadas num volume final de 50µl contendo 200-500ng de DNA, 10 mM Tris-HCl pH 8,5, 1,5 mM MgCl (50mM KCl, 1,0 mM de cada deoxi-nucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 50 ng de cada iniciador e 0.25 U de Taq DNA Polimerase (Gibco). Foram utilizados iniciadores comerciais (Clontech e Gibco, Life Technologies do Brasil Ltda) (tabela 4). A desnaturação das amostras foi realizada a 94°C durante 5 minutos. Posteriormente foram submetidas a 35 ciclos de amplificação, sendo que o tempo e temperatura de desnaturação, anelamento e extensão variaram de acordo com cada iniciador (tabela 5), finalizando com 7 minutos a 72°C. As reações foram realizadas em cicladores automáticos de temperatura. O material amplificado foi separado em gel de agarose a 1-2% e então visualizado sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

**Tabela 4:** Iniciadores usados no PCR do gene p53

<b>Éxon</b>	<b>Seqüência dos iniciadores (5' a 3')</b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>
5	Sense - CTC TTC CTG CAG TAC TCC CCT GC Antisense- GCC CCA GCT CGT CAG CAT CGC TA	211
6	Sense – GAT TGC TCT TAG GTC TGG CCC CTC Antisense – GGC CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC	185
7	Sense – GTG TTG TCT CCT AGG TTG GCT CTG Antisense- CAA GTG GTC CCT GAC CTG GAG TC	139
8	Sense – ACC TGA TTT CCT TAC TGC CTC TGG C Antisense – GTC CTG CTT GCTTAC CTC GCT TAG T	200
9	Sense – GCC TCT TTC CTA GCA CTG CCC AAC Antisense – CCC AAG ACT TAG TAC CTG AAG GGT G	102

**Tabela 5:** Padronização da técnica de PCR para o gene p53

<b>Éxon</b>	<b>desnaturação</b>	<b>anelamento</b>	<b>extensão</b>
5	94° - 30"	58° - 45"	72° - 45"
6	94° - 1'	64° - 1'	72° - 1'
7	94° - 1'	62° - 1'	72° - 20"
8	94° - 1'	60° - 1'	72° - 1'
9	94° - 1'	58° - 1'	72° - 1'

#### **2.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DO PCR (QIA QUICK PURIFICATION KIT - QIAGEN, GERMANY)**

Etapas:

- 1- Adicionou-se 5 volumes de tampão PB para um volume de PCR.
- 2- A mistura foi colocada na coluna própria do kit, sobre um tubo de 2 ml.
- 3- Centrifugação durante 30-60" a 13000 rpm, para ligação do DNA na coluna.
- 4- O fluido que permaneceu no tubo foi descartado.
- 5- Adicionou-se 750 µl de tampão PE na coluna. Centrifugação durante 30-60" a 13000 rpm.
- 6- O fluido que ficou no tubo foi descartado e a amostra centrifugada por mais 1 minuto, à velocidade máxima.
- 7- A coluna foi colocada num tubo de 1,5 ml.
- 8- Para eluição do DNA, adicionou-se 30-50 µl de tampão EB na membrana da coluna. A amostra foi centrifugada durante 1 minuto, a 13000 rpm após 1 minuto de repouso.

#### **2.5. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS – SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO ABI-PRISM 377.**

Preparo das reações: num tubo estéril foi colocado 15-45 ng de DNA, 1,6 pMol do iniciador e 4 µl de Big Dye. Adicionou-se água, sendo o volume final 10 µl.

As reações foram colocadas num ciclador automático de temperatura (MJ). A desnaturação das amostras foi realizada a 96°C durante 1 minuto. Posteriormente foram submetidas a 25 ciclos de amplificação, com a seguinte seqüência de desnaturação, anelamento e extensão: 96°C- 10", 57°C – 5", 60°C- 4'), finalizando com 10 minutos de extensão a 60°C.

Purificação: adicionou-se 80 µl de isopropanol a cada amostra. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente durante 20 minutos. Centrifugadas durante 15 minutos a 12000 rpm (21°C). Descartado o sobrenadante. Colocado 150 µl de etanol 70%. Centrifugação durante 10 minutos a 12000 rpm (21°C). Descartou-se o sobrenadante. As amostras foram secas com o tubo aberto em temperatura de 65°C durante 5 minutos.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para descrever o perfil do grupo estudado segundo as diversas variáveis analisadas, foram feitas *tabelas de frequência* das variáveis categóricas e *estatísticas descritivas* (média, desvio-padrão, mediana e valores mínimo e máximo) das variáveis contínuas.

Para analisar a relação entre duas variáveis categóricas (variáveis clínicas, expressão das proteínas p53, p21/WAF-1, c-Myc, Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1, comparação entre o grupo de sobrevida curta e o grupo de sobrevida longa) foi utilizado o *teste Qui-Quadrado* ou, quando o subgrupo fosse pequeno, o *teste exato de Fisher*.

Para analisar a correlação entre as proteínas reguladoras da apoptose, foi utilizado o teste de *Spearman*.

Para estimar a sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD) foi utilizada a curva de sobrevida com estimador de *Kaplan-Meier*. Para comparar as sobrevidas de acordo com algum fator de interesse na sobrevida foi utilizado o *teste Log-rank*. Para verificar a influência dos diversos fatores analisados de interesse na sobrevida foi utilizada a *Análise de Regressão de Cox*, com modelo de riscos proporcionais.

O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja,  $P < 0.05$ .

*Análise univariada.* As variáveis analisadas foram idade ( $\leq 60$  vs  $> 60$ ), LDH (nl vs  $>$  normal), presença de RC (sim vs não), sintomas B (sim vs não), infiltração de medula óssea (sim vs não), p53 (neg vs pos), p53 (0, + vs ++, +++), Bcl-2 (neg vs pos), Bax (neg vs pos), Bak (neg vs pos), Mcl-1 (neg vs pos). Idade e LDH foram também

analisadas como variáveis contínuas, através do teste de Mann-Whitney. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para a comparação entre LDH e expressão das proteínas. Diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0.05$ .

Análise de regressão de Cox foi realizada para cada variável, calculando-se o intervalo de confiança e o risco relativo de cada variável em termos de sobrevida. As variáveis incluídas foram idade, Ann Arbor (I, II vs III, IV), infiltração de medula óssea (pos vs neg), sintomas B, p53 (0,+ vs ++, +++), Bak (0,+,++ vs +++), Mcl-1 (0,++ vs +++), Bax (0,++ vs +++)) e tratamento (CHOP vs outros esquemas). Diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0.05$ . Foram levadas para análise multivariada todos os parâmetros com  $P < 0.2$ . O teste de  $X^2$  foi usado para comparação entre as características clínicas entre os grupos de sobrevida curta e longa e os resultados da imunohistoquímica.

**Análise multivariada.** Foi calculada através do modelo de regressão de Cox e análise de regressão logística com modelo logito. Diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0.05$ .

Para a análise estatística foram utilizados os seguintes programas: SAS System for Windows (Statistical Analysis System), version 6.12. SAS Institute Inc, 1989-1996, Cary, NC, USA, SPSS for Windows, version 10.0.5 (Nov 27,1999). SPSS Inc, 1989-1999, Chicago, IL, USA e Winstat.



***RESULTADOS***

## **1. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53, P21/WAF-1, MDM2 C-MYC E PCNA NOS LNH DE ALTO GRAU DE MALIGNIDADE HISTOLÓGICO (TABELA 6).**

Foi observada coloração nuclear nas reações com os anticorpos p53, PCNA, p21/WAF-1 e Mdm2. Coloração nuclear e citoplasmática foi observada com o anticorpo c-Myc. A intensidade da coloração da reação variou de acordo com o tipo de anticorpo utilizado, sendo menor nas reações com o p53 e maior com os outros anticorpos. Nas figuras 9 -15 encontram-se exemplos das reações imunohistoquímicas.

Expressão de p53 foi detectada em 50% dos linfomas de Burkitt, 36% dos linfomas T-periféricos, 33% dos linfomas anaplásicos, 28% dos linfomas difusos de grandes células B e em 12,5% dos linfomas linfoblásticos.

Expressão da proteína p21/WAF-1 foi observada em 40-57% dos linfomas analisados, sendo mais freqüente a expressão nos linfomas anaplásicos (57%).

A proteína Mdm2 foi detectada em 25-33% dos casos, porém hiperexpressão com padrão +++ foi observada somente nos linfomas difusos de grandes células B.

A expressão de c-Myc variou de 69,5% a 75% nos linfomas de Burkitt, linfoblástico e difusos de grandes células B. Nos linfomas anaplásicos apenas 40% dos casos foram positivos.

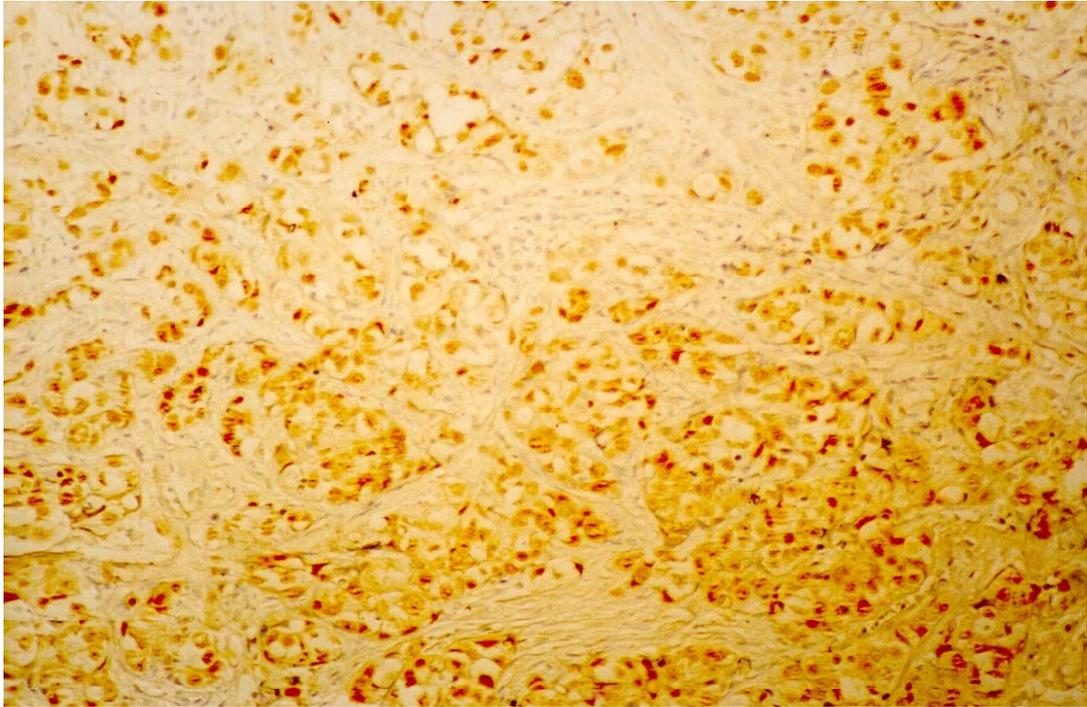
Não houve diferença significativa na presença de expressão das proteínas p53, p21/WAF-1, Mdm2 e c-Myc quando comparados os linfomas difusos de grandes células B com os linfomas T-periféricos. No entanto, a expressão de p53 tende a ser menor nos linfomas linfoblásticos quando comparados com os linfomas de Burkitt ( $P=0.09$ ).

A expressão de PCNA foi alta em todos os grupos, porém os linfomas de Burkitt e linfoblástico apresentaram maior porcentagem de células PCNA positivas.

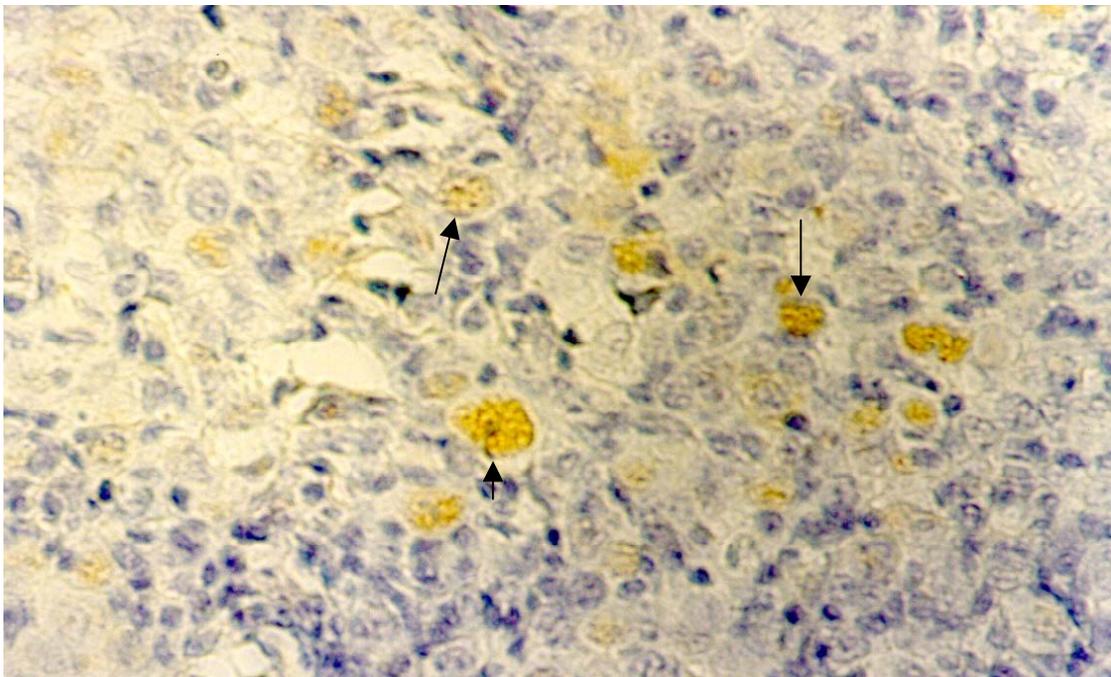
**Tabela 6:** Análise imunohistoquímica de 113 casos de LNH de alto grau de malignidade histológica, com os anticorpos p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc e PCNA

Tipo histológico (REAL)	n (113)	Expressão	p53 n (%)	p21/WAF1 n (%)	Mdm2 n (%)	c-Myc n (%)	PCNA n (%)
Difuso de grandes células B	72	0	50 (72.5)	38 (54.5)	40 (74)	15 (26.5)	0
		+	9 (13)	24 (34.5)	9 (16.5)	12 (21.5)	0
		++	5 (7.25)	5 (7)	4 (7.5)	17 (30.5)	32 (46.5)
		+++	5 (7.25)	3 (4)	1 (2)	12 (21.5)	37 (53.5)
		NA	3	2	18	16	3
B Burkitt	15	0	7 (50)	6 (46)	6 (66.5)	4 (30.5)	0
		+	0	4 (31)	2 (22.5)	5 (38.5)	1 (7.5)
		++	4 (28.5)	2 (15.5)	1 (11)	3 (23)	2 (15.5)
		+++	3 (21.5)	1 (7.5)	0	1 (8)	10 (77)
		NA	1	2	6	2	2
T T-periférico	11	0	7 (64)	6 (60)	8 (100)	1 (11)	0
		+	2 (18)	3 (30)	0	1 (11)	0
		++	2 (18)	1 (10)	0	6 (67)	6 (60)
		+++	0	0	0	1 (11)	4 (40)
		NA	0	1	3	2	1
T Linfoblástico	8	0	7 (87.5)	4 (57)	5 (71.5)	2 (25)	0
		+	1 (12.5)	3 (43)	2 (28.5)	3 (37.5)	1 (14.5)
		++	0	0	0	2 (25)	0
		+++	0	0	0	1 (12.5)	6 (85.5)
		NA	0	1	1	0	1
T Anaplásico CD30+	7	0	4 (67)	3 (43)	2 (66.5)	3 (60)	0
		+	1 (16.5)	3 (43)	1 (33.5)	0	2 (33.3)
		++	0	1 (14)	0	2 (40)	2 (33.3)
		+++	1 (16.5)	0	0	0	2 (33.3)
		NA	1	0	4	2	1

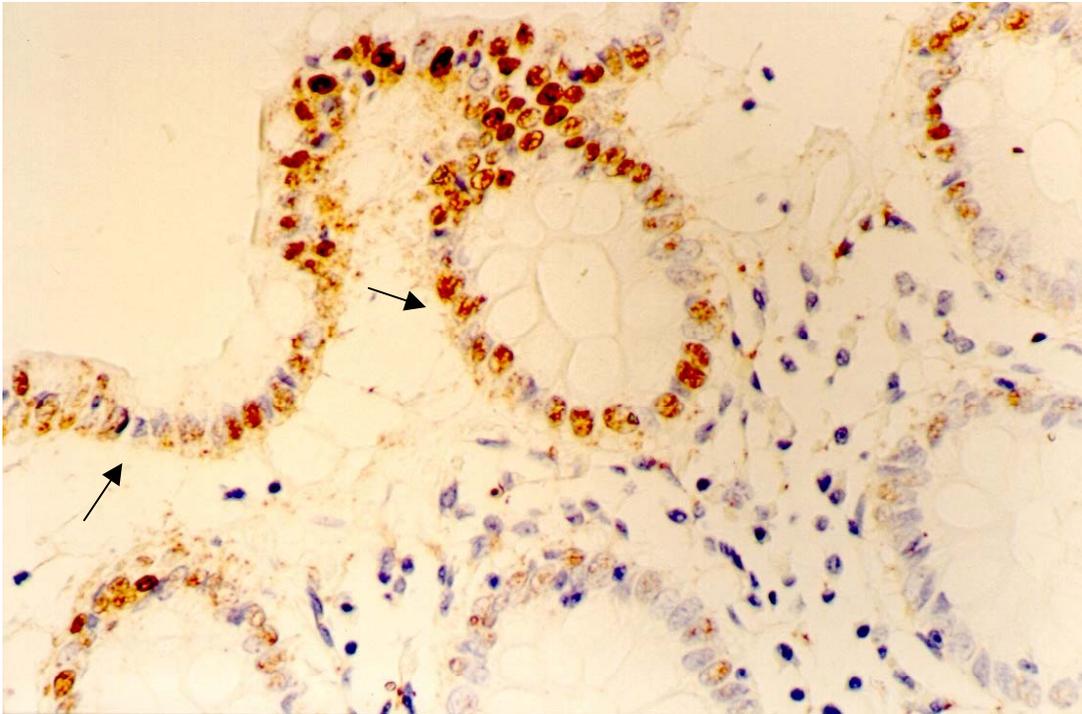
Legenda: 0 - expressão negativa; + (1-9% de células positivas), ++ (10-50%), +++ (>50%), NA - não avaliável.



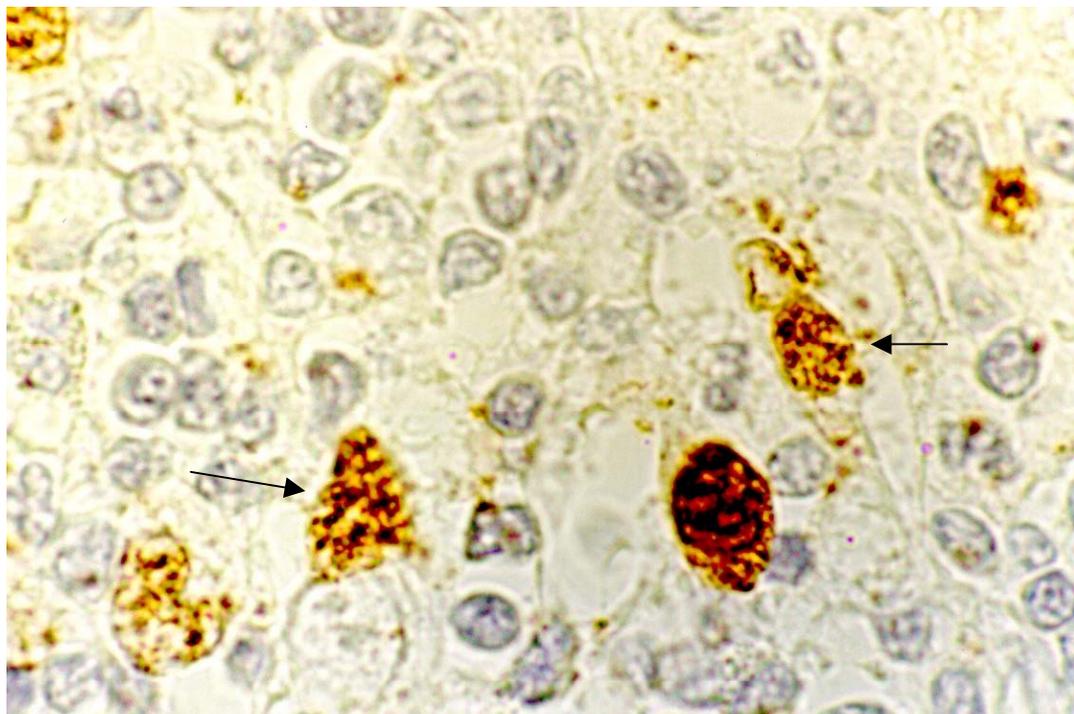
**Figura 9:** Corte histológico de adenocarcinoma de mama. Reação imunohistoquímica positiva com o anticorpo p53 (controle positivo)



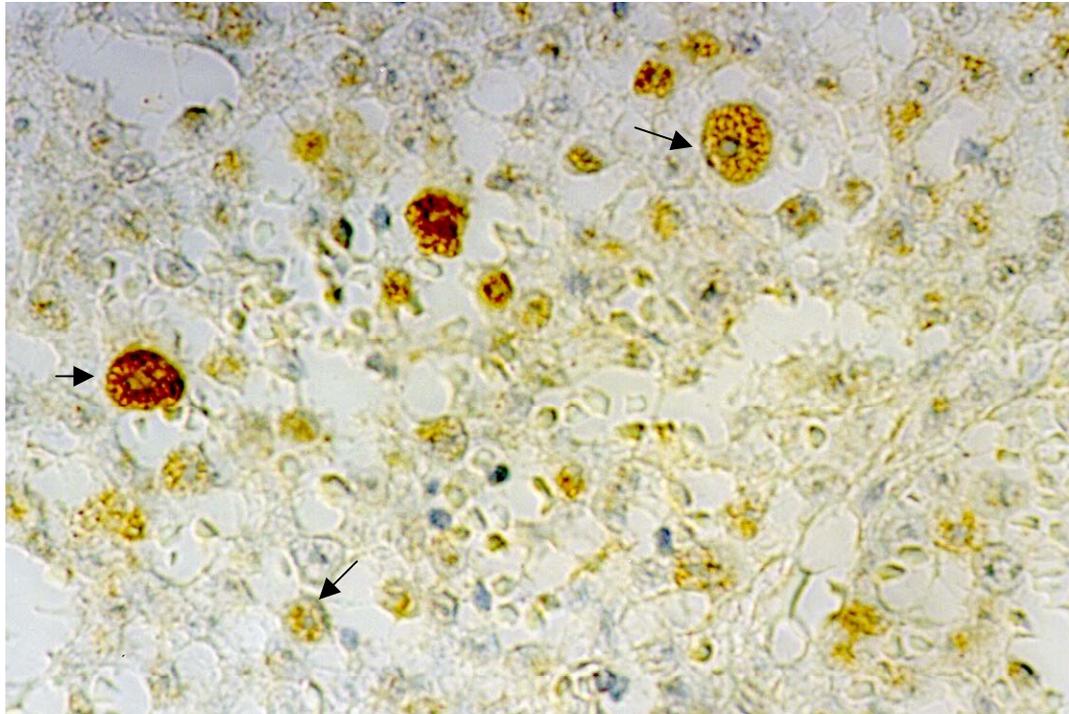
**Figura 10:** Corte histológico de gânglio de um paciente com LNH difuso de grandes células B. Reação imunohistoquímica com o anticorpo p53. As setas indicam exemplos de células positivas.



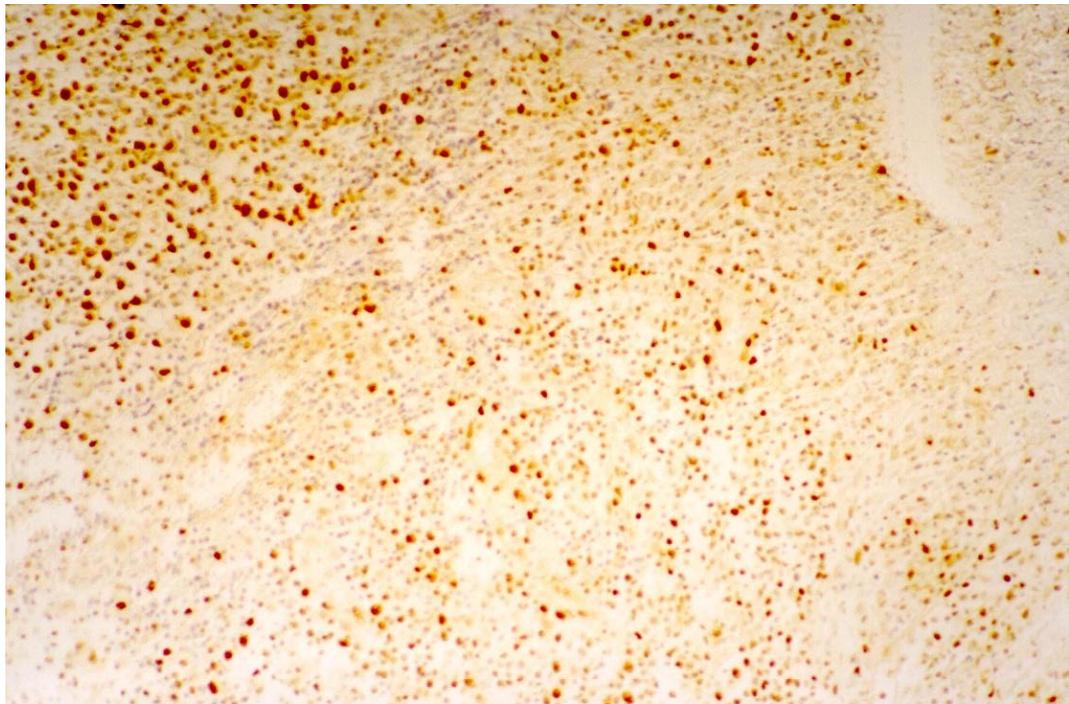
**Figura 11:** Corte histológico de cólon normal. Reação imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo p21/WAF-1 (controle positivo). As células que não estão em proliferação (G0) encontram-se na região mais próxima à luz da mucosa intestinal e são positivas (setas).



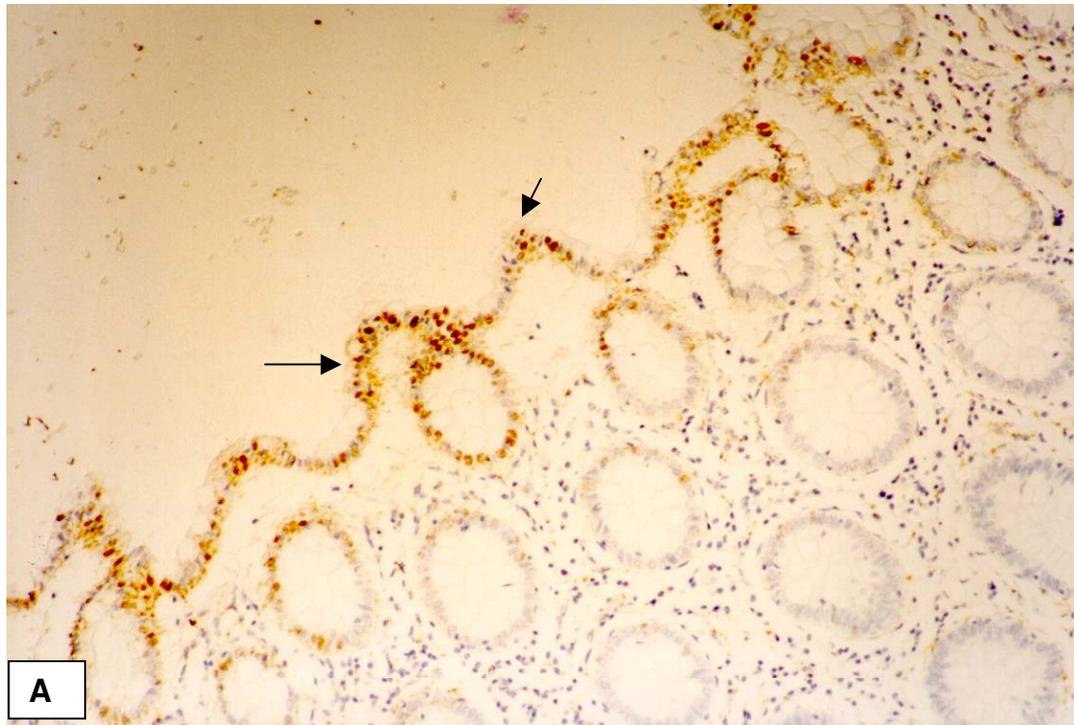
**Figura 12:** Corte histológico de gânglio. Células p21/WAF-1 positivas em um caso de LNH anaplásico de grandes células.



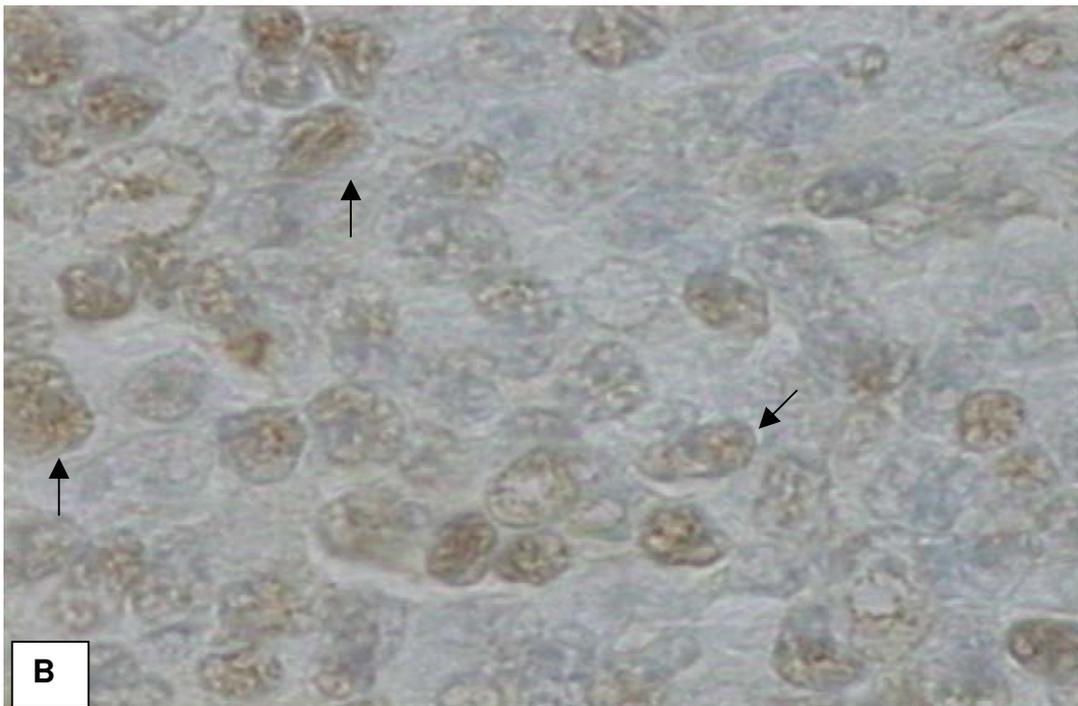
**Figura 13:** Corte histológico de gânglio. Observa-se reação imunohistoquímica positiva nuclear com o anticorpo Mdm2 em um paciente com LNH agressivo.



**Figura 14:** Corte histológico de gânglio de um caso de LNH agressivo. As células PCNA positivas apresentam intensa coloração nuclear.



**Figuras 15 A e B:** Reação imunohistoquímica com o anticorpo c-Myc. **A-** Cólon normal. As células que não estão em proliferação encontram-se na parte mais externa da mucosa e são positivas. **B-**LNH difuso de grandes células B (setas).



## **2. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR (P53, P21/WAF-1, MDM2, C-MYC E PCNA) E DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS COM APOPTOSE (BCL-2, BAX, BAK E MCL-1) COM: TIPO HISTOLÓGICO, FATORES PROGNÓSTICOS, RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA, SOBREVIDA GLOBAL (SG) E LIVRE DE DOENÇA (SLD).**

### **2.1. Correlação da expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular p53, p21/WAF-1, Mdm2 c-Myc e PCNA com resposta à quimioterapia e sobrevida em linfomas agressivos (n=62). Manuscrito publicado: Anexo II (PAGNANO KBB, 2001).**

Neste trabalho foram avaliados 62 casos de linfomas agressivos, 30 homens e 32 mulheres. Os casos foram reclassificados de acordo com a classificação REAL como: difuso de grandes células B (52 pacientes), anaplásico de grandes células (6 pacientes - 5 com CD 30+ e um do tipo null), T-periférico sem especificação (4 pacientes). Os dados clínicos e laboratoriais destes pacientes estão resumidos na **tabela 7**. Dados individuais dos pacientes e da imunohistoquímica encontram-se no Anexo I (Tabela I). O tempo mediano de seguimento foi 15 meses (1-114 meses). A maioria dos pacientes apresentava doença avançada ao diagnóstico. Cerca de 50% foram classificados como IPI alto/ alto intermediário. O IPI não pôde ser calculado em 15 pacientes pela falta da dosagem de LDH ao diagnóstico. Remissão completa foi atingida em 43.5% dos casos e recidivas foram observadas em 22% dos pacientes.

O *status* p53/p21WAF-1 foi avaliado em 59 pacientes. O grupo A foi constituído por 44 pacientes (74.5%), o grupo B por 11 pacientes (18.5%) e grupo C por 4 pacientes (7%).

A expressão de p53 não se correlacionou com a de PCNA, c-Myc, Mdm2 and p21/WAF-1 ( $P=NS$ ). A expressão de PCNA correlacionou-se com a de c-Myc ( $P=0.002$ ), mas não com a de p53, p21/WAF-1 and Mdm2 ( $P= NS$ ). Não houve correlação entre LDH e PCNA.

**Tabela 7:** Dados dos pacientes ao diagnóstico e resposta ao tratamento (n=62)

	No.	%
Ann Arbor		
I/II	21	34
III/IV	41	66
Sintomas B	39	63
Grandes massas ( $\geq 10$ cm)	27	43.5
LDH $\geq$ normal	25	52
Idade > 60 anos	22	41.5
IPI		
Risco: Baixo/baixo intermediário	21/47	45
Risco alto/alto intermediário	26/47	55
Remissão completa	27	43.5
Recidivas	6/27	22
Óbitos	32	51.5
Sobrevida global - mediana 15 meses (1-114 meses)		
Sobrevida livre de doença - mediana 22 meses (1-108 meses)		

IPI (International Prognostic Index) - The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993.

### **Análise da resposta ao tratamento**

Pacientes com ausência de expressão da p53 obtiveram uma maior taxa de RC após quimioterapia ( $P=0.005$ ). O *status* da p53/ p21/WAF-1 foi também importante na obtenção de RC ( $P=0.01$ ). Pacientes com expressão negativa de c-Myc tiveram uma melhor resposta à quimioterapia. ( $P=0.035$ ). Estes resultados são apresentados na **tabela 8**.

A expressão das demais proteínas não influenciou a resposta ao tratamento ou recidiva.

**Tabela 8:** Correlação da expressão de p53 e c-Myc e p53/p21WAF1 *status* com resposta à quimioterapia

Expressão das proteínas	Remissão completa		
	Sim	Não	
p53*	<i>n</i> =26	<i>n</i> =27	
Negativo	24 (60%)	16 (40%)	$P=0.005$
Positivo	2 (16%)	11 (84%)	
p53/p21-status*	<i>n</i> =26	<i>n</i> =27	$P=0.01$
A	24 (60%)	16 (40%)	
B	1 (10%)	9 (90%)	
C	1 (34%)	2 (66%)	
c-Myc	<i>n</i> =22	<i>n</i> =23	$P=0.03$
Negativo	9 (75%)	3 (25%)	
Positivo	13 (39%)	20 (61%)	

\*9 casos não avaliados: 8 com óbito precoce e 1 paciente sem avaliação de p53 (com RC).

A= p53 neg/p21/WAF-1 neg ou pos; B = p53 pos/p21/WAF-1 neg ; C = p53 pos/p21/WAF-1 pos.

### **Análise da sobrevida**

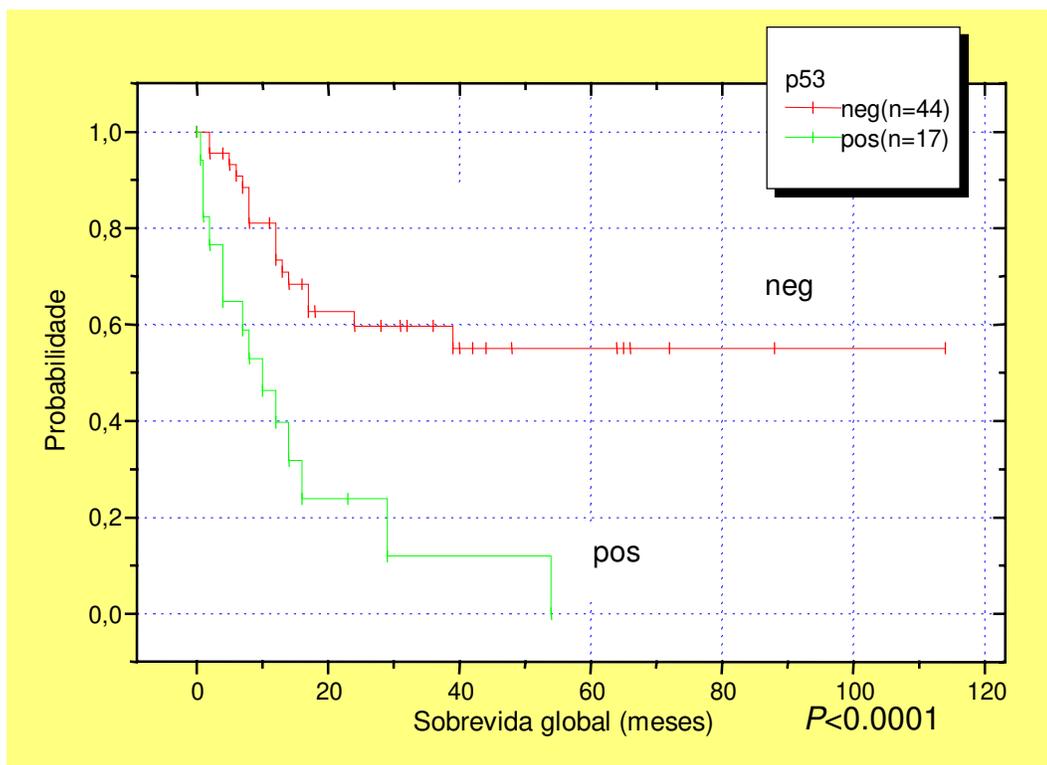
Observamos uma menor sobrevida global nos pacientes com expressão de p53, c-Myc e Mdm2 ( $p < 0.001$ , 0.05 and 0.037 respectivamente)(**gráficos 1, 2 e 3**). Resultados semelhantes foram observados quando analisamos separadamente os linfomas difusos de grandes células B ( $n=52$ ) ( $P < 0.001$ , 0.04, 0.01, respectivamente).

Em relação ao *status* p53/p21WAF-1, a SG foi maior no grupo A, e pior nos grupos B e C ( $P=0.04$ )(**gráfico 4**). Três casos não foram avaliáveis para esta análise.

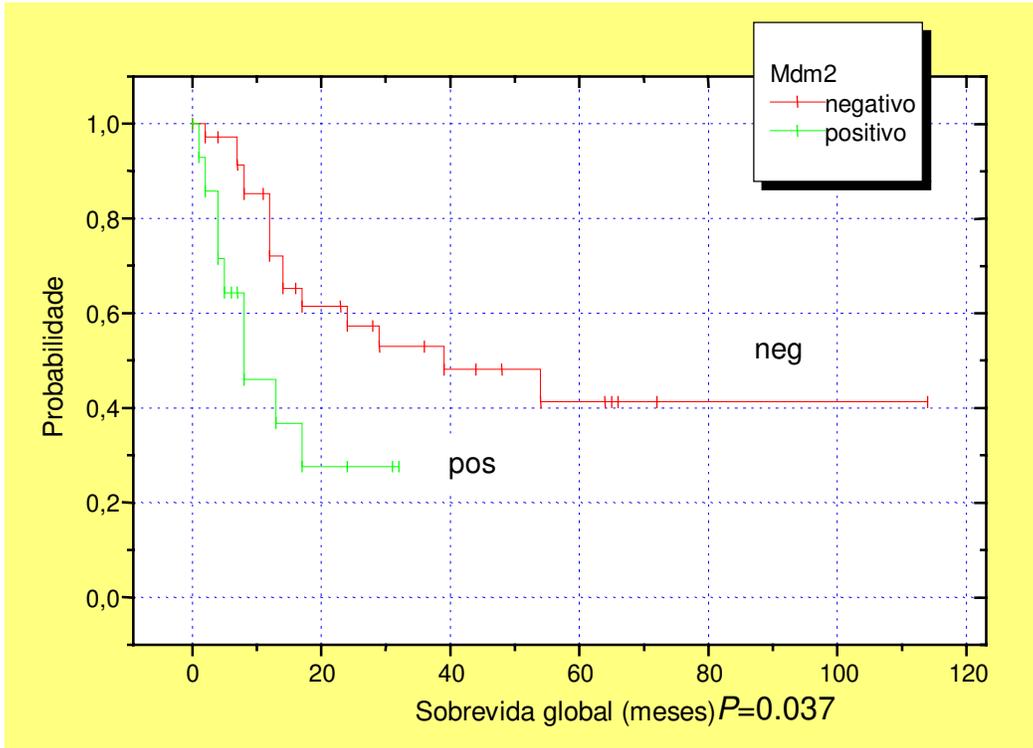
Dois pacientes apresentaram co-expressão da p53 e Mdm2. Ambos faleceram antes de completar 6 meses após o diagnóstico, enquanto que os pacientes p53 positivos/Mdm2 negativos tiveram uma sobrevida maior (17-54 meses). No momento da análise, 3 pacientes deste grupo estavam vivos.

Quando os pacientes foram estratificados de acordo com a idade  $< 55$  anos e  $\geq 55$  anos, a expressão negativa da p53 foi relacionada a um melhor prognóstico em termos de SG, em ambos os grupos. ( $P=0.0015$  e 0.0413, respectivamente). O mesmo foi observado quando os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento de Ann Arbor (estadio I/II vs III/IV)( $P=0.0001$  and 0.0013, respectivamente). No entanto, a expressão da Mdm2 e c-Myc somente influenciou a SG de pacientes com idade inferior a 55 anos ( $P = 0.0453$  e 0.0483, respectivamente). Pacientes com Ann Arbor estadio III e IV e expressão da Mdm2 tiveram uma menor SG ( $P = 0.0013$ ) comparados aos pacientes com ausência de expressão da Mdm2. A sobrevida mediana dos pacientes com idade inferior a 55 anos pode ser vista na **tabela 9**.

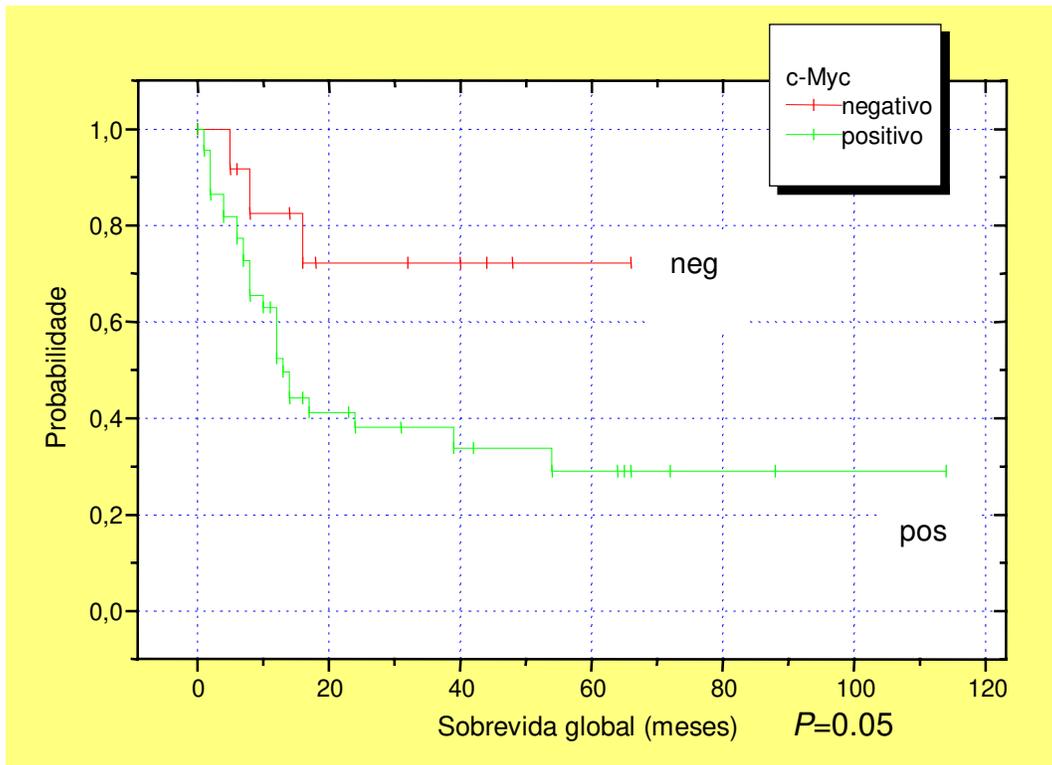
Não houve diferença em termos de SG ou SLD de acordo com o tipo de quimioterapia usados ou tipo histológico.



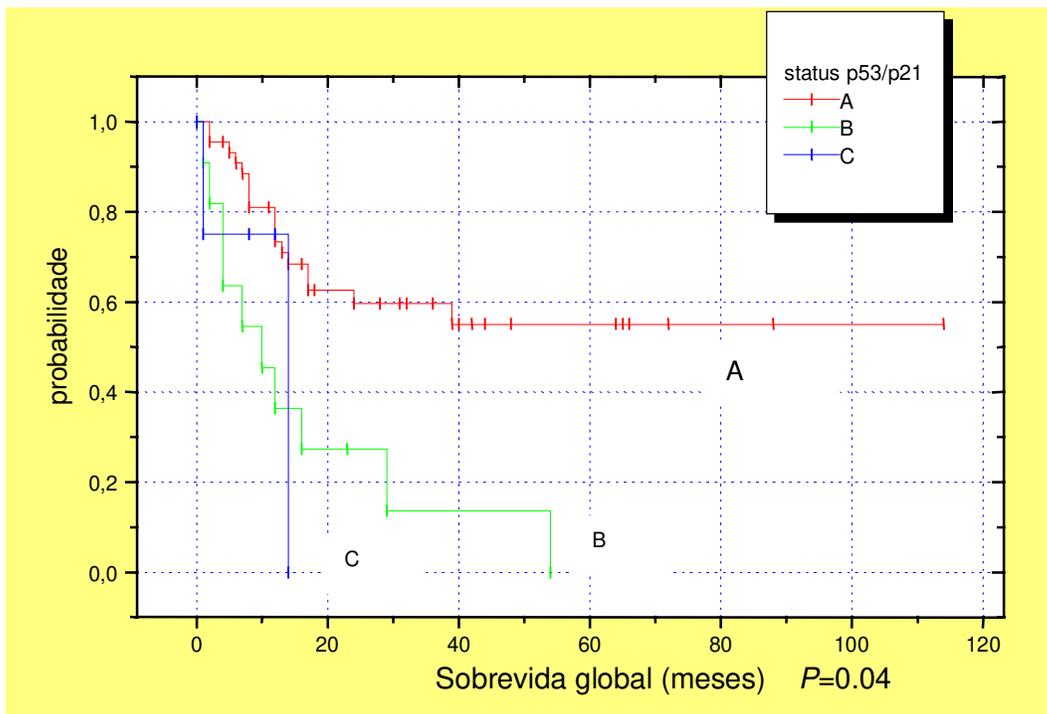
**Gráfico 1:** Sobrevida global de 61 pacientes com LNH de acordo com a expressão da p53



**Gráfico 2:** Sobrevida global de 44 pacientes com LNH de acordo com a expressão da Mdm2



**Gráfico 3:** Sobrevida global de 51 pacientes com LNH de acordo com a expressão da c-Myc



**Gráfico 4:** Sobrevida global de 59 pacientes com LNH de acordo com o *status* p53/p21/WAF1. A-p53(-)/p21/WAF-1(+) ou (-); B-p53(+)/p21/WAF-1(-); C-p53 (+)/p21/WAF-1(+)

**Tabela 9:** Análise da sobrevida global de pacientes com LNH agressivos  $\leq 55$  anos, de acordo com a expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular

Expressão das proteínas	n	Sobrevida mediana (meses)	P (log-rank)
c-Myc -	7	16	0.0483
c-Myc +	20	14	
p53 -	25	39	0.0015
p53 +	8	4	
Mdm2 -	17	39	0.0453
Mdm2 +	5	13	

**2.2. Correlação da expressão das proteínas reguladoras da apoptose (p53, Bcl-2, Bax, Bak, Mcl-1) com resposta ao tratamento e sobrevida em linfomas B de grandes células. Manuscrito publicado: Anexo II (PAGNANO et al,2002).**

Neste trabalho foram avaliados 33 pacientes com LNH difuso de grandes células B, diagnosticados e tratados no HC-Unicamp entre 1983 e 1998. A mediana de seguimento foi 32.5 meses. Foi realizada análise imunohistoquímica das proteínas p53, Bax, Bak, Bcl-2 e Mcl-1.

As características da população avaliada estão listadas na **tabela 10**. Dados individuais dos casos estudados estão no Anexo I (Tabela II). O seguimento clínico variou de 41 a 3741 dias (mediana - 390 dias), sendo considerado como a última data de acompanhamento a data do óbito ou da última consulta. Nove pacientes morreram em decorrência de doença progressiva e nove de outras causas. Cinco pacientes estavam vivos entre Janeiro e Abril/2000 e 9 pacientes perderam o acompanhamento.

Os pacientes foram divididos em 2 grupos: sobrevida longa (n=10), se obtiveram RC e a SG fosse superior a 3.5 anos e sobrevida curta (n=17), se foram resistentes à quimioterapia e morreram dentro de 1.5 ano a partir do diagnóstico.

### **Análise imunohistoquímica**

Os resultados da análise imunohistoquímica das proteínas Bax, Bak, Bcl-2 e Mcl-1 são provenientes da tese de mestrado de autoria de Marcos D. A. Silva (SILVA MDA, 1999).

Expressão da Bcl-2 foi observada em 19/32 pacientes (59%) e expressão negativa em 13 pacientes (40%). Uma amostra não pode ser analisada.

Expressão imunohistoquímica da Bax foi encontrada em 30 pacientes (92.5%). Em 18 casos (54.5%) a expressão foi observada em > 50% das células (+++). Somente 3 pacientes tiveram expressão negativa da Bax. Todos eles também apresentavam expressão negativa da p53.

A expressão da Bak foi avaliada em 21 pacientes. Houve 18 casos positivos (85.7%) e 3 casos negativos (14.3%), todos eles com p53 negativo e 2 com Bax positivo.

A proteína Mcl-1 foi hiperexpressa em 20/21 pacientes (95%).

Expressão nuclear da p53 foi observada em 9/32 pacientes (28%). Em 4 casos, a porcentagem de células positivas foi superior a 10%.

Observamos correlação positiva entre a expressão de Bax e Bak ( $P=0.001$ ), p53 e Bak (0.02) e Bcl-2 (++ e +++) com Bak (0.02).

**Tabela 10:** Características clínicas dos 33 pacientes com LNH difuso de grandes células B

		n	%
Gênero	Masculino	16	48.5
	feminino	17	51.5
Idade (anos)	Mediana	53 (25-85)	
	≤ 60	23	69.7
	> 60	10	30.3
Sintomas B	Presente	24	72.7
	ausente	9	27.3
Ann Arbor	I/II	12	36.4
	III/IV	21	63.6
Grandes massas	Presente	13	39.3
	Ausente	20	60.6
LDH	≤ normal	14	51.8
	> normal	13	48.2
Acometimento de medula óssea	Presente	4	12
	ausente	29	88
Doença extranodal	≤ um sítio	25	75.7
	2 ou mais sítios	8	24.3
Resposta à terapia	RC	12	46
	recidivas	2	16.6
SLD (dias)	Mediana - 1216 (123-3481)		
SG (dias)	Mediana - 390 (41-3741)		

### Análise da resposta ao tratamento e sobrevida

A análise da probabilidade de atingir RC mostrou que o estágio de Ann Arbor I e II foram associados a uma maior taxa de RC ( $P=0.009$ ). Os demais resultados estão incluídos na tabela 11 .

**Tabela 11:** Testes de associação para RC, em 26 casos de LNH difuso de grandes células B (Qui-quadrado ou exato de Fisher)

Variável	Valor de P
Sexo	0.951
Idade (categórica)	0.248
LDH (categórica)	0.670
Estadiamento (I,II,III,IV)	0.054
<b>Estadiamento (I/II vs III/IV)</b>	<b>0.009</b>
Sintomas B	0.19
Medula óssea	0.1
Sítios extranodais (0,1 vs 2,3)	0.391
Bcl-2 (0 vs 1,2,3)	0.944
Bcl-2 (0,1 vs 2,3)	0.697
Bax (0 vs 2,3)	0.58
Bax (0,2 vs 3)	1.00
Bak (0 vs 2,3)	1.00
Bak (0,2 vs 3)	1.00
Mcl-1 (0 vs 2,3)	0.444
Mcl-1 (0,2 vs 3)	0.153
p53 (0,1,2,3)	0.225
p53 (0 vs 1,2,3)	0.081
p53 (0,1 vs 2,3)	0.100
Tratamento	0.422

Na análise de regressão de Cox univariada a expressão de p53 ++ e +++ foi significativamente associada com uma menor SG ( $P=0.0098$ ; risco relativo=4,774; 95% de intervalo de confiança=1.457-15.63). Apresentaram  $P<0,20$  as variáveis sexo, idade, medula óssea, Mcl-1 e tratamento. Permaneceram significativas na análise multivariada a expressão da p53 e o acometimento de medula óssea, que foram associados com uma menor SG (**tabela 12**) ( $P=0.0045$  e  $0.0269$ , respectivamente). Os resultados da análise univariada estão na **Tabela 13**.

Nas curvas de Kaplan-Meier, observamos que pacientes com expressão negativa da p53 ou com baixa expressão (+) apresentaram uma maior SG ( $P=0.0045$ ; **gráfico 5**). A expressão da Bcl-2, Bak, Bax e Mcl-1 não influenciou a SG dos pacientes (**gráfico 6**).

Não foi observada diferença nas variáveis selecionadas, comparando-se os grupos de diferentes prognósticos (sobrevida longa e curta).

SLD não pode ser calculada devido ao reduzido número de casos.

**Tabela 12:** Análise multivariada dos fatores que influenciam SG (modelo de regressão de Cox)

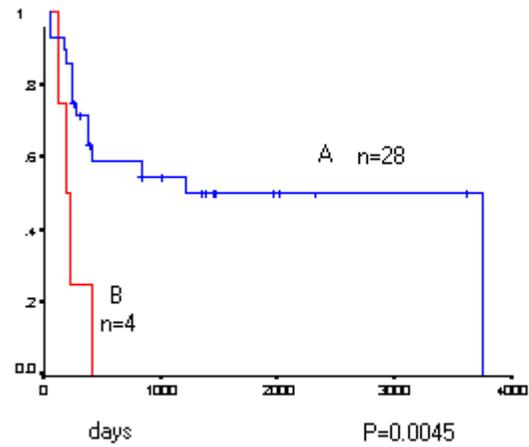
Para p53 0, + vs ++ , +++

Variável	Razão de risco	95% IC	P
medula óssea (neg vs pos)	4.524	1.188-17.226	0.0269
p53 (0,+ vs ++,+++)	8.393	1.937-36369	0.0045

**Tabela 13:** Análise de regressão de Cox univariada para sobrevida global de 33 pacientes com LNH difuso de grandes células B

<b>variável</b>	<b>valor de p</b>	<b>Razão de risco</b>	<b>IC 95%RR</b>
<i>Sexo (masc vs fem)*</i>	<i>0.1583</i>	<i>1.962</i>	<i>0.769-5.007</i>
Idade (categórica)	0.2789	1.674	0.659-4.253
LDH (categórica)	0.8133	1.126	0.421-3.013
Estadiamento (I,II,III,IV)	0.9566	1.012	0.649-1.579
Estadiamento (I/II vs III/IV)	0.7907	1.143	0.426-3.063
Sintomas B	0.4635	1.517	0.498-4.620
<i>Medula óssea (pos vs neg)*</i>	<i>0.0955</i>	<i>2.583</i>	<i>0.846-7.884</i>
Sítios extranodais (0,1 vs 2,3)	0.3100	1.663	0.623-4.439
Bcl-2 (0 vs 1,2,3)	0.5442	0.751	0.297-1.896
Bcl-2 (0,1 vs 2,3)	0.2359	0.510	0.167-1.553
Bax (0,2 vs 3)	0.3923	1.1514	0.585-3.920
Bak (0,1,2,3)	0.2696	1.421	0.762-2.650
Bak (0,2 vs 3)	0.5703	1.397	0.440-4.432
<i>Mcl-1 (0,2 vs 3)*</i>	<i>0.0933</i>	<i>3.159</i>	<i>0.824-12.10</i>
<i>Mcl-1 (0,1,2,3)*</i>	<i>0.0934</i>	<i>2.921</i>	<i>0.835-10.21</i>
<b><i>p53 (0,1,2,3)*</i></b>	<b><i>0.0343</i></b>	<b><i>1.659</i></b>	<b><i>1.038-2.653</i></b>
<i>p53 (0 vs 1,2,3)*</i>	<i>0.0706</i>	<i>2.577</i>	<i>0.924-7.188</i>
<b><i>p53 (0,1 vs 2,3)*</i></b>	<b><i>0.0098</i></b>	<b><i>4.774</i></b>	<b><i>1.457-15.63</i></b>
<i>Tratamento*</i>	<i>0.1350</i>	<i>0.428</i>	<i>0.141-1.303</i>

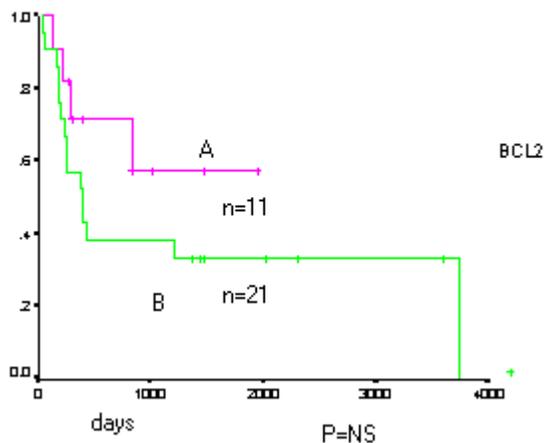
\* as variáveis com P<0.20 (em itálico) foram selecionadas para análise multivariada



A – expressão de p53 0 e +

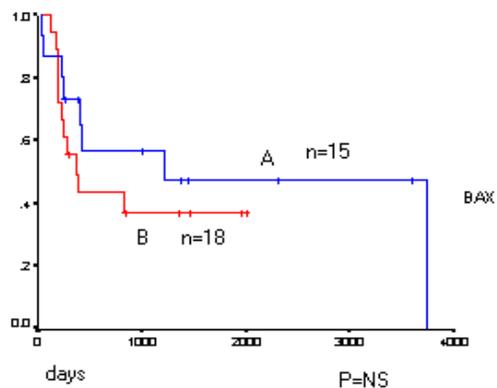
B - expressão de p53 ++ e +++

**Gráfico 5:** Sobrevida global dos pacientes com LNH difusos de grandes células B, de acordo com a expressão da p53



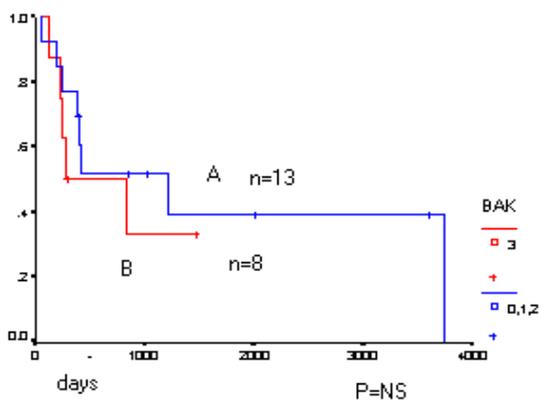
A- Bcl-2: expressão ++ , +++

B- Bcl-2: expressão 0 , +



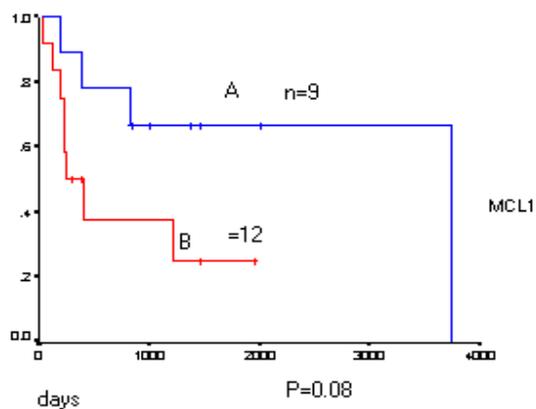
A – Bax: expressão 0, +, ++

B – Bax: expressão +++



A – Bak: expressão 0,+,++

B – Bak: expressão +++



A – Mcl-1: expressão 0, +, ++

B – Mcl-1: expressão +++

**Gráfico 6:** Sobrevida global dos pacientes com LNH difuso de grandes células B de acordo com a expressão da Bcl-2, Bax, Bak e Mcl-1

### 3. Pesquisa de mutação do gene *p53* nos casos com expressão da *p53*

Foi realizada a extração de DNA dos blocos de parafina de 15 casos de LNH agressivos que apresentavam expressão da *p53*, através do método previamente descrito (kit de extração DNA easy tissue kit) (QIAGEN, Germany).

O DNA extraído foi amplificado com os iniciadores dos éxons 5-9 do gene *p53*, através da reação da cadeia de polimerase (PCR).

O produto do PCR foi purificado utilizando-se o kit de purificação de PCR – QIAGEN.

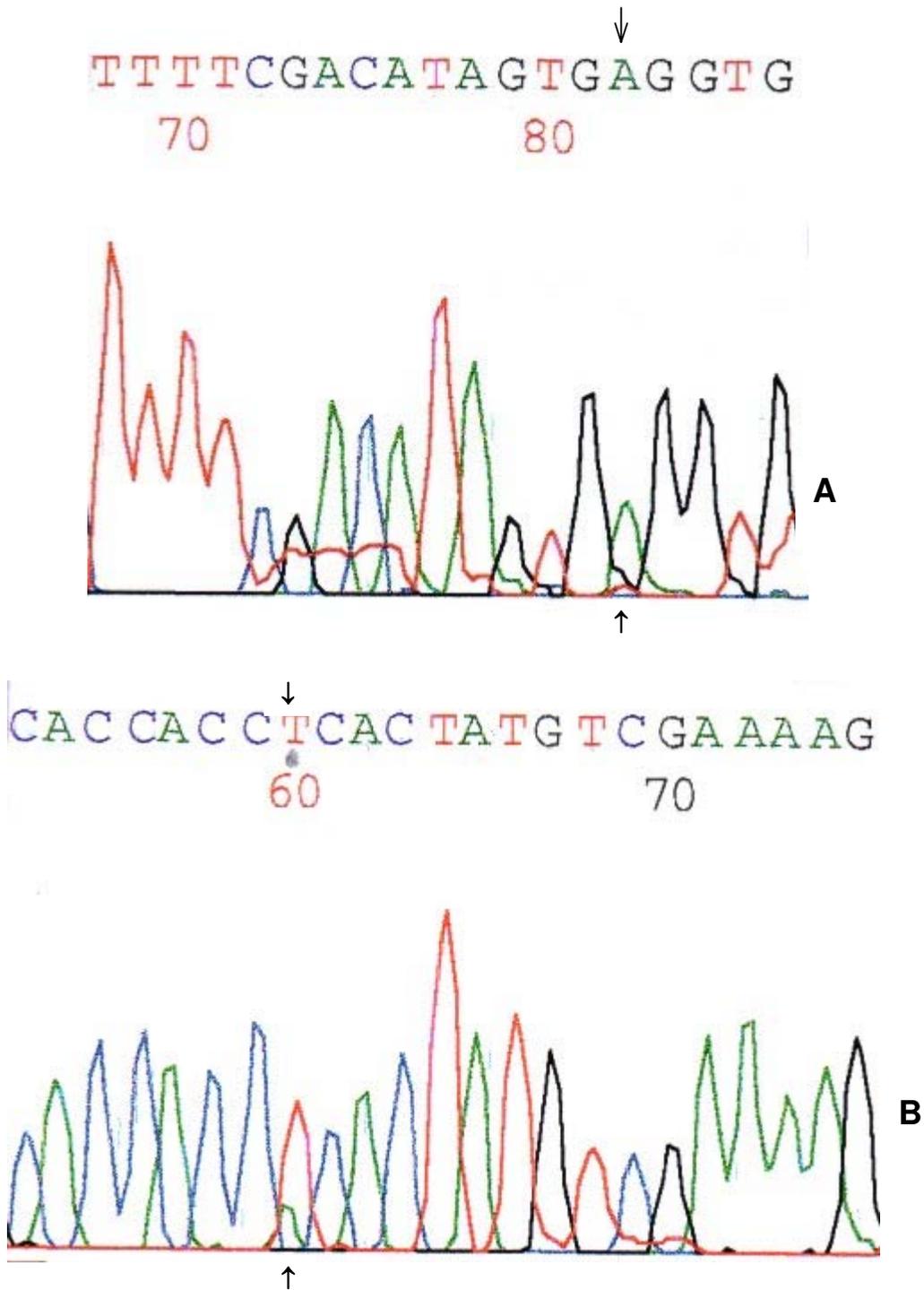
Foi realizado sequenciamento direto dos produtos do PCR com sequenciador automático ABI-PRISM 377 de 7 pacientes (**tabela 12**), com o achado de uma mutação de ponto no gene *p53* no éxon 6 (**figuras 16 A e B**).

Não foi possível a amplificação por PCR dos demais casos por dificuldades técnicas. Alguns não tinham material suficiente e em outros houve degradação do DNA, provavelmente secundário ao processo de fixação com formol.

**Tabela 14:** Resultados das reações de sequenciamento dos éxon 6 e 9 – presença de mutações do gene *p53*

Paciente/tabela I	Tipo histológico	éxon 6	éxon 9	Expressão da <i>p53</i>	Expressão da <i>p21</i>
1/3	Difuso de grandes células B	Sem mutação		++	0
14/11	Anaplásico		Sem mutação	++	+
15	Difuso de grandes células B	Sem mutação	Sem mutação	+	+
19	Anaplásico	Sem mutação	Sem mutação	+	0
23/22	Difuso de grandes células B	Sem mutação		+	+
<b>31/40</b>	Difuso de grandes células B	<b>mutação*</b>		<b>++</b>	<b>0</b>
34	Difuso de grandes células B	Sem mutação		+	+

\* mutação no éxon 6 : códon 216 (Val→Glu; T→A) (figura 1). Essa mutação foi descrita em pacientes com linfoma de Burkitt (GAIDANO et al, 1991) e com adenocarcinoma de mama (UMEKITA et al, 1994).



**Figura 16:** Reação de sequenciamento do gene *p53* de um paciente com LNH difuso de grandes células B. A seta mostra a substituição do nucleotídeo T→A , usando-se o iniciador sense (A) e antisense (B).



*DISCUSSÃO*

No nosso trabalho avaliamos o papel da expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular (p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc) e da apoptose (p53, Bax, Bak, Bcl-2, Mcl-1) no prognóstico de pacientes com linfomas agressivos.

No presente estudo observamos hiperexpressão da proteína p53 nos linfomas agressivos semelhante à relatada na literatura (VILLUENDAS et al, 1993; SCHLAIFER et al, 1996; KODURU et al, 1997; SANCHEZ et al, 1998; MOLLER et al, 1999). Vários estudos demonstraram hiperexpressão da p53 secundária a acúmulo nuclear da proteína nos LNH, cuja frequência varia dependendo do tipo histológico (IMMAMURA et al, 1994; DE RE et al, 1994; SCHLAIFER et al, 1996; MARTINEZ-DELGADO et al, 1997; SOINI et al, 1998; SANCHEZ et al, 1998).

Em relação aos linfomas B, detectamos expressão da p53 em 50% dos linfomas de Burkitt e em 28% dos linfomas difusos de grandes células B. De fato, a hiperexpressão da p53 é mais frequentemente observada nos linfomas de Burkitt (VILLUENDAS et al, 1992; SOINI et al, 1992; NAGAI et al, 1998), nas formas agressivas de linfomas de células do manto (HERNANDEZ et al, 1996) e em cerca de 17-40% dos linfomas difusos de grandes células B (KRAMER et al, 1996; NAVARATNAM et al, 1995; PIRIS et al, 1994; SANCHEZ et al, 1998).

Encontramos expressão da p53 em 40% dos linfomas T-periféricos, 33% dos anaplásicos CD 30 + e somente em um dos oito casos de linfomas linfoblástico T (12,5%), corroborando os dados de PETIT e colaboradores (2001) que observaram expressão da p53 em 37% dos linfomas T, sendo frequente nos linfomas anaplásicos CD30+, T-periféricos, NK/T nasal e raro nos linfomas linfoblásticos.

No nosso trabalho, a expressão da p53 foi relacionada a uma pior resposta à quimioterapia e menor sobrevida global. O valor prognóstico do papel do p53 e das proteínas relacionadas com o controle do ciclo celular e apoptose nos LNH agressivos ainda é um tema controverso na literatura. Os diferentes métodos de avaliação do status do p53, a seleção dos pacientes, análise estatística e as diferenças de tratamento podem dificultar a comparação entre diversos estudos. Um exemplo que pode ser citado é um trabalho do grupo de PIRIS et al (1994), que mostrou menor sobrevida em LNH B de alto

grau de malignidade em pacientes com expressão da p53 e Bcl-2. No entanto, esses autores não especificaram exatamente como era feita a avaliação da imunohistoquímica e, na análise de sobrevida, linfomas de Burkitt, que apresentam um comportamento clínico distinto, foram analisados em conjunto com outros linfomas B, cuja evolução clínica e tratamento são diferentes. NIEDER et al (2001), numa meta-análise, não puderam concluir se de fato a presença de mutação do *p53* ou superexpressão da proteína são realmente fatores preditivos de mau prognóstico.

No nosso estudo, remissão completa foi atingida por 60% dos pacientes com expressão negativa da p53 e somente em 16% dos casos com expressão da p53 ( $P=0.005$ ). A hiperexpressão da p53 poderia estar relacionada nesses casos a uma disfunção da proteína, que é fundamental na interrupção do ciclo celular e indução da apoptose em resposta a lesões do DNA. A suscetibilidade à apoptose é um fator determinante de resposta à quimioterapia antineoplásica. Portanto, as células neoplásicas com disfunção da p53 seriam incapazes de responder ao estímulo tóxico (lesão do DNA causado pelo quimioterápico), justificando a má resposta ao tratamento. Diversos estudos mostram uma associação entre resistência a agentes quimioterápicos e diminuição da capacidade celular de indução da apoptose (SACHS et al, 1993; LOWE et al, 1994; O'CONNOR et al, 1997; OLIVEIRA et al, 2002). Corroborando nossos resultados, WILSON et al (1997) e MOLLER et al (1999) relataram que anormalidades da p53 foram relacionadas com resistência a drogas antineoplásicas e pior resposta à quimioterapia. SAKAI et al (1998) não encontraram correlação entre expressão da p53 e resposta à quimioterapia. Porém, nesse estudo poucos casos foram avaliados, e o grupo estudado era constituído por diferentes subtipos histológicos de LNH não comparáveis. Em um estudo brasileiro, expressão de p53 foi encontrada em 38% de 24 casos de LNH difuso de grandes células B, porém não foi observada correlação entre expressão e resposta à quimioterapia ou IPI (KERBAUY et al, 2001).

A análise dos nossos resultados demonstrou que a expressão da p53 é um fator prognóstico independente na determinação da SG, quando comparada à idade, LDH e estadio de Ann Arbor. Os pacientes com expressão da p53 tiveram uma sobrevida mediana de 4 meses, enquanto que os casos com expressão negativa da p53 apresentaram uma

mediana de 39 meses ( $P=0,0015$ ). Quando os pacientes foram estratificados de acordo com a idade  $< 55$  anos e  $\geq 55$  anos, a expressão negativa de p53 foi relacionada a um melhor prognóstico em termos da SG, em ambos os grupos ( $P=0,0015$  e  $0,0413$ , respectivamente). O mesmo foi observado quando os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento de Ann Arbor (estadio I/II vs III/IV)( $P=0,0001$  e  $0,0013$ , respectivamente). A análise isolada dos casos de LNH difuso de grandes células B foi realizada no intuito de avaliar a expressão das proteínas num grupo mais homogêneo de pacientes. Pudemos observar os mesmos resultados significativos em relação às curvas de sobrevida.

Os pacientes com expressão negativa da p53 apresentaram uma maior sobrevida em comparação com os casos com expressão da p53 e expressão ausente da p21/WAF-1. Esse último fenótipo é geralmente associado com a presença de mutações de ponto, que podem inativar a função da p53 (CHILOSI et al, 1996; VILLUENDAS et al, 1997; KODURU et al, 1997). Por outro lado, superexpressão da p53 selvagem é associada com acúmulo da p21/WAF-1 (MAESTRO et al, 1997). Nos linfomas anaplásicos CD 30 + é comum co-expressão das duas proteínas, mas mutações do p53 são raramente observadas (CESARMAN et al, 1993).

Portanto, a análise imunohistoquímica combinada da p53 e p21/WAF-1 é útil, pois traz informações a respeito do estado funcional do gene supressor p53. MOLLER et al (1999) analisaram 34 pacientes com LNH difuso de grandes células B e encontraram uma sensibilidade e especificidade de 100% na detecção de mutações de ponto do p53, associando-se a expressão de ambas as proteínas. Neste estudo, os casos com hiperexpressão da p53 e expressão negativa da p21/WAF-1 apresentaram uma menor sobrevida. De fato, um dos casos que sequenciamos apresentou uma mutação no éxon 6 do p53. O paciente apresentava hiperexpressão da p53 (++) e ausência de expressão da p21/WAF-1. Sua evolução clínica foi extremamente rápida, com falha de resposta à quimioterapia, falecendo 7 meses após o diagnóstico, em decorrência de progressão de doença.

Assim como em nosso estudo, KODURU et al (1997) observaram que presença de anormalidades da p53 (mutações e hiperexpressão) teve influência negativa na sobrevida de pacientes com linfomas de células B. Esses achados corroboram os trabalhos de PIRIS

et al (1994) e NAVARATNAM et al, (1998) que haviam previamente relatado a associação entre hiperexpressão de p53 e menor sobrevida. No entanto, outros autores não encontraram correlação entre expressão de p53 e sobrevida em LNH difuso de grandes células B (KRAMER, 1996; SANCHEZ, 1998; OSADA, 1999).

Nos estudos baseados na análise de DNA, mutações do *p53* foram encontradas em 19-33% dos linfomas de Burkitt (PREUDHOMME et al, 1995) e em 22% dos linfomas difusos de grandes células B (ICHIKAWA et al, 1997). Neste último trabalho, houve uma menor sobrevida dos pacientes com mutação do *p53*, porém somente nos grupos de IPI de risco baixo e baixo-intermediário. SÁNCHEZ-BEATO et al (2001) observaram uma menor sobrevida nos LNH difuso de grandes células B com acúmulo de alterações do *p53*, *p16* e *p27*, porém não houve diferença de sobrevida entre os pacientes com e sem mutação do *p53* isoladamente.

No nosso estudo, um dos objetivos iniciais era realizar a pesquisa de mutações nas regiões do gene *p53* onde elas são mais frequentemente encontradas, ou seja, no domínio de ligação do DNA, localizado nos éxons 5-8 (códon 126-306). O sequenciamento destes éxons detecta cerca de 85% das mutações do *p53* (KOCIALKOWSKI et al, 1995). No entanto, a análise de mutações do *p53* foi prejudicada em nosso trabalho por dois motivos: material insuficiente (bloco desbastado) e dificuldade de extração de DNA intacto dos blocos, o que impediu a amplificação adequada pela técnica de PCR. Atribuímos essa dificuldade ao tipo de material utilizado, tecido fixado em formol e embebido em parafina. Durante a fixação por formalina, o formaldeído dentro dos tecidos muda gradualmente para ácido fórmico, que pode hidrolisar o DNA. O tempo de fixação (superior a 24 horas), o período de estocagem do bloco (GREER et al, 1994) e o uso de formalina não tamponada também podem afetar a qualidade do DNA (GOELZ et al, 1985; FRANK et al, 1996). A maior parte dos nossos casos apresentaram um produto de PCR inadequado, com bandas de fraca intensidade, amplificação de produtos inespecíficos e não amplificação em vários casos. Só foi possível realizar sequenciamento de sete casos, pois o produto do PCR dos demais éxons foi inadequado para a reação, mesmo após purificação do PCR.

No nosso trabalho, a expressão da c-Myc foi encontrada em 69-75% dos linfomas, com exceção dos linfomas anaplásicos CD30+ , onde foi observada em 40% dos casos.

Nos pacientes com LNH difuso de grandes células B, a expressão negativa da c-Myc correlacionou-se com melhor resposta à quimioterapia (75% dos pacientes negativos atingiram RC, enquanto que somente 25% dos positivos responderam ao tratamento quimioterápico). Além disso, observamos uma menor sobrevida global nos pacientes com hiperexpressão da c-Myc, porém somente naqueles com idade inferior a 55 anos. Recentemente CHANG et al (2000) encontraram correlação entre co-expressão da c-Myc e p53 com estadios mais avançados e IPI de risco alto e alto/intermediário em pacientes com LNH difuso de grandes células B, porém o reduzido número de casos (n=21) não permitiu a realização da análise de sobrevida. No entanto, num estudo com maior número de casos (n=76), ZHANG et al (1999) não encontraram influência da expressão de c-Myc em relação à SG e SLD dos pacientes avaliados.

Não observamos correlação entre a expressão da proteína p21/WAF-1 com as demais proteínas estudadas (p53, c-Myc, Mdm-2 ou PCNA) e com parâmetros clínicos. Isoladamente, a expressão da p21/WAF-1 não teve influência na SG, exceto quando associada à expressão da p53. Por outro lado, PYNOL et al (1997) observaram uma expressão diminuída da p21/WAF-1 em células cancerosas, esta correlacionada com progressão de doença. Um estudo recente mostra que a hipermetilação da p21/WAF-1, levando a uma diminuição dos níveis de RNAm e, portanto, da proteína, também seria um fator de mau prognóstico para algumas neoplasias (ROMAN-GOMEZ et al, 2002).

No nosso trabalho, a expressão da Mdm2 foi observada em cerca de 30% dos linfomas de alto grau de malignidade histológico, corroborando resultados de outros autores (MAESTRO et al, 1995; KAWAMATA et al, 1996; SANCHEZ et al, 1998; MOLLER et al, 1999; EISCHEN et al, 1999). A Mdm2 inativa e degrada a p53, alterando, portanto, os mecanismos de indução da apoptose e bloqueio da proliferação celular mediados pela p53. A amplificação ou superexpressão da Mdm2 pode aumentar a capacidade de transformação neoplásica da célula e ocorre em várias neoplasias humanas (BARTEL et al, 2001). Nos linfomas, o gene *mdm2* não está amplificado, porém a expressão da proteína está

aumentada nos linfomas agressivos, devido a um aumento da tradução do RNA (KAWAMATA et al, 1996; CAPOULADE et al, 1998).

Observamos no nosso estudo que os pacientes com linfomas agressivos e expressão negativa da Mdm2 obtiveram uma melhor SG. Quando os pacientes foram estratificados pela idade, a expressão negativa de Mdm2 foi associada com uma maior SG somente nos pacientes com idade inferior a 55 anos. Nestes pacientes, a sobrevida mediana foi 39 meses para os casos negativos e 13 meses para os positivos ( $P = 0.04$ ). A expressão da Mdm2 também foi considerada um fator prognóstico independente nos casos com estadio avançado (Ann Arbor III e IV). Pacientes Mdm2 positivos tiveram uma menor SG comparados aos pacientes Mdm2 negativos ( $P = 0.0013$ ). Corroborando nossos resultados, SANCHEZ et al (1998) também identificaram a baixa expressão de Mdm2 como fator de bom prognóstico nos LNH difusos de grandes células B e MOLLER et al (1999) mostraram associação da hiperexpressão de Mdm2 com uma menor SG em linfomas foliculares, LNH de zona marginal e LNH de células do manto. Portanto, esses dados sugerem que a hiperexpressão da Mdm2 é de fato um fator de mau prognóstico nos LNH.

Na análise das proteínas reguladoras da apoptose, observamos uma alta expressão de Bak, Bax, Mcl-1 e Bcl2 nos LNH difusos de grandes células B.

A proteína Bcl-2 é considerada uma molécula importante na resistência a drogas, devido a seu efeito anti-apoptótico. Expressão da Bcl-2 foi encontrada em 59% dos nossos casos com LNH difuso de grandes células B. No entanto, a expressão da Bcl-2 não foi correlacionada com resposta à quimioterapia, SG ou SLD, corroborando os dados de ZHANG et al (1999) e WILSON et al (1997). O impacto clínico da expressão da Bcl-2 foi bem ilustrado por KRAMER et al (1998), que mostrou uma SLD significativamente maior nos pacientes com LNH difuso de grandes células B com ausência de expressão da Bcl-2. Outros estudos também demonstraram um efeito adverso da alta expressão da Bcl-2, associando-a a uma menor SLD (KRAMER, 1996; HERMINE, et al 1996; GASCOYNE et al, 1997; SANCHEZ et al, 1998) e menor SG (HILL et al, 1996; GASCOYNE et al, 1997; KRAJEWSKI et al, 1997; KRAMER et al, 1998; BAIREY et al, 1999) nos LNH difuso de grandes células B. Uma explicação possível para essa discrepância de resultados é que a expressão de genes associados ao Bcl-2 (Bax, Bcl-xl) e a presença de mutações ou

disfunção da p53 poderiam modular o efeito da Bcl-2 (PEPPER et al, 1997; PEARSON et al, 2000) .

A proteína pró-apotótica Bax é regulada pela p53 (PEARSON et al, 2000) e forma um dímero com a proteína Bcl-2, antagonizando seu efeito anti-apoptótico. Observamos uma alta expressão da Bax nos nossos pacientes com LNH difuso de grandes células B, com exceção de três casos, mas não houve diferença em relação ao tempo de sobrevida entre os casos com expressão ou não da proteína. Superexpressão da Bax foi relatada em 100% dos linfomas do tipo MALT e os casos com histologia de alto grau de malignidade apresentaram maior número de células positivas (STEFANAKI et al, 1998). A expressão da Bax está relacionada com tumores mais agressivos e indiferenciados (KRAJEWSKI et al, 1997) e a baixa expressão da Bax foi associada com um pior prognóstico em tumores sólidos (KRAJEWSKI et al, 1995). No entanto, a expressão da Bax não é considerada um fator prognóstico independente nos LNH (GASCOYNE et al, 1997). Neste último trabalho citado, a análise combinada da expressão da Bax com a expressão da Bcl-2 mostrou que, os pacientes com baixa expressão da Bcl-2 e a ausência de expressão da Bax apresentaram menor SG e SLD, sugerindo que a ausência da Bax conferia um fenótipo mais agressivo. A diminuição dos níveis da Bax poderia levar à resistência das células tumorais à indução da apoptose pelos agentes quimioterápicos. Contrariando esses resultados, alguns estudos correlacionaram alta expressão da Bax com pior prognóstico em pacientes com LNH. Recentemente, BAIREY et al (1999) observaram que a expressão da Bax foi associada com menor SG num grupo com LNH quimiorresistente. A superexpressão da Bax poderia estar relacionada com a presença de mutações do gene, pois podem ser encontradas em cerca de 21% de linhagens de células de neoplasias hematológicas humanas (MEIJERINK et al, 1998). Por outro lado, mutações do *bax* do tipo “null” ou deleções, com desvio de leitura, poderiam levar a uma perda da expressão da proteína (GUTIERREZ et al, 1998, BRIMMEL et al, 1998).

A proteína Mcl-1 é uma proteína anti-apoptótica, cuja expressão nos LNH foi relatada inicialmente por SCHLAIFER et al (1996). No nosso trabalho, superexpressão da Mcl-1 foi observada em quase todos os casos avaliados, mas não encontramos uma associação relevante da expressão da Mcl-1 com parâmetros clínicos e sobrevida. A análise

da curva de sobrevida de Kaplan-Meier sugere uma pior sobrevida em tumores com alta expressão da Mcl-1, embora não seja estatisticamente significativa ( $P=0,08$ ), provavelmente devido ao pequeno número de casos avaliados. A alta expressão da Mcl-1 foi associada com falha de resposta ao tratamento quimioterápico de pacientes com LLC (KITADA et al, 1998). É interessante também citar o trabalho de ZHOU et al (2001), onde foram monitorados camundongos transgênicos que expressavam Mcl-1. Cerca de 85% dos animais transgênicos desenvolveram LNH de vários subtipos, principalmente do tipo folicular e difuso de grandes células B num período de 2 anos de observação. Esse achado demonstra a importância da regulação dessa proteína e seu provável envolvimento na gênese dos LNH.

Bak é uma proteína pró-apoptótica regulada pela p53 (POHL et al, 1999; PEARSON v, 2000; KITAMURA et al, 1999). Poucos trabalhos na literatura avaliaram a correlação entre a expressão da Bak e prognóstico em LNH. No nosso estudo, superexpressão da Bak foi observada na maioria dos LNH difuso de grandes células B. No entanto, a superexpressão da Bak não foi associada a uma menor sobrevida global, corroborando os dados publicados por BAIREY et al (1999). Por outro lado, SHOELCH et al (1999) descreveram um aumento de expressão da Bak relacionado à progressão de doença em carcinoma epidermóide oral, independente do status do *p53*.

Em relação à atividade proliferativa dos nossos casos, esta foi avaliada através da expressão da PCNA. Essa proteína, hipo-regulada pela p53, detecta células nas fases  $G_1$  tardia e S do ciclo celular, correlacionando-se diretamente com as taxas de proliferação celular e síntese de DNA. A PCNA representa a atividade proliferativa dos LNH, correlacionando-se com outros marcadores, como o Ki-67, MIB-1 e fração da fase S (PICH et al, 1994). Observamos expressão da PCNA em todos os casos avaliados e encontramos uma maior taxa de células positivas e maior frequência de expressão nos linfomas de Burkitt (77% com padrão +++ ) e linfoblástico (85,6 % com padrão +++). Observamos correlação entre o grau da expressão da PCNA com a da c-Myc nos linfomas agressivos ( $P=0.002$ ), ambas relacionadas com proliferação celular. Tal associação foi descrita por PALESTRO et al (1997), que analisou proliferação celular com MIB-1, expressão da Bcl-2, c-Myc e p53 em linfoma linfocítico e encontrou correlação direta da expressão de MIB-1

com a da c-Myc, o que poderia estar relacionado com doença mais agressiva. No entanto, em concordância com nosso trabalho, esse autor também não encontrou correlação entre o marcador de proliferação com a expressão da p53, ao contrário do observado no trabalho de KORKOLOPOULOU et al (1994). Tal correlação pode ocorrer, pois a p53 selvagem tem um efeito de regulação negativa sobre a PCNA, impedindo a progressão das células no ciclo celular. Porém no caso de uma p53 desregulada ou com mutação haveria o efeito contrário, com aumento da expressão da PCNA, levando à proliferação celular.

Em conclusão, o nosso estudo demonstrou a influência das proteínas p53, Mdm2, c-Myc e provavelmente Mcl-1 no prognóstico dos pacientes com LNH agressivos. As demais proteínas avaliadas (Bcl-2, Bax, Bak), envolvidas na apoptose, não tiveram influência na resposta ao tratamento, embora estivessem altamente expressas.



*CONCLUSÃO*

1. A expressão das proteínas p53 e c-Myc foi relacionada a uma pior resposta à quimioterapia nos pacientes com linfomas agressivos.
2. A expressão da p53, Mdm2 e c-Myc foi relacionada a uma menor SG nos pacientes com linfomas agressivos e nos pacientes com LNH difuso de grandes células B.
3. O fenótipo p53+/p21/WAF-1- foi relacionado a um pior prognóstico (menor sobrevida e pior resposta à quimioterapia) nos pacientes com linfomas agressivos.
4. As proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak foram altamente expressas nos pacientes com LNH difuso de grandes células B. No entanto, não houve correlação da expressão dessas proteínas com parâmetros clínicos, resposta à quimioterapia e sobrevida.
5. As proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 e Bcl-2 também foram altamente expressas nos LNH difusos de grandes células B. A expressão de Bcl-2 não foi correlacionada com sobrevida ou resposta à quimioterapia. No entanto, houve uma tendência de menor sobrevida global nos pacientes com hiperexpressão de Mcl-1.
6. A utilização de material fixado em formol e embebido em parafina oferece dificuldades técnicas na obtenção de DNA intacto para realização de PCR e sequenciamento. No entanto, é possível obter amplificação em alguns casos.
7. A técnica de imunohistoquímica é um método simples e rápido de avaliação da proteína p53 e oferece informações relevantes relacionadas ao prognóstico dos linfomas agressivos, principalmente quando associada à avaliação da p21/WAF-1.



*SUMMARY*

Aggressive non-Hodgkin's lymphomas (NHL) form a heterogeneous group in terms of clinical presentation, histology, immunophenotype, response to treatment and prognosis. Diffuse large B-cell NHL (DLCL) constitute up to 20-25% of NHL in many series. Combination chemotherapy may cure 40-50% of adult patients. Several clinical prognostic factors have been described to predict clinical outcome, as age, LDH, performance status, and stage and are useful for identifying high-risk patients, who would benefit from a more intensive approach.

Abnormalities of cell cycle and apoptosis regulating proteins seem to be an important mechanism of tumorigenesis and may play a role in the prognosis of aggressive NHL.

The expression of p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins were examined by the immunohistochemistry of paraffin embedded tissues of 113 high grade non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and in 62 patients with aggressive NHL correlated to clinical data. Expression of p53, p21/WAF-1, Mdm2 and c-Myc protein was observed in 17 out of 62 cases (30%), 25 out of 60 (42%), 13 out of 44 (30%) and 39 out of 51 (76.5%), respectively. The p53+/p21WAF-1 phenotype, which is more frequently found in p53 mutations, was associated with a worse overall survival ( $P=0.04$ ) and with a lower rate of complete response (CR) ( $PF=0.01$ ). p53 and c-Myc negative expression was related to a better response to chemotherapy ( $PF=0.005$  and  $0.035$ , respectively). The expression of p53, c-Myc and Mdm2 was related to a shortened overall survival ( $P < 0.001$ ,  $0.05$  and  $0.037$  respectively), suggesting that the expression of these proteins could be associated with a poor outcome in these patients.

We looked for mutations of p53 gene in aggressive NHL patients with hiperexpression of p53 protein (n=17). DNA extraction was performed in 15 patients and PCR amplification of exons 5-9 was possible in 7 cases. We found a point mutation in exon 6 (Val→Glu;T→A), in a patient with p53 hiperexpression and p21 negative expression.

We also evaluated the expression of apoptosis-regulating proteins (p53, Bcl-2, Bax, Bak and Mcl-1) of paraffin-embedded tissues of 33 patients with diffuse large B-cell NHL, and assessed the relationship of these proteins to clinical outcome and response to chemotherapy.

Our results showed that p53 expression was an independent immunohistochemical parameter related to a poor prognosis in these lymphomas. Bcl-2, Bax, Bak and Mcl-1 proteins, though highly expressed in almost all cases were not associated with prognosis or response to treatment.



*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

- ADAMSON, D.J.A.; THOMPSON, W.D.; DAWSON, A.A.; BENNETT, B.; HAITES, N.E. p53 mutation and expression in lymphoma. **Br J Cancer**, v.72, n.1, p.150-154, Jul.1995.
- AKASAKA, T.; MURAMATSU, M.; KADOWAKI, N.; OHNO, H.; ISHIZAKI, K.; YAMABE, H.; FUKUHARA, L.; MINORU, O. p53 mutations in B-cell lymphoid neoplasms with reference to oncogene rearrangements associated with chromosomal translocations. **Jpn J Cancer Res**, v. 87, p.930-937, Sep. 1996.
- AMADORI, S.; GUGLIELMI, C.; ANSELMO, A.P.; CIMINO, G.; RUCO, L.P.; PAPA, G.; BIAGINI, C.; MANDELLI, F. Treatment of diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas with an intensive multi-drug regimen including high-dose cytosine arabinoside (F-MACHOP). **Semin Oncol**, v.12, n.2, p.218-222, Jun. 1985.
- BALDINI, L.; FRACCHIOLLA, N.S.; CRO,L.M.; TRECCA, D.; ROMITTI, L.; POLLI, E.; MAIOLO, A.T.; NERI, A. Frequent p53 gene involvement in splenic B-cell leukemia/lymphomas of possible marginal zone origin. **Blood**, v. 84, n.1, p.270-278, Jul. 1994.
- BARLOW, C.; BROWN, K.D.; DENG, C.; TAGLE, K.A.; WYNshaw-BORIS, A. Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. **Nature Genetics**, v. 17, p.453-456, Dec. 1997.
- BAIREY, O.; ZIMRA, Y.; SHAKLAI, M.; OKON, E.; RABIZADEH, E. Bcl-2, Bcl-X, Bax and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. **Clin Can Research**, v.5, p.2860-2866, Oct. 1999.
- BANIN, S.; MOYAL, L.; SHIEH, S.; TAYA, Y.; ANDERSON, C.W.; CHESSA, L.; SMORODINSKY, N.I.; PRIVES, C.; REISS, Y.; SHILOH, Y.; ZIV, Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. **Science**, v.281, n.5383, p. 1674-1677, Sep.1998.
- BARTEL, F.; MEYE, A.; WURL, P.; KAPPLER, M.; BACHE, M.; LAUTENSCHLAGER, C.; GRUNBAUM, U.; SCHMIDT, H.; TAUBERT, H. Amplification of the MDM2 gene, but not expression of splice variants of MDM2 MRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma. **Int J Cancer**, v.95, n.3, p.168-75, May 2001.

- BRAY, I.; BRENNAN P.; BOFFETTA, P. Recent trends and future projections of lymphoid neoplasms - a Bayesian age-period-cohort analysis. **Cancer Causes Control**, v.12, n.9, p. 813-820, Nov. 2001.
- BRIMMEL. M; MENDIOLA, R.; MANGION, J.; PACKHAM, G. *BAX* frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. **Oncogene**, v.16, n.14, p.1803-1812, Apr. 1998.
- CABANILLAS, F.; PATHAK, S.; GRANT, G.; HAGEMEISTER, F.B.; McLAUGHIN, P.; SWAN, F.; RODRIGUEZ, M.A.; TRUJILLO, J.; CORK, A.; BUTLER, J.J.; KATZ, R.; BOURNE, S.; FREIREICH, E.J. Refractoriness to chemotherapy and poor survival related to abnormalities of chromosomes 17 and 7 in lymphoma. **Am J of Medicine**, v.87, p.167-172, 1987.
- CAHILLY-SYNDER, L., YANG-FENG, T., FRANCKE, U., GEORGE, D.L. Molecular analysis and chromosome mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. **Somatic Cell Mol. Genet**, v.13, p.235-244, 1987.
- CALMELS, L.; HAINUT, P.; OHSHIMA, H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. **Cancer Res**, v.57, p.3365-3369, Aug.1997.
- CANMAN, C.E.; LIM, D.S.; CIMPRICH, K.A.; TAYA, Y.; TAMAI, K.; SAKAGUCHI, K.; APPELLA, E.; KASTAN, M.B. SILICIANO, J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. **Science**, v.281, n.5383, p.1677-1679, Sep. 1988.
- CAPOULADE, C.; PAILLERETS, B.B.; LEFRÈRE, I.; RONSIN, M.; FEUNTEUN, J.; TURSZ, T.; WIELS, J. Overexpression of MDM2 due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. **Oncogene**, v.16, p.1603-1610, 1998.
- CARBONE, P.P.; KAPLAN, H.S.; MUSSHOF, K.; SMITHERS, D.W.; TUBIANA, M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. **Cancer Research**, v.31, p.1860-1861, Nov.1971.

- CESARMAN, E.; CHADBURN, A.; INGHIRAMI, G.; GAIDANO, G.; KNOWLES, D.M. Structure and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. **Blood**, v.80, n.12, p.3205-3216, Dec.1992.
- CESARMAN, E.; INGHIRAMI, G.; CHADBURN, A.; KNOWLES, D.M. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. **Am J Pathol**, v.143, n.3, p.845-856, Sep.1993.
- CHAN, J.K.C.; BANKS, P.M.; CLEARY, M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C.; GROGAN, T.M.; HARRIS, N.L.; ISAACSON, P.G. et al. A proposal for classification of lymphoid neoplasms (by the International Lymphoma Study Group). **Histopathology**, v.25, n.6, p.517-536, Dec.1994.
- CHANG, C.C.; LUI, Y.C.; CLEVELAND, R.P.; PERKINS, S.L. Expression of c-Myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas. **Am J Clin Pathol**, v.113, p.512-518, 2000.
- CHANG, H.; BENCHIMOL, S.; MINDEN, M.D.; MESSNER, H. A. Alterations of p53 and *c-myc* in the clonal evolution of malignant lymphomas. **Blood**, v.83, n.2, p.452-459, 1994.
- CHANG, J.; SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **J Clin Oncol**, v.13, p.1009-1022, 1995.
- CHEN, P.M.; CHIOU, T.J.; HSIEH, R.K.; FAN, F.S.; CHU, C.J.; LIN, C.Z.; CHIANG, H.; YEN, C.C.; WANG, W.S.; LIU, J.H. p53 gene mutations and rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer**, v.5, n.3, p.718-724, Feb.1999.
- CHILOSI, M.; DOGLIONI, C.; MAGALINI, A.; INGHIRAMI, G.; KRAMPERA, M.; NADALI, G.; RAHAL, D.; PEDRON, S.; BENEDETTI, A.; SCARDONI, M.; MACRI, E.; LESTANI, M.; MENESTRINA, F.; PIZZOLO, G.; SCARPA, A. p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. **Blood**, v.88, n.10, p.4012-4020, Nov.1996.

- DE RE, V.; CARBONE, A.; DE VITA, S.; GLOGHINI, A.; MAEISTRO, R.; GASPAROTTO, D.; VUKOSAVLJEVIC, T.; BOIOCCHI, M. p53 protein over-expression and p53 gene abnormalities in HIV-1 related non-Hodgkin's lymphomas. **Int J Cancer**, v.56, p.662-667, 1994.
- DEBATIN, M-K; HERR, I. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v.98, n.9, p.2603-2604, 2001.
- DONEHOWER, L.A.; BRADLEY, A. The tumor suppressor p53. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1155, n.2, p.181-205, 1993.
- DEVESA, S.S.; FEARS, T. Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. **Cancer Res**, (suppl), v.52, p.5432s-5440s, 1992.
- EISCHEN, C.M.; WEBER, J.D.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J.; CLEVELAND, J.L. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. **Genes Dev**, v.13, n. 20, p.2658-2669, Oct.1999.
- EL-DEIRY, W.S.; HARPER, J.W.; O'CONNOR, P.M.; VELCULESCU, V.E.; CANMAN, C.E.; JACKMAN, J.; PIETPOL, J.A.; BURRELL, M.; HILL, D.E.; WANG, Y. et al. WAF/CIP1 is induced in p-53mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res**, v.54, n.5, p.1169-1174, Mar.1994.
- EL-DEIRY, W.; TOKINO, T.; WALDMAN, T.; OLINER, J.D.; VELCULESCU, V.E.; BURRELL, M.; HILL, D.E.; HEALY, E.; REES, J.L.; HAMILTON, S.R.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Topological control of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res**, v.55, p.2910-2919, Jul.1995.
- EL-DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V.E.; LEVY, D.B.; PARSONS, R.; TRENT, J.M.; LIN, D.; MERCER, W.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. WAF-1, a potent mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v.75, p.817, 1993.
- FINDLEY, H.W.; GU, L.; YEAGER, A.M.; ZHOU, M. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.89, n.8, p.2986-2993, Apr.1997.

- FORRESTER, K.; AMBS, S.; LUPOLD, S.E.; KAPUST, R.B.; SPILLARE, E.A.; WEINBERG, W.C.; FELLE-Y-BOSCO, E.; WANG, X.W.; GELLER, D.A.; TZENG, E.; BILLIAR, T.R.; HARRIS, C.C. Nitric oxid-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, p.2442-2447, Mar.1996.
- FRANK, T.S.; SVOBODA-NEWMAN, S.; HSI, E.D. Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. **Diagn Mol Pathol**, v.5, n.3, p.220-224, 1996.
- FREEDMAN, D.A. & LEVINE, A.J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. **Mol Cell Biol**, v.18, p.7288-7293, 1998.
- GAIDANO, G.; BALLERINI, P.; GONG, J.Z.; INGHIRAMI, G.; NERI, A.; NEWCOMB, E.W.; MAGRATH, I.T.; KNOWLES, D.M.; DALLA-FAVERA, R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci**, v.88, p.5413-5417, Jun.1991.
- GASCOYNE, R.D.; ADOMAT, S.A.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; HORSMAN, D.E.; TOLCHER, A.W.; O'REILLY, S.E.; HOSKINS, P.; COLDMAN, A.F.; REED, J.C.; CONNORS, J.M. Prognostic significance of bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v.90, n.1, p.244-251, Jul.1997.
- GASCOYNE, R.D.; KRAJEWSKA, M.; KRAJEWSKI, S.; CONNORS, J.M.; REED, J.C. Prognostic significance of Bax protein expression in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v.90, n.8, p.3173-3178, Oct.1997.
- GEYER, R.K.; YU, Z.K.; MAKI, C.G. The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. **Nature Cell Biology**, v.2, n.9, p.569-573, Sep.2000.
- GOELZ, S.E.; HAMILTON, S.R.; VOGELSTEIN, B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.130, n.1, p. 118-126, Jul.1985.

- GOTTIFREDI, V.; PRIVES, C. Getting p53 out of the nucleus. **Science**, v.292, n.5523, p.1851-1852, Jun.2001.
- GOTTLIEB, R.A. Apoptosis. In:Williams Hematology, 6<sup>th</sup> edition, chapter 11, p.125-129, 2001.
- GREENBLATT, M.S.; BENETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res**, v.54, n.18, p.4855-4878, Sep.1994.
- GREER, C.E.; WHEELER, C.M.; MANOS, M.M. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. **PCR Methods Appl**, v.3(Suppl), p.S113-S122, 1994.
- GREENLEE, R.T.; HILL-HARMON, M.B.; MURRAY, T.; THUN, M. Cancer statistic, 2001. **CA Cancer J Clin**, v.51, n.1, p.15-36, 2001.
- GREINER, T.C.; MOYNIHAN, M.J.; CHAN, W.C.; LYTLE, D.M.; PEDERSEN, A.; ANDERSON, J.R.; WEISENBURGER, D.D. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. **Blood**, v.87, n.10, p.4302-4310, May.1996.
- GRONBAEK, K.; DE NULLY BROWN, P.; MOLLER, M.B.; NEDERGAARD, T.; RALFKIAER, E.; MOLLER, P.; ZEUTHEN, J.; GULDBERG, P. concurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Leukemia**, v.14, .10, p.1727-1735, Oct.2000.
- GUTTIERREZ, M.I.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; HUSSAIN, A.; RAFFELD, M.; MAGRATH, I.; BHATIA, K. Loss of Bax expression is frequently seen in Burkitt's biopsies and may result from null mutations in the Bax gene. **Blood**, v.92, n.10, suppl.1, p.406A, Nov.1998.
- HALL, P.A.; MCKEE, P.H.; MENAGE, H.P.; DOVER, R.; LANE, D.P. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. **Oncogene**, v.8, p.203-207, 1993.

- HARPER, J.W.; ADAMI, G.R.; WEI, N.; KEYOMARSI, K.; ELLEDGE, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, v.75, n.4, p.805-816, Nov.1993.
- HARRIS, C.C.; HOLLSTEIN, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **The New England J Med**, v.329, n.18, p.1318-1327, Oct.1993.
- HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H.; BANKS, P.M.; CHAN, J.K.C.; CLEARY, M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C.; GROGAN, T.M.; ISAACSON, P.G.; KNOWLES, D.M.; MASON, D.Y.; MULLER-HERMELINK, H.K.; PILERI, A.S.; PIRIS, M.A.; RALFKIAER, E.; WARNKE, R.A. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**, v.84, n.5, p.1361-1392, Sep.1994.
- HAUPT, Y.; MAYA, R.; KAZAZ, A.; OREN, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, v.387, p.296-299, May 1997.
- HERMINE, O.; HAIOUN, C.; LEPAGE, E.; D'AGAY, M.F.; BRIERE, J.; LAVIGNAC, C.; FILLET, G.; SALLES, G.; MAROLLEAU, J.P.; DIEBOLD, J.; REYES, F.; GAULARD, P. Prognostic significance of bcl-2 expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v.87, n.1, p.265-272, Jan.1996.
- HERNANDEZ, L.; FEST, T.; CAZORLA, M.; TERYUIA-FELDESTSTEIN, J.; BOSCH, F.; PEINADO, M.A.; PIRIS, M.A.; MONTSERRAT, E.; CARDESA, A.; JAFFE, E.S.; CAMPO, E.; RAFFELD, M. p53 mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. **Blood**, v.87, n.8, p.3351-3359, April 1996.
- HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v.98, n.9, p.2603-2614, Nov.2001.
- HIDDEMANN, W.; LONGO, D.L.; COIFFIER, B.; FISHER, R.I.; CABANILLAS, F.; CAVALLI, F.; NADLER, L.M.; DE VITA, V.T.; LISTER, T.A.; ARMITAGE, J.O. Lymphoma classification - the gap between biology and clinical management is closing. **Blood**, v.88, n.11, p.4085-4089, Dec 1996.

- HILL, M.E.; MACLENNAN, K.A.; CUNNINGHAM, D.C.; VOUGHAN HUDSON, B.; BURKE, M.; CLARKE, P.; DI STEFANO, F.; ANDERSON, L.; VAUGHAN HUDSON, G.; MASON, D.; SELBY, P.; LINCH, D.C. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. **Blood**, v.88, n.1, p.1046-1051, Aug.1996.
- HIRAO, A.; KONG, Y.Y. MATSUOKA, S.; WAKEHAM, A.; RULAND, J.; YOSHIDA, H.; LIU, D.; ELLEDGE, S.J.; MAK, T.W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. **Science**, v.287, p. 1824-1827, Mar .1 2000.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v.29, n.4, p. 577-580, 1981.
- ICHIKAWA, A.; HOTTA, T.; SAITO, H. Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**, v.11, p.21-25, 1993
- ICHIKAWA, A.; HOTTA, T.; TAKAGI, N.; TSUSHITA, K.; KINOSHITA, T.; NAGAI, H.; MURAKAMI, Y.; HAYASHI, K.; SAITO, H. Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. **Blood**, v.79, n.10, p.2701-2707, 1992.
- ICHIKAWA, A.; KINOSHITA, T.; WATANABE, T.; KATO, H.; NAGAI, H.; TSUSHITA, K.; SAITO, H.; HOTTA, T. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. **The New England J of Medicine**, v.337, p.529-534, 1997.
- IMAMURA, J.; MIUYOSHI, I.; KOEFFLER, H.P. p53 in hematologic malignancies. **Blood**, v.84, p.2412-2421, 1994.
- INGHIRAMI, G.; MACRI, L.; CESARMAN, E.; CHADBURN, A.; ZHONG, J.; KNOWLES, D.M. Molecular characterization of CD 30+ anaplastic large cell lymphoma: high frequency of c-myc proto-oncogene activation. **Blood**, v.83, p.3581-3590, 1994.

- KAMIJO, T.; WEBER, J.D.; ZAMBETTI, G.; ZINDY, F.; ROUSSEL, M.F. SHERR, C.J. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. **Proc Natl Acad Sci USA** , v.95, p. 8292-8297,1998.
- KAUFMAN, W.K.; PAULES, R.S. DNA damage and cell cycle checkpoints. **The FASEB Journal**, v.10, Feb, p.238-247, 1996.
- KAWASAKI, C.; OHSHIM, K.; SUZUMIYA, J.; KANDA, M.; TSUCHIYA, T.; TAMURA, K.; KIKUCHI, M. Rearrangements of bcl-1, bcl-2, bcl-6 and c-myc in diffuse large b-cell lymphomas. **Leuk Lymphoma**, v.42, n.5, p.1099-1106, Sep-Oct.2001.
- KAWATAMATA, N.; MILER, C., LEVY, V.; SHINNTAKU, I.P.; KOEFFLER, H.P.; SAID, J.W. Mdm2 oncogene expression in non-Hodgkin's lymphomas. **Diagn Mol Pathol.**, v.5, p.33-38, 1996.
- KERBAUY, F.R.; DUARTE, L.C.C.; ALVES, A.C.; SEIXAS, M.T.; SILVA, M.R.R.; AGUIAR, K.C.C.; CARREGOZA, M.I.; OLIVEIRA, J.S.R.; KERBAUY, L.; COLLEONI, G.W.B. Expressão dos produtos dos genes p53 e bcl-2 em linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e sua correlação com o índice prognóstico internacional (IPI) e resposta à quimioterapia. **Série de Monografias da Escola Brasileira de Hematologia**, v.8, suplemento, p.105, 2001.
- KHATIB, Z.A.; MATSUSHIME, H.; VALENTINE, M.; SHAPIRO, D.N.; SHERR, C.J.; LOOK, A.T. Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. **Cancer Res**, v.3, n.22, p.5535-41, 1993.
- KITADA, S.; ANDERSEN, J.; AKAR, S.; ZAPATA, J.M.; TAKAYAMA, S.; KRAJEWSKI, S.; WANG, H.G.; ZHANG, X.; BULLRICH, F.; CROCE, C.M.; RAI, K.; HINES, J.; REED, J.C. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. **Blood**, v.91, p.3379-3389, 1998.

- KITAMURA, Y.; OTA, T.; MATSUOKA, Y.; TOOYAMA, I.; KIMURA, H.; SGIMOHAMA, S.; NOMURA, Y.; GEBICKE-HAETER, P.J.; TANIGUCHE, T. Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. **Glia**, v.25, p.154-164, 1999.
- KLIMO, P.; CONNORS, J.M. MACOP-B chemotherapy for the treatment of diffuse large-cell lymphoma. **Ann Intern Med**, v.102, n.5, p.596-602, 1985.
- KLUCK, R.M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v.275, p.1132-1136, 1997.
- KOCIALKOWSKI, S.; PEZZELLA, F.; MORRISON, H.; JONES, M.; LAHA, S.; HARRIS, A.L.; MASON, D.Y.; GATTER, K.C. Mutations in the p53 gene are not limited to classic "hot spots" and are not predictive of p53 protein expression in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. **British J of Haematol**, v.89, p.55-60, 1995.
- KODURU, P.R.; RAJU, K.; VADMAL, V.; MENEZES, G.; SHAH, S.; SUSIN, M.; KOLITZ, J.; BROOME, J. D. Correlation between mutation in p53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v.90, n.10, p.4078-4091, 1997.
- KORKOLOPOULOU, P.; OATES, J.; KITTAS, C.; CROCKER, J. p53, c-myc p62 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-Hodgkin's lymphomas. **J Clin Pathol**, v.47n.1, p.9-14, Jan.1994.
- KRAJEWSKI, S.; BLOMVQVIST, C.; FRANSSILA, K.; KRAJWESKA, M.; WASENIUS, V.M.; NISKANEN, E.; NORDLING, S.; REED, J.C. Reduced expression of proapoptotic gene *BAX* is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. **Cancer Res**, v.55, p.4471-4478, 1995.
- KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; EHRMANN, J.; SIKORSKA, M.; LACH, B.; CHATTEN, J.; REED, J.C. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1 and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. **Am J Pathology**, v.150, p.805-814, 1997.

- KRAMER, M.H.; HERMANS, J.; PARKER, J.; KROL, A.D.; KLUIN-NELEMANS, J.C.; HAAK, H.L.; VAN KRIEKEN, J.H.; DE JONG, D.; KLUIN, P.M. Clinical significance of bcl-2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. **J Clin Oncol**, v.14, p.2131-2138, 1996.
- KRAMER, M.H.; HERMANS, J.; WIJBURG, E.; PHILIPPO, K.; GEELEN, E.; VAN KRIEKEN, J.H.; DE JONG, D.; MAARTENSE, E.; SCHUURING, E.; KLUIN, P.M. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v.92, n.9, p.3152-3162, nov.1998.
- KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine*, v.3, n.6. p.614-620, 1997.
- KUBBUTAT, M.H.G.; JONES, S.N.; VOUSDEN, K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2. **Nature**, v.387, p.299-303, 1997.
- LANDERS, J.E.; CASSEL, S.L.; GEORGE, D.L. Translational enhancement of *mdm2* oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. **Cancer Research**, v.57, p.3562-3568, 1997.
- LENS, K.; DYER, M.J.S.; GARCIA-MARCO, J.M.; DE SCHOUWER, J.J.C.; HAMOUDI, R.A.; JONES, D.; FARAHAT, N.; MATUTES, E.; CATOVSKY, D. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. **British J of Haematol**, v.99, p.848-857, 1997.
- LEVINE, A.J. & FREEDMAN, D.A. Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein – thirty-eighth GHA Clowes Memorial Award Lecture. **Cancer Research**, v.59, p.1-7, 1999.
- LEVINE, A.J. Tumor suppressor genes. **Scientific American Science&Medicine**, jan/feb, p.28-37, 1995.
- LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, v.351, n.6326, p.453-456, 1991.

- LINZER, D.E.; LEVINE, A.J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell**, v.17, p.43-52, 1979.
- LO COCO, F.; GAIDANO, G.; LOUIE, D.C.; OFFIT, K.; CHAGANTI, R.S.K.; DALLA-FAVARA, R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. **Blood**, v.82, p.2289-2295, 1993.
- LOWE, S.; BODIS, S.; MCCLATCHEY, A.; REMINGTON, L.; RULEY, E.; FISHER, D.E.; HOUSMAN, D.E.; JACKS, T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. **Science**, v.266, p.807-810, 1994.
- MAESTRO, R.; GLOGHINI, A.; DOGLIONI, C.; GASPAROTTO, D.; VUKOSAVLJEVIC, T.; DE RE, V.; LAURINO, L.; CARBONE, A.; BOIOCCHI, M. Mdm2 does not account for stabilization of wild type p53 protein in non Hodgkin's lymphomas. **Blood**, v.85, p.3239-3246, 1995.
- MAESTRO, R.; GLOGHINI, A.; DOGLIONI, C.; PICCININ, S.; VUKOSAVJEVIC, T.; GASPAROTTO, D.; CARBONE, A.; BOIOCCHI, M. Human non-Hodgkin's lymphomas overexpress a wild-type form of p53 which is a functional transcriptional activator of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. **Blood**, v.89, p.2523-2528, 1997.
- MARTIN, K.; TROUCHE, D.; HAGEMER, C.; SØRENSEN, T.S.; LA THANGUE, N.B.; KOUZARIDES, T. Stimulation of E2F/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. **Nature**, v.375, p.691-694, 1995.
- MARTINEZ-DELGADO, B.; ROBLEDO, M.; ARRANZ, E.; INFANTES, F.; ECHEZARRETA, G.; MARCOS, B.; SANZ, C.; RIVAS, C.; BENITEZ, J. Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas. **American J of Hematol**, v.55, p.1-8, 1997.
- MARX, J. New link found between p53 and DNA repair. **Science**, v.266, p.1321-1322, 1994.

- MEIJERINK, J.P.P.; MENSINK, E.J.B.M.; WANG, K.; SEDLAK, T.W.; SLOETJES, A.W.; DE WITTE, T.; WAKSMAN, G.; KORSMEYER, S.J. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of *BAX*. **Blood**, v.91, p.2991-2997, 1998.
- MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. **Cell** v.80, p.293-299, 1995.
- MØLLER, M.B.; GERDES, A.M.; SKJØDT, K.; MORTENSEN, L.S.; PEDERSEN, N.T. Disrupted p53 function as predictor of treatment failure and poor prognosis in B and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Clin Cancer Res**, v.5, n.5, May, p.1085-1091, 1999.
- MØLLER, M.B.; INO, Y.; GERDES, A.M.; SKJØDT, K.; LOUIS, D.N.; PEDERSEN, N.T. Aberrations of the p53 pathway components p53, MDM2, and CDKN2A appear independent in diffuse large B cell lymphoma. **Leukemia**, v.13, p.453-459, 1999.
- MØLLER, M.B.; NIELSEN, O.; PEDERSEN, N.T. Cyclin D3 expression in non-Hodgkin's lymphoma. Correlation with other cell cycle regulators and clinical features. **Am J Clin Pathology**, v.115, p.404-412, 2001.
- MØLLER, M.B.; NIELSEN, O.; PEDERSEN, N.T. Oncoprotein MDM2 overexpression is associated with poor prognosis in distinct non-Hodgkin's lymphoma entities. **Mod Pathol**, v.12, p.1010-1016, 1999.
- NAGAI, J.; KIGASAWA, H.; KOGA, N.; KATOH, A.; NISHIHIRA, H.; NAGAIO, T. Clinical significance of detecting p53 protein in Burkitt lymphoma and B-cell acute lymphoblastic leukemia using immunocytochemistry. **Leuk Lymphoma**, v.28, p.591-597, 1998.
- NAVARATNAM, S.; WILLIAMS, G.J.; RUBINGER, M.; PETTIGREW, N.M.; MOWAT, M.R.; BEGLEITER, A.; JOHNSTON, J.B. Expression of p53 predicts treatment failure in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma**, v.29, n. 1/2, p.139-144, 1998.

- NERI, A.; BALDINI, L.; TRECCA, D.; CRO, L.; POLLI, E.; MAIOLO, A.T. p53 mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. **Blood**, v.81, p.128-135, 1993.
- NIEDER, C.; PETERSEN, S.; PETERSEN, C.; THAMES, H.D. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma. **Ann Hematol**, v.80, p.2-8, 2001.
- NIGRO, J.; BAKER, S.; PREISINGER, A.C.; JESSUP, J.M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S.H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILEE, P.; GLOVER, T.; COLLINS, F.S.; WESTON, A.; MODALI, R.; HARRIS, C.C.; VOGELSTEIN, B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v.342, p. 705-708, 1989.
- OBAYA, A.J.; MATEYAK, M.K.; SEDIVY, J.M. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. **Oncogene**, v.18, n.19, p.2934-2941, May 1999.
- O'CONNOR, P.M.; JACKMAN, J.; BAE, I.; MYERS, T.; FAN, S.; MUTOH, M.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; SAUSVILLE, E.A.; WEINSTEIN, J.N.; FRIEND, S.; FORNACE, J.R. AJ, KOHN, K.W. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the national Cancer Institute Anticancer Drug Screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. **Cancer Research**, v.57, p.4285-4300, 1997.
- OLINER JD. The role of p53 in cancer development. **Scientific American Science & Medicine**, Sep/Oct, p.16-25, 1994.
- OLIVEIRA, G.B.; PEREIRA, F.G.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. **Cytometry**, v.46, n.6, p. 329-335, Dec, 2001.
- O'REILLY, S.E.; HOSKINS, P.; KLIMO, P.; CONNORS, J.M. MACOP-B and VACOP-B in diffuse large cell lymphomas and MOPP/ABV in Hodgkin's disease. **Ann Oncol**, v.291, p.17-23, 1991.

- OREN M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? **Faseb**, v.6, p.3169-3176, 1992.
- OSADA, M.; ISHIOKA, C.; ICHINOHASAMA, R.; KADOWAKI, I.; MURAKAWA, Y.; WATANABE, M.; KANAMARU, R.; IKAWA, S. Influence of p53 mutation on pathological grade, but not prognosis of non-Hodgkin's lymphoma. **Anticancer Drug Des**, v.14, n.2, p.107-114, 1999.
- PAGNANO, K.B.B.; VASSALLO, J.; LORAND-METZE, I.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O. P53, Mdm2 and c-Myc overexpression is associated with a poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. **American J Hematol**, v.67, p.84-92, 2001.
- PAGNANO, K.B.B.; SILVA, M.D.; VASSALLO, J.; ARANHA, F.J.P.; SAAD, S.T.O. Apoptosis-regulating proteins and prognosis in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphomas. **Acta Haematol**, v.107, n.1, p.29-34, 2002.
- PALESTRO, G.; PONTI, R.; CHIUSA, L.; CHIARLE, R.; GEUNA, M.; NOVERO, D.; FREILONE, R.; PICH, A. Cell proliferation, bcl-2, c-myc, p53 and apoptosis as indicators of different aggressiveness in small lymphocytic lymphoma (SLL). **Eur J Haematol**, v.59, p.148-154, 1997.
- PASQUALUCCI, L.; DALLA-FAVERA, R. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphomas. In: American Society of Hematology Education Program Book, p.200-205, 2001.
- PEARSON, A.S.; SPITZ, F.R.; SWISHER, S.G.; KATAOKA, M.; SARKISS, M.G.; MEYN, R.E.; MCDONELL, T.J.; CRISTIANO, R.J.; ROTH, J.A. Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. **Clin Cancer Res**, v.6, p.887-890, 2000.
- PENG, H.; DISS, T.; ISAACSON, P.G.; PAN, L. C-myc gene abnormalities in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. **Journal of Pathology**, v.181, p. 381-386, 1997.
- PEPPER, C.; HOY, T.; BENTLEY, D.P. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. **British J of Cancer**, v.76, n.7, p.935-938, 1997.

- PETIT, B.; LEROY, K.; KANAVAROS, P.; BOULLAND, M.; DRUET-CABANAC, M.; HAIOUN, C.; BORDESSOULE, D.; GAULARD, P. Expression of p53 protein in T- and natural killer-cell lymphomas is associated with some clinicopathologic entities but rarely related to p53 mutations. **Hum Pathol**, v.32, n.2, p.196-204, Feb.2001.
- PEZZELA, P.; MORRISON, H.; JONES, M.; GATTER, K.C.; LANE, D.; HARRIS, A.L.; MASON, D.Y. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in non Hodgkin's lymphoma. **Histopathology**, v.22, p.39-44, 1993.
- PICH, A.; PONTI, R.; VALENTE, G.; CHIUSA, L.; GEUNA, M.; NOVERO, D.; PALESTRO, G. MIB-1, Ki-67 and PCNA scores and DNA flow cytometry in intermediate grade malignant lymphomas. **J Clin Pathology**, v.47, p.18-22, 1994.
- PIETPOL, J.; VOGELSTEIN, B. No room at the p53 inn. **Nature**, v.365. p.17-18, 1993.
- PIRIS, M.A.; PEZZELLA, F.; MARTINEZ-MONTERO, J.C.; ORRADRE, J.L.; VILLUENDAS, R.; SANCHEZ-BEATO, M.; CUENA, R.; CRUZ, M.A.; MARTINEZ, B.; GARRIDO, M.C.; GATTER, K.; AIELLO, A.; DELIA, D.; GIARDINI, R.; RILKE, F. p53 and *bcl-2* expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. **Br J Cancer**, v.69, p.337-341, 1994.
- POHL, U.; WAGENKNECHT, B.; NAUMANN, U.; WELLER, M. p53 enhances Bak and CD 95 expression in human malignant glioma cells but does not enhance CD95L-induced apoptosis. **Cell Physiol Biochem**, v.9, p.9-37, 1999.
- POMERANTZ, J.; SCHREIBER-AGUS, N.; LIÉGEOIS, N.J.; SILVERMAN, A.; ALLAND, L.; CHIN, L.; POTES, J.; CHEN, K.; ORLOW, I.; LEE, H-W.; CORDON-CARDO, C.; DEPINHO, R.A. The *Ink4a* tumor suppressor gene product, p19<sup>ARF</sup>, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell**, v.92, p.713-723, 1998.
- PRENDERGAST, G.C. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. **Oncogene**, n.18, p.2967-2987, 1999.

- PREUDHOMME, C.; DERVITE, I.; WATTEL, E.; VANRUMBEKE, M.; FLACTIF, M.; LAI, J.L.; HECQUET, B.; COPPIN, M.C.; NELKIN, B.; GOSSELIN, B.; FENAU, P. Clinical significance of p53 mutations in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases. **Journal of Clinical Oncology**, v.13, n.4, p.812-820, 1995.
- PROKOCIMER, M.; ROTTER, V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. **Blood**, v.8, p2391, 1994.
- PYNIOL, M.; HERNANDEZ, L.; CAZORLA, M.; BALBIN, M.; JARES, P.; FERNANDEZ, P.L.; MONTSERRAT, E.; CARDESA A.; LOPEZ-OTIN, C.; CAMPO, E. Deletions and loss of expression of p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>WAF1</sup> genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. **Blood**, v.89, p 272-280, 1997.
- RODRIGUEZ, M.A.; FORD, R.J.; GOODACRE, A.; SELVANAYAGAM, P.; CABANILLAS, F.; DEISSEROTH, A.B. Chromosome 17p and p53 changes in lymphoma. **British Journal of Haematology**, v.79, p.575-582, 1991.
- RODRIGUEZ, V.; CABANILLAS, F.; BURGESS, M.A.; MCKELVEY, E.M.; VALDIVIESO, M.; BODEY, G.P.; FREIREICH, E.J. Combination chemotherapy (CHOP-Bleo) in advanced (non-Hodgkin) malignant lymphoma. **Blood**, v.49, n.3, p.325-333, 1977.
- ROMAN-GOMEZ, J.; CASTILLEJO, J.A.; JIMENEZ, A.; GONZALEZ, M.G.; MORENO, F.; RODRIGUEZ, M.C.; BARRIOS, M.; MALDONADO, J.; TORRES, A. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21CIP1/WAF1/SDI1 gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.99, p 2291-2296, 2002.
- ROSSÉ, T.; OLIVIER, R.; MONNEY, L.; RAGER, M.; CONUS, S.; FELLAY, I.; JANSEN, B.; BORNER, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. **Nature**, v.391, p.496-499, 1998.

- SACHS, L.; LOTEM, J. Hematopoietic cells from mice deficient in wild type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. **Blood**, v.82, p.1092-1096, 1993.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H., STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, I.R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n.4839, p.487-491, Jan. 1988.
- SAKAI, A.; ODAKI, K.; ASAOKU, H.; SHINTAKU, S.; HOSHINO, S.; OKITA, H.; KIMURA, A. Expressions of p53 and PCNA do not correlate with the International Index or early response to chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma. **American J Hematology**, v.58, p.42-48, 1998.
- SANCHEZ, E.; CHACON, I.; PLAZA, M.M.; MUÑOZ, I.; CRUZ, M.A.; MARTINEZ, B.; LOPEZ, L.; MARTINEZ-MONTERO, J.C.; ORRADRE, J.L.; SAEZ, A.I.; GARCIA, J.F.; PIRIS, M.A. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. **J Clin Oncology**, v.16, p. 1931-1939, 1998.
- SANCHÉZ-BEATO, M.; SÁEZ, A.I.; NAVAS, I.C.; ALGARA, P.; MATEO, M.S.; VILLUENDAS, R.; CAMACHO, F.; SÁNCHEZ-AGUILERA, A.; SÁNCHEZ, E.; PIRIS, M.A. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16 and p27. **American J of Pathol**, v.159, n.1, p.205-213, 2001.
- SANDER, C.A.; YANO, T.; CLARK, H.M.; HARRIS, C.; LONGO, D.L.; JAFFE, E.S.; RAFFELD, M. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. **Blood**, v.82, p.1994-2004, 1994.
- SCHALAIFFER, D.; KRAJEWSKI, S.; GALOINS, RIGAL-HUGUET, F.; LAURENT, G.; MASSIP, P.; PRIS, J.; DELSOL, G.; REED, J.C.; BROUSSET, P. Immunodetection of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. **American J of Pathology**, v.149, p.177-185, 1996.

- SCHWARTZ, D.; LE, Q.T.; ALMOG, N.; PELED, A.; GOLDFINGER, N.; ROTTER, V.  
Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the  $\gamma$ -irradiation-induced delay and DNA repair. **Oncogene**, v.15, p.2597-2607, 1997.
- SHEIKH, M.S.; ROCHEFORT, H.; GARCIA, M. Overexpression of p21/WAF1/CIP1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. **Oncogene**, v.11, p.1899,1995.
- SHIPP, M.A. et al. - A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. **The N Engl J Med**, v.329, n.14, p.987-994, 1993.
- SHOELCH, M.L.; LE, Q.T.; SILVERMAN, S. JR.; MCMILLAN, A.; DEKKER, N.P.; FU, K.K.; ZIOBER, B.L.; REGEZI, J.A. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.35, p.77-85, 1999.
- SILVA MDA. Análise da expressão de proteínas da família BCL-2 em Linfomas não-Hodgkin. Campinas : UNICAMP, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas – 15/12/1999) – Departamento de Bioquímica -Unicamp.
- SMITH, M.; CHEN, T.; ZHAN, Q.; BAE, I.; CHEN, C.Y.; GILMER, T.M.; KASTAN, M.B.; O'CONNOR, P.M.; FORNACE, JR. A.J. Interaction of the p53 regulated protein Gadd 45 with proliferating cell nuclear antigen. **Science**, v.266, p1376-1380, 1994.
- SOINI, Y.; PAAKKO, P.; ALAVAIIKKO, M.; VAHAKANGAS, K. p53 expression in lymphatic malignancies. **J Clin Pathol**, v.45, n.11, p.1011-1014, Nov.1992.
- SOINI Y, RAUNIO H, PAAKKO P. High-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas differ from low-grade lymphomas in the extent of apoptosis and their expression of bcl-2, mcl-1, bax and p53. **Tumour Biol**, v.19, n.3, p.176-185, 1998.
- STEFANAKI, K.; TZARDI, M.; KOUVIDOU, C.H.; CHANIOTIS, V.; BOLIOU, M.; VLYCHOU, M.; ZOIS, M.; KAKOLYRIS, S.; DELIDES, G.; RONTOGIANNID, GEORGOULIAS, V.; KANAVAROS, P. Expression of p53, p21, Rb, bax and Ki67 proteins in lymphomas of the mucosa-associated lymphoid (MALT) tissue. **Anticancer Research**, v.18, p.2403-2408, 1998.

- STOMMEL, J.M.; MARCHENKO, N.D.; JIMENEZ, G.S.; MOLL, U.M.; HOPE, T.J.; WAHL, G.M. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. **EMBO J**, v.18, n.6, p.1660-72, Mar, 1999.
- SUGRUE, M.M.; SHIN, D.Y.; LEE, S.W.; AARONSON, S.A. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.9648-9653, 1997.
- TAO, W.; LEVINE, A. J. P19 (ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.6937-6941, 1999.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v.89, n.11, p.3909-3918, Jun.1997.
- UMEKITA, Y.; KOBAYASHI, K.; SAHEKI, T.; YOSHIDA, H. Nuclear accumulation of p53 protein correlates with mutations in the p53 gene on archival paraffin-embedded tissues of human breast cancer. **Japanese Journal of Cancer Research**, v.85, p.825-830, 1994.
- VELCULESCU, V.E.; EL-DEIRY, W.S. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. **Clinical Chemistry**, v.42, n.6, p.858-868, 1996.
- VILLUENDAS, R.; PIRIS, M.A.; ORRADRE, J.L.; MOLLEJO, M.; ALGARA, P.; SANCHEZ, L.; MARTINEZ, J.C.; MARTINEZ, P. p53 protein expression in lymphomas and reactive lymphoid tissue. **J Pathol**, v.166, n.3, p.235-241, Mar. 1992.
- VILLUENDAS, R.; PIRIS, M.A.; ALGARA, P.; SANCHEZ-BEATO, M.; SANCHEZ-VERDE, L.; MARTINEZ, J.C.; ORRADRE, J.L.; GARCIA, P.; LOPEZ, C.; MARTINEZ, P. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. **Blood**, v.82, p.3151-3156, 1993.

- VILLUENDAS, R.; PEZZELLA, F.; GATTER, K.; ALGARA, P.; SANCHEZ-BEATO, M.; MARTINEZ, P.; MARTINEZ, J.C.; MUNOZ, K.; GARCIA, P.; SANCHEZ, L.; KOCIALKOWSKY, S.; CAMKPO, E.; ORRADRE, J.L.; PIRIS, M.A. p21/WAF1/CIP1 and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21- immunophenotype associated with missense mutations. **J Pathol**, v.181, p.51-61, 1997.
- VITOLO, U.; GAIDANO, G.; BOTTO, B.; VOLPE, G.; AUDISIO, E.; BERTINI, M.; CALVI, R.; FREILONE, R.; NOVERO, D.; ORSUCCI, L.; PASTORE, C.; CAPELLO, D. et al. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in b-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. **Ann Oncol**, v.9, n.1, p.55-61, Jan.1998.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. p53 function and dysfunction. **Cell**, v.70, n.4, p.523-526, 1992.
- WEBER, J.D.; TAYLOR, L.J.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J.; BAR-SAGI, D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. **Nat Cell Biol**. v.1, n.1, May, p.20-26, 1999.
- WEINBERG, R. Tumor suppressor genes. **Science**, v.254, p.1138-254, 1991.
- WILSON, W.H.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; FEST, T.; HARRIS, C.; STEINBERG, S.M.; JAFFE, E.S.; RAFFELD, M. Relationship of p53, bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. **Blood**, v.89, p.601-609,1997.
- WU, X.; BAYLE, J.H.; OLSON, D.; LEVINE, A.J. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. **Genes Dev**, v.7, p.1126-1132, 1993.
- XIAO, Z.X.; CHEN, J.; LEVINE, A.J.; MODJTAHEDI, N.; XING, J.; SELLERS, W.R.; LIVINGSTON, D.M. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. **Nature**, 375, p.694-698, 1995.
- YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, J.; PENG, T.I.; JONES, D.P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v.275, p.1129-1132, 1997.

- YIN, C.; KNUDSON, C.M.; KORSMEYER, S.J.; VAN DYKE, T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. **Nature**, v.385, p.637-640, 1997.
- ZAGO, M.A.; GARICOCHEA, B. - Bases moleculares e citogenéticas. Oncogenes e antioncogenes. In: Hematologia - Fundamentos e Prática. Editora Atheneu, 2001, Cap.37, p.370.
- ZENG, Y-X.; EL-DEIRY, W. Regulation of p21/WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. **Oncogene**, v.12, p.1557-1564, 1996.
- ZHANG, Y.; XIONG, Y. Mutations in human ARF exon 2 disrupts its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. **Mol Cell**, v.3, n.5, p.579-591, 1999.
- ZHANG A, OHSHIMA K, SATO K, KANDA M, SUZUMIYA J, SHIMAZAKI K, KAWASAKI C, KIKUCHI M. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. **Pathol Int**, v.49, n.12, p.1043-1052, Dec.1999.
- ZHANG, Y.; XIONG, Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. **Science**, v.292, p.1910-1915, 2001.
- ZHANG, Y.; XIONG, Y.; YARBROUGH, W.G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: *ARF-INK4a* locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell**, v.92, p.725-734, 1998.
- ZHOU, P.; LEVY, N.B.; XIE, H.; QIAN, L.; LEE, C.Y.G.; GAYSCOYNE, R.D.; CRAIG, R.W. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. **Blood**, v.97, p.3902-3909, 2001.



***ANEXOS***

Tabela I - Dados de 62 pacientes com LNH agressivo

N	idade	sexo	tipo histológico	LDH	Ann Arbor	sintomas B	bulky	IPI	RC	Recaída	Óbito	causa	SG(meses)	n	SLD(meses)	p53	p21/WAF-1	Mdm2	c-Myc	PCNA	Status p53
1	60	fem	B	217	2	0	sim	1	NÃO		SIM	LNH	17,0	1		0	0	1	3	2	A
2	76	fem	B	5702	4	sim	sim	4			SIM	TOXICIDADE	0,6	2		3					
3	60	mas	B	2606	4	sim	sim	4	NAO		SIM	LNH	4,0	3		2	0	2	1	3	B
4	22	mas	B	856	4	sim	sim	4	SIM	não	SIM	CARDIO TOXICIDADE	17,0	4	3,00	0	0				A
5	57	mas	B	1102	4	sim	sim	3	SIM	não	0		23,0	5	18,00	1	0	0	2	3	B
6	39	mas	B	345	2	0	não	1	SIM	Não	0		6,0	6	2,00	0	0	2	0	1	A
7	63	mas	B		3	sim	não				0		7,0	7		0	0	1	2	3	A
8	36	fem	B		4	sim	não		SIM	Sim	0		48,0	8	5,00	0	0	0	0	1	A
9	35	fem	B		4	sim	sim		NAO		SIM	LNH	4,0	9		3	0			2	B
10	60	fem	B	350	2	0	sim	1	SIM	sim	SIM	LNH	24,0	10	17,00	0	0	0	2	2	A
11	31	fem	Anaplásico	622	2	0	sim	2	NAO		SIM	LNH	14,0	11		3	1	0	2	2	C
12	53	fem	B		1	sim	sim		SIM	não	0		31,0	12	23,00	0	1	1	2	3	A
13	28	mas	B		4	sim	não		NAO		SIM	LNH	13,0	13		0	3	1	3	3	A
14	34	fem	B	631	4	0	sim	3	SIM	não	0		48,0	14	42,00	0	0	0		3	A
15	25	mas	B	200	2	sim	não	1	NAO		SIM	LNH	6,0	15		0	1		2	2	A
16	27	fem	B	225	4	sim	não	2	SIM	sim	SIM	LNH	31,0	16	4,00		1			2	
17	54	fem	B	398	2	0	sim	1	SIM	não	0		72,0	17	30,00	0	2	0	2		A
18	53	mas	B	105	2	sim	sim	1	SIM	não	0		64,0	18	55,00	0	0	0	1	3	A
19	25	mas	B	162	2	sim	sim	3	SIM	não	0		65,0	19	60,00	0	0	0	3	3	A
20	81	fem	B	341	4	0	sim	1	NAO		SIM	LNH	8,0	20		0	2	1	3	3	A
21	60	fem	B	212	2	0	não	2	SIM	não	0		42,0	21	36,00	0	0		1	2	A

Tabela I - Dados de 62 pacientes com LNH agressivo

N	idade	sexo	tipo histológico	LDH	Ann Arbor	sintomas B	bulky	IPI	RC	Recaída	Óbito	causa	SG(meses)	n	SLD(meses)	p53	p21/WAF-1	Mdm2	c-Myc	PCNA	Status p53
22	52	fem	B	377	4	sim	não		SIM	sim	0		8,0	22	2,00	1	1	0	3	3	C
23	48	mas	B		3	sim	sim				SIM	IGN	1,0	23		3	0		3	3	B
24	45	fem	B		3	0	não		SIM	não	0		114,0	24	108,00	0	0	0	2	2	A
25	38	fem	B	146	3	sim	não	2	NAO		SIM	LNH	14,0	25		0	0	0	2	3	A
26	64	fem	B		4	sim	não		SIM	não	0		88,0	26	72,00	0	0		1	3	A
27	60	fem	B	637	4	sim	sim	3	NAO		0		28,0	27		0	1	0		2	A
28	66	fem	B	115	3	0	sim	3	NAO		SIM	LNH	29,0	28		1	0	0		2	B
29	33	fem	Anaplásico	242	4	sim	não	3	SIM	sim	0		24,0	29	19,00	0	0				A
30	79	mas	B	375	1	sim	sim	2	NAO		0		16,0	30	6,00	0	0	0		2	A
31	51	mas	B	574	4	0	não	3			0		4,0	31		0	0	0		3	A
32	60	fem	T		4	sim	não		NAO		SIM	LNH	54,0	32	18,00	2	0	0	2	3	B
33	39	mas	T	382	4	sim	não	2	NAO		SIM	SEPSIS	12,0	33		0	0	0	1	3	A
34	38	mas	T		1	sim	sim	2	NAO		SIM	SEPSIS	2,0	34		2	0		2	2	B
35	52	mas	B	442	1	0	sim	1			SIM	SEPSIS	1,0	35		1	1	1	2	3	C
36	37	mas	Anaplásico	5343	4	0	não	4	SIM	não	0		36,0	36	33,00	0	1	0		3	A
37	68	fem	B	602	3	sim	não	4	NAO		SIM	LNH	8,0	37		0	1	0	2	3	A
38	68	mas	T	463	3	sim	não	3	SIM	não	0		16,0	38	12,00	0	1	0	3	3	A
39	60	mas	Anaplásico	635	4	sim	não	3			SIM	LNH	2,0	39		0	1	0	2	2	A
<b>40</b>	<b>78</b>	<b>mas</b>	<b>B</b>	<b>549</b>	<b>2</b>	<b>sim</b>	<b>não</b>		<b>NAO</b>		<b>SIM</b>	<b>LNH</b>	<b>7,0</b>	<b>40</b>		<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>B</b>
41	85	mas	B	336	2	0	não	1			SIM	IGN	8,0	41		1			3	3	
42	34	fem	B	830	4	sim	sim	3	SIM	não	0		31,0	42	28,00	0	0		1	2	A
43	53	fem	B	1114	4	sim	não	4			SIM	LNH	2,0	43		0	0	1	1	2	A

Tabela I - Dados de 62 pacientes com LNH agressivo

N	idade	sexo	tipo histológico	LDH	Ann Arbor	sintomas B	bulky	IPI	RC	Recaída	Óbito	causa	SG(meses)	n	SLD(meses)	p53	p21/WAF-1	Mdm2	c-Myc	PCNA	Status p53
44	74	mas	B	721	4	sim	não	3	NAO		SIM	SEPSIS	12,0	44		0	0	0	3	2	A
45	66	fem	B	343	4	0	não	3	NAO		SIM	LNH	12,0	45		3	0	0	2	3	B
46	19	mas	Anaplásico	1078	4	sim	sim	3	NAO		SIM	LNH	16,0	46		1	0		0	1	B
47	53	mas	B	348	4	0	não	3	NAO		0		12,0	47		3	3	0	3	3	C
48	38	mas	B	868	3	0	não	3	SIM	não	0		66,0	48	63,00	0	1		0	1	A
49	70	fem	B	660	3	0	não	3	NAO		SIM	LNH	10,0	49		1	0		1	3	B
50	36	mas	B	1456	4	sim	não	4	NAO		SIM	LNH	12,0	50		0	1	0	1	3	A
51	76	fem	B	1296	2	0	sim	2	NAO		0		11,0	51		0	1	0	1	1	A
52	28	mas	B	1145	3	0	sim	3	SIM	não	0		44,0	52	38,00	0	0	0	0	2	A
53	40	mas	B		4	sim	não		NAO		SIM	LNH	7,0	53		0	0	0	3	3	A
54	58	fem	B		2	0	não		SIM	não	0		66,0	54	39,00	0	0	0	0	1	A
55	46	fem	B	605	4	sim	sim	4	SIM	sim	SIM	LNH	39,0	55	7,00	0	1	0	1	2	A
56	68	mas	Anaplásico	286	1	0	sim	1	SIM	não	0		24,0	56	21,00	0	1	1	1	3	A
57	69	fem	B	354	1	sim	não	1	SIM	não	0		40,0	57	36,00	0	0		0	2	A
58	65	fem	B	1510	2	sim	não	2	SIM	não	0		32,0	58	27,00	0	1	1	0	3	A
59	77	mas	B	369	2	sim	sim	2	SIM		SIM	IGN	5,0	59	1,00	0	1	2	0	3	A
60	73	fem	B		3	sim	não		NAO		SIM	SEPSIS	8,0	60		0	1	1	0	3	A
61	49	mas	B		3	0	não		NAO		0		18,0	61		0	2		0	3	A
62	43	fem	B	1009	3	sim	não	3	SIM	sim	0		14,0	62	10,00	0	2		0	3	A

Tabela II - Dados clínicos e laboratoriais de 33 pacientes com LNH B de grandes células																						
n	idade	sexo	Ann arbor	LDH	sint B	bulky	mo	sítios extranodais	IPI	tratamento	remissão	recidiva	SG (dias)	SLD (dias)	óbito	causa óbito	Situação	p53	bcl-2	bax	bak	mcl-1
1	60	m	4	2606	1	1	1	mo,fig,orbita,pleura	AR	CHOP	0		118		1	LNH	Óbito	2	3	3	3	3
2	57	m	4	1102	1	1	0	pele,fígado	AR	FMACHOP	1	0	1463	1249	0		Vivo	1	2	3	3	2
3	36	m	1	415	0	0	0	amígdala	BR	VACOPB	1	0	835	719	0		Vivo	0	2	3	2	2
4	36	f	4		1	0	0	pleura		CHOP	1	1	1461	123	0		perda seguimento	0	1	3	3	3
5	60	f	2	350	0	1	0	0	BR	CHOP	1	1	829	488	1	ignorado	Óbito	0	2	3	3	2
7	53	f	1		1	1	0	0		CHOP	1	0	1006	731	0		perda seguimento	0	3	2	0	2
8	28	m	4		1	0	1	mo,fígado,intestino		CHOP	0		377		1	LNH	Óbito	0	0	3	2	2
9	65	f	4		1	0	0	fígado		CHOP	0		3741		1	LNH/sepsis	Óbito	0	1	2	0	2
10	25	m	2	200	1	0	0	0	BR	MACOPB	0		184		1	LNH	Óbito	0	0	3		3
11	53	m	2	105	1	1	0	0	BR	CHOP	1	0	1949	1666	0		perda seguimento	0	3	3		3
12	64	m	3	460	1	1	0	0	AI	CHOP	0		188		1	LNH	Óbito	2	0	3		2
13	25	m	2	162	1	1	0	intestino delgado	BR	FMACHOP	1	0	2008	1743	0		perda seguimento	0	0	3	2	2
14	60	f	2	212	0	0	0	0	BR	CHOP	1	0	1369	973	0		perda seguimento	0		0		0
15	52	f	4	377	1	0	0	fígado	BI	MACOPB	0		293		0		perda seguimento	1	2	3	3	3
16	45	f	3		0	0	0	0		MACOPB	1	0	3599	3481	0		perda seguimento	0	1	0	2	
17	38	f	4	146	1	0	0	fígado		MACOPB	0		411		1	sepsis	Óbito	0	0	2	2	
18	52	m	1	442	0	1	0	0	BR	FMACHOP			41		1	sepsis	Óbito	1	1	2	2	3
19	34	f	4	830	1	1	0	pericárdio,pulmão	AI	VACOPB	1	0	1354	1196	0		Vivo	0	0	3		
20	68	f	3	602	1	1	0	0	AR	CHOP	0		272		1	sepsis	Óbito	0	2	3	3	
22	53	f	4	1114	1	0	0	peritônio,snc	AR	CHOP			49		1	LNH	Óbito	0	1	2		
23	85	m	2	336	0	0	0	0	BR	CHOP			241		1	ignorado	Óbito	1	0	2	3	3
25	66	f	4	343	0	0	0	tireóide,osso	AI	CHOP	0		398		1	LNH	Óbito	3	0	2	2	3
26	78	m	3	549	1	0	0	0	AR	CHOP	0		220		1	LNH	Óbito	2	3	3	3	3
27	38	m	1	868	1	0	0	pálato	BI	CHOP			184		1	sepsis	Óbito		0	3	2	
28	70	f	3	660	0	0	0	0	AI	CHOP	0		256		0		perda seguimento	1	2	2		
29	36	f	4	1456	1	0	0	osso	AR	CHOP	0		368		1	LNH	Óbito	0	1	3		
30	28	m	3	1145	0	1	0	0	AI	FMACHOP	1	0	2311	2126	0		Vivo	0	0	2		
31	40	m	4	103	1	0	1	mo, pleura		MACOPB	0		230		1	LNH	Óbito	0	0	2	2	3
32	60	m	4	240	1	0	0	pleura		MACOPB			390		0		perda seguimento	0	3	2	2	3
33	46	f	4	605	1	1	1	mo,amígdala		CHOP	0		1204		1	sepsis	Óbito	0	0	0	0	3
34	65	f	2	1510	1	0	0	0	BI	CHOP	1	0	1444	1236	0		Vivo	0	0	2		
35	77	m	2	369	1	1	0	0	BI	CHOP			160		1	ignorado	Óbito	0	1	3		

# AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY

VOLUME 67, NUMBER 2, JUNE  
2001

 WILEY-LISS

 This journal is online  
**InterScience®**  
[www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)

ISSN 0361-8608

# p53, Mdm2, and c-Myc Overexpression Is Associated With a Poor Prognosis in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas

Katia B.B. Pagnano,<sup>1</sup> Jose Vassallo,<sup>2</sup> Irene Lorand-Metze,<sup>1</sup> Fernando F. Costa,<sup>1</sup> and Sara T.O. Saad<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Hemocentro/Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Pathology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

The expression of p53, p21/WAF-1, Mdm2, c-Myc, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins was examined by the immunohistochemistry of paraffin-embedded tissues of 62 patients with aggressive non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and correlated to clinical data. Expression of p53, p21/WAF-1, Mdm2, and c-Myc protein was observed in 17 out of 62 cases (30%), 25 out of 60 (42%), 13 out of 44 (30%), and 39 out of 51 (76.5%), respectively. The p53<sup>+</sup>/p21WAF-1 phenotype, which is more frequently found in p53 mutations, was associated with a worse overall survival ( $P = 0.04$ ) and with a lower rate of complete response (CR) ( $PF = 0.01$ ). p53 and c-Myc negative expression was related to a better response to chemotherapy ( $PF = 0.005$  and  $0.035$ , respectively). The expression of p53, c-Myc, and Mdm2 was related to a shortened overall survival ( $P < 0.001$ ,  $0.05$ , and  $0.037$ , respectively), suggesting that the expression of these proteins could be associated with a poor outcome in these patients. *Am. J. Hematol.* 67:84–92, 2001.

© 2001 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** p53; p21/WAF-1; Mdm2; c-Myc; non-Hodgkin's lymphoma; prognosis

## INTRODUCTION

Among various malignant diseases, non-Hodgkin's lymphomas (NHL) have had one of the most rapidly increasing incidences during the last years [1,2]. Almost half of the NHL cases are considered to be aggressive lymphomas. Conventional chemotherapy can cure less than 40% of these patients. Many clinical features have been identified as independent prognostic factors in aggressive lymphomas and are useful for identifying high-risk patients, who would benefit from a more intensive approach [3]. Abnormalities of cell cycle proteins seem to be an important mechanism of tumorigenesis and may play a role in the prognosis of aggressive NHL [4].

The p53 tumor suppressor gene is affected in a wide range of human cancers, including hematological malignancies [5–10]. In some lymphoid tumors, p53 mutations have been associated with a poor prognosis and with disease progression [11–16]. The p53 gene encodes a nuclear phosphoprotein, p53, which plays a key role in cell cycle arrest, induction of apoptosis, and DNA damage repair [17–18]. The p53 protein is a transcription

factor for p21/WAF1 protein, which is involved in the control of the G1 to S-phase transition in the cell cycle, causing a negative effect on cellular proliferation [19,20]. The p53 may be inactivated by mutations of the p53 gene, leading to an abnormal protein or by its interaction with Mdm2, which antagonizes p53 activity, exporting p53 from the nucleus to the cytoplasm where it is degraded [21,22]. Mdm2 is controlled by the nucleolar protein p19 (Arf), which sequesters Mdm2 in the nucleoli after activation of the oncoprotein c-Myc [23–25]. The c-Myc protein forms a heterodimer with other proteins and may stimulate proliferation (Myc/Max) or apoptosis (Mad/Max).

It seems that, at the time of diagnosis, 20% B-NHL have somatic mutations in the p53 gene and expression of p53 is remarkably higher among mutated p53, espe-

\*Correspondence to: Sara T.O. Saad, M.D., Cidade Universitaria Zeferino Vaz, s/n Hemocentro-UNICAMP, Caixa Postal 6198, 13081-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: sara@unicamp.br

Received for publication 4 February 2000; Accepted 15 December 2000

© 2001 Wiley-Liss, Inc.

cially when a missense mutation is identified [16]. However, 50% of those with wild type p53 also have a high p53 expression detected by immunohistochemistry. Wild type p53 protein has a short half-life and is not usually detected by routine immunohistochemical methods. However, when p53 is mutated or stabilized by other proteins, its half-life increases, making the detection by immunohistochemistry possible. Expression of p53 is not always dependent on p53 mutations but can reflect the functional status of the protein, when associated to the analysis of other cell cycle proteins [26,27]. The clinical importance of immunohistochemical expression of p53, p21/WAF-1, c-Myc, and Mdm2 proteins in NHL is still controversial [4,9,16,42-45,49]. Sanchez et al. [4] evaluated the relationship between cell cycle regulator proteins and the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphomas and found no correlation between p53 expression and prognosis, but low Mdm2 expression was identified as a positive prognostic marker, related to prolonged overall survival. As far as we know, there is no clinical study evaluating concomitantly the expression of p53, p21/WAF-1, Mdm2, and c-Myc proteins in aggressive lymphomas and correlating their expression to clinical outcome.

In this study we characterized the expression of p53, p21/WAF-1, Mdm2, and c-Myc proteins in a population of aggressive NHL and correlated the findings to clinical and laboratory prognostic factors, response to chemotherapy, overall survival, and disease-free survival. We demonstrated for the first time a shorter overall survival in c-Myc-positive patients. In addition, p53 and c-Myc-negative expression were related to better response to chemotherapy, and p53 and mdm2-positive expression were associated with a shorter overall survival. PCNA, a known proliferation marker in NHL, was used to measure the proliferation rate [28-30].

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

A total of 62 biopsies taken from tissue sample of 62 newly diagnosed patients, aged from 19 to 85 years (median 52.7), 30 males and 32 females, HIV-negative, with aggressive NHL, who were seen at the Hematology Service at The State University of Campinas, were studied. The lymph node biopsies were performed at the time of clinical diagnosis and were recovered from the files of the Department of Pathology. The initial diagnosis was confirmed by two pathologists and the samples were reclassified according to REAL classification [31] as diffuse large B-cell (52 patients); anaplastic large cell (6 patients: five CD 30<sup>+</sup> and one null cell type); peripheral T-cell (non otherwise specified) (4 patients).

The initial stage included patient history, physical examination, standard blood tests including lactate dehy-

TABLE I. Antibodies Used for Evaluation of Cell Cycle Protein Expression\*

Antibodies to	Clone/source	Dilution	Incubation	Detection method
p53	DO-7, Dako	1:50	ON, 37°C	StrABP <sub>x</sub>
p21/WAF-1	Cat. no. OP64, Calbiochem	1:100	1 hr. RT	Dako, CSA
Mdm2	Cat. no. sc-965, Santa Cruz	1:150	1 hr. RT	Dako, CSA
c-Myc	Cat. no. sc-40, Santa Cruz	1:50	ON, 37°C	StrABP <sub>x</sub>
PCNA	Cat. no. sc-56, Santa Cruz	1:100	ON, 37°C	StrABP <sub>x</sub>

\*Abbreviations: StrABP<sub>x</sub>, streptavidin-biotin-peroxidase; CSA, catalyzed signal amplification; ON, overnight; RT, room temperature.

drogenase (DHL), abdomen ultrasonography and/or computerized tomography (CT), chest radiography and/or CT, and bone marrow biopsy. The median follow-up was 15 months (1-114 months). Patients were classified according to Ann Arbor and International Prognostic Index (IPI) [3]. Patients above 60 years old were treated with CHOP, and younger patients were treated with third-generation protocols (MACOP-B, VACOP-B, or F-MACHOP) [32]. Complete remission (CR) was defined as the normalization of physical and radiological findings 4 weeks after the last cycle of chemotherapy. Partial response (PR) was defined as 50% reduction of the initial tumor mass. Patients who did not fulfill the above criteria were considered nonresponders (NR).

### Methods

Immunohistochemical analysis was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The sections were placed on previously silanized glass slides and submitted to immunohistochemistry according to the previously reported technique [33], with some modifications, as follows. The antibodies used in this study and some technical aspects are summarized in Table I. Prior to antibody incubation, antigen retrieval was achieved by immersion of sections in citrate buffer, pH 6.0, 0.01 M, followed by 3 cycles of microwaving of 7 min each for p53 antibody and 2 cycles of 7 min for the other antibodies. Staining was performed with diaminobenzidine, counterstaining with Meyer's hematoxylin, and mounting with Entellan.

The following positive controls were used: tissue sections of breast cancer with known positivity for p53; tissues of normal colon for p21/WAF1 and c-Myc reactions; the positive cells are localized in the most superficial cells which are in G0 of the cell cycle. The positive control used for PCNA was a tonsil section. Negative controls were used in every reaction by using TBS instead of primary antibody.

The expression was scored semiquantitatively by two

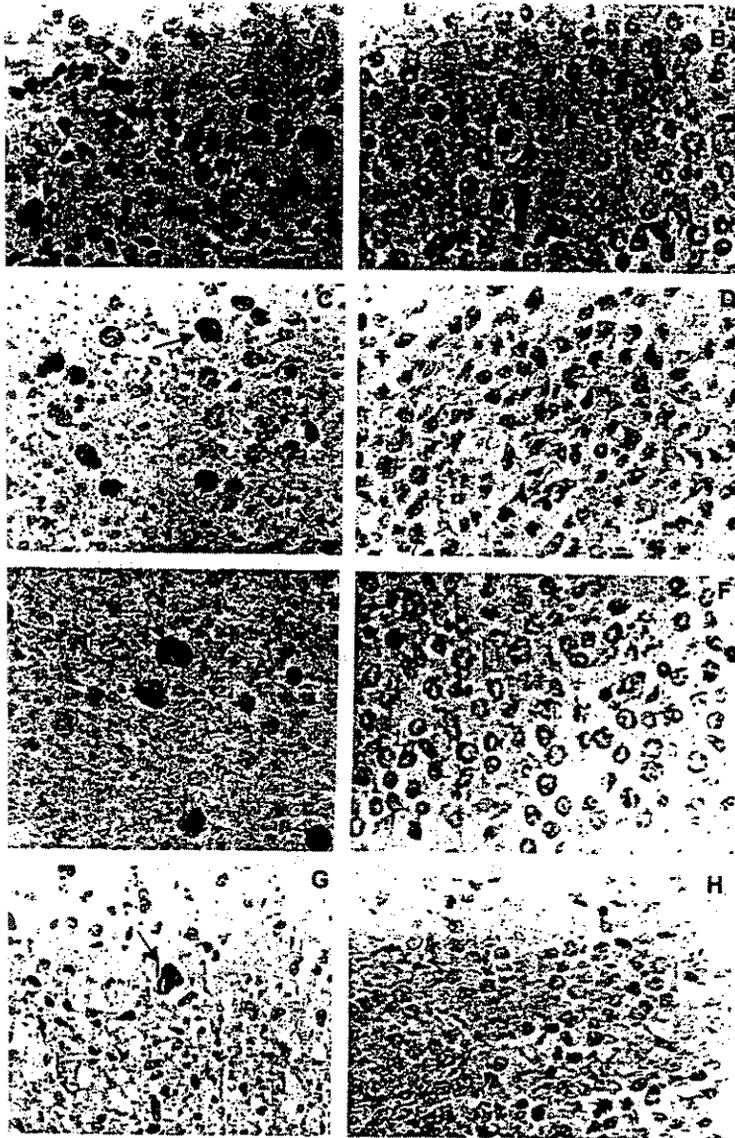


Fig. 1. Immunostaining of aggressive NHL. (A) p53-positive cells (arrows); (B) p53-negative; (C) p21/WAF-1-positive; (D) p21/WAF-1-negative; (E) Mdm2-positive; (F) Mdm2-negative; (G) C-Myc-positive; (H) c-Myc-negative.

vers, by analysis of 5–10 higher power fields under magnification of an optical microscope. The results quantified as negative (0) if no staining was observed in any cell and positive if the neoplastic cells exhibited nuclear staining in 1–9% of the cells (+), between 10% and 50% (++) and more than 50% (+++). Examples of positive and negative reactions can be seen in Figure 1.

#### Statistical Analysis

Overall survival and disease-free survival analysis were calculated by Kaplan–Meier method, and the survival curves were compared by the log-rank test. Differences were considered significant if *P* was lower than

The study of CR was performed by  $\chi^2$  test for evaluation of p53 and c-Myc proteins, and Fisher's exact test was used for the evaluation of p21/WAF-1, PCNA, and Mdm2. Fisher's test was also used for the comparison between protein expressions. Differences were considered significant if *P* was lower than 0.05. The Kruskal–Wallis test was used for comparison between LDH and protein expression.

#### RESULTS

Clinical and laboratory data of all patients are summarized in Table II. The predominant subtype observed was diffuse large B-cell lymphomas. The majority of patients

TABLE II. Patient Data at Diagnosis ( $n = 62$ )

	No.	%
Ann Arbor Stage		
I/II	21	34
III/IV	41	66
B symptoms	39	63
Bulky disease	27	43.5
LDH > normal	25	52
Age > 64 years	22	41.5
IPI <sup>a</sup>		
Low/low-intermediate risk	21/47	45
High/high-intermediate risk	26/47	55
Complete response	27	43.5
Relapses	6/27	2
Death	32	51.5

Overall survival, median 15 months  
Disease-free survival, median 22 months

<sup>a</sup>IPI (International Prognostic Index; Shipp et al., 1993).

presented advanced disease at diagnosis. About 50% were classified as high/high-intermediate risk IPI. However, CR was achieved in 43.5%, and relapses were seen in 22%.

#### Immunohistochemicals Analysis

Nuclear staining for p53 was seen in 17 out of 61 cases (30%). Seven cases presented + expression, 4 cases presented ++, and 6 presented +++. Among these p53 positive cases, 4 showed p21/WAF-1 expression and 2 cases expressed both p53 and Mdm2.

p21/WAF-1 nuclear expression was observed in 25 out of 60 patients (42%). The expression was + in 19 patients, ++ in 4 patients, and +++ in 2 patients. c-Myc expression was evaluated in 51 cases and was present in 39 cases (76.5%): 0 in 12 patients, + in 12 patients, ++ in 16 patients, and +++ in 11 patients.

Mdm2 immunoreactivity was seen in 13 out of 44 cases (30%). Proliferative activity was evaluated by PCNA expression, which detects cells in the proliferative cell cycle. PCNA expression was accessible in 58 cases and scored as + in 6 patients, ++ in 19 patients, and +++ in 33 patients.

p53 expression was not correlated to PCNA, c-Myc, Mdm2, or p21/WAF-1 expression ( $P = NS$ ). PCNA expression was correlated to c-Myc expression ( $P = 0.002$ ) but not to p53, p21/WAF-1, or Mdm2 ( $P = NS$ ).

Patients with negative p53 expression had a higher rate of complete response after chemotherapy ( $P = 0.005$ ). p53 and p21/WAF-1 status was also important in achieving a complete response ( $P = 0.01$ ). Patients with negative c-Myc expression had a better response to chemotherapy ( $P = 0.03$ ). These results are presented in Table III.

p21/WAF1 expression was not associated with Mdm2 or PCNA expression or with response to chemotherapy,

TABLE III. Correlation of p53 and c-Myc Expression and p53/p21WAF1 Status With Response to Chemotherapy

	Complete remission		
	Yes	No	
p53 expression <sup>a</sup>	$n = 26$	$n = 27$	$P = 0.005$
Negative	24 (60%)	16 (40%)	
Positive	2 (16%)	11 (8.4%)	
p53/p21 status <sup>a</sup>	$n = 26$	$n = 27$	$P = 0.01$
A <sup>b</sup>	24 (60%)	16 (40%)	
B <sup>b</sup>	1 (10%)	9 (90%)	
C <sup>b</sup>	1 (34%)	2 (66%)	
c-myc expression	$n = 22$	$n = 23$	$P = 0.03$
Negative	9 (41%)	3 (13%)	
Positive	13 (59%)	20 (87%)	

<sup>a</sup>9 missing cases: 8 early deaths and 1 patient without p53 evaluation.

<sup>b</sup>A = p53<sup>-</sup>/p21/WAF-1<sup>-</sup> or +; B = p53<sup>+</sup>/p21/WAF-1<sup>-</sup>; C = p53<sup>+</sup>/p21/WAF-1<sup>+</sup>.

overall survival, and disease-free survival. Relapse was not associated with the expression of any of these proteins.

There was no correlation between DHL and PCNA or p53 or c-Myc expression.

#### Survival Analysis

Overall survival was shorter in patients with p53, c-Myc-, and Mdm2-positive expression ( $P < 0.001$ , 0.05, and 0.037, respectively) (Figs. 3-5). Similar results were observed when we analyzed separately diffuse large B-cell lymphomas ( $n = 52$ ) ( $P < 0.001$ , 0.04, 0.01, respectively).

The status p53/p21WAF-1 was evaluated in 59 patients as follows: cases p53-negative/p21/WAF-1-negative or -positive were grouped as "A" ( $n = 44$ , 74.5%); cases with p53-positive and p21/WAF-1-negative expression were grouped as "B" ( $n = 11$ , 18.5%); and cases with simultaneous p53 and p21/WAF-1 expression were grouped as "C" ( $n = 4$ , 7%). Three cases were not available for this analysis. The overall survival was longer in group A and worse in groups B and C ( $P = 0.04$ ) (Fig. 2).

Two patients were double-positive for p53 and Mdm2, and both died before completing 6 months from diagnosis, while p53-positive/Mdm2-negative patients had a longer survival (17-54 months). At the moment of analysis, 3 patients of this group were still living.

When patients were stratified according to age under 55 years and above 55 years, p53-negative expression was related to a better prognosis in terms of overall survival in both groups ( $P = 0.0015$  and 0.0413). The same was observed when p53-negative patients were stratified according to Ann Arbor stage ( $P = 0.0001$  and 0.0013). However, Mdm2 and c-Myc expression only influenced overall survival of patients with age under 55 years ( $P = 0.0453$  and 0.0483, respectively). Patients with Ann Ar-

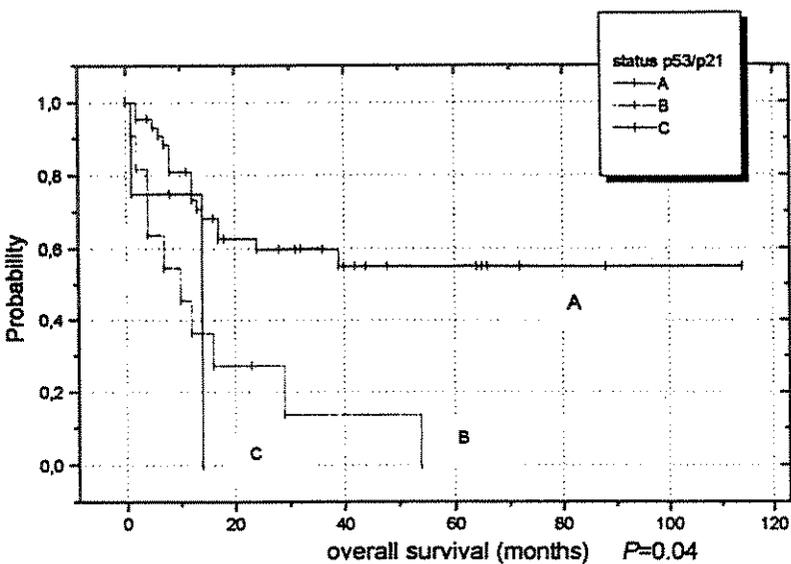


Fig. 2. Overall survival of 59 NHL patients according to p53/p21/WAF-1 phenotypes: (A) p53<sup>-</sup>/p21/WAF-1<sup>+</sup> or <sup>-</sup>; (B) p53<sup>+</sup>/p21/WAF-1<sup>-</sup>; (C) p53<sup>+</sup>/p21/WAF-1<sup>+</sup>.

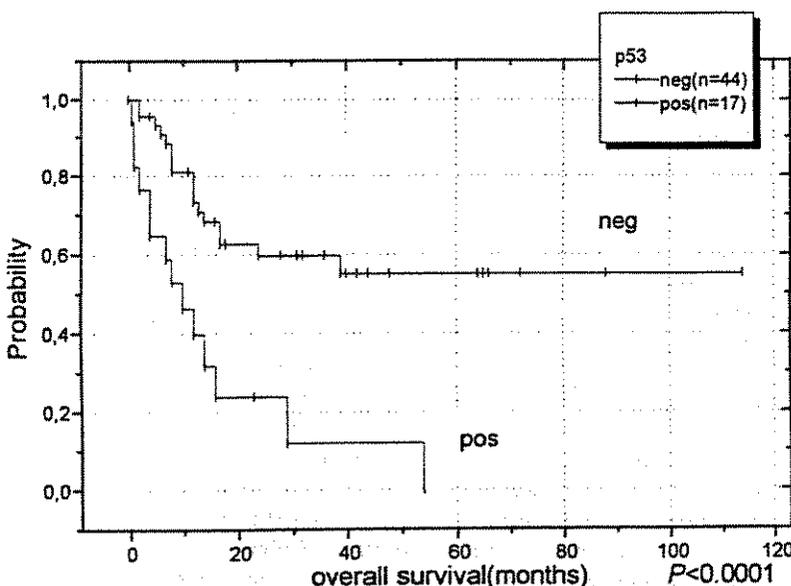


Fig. 3. Overall survival of 61 NHL patients according to p53 expression.

bor stage III and IV who had Mdm2-positive expression had a poorer overall survival ( $P = 0.0013$ ) compared to Mdm2-negative patients. The median survival of the patients under 55 years old is shown in Table IV.

There was no difference of OS or DFS according to type of chemotherapy used or immunophenotype (data not shown).

**DISCUSSION**

In the present study, we observed a high expression of p53 and Mdm2 proteins in aggressive NHL (30%), simi-

**TABLE IV. Overall Survival Analysis of NHL Patients <55 Years, According to Cell Cycle Protein Expression**

Protein expression	n	Median survival (months)	P (log-rank)
c-Myc <sup>-</sup>	7	16	0.0483
c-Myc <sup>+</sup>	20	14	
p53 <sup>-</sup>	25	39	0.0015
p53 <sup>+</sup>	8	4	
Mdm2 <sup>-</sup>	17	39	0.0453
Mdm2 <sup>+</sup>	5	13	

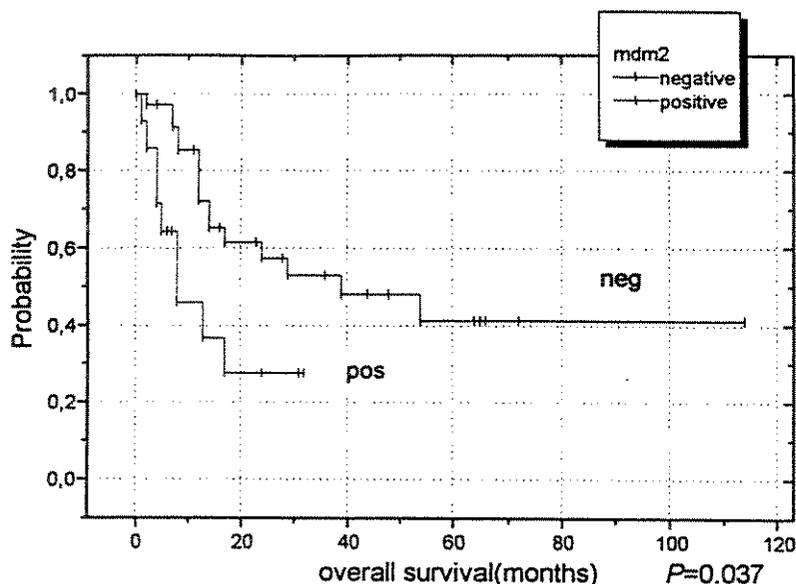


Fig. 4. Overall survival of 44 NHL patients according to Mdm2 expression.

lar to those previously reported [4,16,26,34,42,45,46]. In both cases, overexpression was associated to a poor overall survival. Overexpression of p53 protein due to nuclear accumulation has been related in a series of lymphoma patients and varies from 5% to 90% depending on histologic subtype [10]. It is overexpressed in aggressive variants of mantle cell lymphomas [9], around 30% of high-grade NHL, and in about 90% in patients with HIV infection [34,35]. Mdm2 expression has been described in approximately 25% of NHL and in one-third of wild-type p53-positive cases, mainly in large B-cell lymphomas [36,37]. p21/WAF-1 expression is present in 20–30% of NHL, mainly in CD30-positive NHL, but there is no description of structural abnormalities of p21/WAF-1 in these cases [38].

In our study, p53 expression was considered to be an independent prognostic factor when compared to age, DHL, and Ann Arbor stage. We observed a better overall survival in p53-negative patients, comparing to those with p53-positive/p21/WAF-1-negative phenotype. This last phenotype is usually associated to the presence of missense mutations that could inactivate p53 function [39,40]. A positive correlation between p53 missense mutations and p53 expression has been found by Koduru et al. [16] in a population of B-cell NHL, and both p53 mutation and expression had a negative influence on survival. However, Sanchez et al. [4] found no correlation between p53 expression and prognosis in diffuse large B-cell lymphomas. Overexpression of wild-type p53 protein, associated with accumulation of p21/WAF1 protein, indicates that p53 is functional with respect to p21/WAF-1 activation [38]. Coexpression of p53 and p21/WAF-1 is observed in CD30<sup>+</sup> anaplastic NHL, but p53

mutations are not usually seen [41]. Thus immunohistochemical analysis of p21/WAF1 combined with p53 can provide information regarding the functional status of p53 tumor suppressor gene [42]. Actually, Wyndham et al. [43] observed that immunohistochemistry has a sensitivity of 79% and specificity of 98% in detecting p53 mutations. In addition, mutations of the p53 gene usually show null or low levels of Mdm2, suggesting that such mutations result in proteins unable to transactivate these genes.

We could also observe a correlation between response to chemotherapy and p53 expression. CR was achieved in 60% of p53-negative cases and in only 16% of p53-positive cases ( $P = 0.005$ ). Loss of normal p53 function, leading to drug resistance, could be one explanation for this finding. Corroborating our results, Wyndham et al. [43] and Moller et al. [42] reported that p53 abnormalities (mutations and overexpression) were associated with drug resistance and also with a poor response to chemotherapy. However, Sakai et al. [44] found no correlation between p53 expression and early response to chemotherapy, but in this study, several cases and different subtypes of NHL were evaluated.

p21/WAF-1 expression was not correlated with c-Myc, Mdm2, or PCNA expression. P21/WAF-1 expression had no association with clinical parameters, except when associated with p53 status.

Mdm2-negative patients in our study presented a better overall survival (Fig. 4). When patients were stratified according to age, Mdm2-negative expression was associated with a longer overall survival only in patients under 55 years. In these patients, the median survival was 39 months for negative Mdm2 and 13 months for posi-

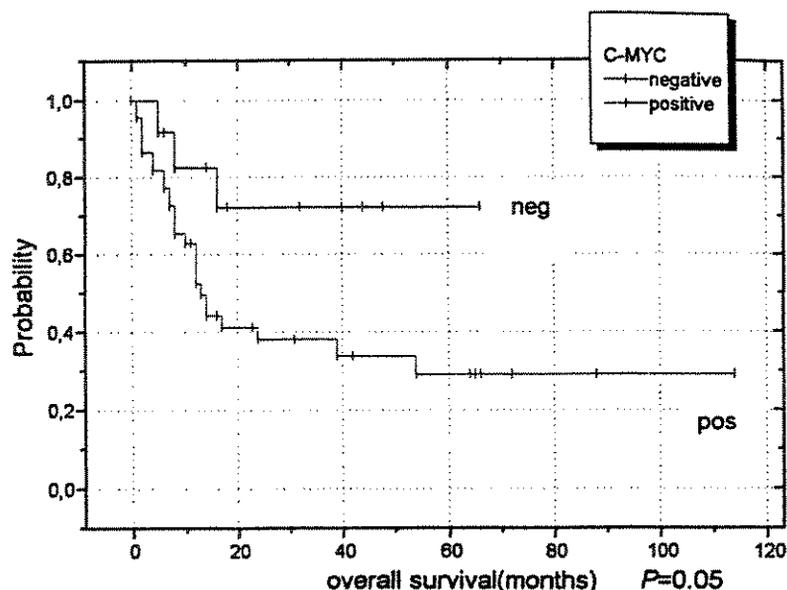


Fig. 5. Overall survival of 51 NHL patients according to c-Myc expression.

tive Mdm2 ( $P = 0.04$ ). Mdm2-negative patients with Ann Arbor III/IV had a median survival of 39 months. In contrast, Mdm2-positive patients had a median OS of 8 months ( $P = 0.0013$ ). Sanchez et al. [4] also identified a low expression of Mdm2 as a positive prognostic marker, related to a prolonged overall survival in aggressive B-cell NHL. Recently, Moller et al. [45] verified that Mdm2 overexpression was associated to a short survival in follicle center lymphomas, extranodal marginal zone lymphomas, and mantle cell lymphomas.

In our study, we found an association of c-Myc expression with shorter survival ( $P = 0.05$ ). The role of c-Myc protein in lymphomagenesis is complex. C-myc activates the p19(ARF)-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway, enhancing p53-dependent apoptosis [46]. We did not find a correlation between p53 and c-Myc expression. We inferred that overexpression of c-Myc was not enough to lead to apoptosis mediated by p53 in the most p53-positive cases, because p53 overexpression might be associated with an abnormal protein that would not respond to c-Myc regulation. Korkopoulous et al. [47] found an association between PCNA and c-Myc. We found a positive correlation between c-Myc expression and PCNA ( $PF = 0.047$ ), indicating a high proliferating state.

We did not find a correlation between p53, Mdm2, or p21/WAF-1 expression and degree of proliferation, measured by PCNA.

In conclusion, in the present study we found that the expression of p53, Mdm2, and c-Myc proteins is apparently important in determining the prognosis of patients with aggressive NHL, and these proteins may be useful as markers of poor outcome. p53 expression is an independent factor of poor prognosis in aggressive lympho-

mas. These findings, associated with other known prognostic factors, may be helpful to understand the biology of this group of neoplastic diseases and to direct novel strategies to aggressive NHL treatment in the future.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are greatly indebted to Raquel Susana Foglio for editing the manuscript and to Marcos D.A. Silva for the preparation of the tissue sections. This work was supported by grants from CNPQ and FAPESP.

#### REFERENCES

1. Devesa SS, Fears T. Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. *Cancer Res* 1992;52:5432.
2. Morgan GJ, Jack A, Clayden AD, Brincker H, Coebergh JW, Carli PM, Vormanen M, Tumino R, Cartwright RC. Trends in the incidence of lymphoma in Europe. *Br J Haematol* 1996;93:104.
3. Shipp et al. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med* 1993;14:987-994.
4. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz M, Cruz MA, Martinez B, Lopez L, Martinez-Montero JC, Orradre JL, Saez AI, Garcia JF, Piris MA. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 1998;16:1931-1939.
5. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989;342:702-708.
6. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
7. Weinberg R. Tumor suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-1254.
8. Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? *FASEB* 1992;6:3169-3176.
9. Hernandez L, Fest T, Cazprla M, Teryuia-Feldestein J, Bosch F, Pei-

- nado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardes A, Jaffe ES, Campo E, Raffeld M. p53 mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996;87:3351-3359.
10. Imamura J, Miuyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994;84:2412-2421.
  11. Chang H, Benchimol S, Mindem MD, Messner HA. Alterations of p53 and c-myc in the clonal evolution of malignant lymphoma. *Blood* 1994;83:452-459.
  12. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favara R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993;82:2289-2295.
  13. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993;82:1994-2004.
  14. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, Saito H, Hotta T. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *New Engl J Med* 1997;337:529-534.
  15. Greiner TC, Mounihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, Weisenburger DD. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 1996;87:4302-4310.
  16. Koduru PR, Raju K, Vadmal V, Menezes G, Shah S, Susin M, Kolitz J, Broome JD. Correlation between mutation in p53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:4078-4091.
  17. Sachs L, Lotem J. Hematopoietic cells from mice deficient in wild type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood* 1993;82:1092-1096.
  18. Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993;262:1644-1645.
  19. Marx J. New link found between p53 and DNA repair. *Science* 1994;266:1321-1322.
  20. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. p21/WAF-1, a potent mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817.
  21. Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997;387:299-303.
  22. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387:296-299.
  23. Lindsey DM, Turchi JJ, Berberich SJ. Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res* 1997;57:5013-5016.
  24. Tao W, Levine AJ. P19 (ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6937-6941.
  25. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8292-8297.
  26. Villuendas R, Piris MA, Algara P, Sanchez-Beato M, Sanchez-Verde L, Martinez JC, Orradre JL, Garcia P, Lopez C, Martinez P. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood* 1993;82:3151-3156.
  27. Martinez-Delgado B, Robledo M, Arranz E, Infantes F, Echezarrreta G, Marcos B, Sanz C, Rivas C, Benitez J. Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas. *Am J Hematol* 1997;55:1-8.
  28. Pich A, Ponti R, Valente G, Chiusa L, Geuna M, Novero D, Palestro G. MIB-1, Ki67 and PCNA scores and DNA cytometry in intermediate grade malignant lymphomas. *J Clin Pathol* 1994;47:18-22.
  29. Czader M, Porwit A, Tani E, Ost A, Mazur J, Auer G. DNA image cytometry and the expression of proliferative markers (proliferating cell nuclear antigen and Ki67) in non-Hodgkin's lymphomas. *Mod Pathol* 1995;8:51-58.
  30. Smith M, Chen T, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Interaction of the p53 regulated protein Gadd 45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994;266:1376-1380.
  31. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Michael LC, Delsol G, Wolf-Petersers C, Falini B, Gaffer KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri AS, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
  32. Fisher RE, Gaynor ER, Dahlborg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med* 1993;328:1002.
  33. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
  34. Schalaifer D, Krajewski S, Galoin S, Rigal-Huguet F, Laurent G, Massip P, Pris J, Delsol G, Reed JC, Brousset P. Immunodetection of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Pathol* 1996;149:177-185.
  35. De Re V, Carbone A, DeVita S, Globini A, Maestro R, Gasparotto D, Vukosa Vljevic T, Boiocchi M. p53 protein over-expression and p53 gene abnormalities in HIV-1 related non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer* 1994;56:662-667.
  36. Maestro R, Gioghini A, Doglioni C, Gasparotto D, Vukosavljevic T, De-Re V, Laurino L, Carbone A, Boiocchi M. Mdm2 overexpression does not account for stabilization of wild type p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1995;85:3239-3246.
  37. Kawamata N, Miller C, Levy V, Shintaku IP, Koeffler HP, Said JW. Mdm2 oncogene expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:33-38.
  38. Maestro R, Gioghini A, Doglioni C, Piccinin S, Vukosavljevic T, Gasparotto D, Carbone A, Boiocchi M. Human non-Hodgkin's lymphomas overexpress a wild-type form of p53 which is a functional transcriptional activator of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Blood* 1997;89:2523-2528.
  39. Chilosi M, Doglioni C, Magalini A, Inghirami G, Krampera M, Nadali G, Rahal D, Pedron S, Benedetti A, Scardoni M, Macri E, Lestani M, Menestrina F, Pizzolo G, Scarpa A. p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. *Blood* 1996;88:4012-4020.
  40. Villuendas R, Pezzella F, Gatter K, Algara P, Sanchez-Beato M, Martinez P, Martinez JC, Munoz K, Garcia P, Sanchez L, Kocialkowsky S, Campo E, Orradre JL, Piris MA. p21/WAF1/CIP1 and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21- immunophenotype associated with missense mutations. *J Pathol* 1997;181:51-61.
  41. Cesarman E, Inghirami G, Chadburn A, Knowles DM. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol* 1993;143:845-856.
  42. Moller MB, Gerdes AM, Skjold K, Mortensen LS, Pedersen NT. Disrupted p53 function as predictor of treatment failure and poor prognosis in B and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:1085-1091.
  43. Wyndham HW, Teruya-Feldstein J, Thierry F, Harris C, Steinberg S, Jaffe ES, Raffeld M. Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997;89:601-609.
  44. Sakai A, Odaki K, Asaoku H, Shintaku S, Hoshino S, Okita H, Kimura A. Expressions of p53 and PCNA do not correlate with the International Index or early response to chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 1998;58:42-48.
  45. Moller MB, Nielsen O, Pedersen NT. Oncoprotein Mdm2 overexpres-

- sion is associated with poor prognosis in distinct non-Hodgkin's lymphoma entities. *Mod Pathol* 1999;12:1010-1016.
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 1999;13:2658-2669.
- Korkolopoulou P, Oates F, Kittas C, Crocker J. p53, c-myc p62 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 1994;47:9-14.
48. Osada M, Ishioka C, Ichinohasama R, Kadowaki I, Murakawa Y, Watanabe M, Kanamaru R, Ikawa S. Influence of p53 mutation on pathological grade, but not prognosis of non-Hodgkin's lymphoma. *Anticancer Drug Des* 1999;14:107-114.
49. Navaratnam S, Williams GJ, Rubinger M, Pettigrew NM, Mowat MR, Begleiter A, Johnston JB. Expression of p53 predicts treatment failure in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1998;29:139-144.

# Apoptosis-Regulating Proteins and Prognosis in Diffuse Large B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas

K.B.B. Pagnano<sup>a</sup> M.D. Silva<sup>a</sup> J. Vassallo<sup>b</sup> F.J.P. Aranha<sup>a</sup> S.T.O. Saad<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hematology Hemotherapy Center and <sup>b</sup>Department of Pathology, State University of Campinas, Campinas-SP, Brazil

## Key Words

Bcl-2 · Bax · Bak · Mcl-1 · p53 · Non-Hodgkin's lymphoma · Prognosis

## Abstract

We evaluated the expression of apoptosis-regulating proteins (p53, Bcl-2, Bax, Bak and Mcl-1) in paraffin-embedded tissues of 33 patients with diffuse large B cell non-Hodgkin's lymphoma, and assessed the relationship of these proteins to clinical outcome and response to chemotherapy. Our results showed that p53 expression was an independent immunohistochemical parameter related to a poor prognosis in these lymphomas. Bcl-2, Bax, Bak and Mcl-1 proteins, though highly expressed in almost all cases were not associated with prognosis or response to treatment.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Aggressive non-Hodgkin's lymphomas (NHL) form a heterogeneous group in terms of clinical presentation, histology, immunophenotype, response to treatment and prognosis. Diffuse large B cell NHL (DLCL) constitute up

to 20–25% of NHL in many series. Combination chemotherapy may cure 40–50% of adult patients [1, 2].

Several clinical prognostic factors have been described to predict clinical outcome, as age, lactate dehydrogenase (LDH), performance status, and stage [3]. Recently, many publications have suggested that proteins involved in the regulation of cell cycle and apoptosis may lead to drug resistance and consequently to a worse response to treatment and decreased overall survival [4, 5].

Bax is a central member of the Bcl-2 family of apoptosis regulators, which can repress (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) or promote apoptosis (Bax, Bcl-xs, Bad and Bak) [6]; in addition to homodimerization, Bax forms heterodimers with other family proteins, like Mcl-1, Bcl-xl and Bcl-2 [7–9]. Bax overexpression causes apoptosis [7, 9, 10], and may function as a tumor suppressor in human hematopoietic cells [11, 12]. High levels of Bcl-2 protein detected by immunostaining have been associated with early relapse in intermediate and high-grade NHLs [13–15], but the results are still controversial [16], probably because Bcl-2 expression depends on counterbalancing by other Bcl-2 family members. There are few data in the literature regarding the influence of Bak and Mcl-1 expression on the prognosis of aggressive NHL.

Therefore, p53 is another proapoptotic protein that upregulates the expression of Bax and possibly Bak [17,

KARGER

© 2002 S. Karger AG, Basel  
0001-5792/02/1071-0029\$18.50/0

For a full list of products visit our website at [www.karger.com](http://www.karger.com)

Dr. Sara T.O. Saad  
Hemocentro-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n  
Caixa Postal 6108

Overexpression of p53 is frequently associated with abnormal protein function [19] and has a prognostic value [16, 20–23].

The aim of the present study was to analyze retrospectively the expression of apoptosis-regulating proteins (Bax, Bak, Mcl-1 and Bcl-2) in a population with diffuse large B cell NHL and to correlate the findings with response to treatment and survival.

## Patients and Methods

### Patients

We studied 33 cases of DLCL diagnosed and treated at the University of Campinas between 1983 and 1998. Patients were eligible for this study if they had a representative biopsy obtained before treatment as well as paraffin-embedded formalin-fixed tissue blocks for the diagnostic biopsy, available for immunohistochemical study. The histopathologic diagnosis was reviewed by one of the authors and classified according to the Revised European-American classification of lymphoid neoplasms (REAL classification) [24].

The initial staging included: patient history, physical examination, standard blood tests including LDH, abdomen ultrasonography and/or computerized tomography (CT), chest radiography and/or CT and bone marrow biopsy. The median follow-up was 32.5 months. Patients were classified according to the classification of the University of Michigan, Ann Arbor, Mich., USA. Patients were treated with standard protocols, according to age: patients over 60 years old or with poor performance status were treated with CHOP (21 patients) and young patients with third-generation regimens (12 patients) (MA-P-B, VACOP-B or F-MACHOP) [25]. Complete remission (CR) was defined as the normalization of physical and radiological findings, 4 weeks after the last cycle of chemotherapy. Partial response was defined as 50% reduction of the initial tumor mass. Patients who did not fulfill the above criteria were considered nonresponders.

Patients were also divided into two groups: long-term survivors (LTS), if they reached CR and overall survival (OS) was superior to 5 years and short-term survivors (STS) if they were resistant to chemotherapy and died within 1.5 year from diagnosis.

### Methods

Immunohistochemical analysis was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The sections were placed on previously silyanized glass slides and submitted to immunohistochemistry, using the streptavidin-biotin-peroxidase method, according to the previously reported technique [26], with some modifications. Antibody anti-p53 (DO-7, 1:50) was obtained from Dakopatts (Copenhagen, Denmark) and anti-Bcl-2 (SC-509, 1:40), anti-Bax (SC-526, 1:40), anti-Bak (SC-832, 1:40) and anti-Mcl-1 (SC-819, 1:40) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif., USA. Prior to antibody incubation, antigen retrieval was achieved by immersion of sections in citrate buffer, pH 6.0, followed by 3 cycles in a microwave oven (750 W) of 7 min each with p53 antibody. For Bax, Bak, Mcl-1 and Bcl-2 reactions, epitope retrieval was performed by heating in distilled water, in an autoclave at 100°C for 5 min. Incubation was performed overnight, at 4°C. Staining was performed with diaminobenzidine, and counterstaining with Mayer's hematoxylin. Slides were mounted with Entellan.

Positive controls for p53 protein consisted of breast cancer tissue sections with known positivity. For Bcl-2 and Mcl-1, the internal positive controls were endothelial cells; for Bax, endothelial cells and macrophages; for Bak endothelial cells and neutrophils. All reactions were performed with negative controls using TBS instead of primary antibody.

The expression was scored semiquantitatively by three observers, by analysis of 5–10 high-power fields under 40× magnification of an optical microscope. The results were scored in categories (0 = no staining, + = if 1–10% of neoplastic cells exhibited immunohistochemical staining in nucleus and/or cytoplasm, ++ = >10% < 50% and +++ = more than 50%).

### Statistical Analysis

**Survival Analysis.** OS and disease-free survival (DFS) were studied by the Kaplan-Meier method and the survival curves were compared by the log-rank test. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .

**Univariate Analysis.** The variables analyzed were age ( $\leq 60$  vs.  $>60$ ), LDH ( $\leq$  normal vs.  $>$ normal), achievement of CR (yes vs. no), B symptoms (yes vs. no), bone marrow involvement (yes vs. no), p53 (neg. vs. pos.), p53 (0, + vs. ++, +++), Bcl-2 (neg. vs. pos.), Bax (neg. vs. pos.), Bak (neg. vs. pos.), Mcl-1 (neg. vs. pos.). Age and LDH were also analyzed as continuous variables, using the Mann-Whitney test. The study of CR was performed by the  $\chi^2$  or Fisher test for categorical variables. The same test was used to compare clinical variables and p53, Bcl-2, Bax, Bak and Mcl-1 expression. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ . For comparison of the STS and LTS groups, the Fisher test was used.

The Cox proportional hazards univariate analysis was also performed for each variable, which calculated the confidence interval and the relative risk of each variable in terms of survival. Variables included were age, Ann Arbor (I, II vs. III, IV), bone marrow involvement (pos. vs. neg.), B symptoms, p53 (0, + vs. ++, +++), Bak (0, +, ++ vs. +++), Mcl-1 (0, ++ vs. +++), Bax (0, ++ vs. +++), and treatment (CHOP vs. other regimens). Differences were considered significant if  $p < 0.05$ . Variables with  $p < 0.2$  were selected for multivariate analysis.

A  $\chi^2$  test was used for statistical comparison of the clinical characteristics between STS and LTS and immunostaining results.

**Multivariate analysis** was calculated through a Cox backward proportional hazard model and a logistic regression model. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

For statistical analysis, the following programs were used: SAS System for Windows (Statistical Analysis System), version 6.12. SAS Institute Inc, 1989–1996, Cary, N.C., USA and SPSS for Windows, version 10.0.5 (November 27, 1999). SPSS Inc, 1989–1999, Chicago, Ill., USA.

## Results

### Patients Characteristics

The characteristics of the 33 patients included in this analysis are listed in table 1.

The clinical follow-up ranged from 41 to 3,741 days (median 390 days). Follow-up time was counted until death or last evaluation. Nine patients died of lymphoma,

and 10 patients died of other causes. Five patients were alive between January and April 2000 and 9 patients were lost to follow-up.

#### Immunohistochemical Study

Bcl-2 expression was observed in 19/32 patients (59.4%) and negative expression in 13 patients (40.6%). One sample could not be analyzed.

Bax immunohistochemical expression was found in 30 patients (92.5%). In 18 cases (54.5%), Bax expression was observed in >50% of the cells. Only 3 patients had negative Bax expression. These 3 patients also had negative p53 expression.

Bak expression was evaluated in 21 patients. There were 18 positive cases (85.7%) and 3 negative cases (14.3%), all of them with negative p53 expression, but 2 of them with Bax positive expression.

Mcl-1 expression was positive in 20/21 patients (95%), most of the cases with more than 50% of positive cells.

p53 nuclear expression was observed in 9/32 patients (28%). In 4 cases the percentage of positive cells was greater than 10%.

#### Statistical Analysis

**Univariate Analysis.** Analysis of the probability of inducing CR showed that Ann Arbor stages I and II were associated with a better rate of CR ( $p = 0.009$ ).

The univariate Cox regression model for OS showed that p53 expressions ++ and +++ were significantly associated with shorter OS ( $p = 0.0098$ ; risk ratio = 4,774; 95% CI = 1.457–15.63).

**Multivariate Analysis.** In the logistic regression model for the probability of not achieving a CR, only Ann Arbor stage was significantly associated (stages III and IV; odds ratio = 10, confidence interval: 1,280–78,117;  $p = 0.0281$ ).

In Cox regression models, p53 expression and bone marrow involvement were both associated with a shorter OS (table 2) ( $p = 0.0045$  and  $0.0269$ , respectively).

**Kaplan Meier Survival Analysis.** Patients with p53-negative and low p53 expression (+) had a better OS ( $p = 0.0045$ , fig. 1). Bcl-2, Bak, Bax and Mcl-1 expression did not influence overall survival (fig. 2). No differences in the variables selected were observed, comparing LTS ( $n = 10$ ) and STS ( $n = 17$ ).

DFS and progression-free survival (PFS) according to protein expression could not be calculated due to the small number of patients.

**Table 1.** Clinical features of the 33 patients analyzed

		No.	%
Gender	male	16	48.5
	female	17	51.5
Age (years)	median	53 (25–85)	
	≤ 60	23	69.7
	> 60	10	30.3
B symptoms	present	24	72.7
	absent	9	27.3
Stage (Ann Arbor)	I/II	12	36.4
	III/IV	21	63.6
Bulky disease	present	13	39.3
	absent	20	60.6
LDH	≤ normal	14	51.8
	> normal	13	48.2
Bone marrow involvement	present	4	12
	absent	29	88
Extranodal disease	≤ 1 site	25	75.7
	≥ 2 sites	8	24.3
Response to therapy	CR	12	46
	relapses	2	16.6
Disease-free survival, days	median	1,216	
		(123–3,481)	
Overall survival, days	median	390	
		(41–3,741)	
Death due to lymphoma		9	47.3
Death due to other causes		10	52.5

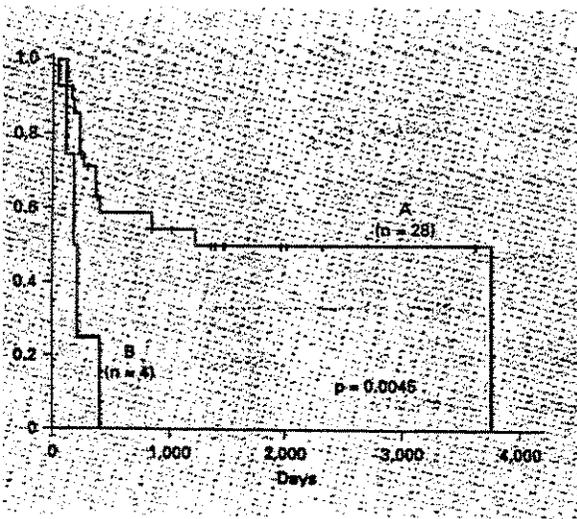
**Table 2.** Multivariate analysis of factors that influence OS by the Cox regression model ( $n = 21$ )

Variable	Risk ratio	95% CI	p
Bone marrow involvement	4.524	1.188–17.226	0.0269
p53 (0, + vs. ++, +++)	8.393	1.937–36.369	0.0045

#### Discussion

In the present study we determined the expression of apoptosis-regulating proteins (Bak, Bax, Bcl-2, Mcl-1 and p53) in a population of DLCL in order to assess the relationship of these proteins to clinical outcome and response to chemotherapy.

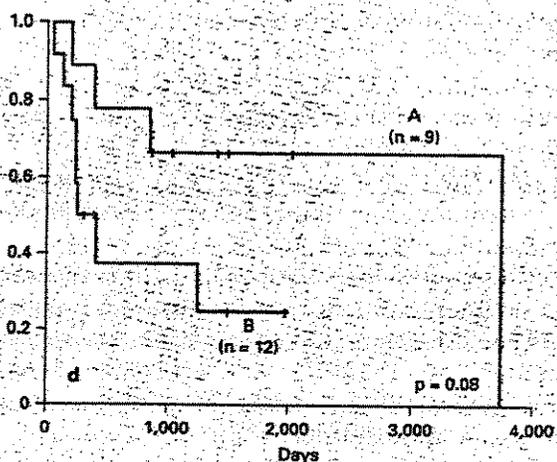
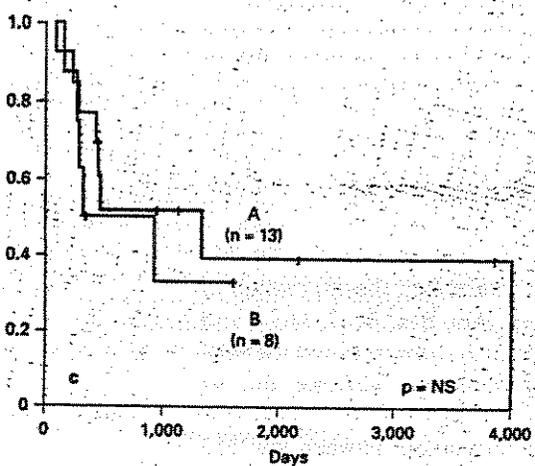
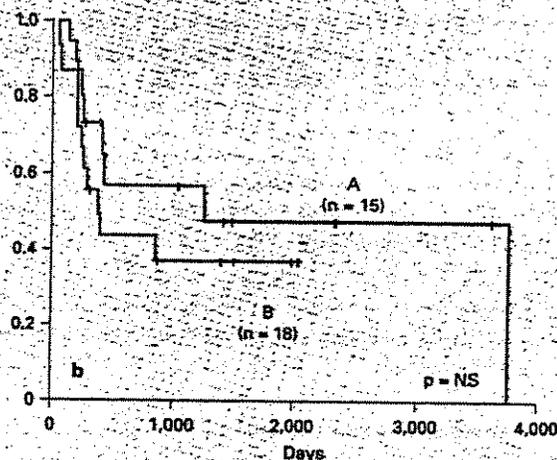
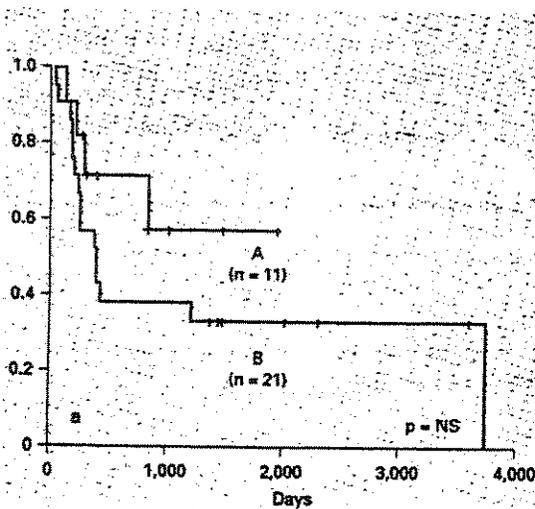
There was a significant correlation between low p53 expression (negative and +) with better overall survival in univariate analysis ( $p = 0.0098$ ). p53 expression was found to be an indicator of poor outcome also in multivar-



iate analysis. Patients with p53-positive expression had a reduced OS ( $p = 0.0045$ ) and have all died. Overexpression of p53 protein is usually associated with a loss of p53 gene function [19], favoring drug resistance and a worse prognosis. Corroborating our results, Navaratnam et al. [21] showed that patients with p53-positive tumors had a

**Fig. 1.** Overall survival of DLCL patients according to p53 expression. Curve A: p53 expression: 0, +; curve B: p53 expression: ++, +++.

**Fig. 2.** Overall survival of DLCL patients according to Bcl-2 (a), Bax (b), Bak (c), and Mcl-1 (d) expression. a Curve A: Bcl-2 expression: ++, +++; curve B: Bcl-2 expression: 0, +. b Curve A: Bax expression: 0, +, ++; curve B: Bax expression: +++. c Curve A: Bak expression: 0, +, ++; curve B: Bak expression: +++. d Curve A: Mcl-1 expression: 0, +, ++; curve B: Mcl-1 expression: +++.



- 10 Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ: BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14559-14563.
- 11 Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ: Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995;270:96-99.
- 12 Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SF, Van Dyke T: Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997;385:637-640.
- 13 Hermine O, Haiou C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavoignac C, Fillet JG, Salles G, Marolleau JP, Diebold J, Reyes F, Gaulard P (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)): Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1996;87:265-272.
- 14 Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol ADG, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, van Krieken JHJM, de Jong D, Kluin PM: Clinical significance of bcl-2 and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma: A population-based study. *J Clin Oncol* 1996;14:2131-2138.
- 15 Gascoyne RD, Adomat AS, Krajewski S, Krajewski M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM: Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:244-251.
- 16 Wilson HW, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe E S, Raffeld M: Relationship of p53, bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997;89:601-609.
- 17 Pohl U, Wagenknecht B, Naumann U, Weller M: p53 enhances Bak and CD95 expression in human malignant glioma cells but does not enhance CD95L-induced apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 1999;9:29-37.
- 18 Pearson AS, Spitz FR, Swisher SG, Kataoka M, Sarkiss MG, Meyn RE, McDonnell TJ, Cristiano RJ, Roth JA: Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:887-890.
- 19 Villuendas R, Piris MA, Algara P, Sanchez-Beato M, Sanchez-Verde L, Martinez JC, Oradre JL, Garcia P, Lopez C, Martinez P: The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood* 1993;82:3151-3156.
- 20 Koduru PRK, Raju K, Vadmal V, Menezes G, Shah S, Susin M, Kolitz J, Broome JD: Correlation between mutation in p53, p53 expression, cytogenetics, histologic type and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:4078-4091.
- 21 Navaratnam S, Williams GJ, Rubinger M, Pettigrew NM, Mowat MR, Begleiter A, Johnston JB: Expression of p53 predicts treatment failure in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1998;29:139-144.
- 22 Moller M, Gerdes AM, Skjott K, Mortensen LS, Pedersen NT: Disrupted p53 function as predictor of treatment failure and poor prognosis in B- and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:1085-1091.
- 23 Pagnano KB, Vassallo J, Lorand-Metze I, Costa FF, Saad ST: p53, Mdm2, and c-Myc overexpression is associated with a poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Hematol* 2001;67:84-92.
- 24 Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Michael LC, Delsol G, Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri AS, Piris MA, Raffkiaer E, Warnke RA: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
- 25 Messori A, Vaiani M, Trippoli S, Rigacci L, Jerkeman M, Longo G: Survival in patients with intermediate or high grade non-Hodgkin's lymphoma: Meta-analysis of randomised studies comparing third generation regimens with CHOP. *Br J Cancer* 2001;84:303-307.
- 26 Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
- 27 Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Muñoz I, Cruz MA, Martinez B, Lopez L, Martinez-Montero JC, Orradre JL, Saez AI, Garcia JF, Piris MA: Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 1998;16:1931-1939.
- 28 Kitamura Y, Ota T, Matusuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Sgimohama S, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Taniguchi T: Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia* 1999;25:154-164.
- 29 Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC: Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: Correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998;91:3379-3389.
- 30 Shoelch ML, LE QT, Silverman S Jr, McMillan A, Dekker Np, Fu KK, Ziober BI, Regezi JA: Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35:77-85.
- 31 Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewski M, Wasenius VM, Niskanen E, Reed JC: Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995;55:4471-4478.
- 32 Krajewski S, Krajewski M, Ehrmann J, Sikorska M, Lach B, Chatten J, Reed JC: Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1 and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol* 1997;150:805-814.
- 33 Meijerink JPP, Mensink EJB, Wang K, Sedlak TW, Sloetjes AW, de Witte T, Waksman G, Korsmeyer SJ: Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 1998;91:2991-2997.
- 34 Gutierrez MI, Quintenilla-Martinez, Hussain L, Raffeld M, Magath I, Bhatia K: Loss of Bax expression is frequently seen in Burkitt's lymphoma biopsies and may result from null mutations in the Bax gene. *Blood* 1998;92:406A.
- 35 Schlaifer D, Krajewski S, Galois S, Rigal-Huguet F, Laurent G, Massip P, Pris J, Delsol G, Reed JC, Brousset P: Immunodeletion of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Pathol* 1996;149:177-185.
- 36 Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CYG, Gascoyne RD, Craig RW: MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 2001;97:3902-3909.
- 37 Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D, Selby P, Linch DC: Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: A British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996;88:1046-1051.
- 38 Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E, Philipo K, Geelen E, van Krieken JHJM, de Jong D, Maartense E, Schuuring E, Kluin PM: Clinical relevance of BCL2, BCL6 and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:3152-3162.