

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**Respostas celulares aos danos causados pelo antitumoral
cisplatina em linhagens de fibroblastos humanos normais
(MRC-5) e astrocítica (U343 MG-a)**

Patricia de Oliveira Carminati

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

**Ribeirão Preto
2005**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RESUMO

Uma variedade de agentes antitumorais é capaz de induzir danos no material genético e estimular respostas como o bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose. A resposta inicial das células é o bloqueio no ciclo em uma tentativa de reparar o dano, no entanto, se esse dano for muito extenso ou comprometer o metabolismo celular, uma cascata de sinalização aciona mecanismos alternativos que inibem a proliferação das células e acionam vias de morte.

Os astrocitomas malignos são os tumores cerebrais mais comuns que afetam o sistema nervoso central, compreendendo mais de 60% dos tumores cerebrais primários. O tratamento padrão é a radioterapia seguida de quimioterapia, no entanto, o prognóstico para pacientes portadores desse tipo de câncer ainda continua desanimador. A cisplatina é um agente genotóxico largamente empregado no tratamento de gliomas, além de outros tipos de câncer. Essa droga liga-se ao DNA, formando aductos, os quais levam a um bloqueio na duplicação e na transcrição, podendo induzir apoptose nas células dependendo da extensão do dano.

No presente trabalho foram avaliadas as respostas celulares ao tratamento com a cisplatina em linhagem de glioma (U343 MG-a) e em fibroblastos normais transformados por SV40 (MRC-5). Foram avaliadas as respostas em termos de sobrevivência celular, indução de apoptose e expressão gênica em larga escala pela técnica de micro-arranjos de cDNA, sendo esta última realizada somente para a linhagem U343.

A cisplatina causou uma redução acentuada na sobrevivência das células MRC-5 (~1%) e U343 (< 1%) após cinco dias de tratamento (teste de sobrevivência celular) com concentrações que variavam de 12,5 a 300 μM . O tratamento por 24 h com iguais concentrações de cisplatina reduziu a sobrevivência das linhagens em cerca de 20-80% (teste de citotoxicidade). Ambas as linhagens sofreram apoptose após o tratamento com diversas concentrações de cisplatina (12,5, 25 e 50 μM). A linhagem U343 apresentou uma frequência máxima de apoptose de 20,4% após o tratamento com 25 μM de cisplatina por 72 h, enquanto a linhagem MRC-5 apresentou 11,0% de apoptose após 50 μM de cisplatina por 48 h.

Os dados de expressão gênica analisados pelo método de micro-arranjos de cDNA, obtidos 48 h após o tratamento das células U343 com 25 μM de cisplatina, mostraram genes significativamente ($p \leq 0,05$) reprimidos relacionados principalmente com alterações no citoesqueleto (*TBCD*, *RHOA*, *LIMK2* e *MARK1*), apoptose ou sobrevivência celular (*BCL2-XL*, *ING1*, *RHOA*, *VDP*, *TIMP2*, *DYRK3* e *NFKBIE*), invasão celular ou metástase (*LIMK2*, *TIMP2* e *CALU*), reparo de DNA (*SMC1L1*) e metabolismo celular (*DYRK3*, *MARK1*, *TBCD*, *LIMK2*, *VDP* e *P4HB*), entre outros

processos. Esses dados apontam para um sério comprometimento da maquinaria celular como um todo após os danos induzidos pela cisplatina. Embora o mecanismo de apoptose justifique cerca de 20% da extensão de morte celular, conforme foi comprovado nos ensaios de apoptose (induzida por 25 μM de cisplatina), a maior parte das células são eliminadas em consequência da ação da droga em vários níveis do metabolismo e manutenção da integridade celular, visto o elevado grau de citotoxicidade da cisplatina, demonstrado nos testes de sobrevivência.

SUMMARY

A variety of antitumoral agents is capable of inducing DNA damage and eliciting cell cycle arrest, DNA repair or apoptotic responses. The initial response is a cell cycle arrest in an attempt to repair the DNA damage, but under conditions of extensive DNA lesions and high drug cytotoxicity, a signaling cascade triggers alternative mechanisms that inhibit cell proliferation and activate cell death pathways.

Astrocytomas are the most common neoplasm of the central nervous system, comprising more than 60% of primary brain tumors. The standard treatment for these tumors are radiotherapy followed by chemotherapy, however, the prognosis for these patients is still very discouraging. Cisplatin is an efficient DNA-damaging antitumor agent employed for the treatment of various human cancers, including gliomas. This drug binds to DNA, producing diverse types of adducts, which can block replication, transcription, and lead to apoptosis induction.

In the present work, we analyzed cellular responses to treatments with the anticancer agent cisplatin in MRC-5 (normal human fibroblasts SV40 transformed) and U343 MG-a (glioma cell line). The responses were evaluated in terms of cell survival, apoptosis induction and profiles of gene expression by the cDNA microarrays method (only for U343 cell line).

Cisplatin treatment resulted in a pronounced reduction in MRC-5 cell survival (~1%) and U343 (< 1%) after five days of treatment (cell survival test) with several concentrations of cisplatin, ranging from 12.5 to 300 μM . Following 24h of treatment under similar cisplatin concentrations the survival was reduced at about 20-80% (cytotoxicity test). Both cell lines underwent apoptosis after treatment with different concentrations of cisplatin (12.5; 25 and 50 μM), but U343 cells presented a maximal frequency of 20.4% apoptosis (25 μM cisplatin treatment for 72h), while MRC-5 cells presented 11.0% (50 μM cisplatin treatment for 48h).

Analysis of gene expression performed for U343 cells treated with 25 μM cisplatin for 48h showed several genes that were found significantly ($p \leq 0,05$) down-regulated, most of them related with cytoskeleton alterations (*TBCD*, *RHOA*, *LIMK2*

and *MARK1*), apoptosis or cell survival (*BCL2-XL*, *ING1*, *RHOA*, *VDP*, *TIMP2*, *DYRK3* and *NFKBIE*), cell invasion or metastasis (*LIMK2*, *TIMP2* and *CALU*), DNA repair (*SMC1L1*), and cell metabolism (*DYRK3*, *MARK1*, *TBCD*, *LIMK2*, *VDP* and *P4HB*), among others. As a whole, these data demonstrate a serious commitment of the cell machinery after cisplatin-induced cellular damage. About 20% of the cell death corresponds to apoptosis, as was showed by the present assays. However, most of the cells are eliminated by the action of the drug in various levels of the metabolism and maintenance of cell integrity, due to the elevated degree of cisplatin cytotoxicity, as demonstrated in cell survival tests.

INTRODUÇÃO

O ciclo celular é tipicamente dividido em quatro fases. Os períodos associados com a duplicação do DNA (fase S) e mitose (fase M) são separados por intervalos de duração variada, chamados G1 e G2, respectivamente. A progressão das células no ciclo é mediada por uma classe de proteínas regulatórias conhecidas como proteínas quinases dependente de ciclina (Cdks), que são compostas de uma subunidade catalítica sem atividade intrínseca e uma subunidade regulatória que se liga à ciclina. Os complexos ciclina/Cdks constituem assim os principais reguladores do ciclo celular, com cada complexo controlando uma transição específica entre as fases subsequentes do ciclo (Hengstschlager *et al.*, 1999; Smits e Medema, 2001).

O controle do ciclo celular, denominado *checkpoint*, representa um mecanismo de “vigilância” cujo papel chave é o de evitar o acúmulo de erros genéticos durante as divisões celulares, dessa forma protegendo a integridade genômica das células (Bartek *et al.*, 1999). Para garantir a fidelidade da duplicação, os *checkpoints* desempenham pelo menos quatro tarefas: induzem rapidamente um retardo no ciclo celular; ajudam a ativar o reparo do DNA; mantém o ciclo celular bloqueado até que o reparo seja completado e reiniciam a progressão do ciclo (Bartek e Lukas, 2001).

O controle negativo na progressão do ciclo celular é exercido durante o desenvolvimento, diferenciação, senescência e morte das células, podendo apresentar uma importante função em impedir a tumorigênese. Em muitos casos, o bloqueio da proliferação celular é requerido em circunstâncias nas quais a integridade do genoma foi comprometida, sendo que uma falha nesse mecanismo poderia perpetuar células com genomas altamente instáveis, as quais poderiam evoluir para um fenótipo maligno (Hartwell e Kastan, 1994). Assim, falhas nos mecanismos de controle do ciclo levam ao acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas, o que conseqüentemente aumenta a probabilidade de malformações durante o desenvolvimento e doenças somáticas, incluindo-se o câncer (Bartek e Lukas, 2001).

As células cancerosas diferem das células normais em muitas características como perda de diferenciação, aumento da capacidade de invasão e diminuição da sensibilidade a drogas. Alterações cromossômicas, tais como perda ou ganho de cromossomos inteiros, mudanças na ploidia, além de uma variedade de aberrações cromossômicas e estruturais, também são eventos comuns em células cancerosas (Hartwell e Kastan, 1994).

Os tumores do sistema nervoso central incluem um número de neoplasmas únicos e de tratamento freqüentemente difícil (Ranuncolo *et al.*, 2004). Os tumores cerebrais contribuem com aproximadamente 2% dos casos de mortalidade por câncer em homens e 1,4% da mortalidade em mulheres e, entre a faixa etária de 15 a 34

anos, eles são considerados a terceira causa mais comum de morte devida ao câncer (Osborne *et al.*, 2001). A incidência de tumores cerebrais geralmente tende a ser maior em países desenvolvidos. Na Europa ocidental, América do Norte e Austrália, há aproximadamente 6-11 novos casos de tumores intracraniais primários por 100.000 pessoas por ano em homens e 4-11 novos casos em mulheres (Figura 1) (Ohgaki, 2005).

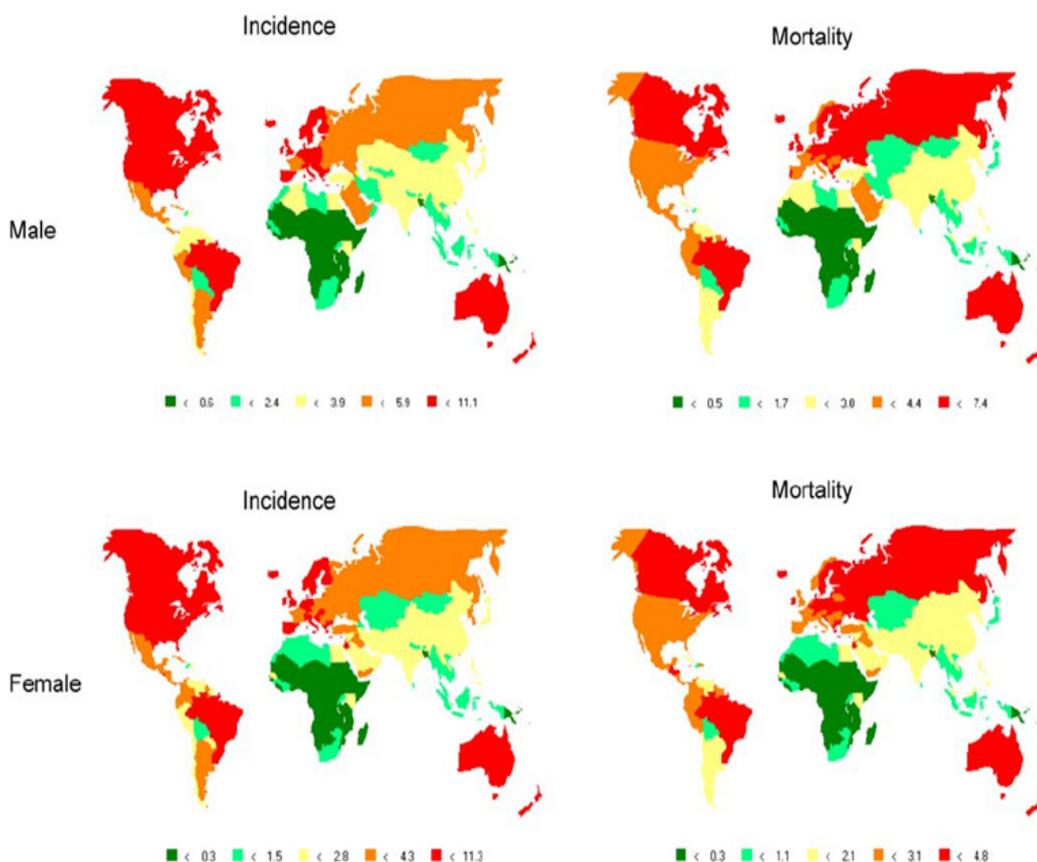


Figura 1: Taxas de mortalidade e incidência global de tumores do sistema nervoso central, ajustada para a população padrão mundial (todas as idades; por 100.000 pessoas por ano). As taxas tendem a ser mais altas em países altamente desenvolvidos. De acordo com Ohgaki (2005).

Os gliomas malignos são agressivos, altamente invasivos e neurologicamente destrutivos, sendo considerados os mais fatais entre as neoplasias humanas (Maher *et al.*, 2001). O tratamento padrão para esses tumores consiste em cirurgia seguida por radioterapia. Os gliomas malignos são muito difíceis de serem erradicados devido à capacidade de se infiltrarem difusamente no parênquima cerebral normal, sendo que a morbidade e mortalidade pós-cirúrgica são altas. A radioterapia após a cirurgia acrescenta cerca de 4 a 5 meses à média de sobrevivência dos pacientes. Quando usada como terapia adjuvante após a cirurgia e a radioterapia, a quimioterapia

prolonga o tempo de progressão da doença e a média de sobrevivência, embora muitas drogas quimioterápicas não induzam respostas satisfatórias nesses casos (Brandes *et al.*, 2000; Gaya *et al.*, 2002).

O atual critério usado pela Organização Mundial de Saúde para classificar os gliomas astrocíticos baseia-se na presença de um núcleo atípico, mitoses, proliferação endotelial e necrose, sem enfatizar, no entanto, qualquer característica em particular. De acordo com esse sistema, astrocitomas com uma dessas características são classificados em astrocitoma de baixo grau (grau II); aqueles com duas características são considerados astrocitomas anaplásicos (grau III) e aqueles com três ou quatro características são chamados de glioblastoma multiforme (grau IV); o grau I é reservado para variantes histológicas especiais de astrocitomas com excelente prognóstico (Smith e Jenkins, 2000; Ranuncolo *et al.*, 2004).

Esses tumores também podem ser separados em duas categorias principais: (a) o grupo de tumores difusamente infiltrantes mais comuns (astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma) e (b) o grupo de neoplasmas astrocíticos menos comuns (astrocitoma pilocítico e xantastrocitoma pleomórfico). Tumores do último grupo tipicamente ocorrem em crianças e adultos jovens, crescem lentamente, possuem um potencial limitado para progressão maligna e podem ser curados pela remoção cirúrgica na maioria dos pacientes. Em contraste, os tumores astrocíticos difusamente infiltrantes preferencialmente se manifestam em adultos, possuem uma tendência para recorrência local e progressão maligna e geralmente não podem ser curados por cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia (Reifenberger e Collins, 2004).

As diferenças nas características genéticas e quanto ao comportamento clínico são também refletidas em distintos padrões de aberrações genéticas. As características histológicas são importantes, pois a classificação e graduação dos tumores astrocíticos, as quais são as principais determinantes do tratamento e prognóstico dos pacientes, são ainda baseadas primariamente em uma avaliação completa de características histológicas e não somente em parâmetros moleculares (Reifenberger e Collins, 2004).

Os astrocitomas malignos são os tumores cerebrais mais comuns que afetam o sistema nervoso central, compreendendo mais de 60% dos tumores cerebrais primários (Iwadate *et al.*, 1996; Kunwar *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002). É provável que estes se desenvolvam como resultado de um acúmulo de alterações genéticas específicas que promovem a proliferação e transformação maligna dos astrócitos (Huang *et al.*, 2002). A mutação no gene *TP53* está entre os primeiros e mais frequentes eventos no desenvolvimento de glioma astrocítico, ocorrendo em aproximadamente 40% de astrocitomas de baixo grau e astrocitomas anaplásicos (Smith e Jenkins, 2000).

Muitas alterações genéticas comuns ao nível cromossômico foram identificadas em tumores obtidos de casos de glioma esporádico: perda dos cromossomos 17p (incluindo o *TP53*), 13q, 9p, 19, 10, 22q e ampliações dos cromossomos 7 e 12q. Essas alterações levam a mudanças na expressão de diversos genes: *IFN*; *PTEN*; *DCC*; *EGFR*; *PDGFR*; *MDM2*; *GLI*; *CDK4* e *SAS* (Osborne *et al.*, 2001).

Os tumores cerebrais frequentemente mostram uma ativação de vias relacionadas a fatores de crescimento que contribuem para a agressividade destes tumores. Moléculas de sinalização envolvidas na gliomagênese incluem o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e RAS. A maioria dos gliomas, tanto de baixo quanto de alto grau, apresentam uma expressão anormal de PDGF e PDGFR como um evento inicial na tumorigênese, o que promove a estimulação da angiogênese e migração e a indução de proliferação das células epiteliais. A super-expressão, amplificação e ativação de mutações do *EGFR* ocorrem em 40-50% dos glioblastoma multiforme, levando a uma cascata *downstream* que envolve a ativação do gene *RAS* (Lonardi *et al.*, 2005) (Figura 2).

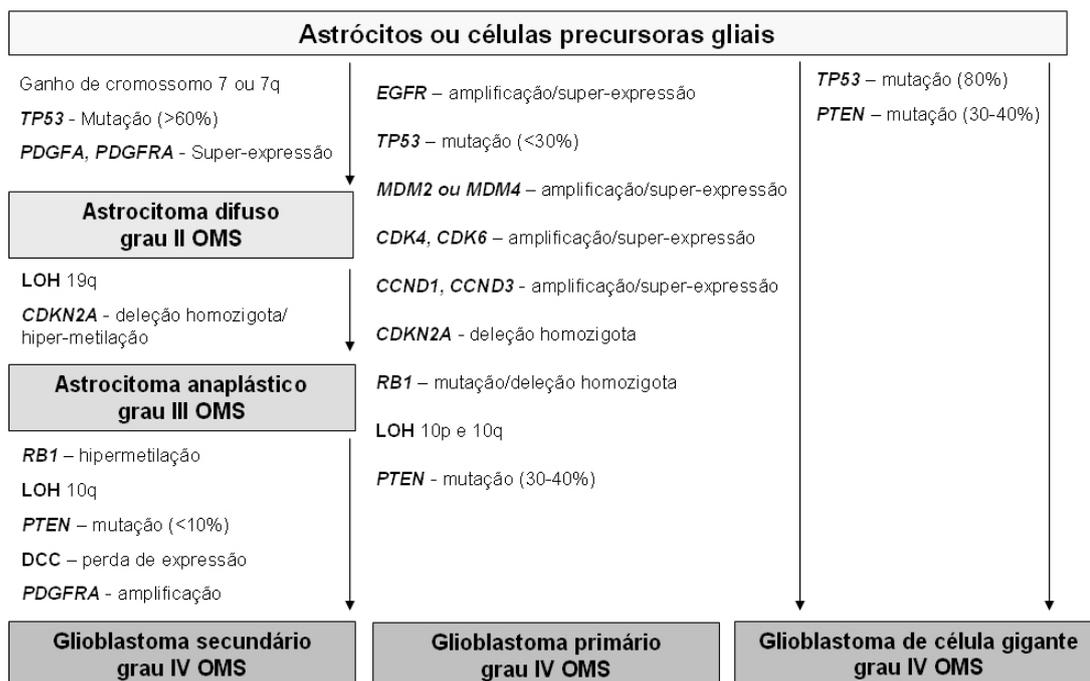


Figura 2: Representação esquemática das aberrações cromossômicas e genéticas típicas associadas aos gliomas astrocíticos. Modificado de Reifenberger e Collins (2004).

Outra molécula envolvida no desenvolvimento e progressão de gliomas é a p16INK4a, codificada pelo gene supressor de tumor *CDKN2A*. Esse gene encontra-se mutado em uma grande porcentagem dos astrocitomas (Konopka e Bonni, 2003; Ohgaki, 2005). O produto do gene *CDKN2A* é capaz de regular o *checkpoint* G1/S por inibir o complexo Cdk4-ciclina D1 e então impedindo a fosforilação da proteína RB (retinoblastoma) (Ranuncolo *et al.*, 2004).

Apoptose

A integridade do DNA genômico está constantemente sob ameaça, mesmo em células perfeitamente saudáveis. Os danos no DNA podem resultar da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de erros estocásticos na duplicação ou recombinação, bem como de genotoxinas ambientais ou terapêuticas. Enquanto os organismos unicelulares respondem à presença de lesões no DNA ativando mecanismos de *checkpoints* e reparo, os organismos multicelulares têm a possibilidade adicional (ou alternativa) de eliminar as células danificadas por meio da ativação de mecanismos de morte celular programada (Norbury e Zhivotovsky, 2004).

A morte celular está envolvida no ciclo normal de desenvolvimento e maturação das células, sendo componente de muitas respostas dos tecidos vivos a agentes xenobióticos (por exemplo, agentes químicos) e a modulações endógenas, como inflamação e distúrbios com o suprimento sanguíneo, também apresentando um papel fundamental no desenvolvimento, prevenção e terapia do câncer (Kanduc *et al.*, 2002).

O termo apoptose, definido como um tipo controlado de morte celular que pode ser induzida por uma variedade de agentes, foi primeiramente introduzido por Kerr *et al.* (1972). A apoptose é uma forma típica de morte celular programada que desempenha um importante papel durante o desenvolvimento, a homeostase e em muitas doenças, como o câncer, AIDS e desordens neurodegenerativas. As características da apoptose compreendem a condensação e fragmentação da cromatina, acompanhadas pela compactação das organelas celulares, dilatação do retículo endoplasmático e uma redução no volume celular. Esse processo resulta na formação dos corpos apoptóticos que rapidamente são fagocitados e digeridos por macrófagos ou pelas células vizinhas (Bohm e Schild, 2003). Durante os estágios iniciais da apoptose, a assimetria fosfolipídica da membrana celular é alterada, resultando no deslocamento da fosfatidil-serina para a superfície celular. Durante a apoptose, o DNA é cortado por endonucleases em sítios entre os nucleossomos (fragmentação inter-nucleossômica), gerando vários multímeros de unidades nucleossomais de DNA (Ziegler e Groscurth, 2004).

A manutenção do balanço entre proliferação e morte celular é de fundamental importância para a função celular normal, e uma perturbação neste balanço é a causa primária de tumores (Johnstone *et al.*, 2002). Durante o desenvolvimento, as células normais sofrem diferenciação terminal e finalmente morrem por apoptose. Em contraste, as células tumorais falham em completar a diferenciação ou readquirem a capacidade para reverter o programa de diferenciação e entrar novamente no ciclo celular. Desta maneira as células tumorais escapam da apoptose e podem sobreviver em um ambiente hostil sob condições nas quais fatores de crescimento e oxigênio são limitados. O desenvolvimento do tumor também é facilitado por defeitos no programa apoptótico, tais como ativação de fatores anti-apoptóticos e/ou inativação de fatores que promovem a sobrevivência celular. Defeitos no programa de morte e mecanismos anti-apoptóticos podem render às células vantagens de crescimento seletivo que favorecem tumores mais agressivos e resistentes à quimioterapia (Persengiev e Green, 2003).

Alterações nos mecanismos que levam à apoptose permitem que as células neoplásicas vivam além de seu tempo de vida normal, acumulando mutações genéticas, mantendo o crescimento sob condições de hipóxia e estresse oxidativo e promovendo angiogênese tumoral (Yu e Zhang, 2004). Portanto, torna-se claro que a resistência celular aos sinais apoptóticos constitui um passo importante no processo de carcinogênese. Além disso, defeitos na apoptose afetam o resultado da terapia, desde que alguns agentes usados no tratamento do câncer, tais como a cisplatina e a radiação ionizante, utilizam vias apoptóticas para a indução de morte nas células (Johnstone *et al.*, 2002; Al-Mohanna *et al.*, 2004), pelo menos parcialmente.

Um outro tipo de morte celular é a necrose, que difere do processo de apoptose pelo fato de que as células incham e se rompem, liberando o material citoplasmático e atraindo linfócitos, o que freqüentemente desenvolve uma resposta inflamatória. Sabe-se que o processo de necrose é causado por injúria resultando na morte de grupos de células em um tecido, contrastando com a apoptose que resulta em morte de células individuais (Zimmermann e Green, 2001); (Ziegler e Groscurth, 2004).

Embora a compreensão das vias de sinalização que acionam a apoptose seja incompleta, este processo é controlado por um número de proteínas complexas, as quais são ativadas por vários alvos e arranjadas em módulos de sinalização seqüencial. A apoptose ocorre por meio de duas vias principais. A primeira, referida como via extrínseca ou citoplasmática, é acionada através do receptor de morte Fas, um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral. A segunda é a via intrínseca ou mitocondrial que, quando estimulada, leva à liberação do citocromo c da mitocôndria e ativação do sinal de morte. A via intrínseca é acionada por vários

estresses extra e intracelular, tais como supressão de fatores de crescimento, hipóxia e danos no DNA. Os sinais que são transduzidos em resposta a esses estresses convergem principalmente para a mitocôndria. Uma série de eventos bioquímicos é induzida resultando na permeabilização da membrana mitocondrial externa, a liberação do citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas, como SMAC/DIABLO, a formação de um apoptossomo (um grande complexo protéico que contém citocromo c, fator ativador de proteases apoptóticas (APAF1) e caspase 9) e ativação de outras caspases (Okada e Mak, 2004; Bohm e Schild, 2003; Ghobrial *et al.*, 2005).

A via final que leva à execução do sinal de morte é a ativação de uma série de caspases. Tanto a via intrínseca quanto a extrínseca convergem para a ativação da caspase 3. As caspases *downstream* induzem a clivagem de proteínas quinase, proteínas do citoesqueleto, proteínas de reparo do DNA e subunidades de endonucleases inibitórias. As caspases também afetam a estrutura do citoesqueleto, regulação do ciclo celular e vias de sinalização, que por fim levam à manifestação morfológica da apoptose, tais como a condensação, a fragmentação do DNA e vesiculação da membrana (Ghobrial *et al.*, 2005).

Um dos mais importantes reguladores da via intrínseca é a família de proteínas BCL-2, a qual inclui membros pró-apoptóticos (BAX, BAK, BAD, BCL-XS, BID, BIK, BIM e HRK) e anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BFL1 e MCL-1). Os membros anti-apoptóticos agem como repressores da apoptose, bloqueando a liberação de citocromo c, enquanto os membros pró-apoptóticos atuam como promotores. Esses efeitos parecem ser dependentes do balanço entre BCL-2 e BAX, e não devidos ao BCL-2 apenas (Ghobrial *et al.*, 2005).

Agente antitumoral Cisplatina

O potencial de compostos de platina como agentes antitumorais foi primeiramente reconhecido após a demonstração da sua capacidade de inibição da divisão bacteriana. Investigações subseqüentes identificaram a cisplatina como composto ativo e uma década de estudos clínicos levaram à sua aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1978 (revisado em Cohen e Lippard, 2001).

A cis-diclorodiaminoplatina (CDDP) ou cisplatina é um agente genotóxico largamente empregado no tratamento do câncer. A quimioterapia baseada em cisplatina mostrou-se efetiva contra câncer de testículo, ovário, esôfago, carcinoma de bexiga, mama, cabeça, pescoço e pulmão (Kartalou e Essigmann, 2001; Chaney *et al.*, 2004; Brabec e Kasparkova, 2005; Kim *et al.*, 2005; Wang e Lippard, 2005) sendo também utilizada para o tratamento de gliomas (Poppenborg *et al.*, 1999; Diaz *et al.*, 2005). Essa droga liga-se ao DNA, formando aductos intra e intercadeias, o que causa alterações na topologia do dúplice de DNA e atrai grupos de alta mobilidade e outras

proteínas (Jordan e Carmo-Fonseca, 2000). O DNA é o alvo principal da cisplatina, muito embora somente 1% da cisplatina intracelular reaja com o DNA nuclear (Mandic *et al.*, 2003; Wang e Lippard, 2005).

O mecanismo pelo qual a cisplatina alcança o interior das células não é bem conhecido. O composto é uma molécula polar e não atravessa a membrana facilmente. Foi proposto que aproximadamente 50% da taxa inicial de entrada da droga na célula seja devido à difusão passiva através da membrana celular e que 50% de droga remanescente resulta da difusão facilitada por meio de um canal na membrana celular (Sedletska *et al.*, 2005).

A cisplatina forma uma variedade de aductos no DNA, sendo o mais predominante (>90%) o *crosslink* 1,2-intracadeia. Neste aducto, o átomo de platina está ligado covalentemente à posição N7 das bases purinas adjacentes (Zamble e Lippard, 1995; Wozniak e Blasiak, 2002; Fuertes *et al.*, 2003) (Figura 3).

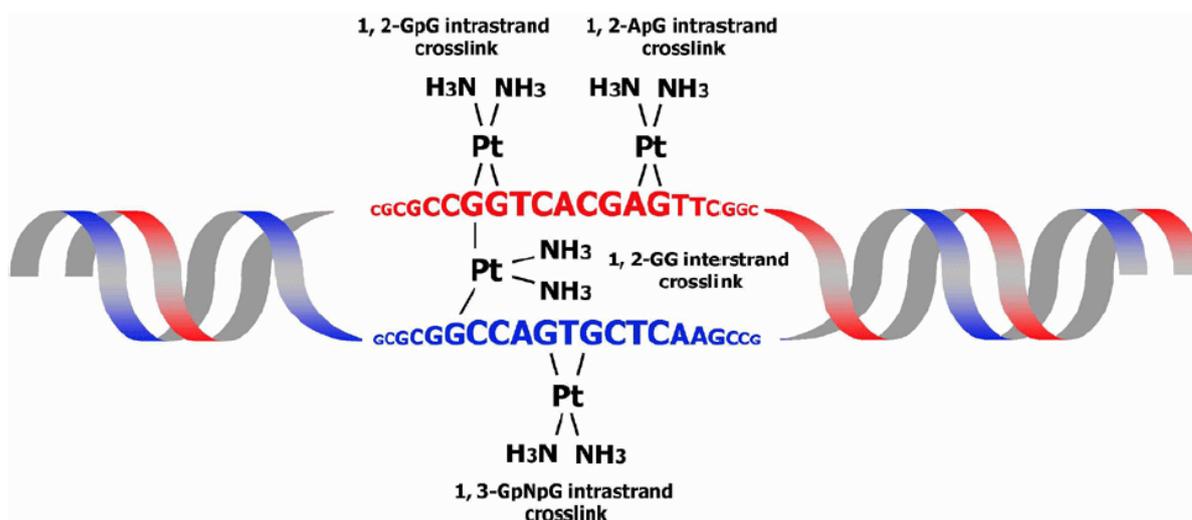


Figura 3: Representação esquemática dos tipos de aductos de cisplatina-DNA. Os aductos 1,2-d(GpG) e d(ApG) intracadeia são os principais *crosslinks* causados pela cisplatina (85-90% das lesões totais). Em menor frequência está o *crosslink* 1,3-d(GpNpG) intracadeia. De acordo com Torigoe *et al.*, 2005.

O alvo para os compostos antitumorais de platina é o DNA, ao qual eles se ligam eficientemente formando uma variedade de aductos, os quais bloqueiam a duplicação e a transcrição e induzem morte celular. A natureza dos aductos afeta um número de vias de transdução e induzem a apoptose ou necrose nas células tumorais (Fuertes *et al.*, 2003). Juntamente aos fatores que não operam diretamente ao nível dos aductos no DNA, estes têm um importante papel na atividade biológica dos complexos de platina, incluindo-se a sua citotoxicidade e processos relacionados à resistência das células tumorais (Brabec e Kasparkova, 2005). O tratamento com a

cisplatina induz não somente estresses que causam danos no DNA, mas também estresse oxidativo e no retículo endoplasmático (Torigoe *et al.*, 2005).

O uso clínico da cisplatina está limitado pelo seu efeito tóxico e pelo desenvolvimento de resistência (Sedletska *et al.*, 2005; Wang e Lippard, 2005). Existem muitos mecanismos envolvidos na resistência à cisplatina, como a absorção reduzida da droga, aumento dos níveis celulares de tiol/folato e aumento da taxa de reparo do DNA, assim como elevação do conteúdo da glutathione ou da atividade da glutathione-S-transferase, elevação da metalotioneína e variação nas atividades de reparo de DNA. Esses mecanismos celulares contribuem para modular a interação droga-alvo e a sensibilidade à droga (Sedletska *et al.*, 2005).

O reparo do DNA é considerado um importante mecanismo de resistência para a quimioterapia baseada em cisplatina. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER: *nucleotide excision repair*) é uma via vital na remoção dos aductos cisplatina-DNA e no reparo do dano no DNA e, dessa forma, esse sistema de reparo constitui o principal mecanismo de defesa celular contra os efeitos tóxicos da cisplatina e um dos principais fatores que contribuem para a resistência tumoral à droga (Brabec e Kasparkova, 2005; Torigoe *et al.*, 2005). Defeitos celulares no NER resultaram em hipersensibilidade à cisplatina (Cohen e Lippard, 2001; Siddik, 2003), sendo relatado que proteínas relacionadas ao NER, como ERCC1 e XPA, foram super-expressadas em tumores de ovário resistente à cisplatina (Torigoe *et al.*, 2005).

Em células humanas, o NER envolve o reconhecimento do dano pela XPA em complexo com a proteína RPA e a excisão da lesão ocorre por ação de endonucleases específicas, XPG no sítio 3' da lesão e ERCC1/XPF no sítio 5'. O *gap* resultante é preenchido por uma maquinaria de síntese consistindo de PCNA, fator de replicação C, RPA, DNA polimerase δ/ϵ e DNA ligase I (Wozniak e Blasiak, 2002; Christmann *et al.*, 2003; Tremeau-Bravard *et al.*, 2004). O NER consiste em dois sub-mecanismos sobrepostos: reparo genômico global (GGR), que é capaz de reparar lesões na fita não transcrita de genes ativos e no genoma não transcrito, e reparo acoplado à transcrição (TCR). Este remove lesões que bloqueiam a transcrição (Hanawalt, 2001; Tremeau-Bravard *et al.*, 2004). Furuta *et al.* (2002) demonstraram a importância do TCR para a resposta celular aos danos causados pela cisplatina, os quais representam um forte impedimento para a progressão da RNA polimerase II.

Há evidências de que mecanismos celulares adicionais de reparo podem afetar a eficácia antitumoral da cisplatina (Beljanski *et al.*, 2004). O reparo homólogo (HR) e síntese translesão (TLS) proporcionam rotas pelas quais as células podem continuar a duplicação, a despeito da presença de aductos bloqueando a forquilha de duplicação (Doetsch *et al.*, 2001). HR e TLS são freqüentemente considerados como vias de tolerância, pois permitem às células completarem a duplicação e a mitose ao custo de mutações e freqüências de recombinação aumentadas.

Sabe-se que a ação genotóxica da cisplatina requer também a atividade de reparo do DNA tipo *mismatch*, um sistema de reparo pós-duplicação que corrige nucleotídeos não pareados ou pareados de forma errada (Yamada *et al.*, 1997; Jordan e Carmo-Fonseca, 2000). O papel primário do MMR (*mismatch repair*) é a correção de erros gerados na duplicação do DNA, supressão da recombinação, interação com outros sistemas de reparo, regulação dos *checkpoints* e apoptose. O *status* do MMR de uma célula pode influenciar a sua resposta a uma grande variedade de agentes quimioterápicos. Recentes observações suportam a visão de que o MMR media a citotoxicidade da cisplatina em células tumorais e que a disfunção deste tipo de reparo pode resultar na resistência ou tolerância à cisplatina (Papouli *et al.*, 2004). A ligação do complexo MMR aos aductos de cisplatina parece aumentar a citotoxicidade desses aductos, tanto por ativar vias de sinalização *downstream* que levam à apoptose ou por causar um ciclo de tentativas frustradas de reparo durante a síntese translesão dos aductos cisplatina-DNA (Brabec e Kasparkova, 2005).

Foi descoberto que proteínas do domínio HMG (*high mobility group*) poderiam se ligar com alta afinidade ao *crosslink* 1,2 intracadeia e que este reconhecimento do dano por parte das proteínas HMG poderia provocar um efeito observável nas células tratadas com a cisplatina e, portanto, essas proteínas poderiam mediar a genotoxicidade dessa droga (revisado em Cohen e Lippard, 2001). Uma outra possível via pela qual a cisplatina poderia causar genotoxicidade é por meio do *repair shielding*. Os aductos de cisplatina são removidos primariamente por enzimas do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Quando as proteínas do domínio HMG, como HMG1, se ligam às lesões causadas pela cisplatina, o NER pode ser bloqueado, permitindo a persistência do dano. Os aductos cisplatina-DNA resultantes bloqueiam a duplicação e transcrição (Cohen e Lippard, 2001).

Outro mecanismo pelo qual a cisplatina pode danificar as células é por meio do seqüestro de fatores nucleares essenciais para as funções celulares. A ligação de tais fatores ao DNA modificado pela cisplatina desvia os mesmos de seus sítios naturais, impedindo essas proteínas de realizarem as suas funções críticas (Cohen e Lippard, 2001; Chaney *et al.*, 2004).

Apesar de todas essas informações a respeito dos mecanismos de ação da cisplatina, os mecanismos de processamento das lesões induzidas pela droga (envolvendo principalmente o controle do ciclo celular, indução de apoptose e reparo do DNA) ainda não são compreendidos, sendo importante a elucidação destes, visando obter dados que sejam relevantes no sentido de tornar as estratégias terapêuticas mais eficientes.

OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente trabalho consistem em avaliar as repostas celulares aos tratamentos com o agente antitumoral cisplatina em células de glioma. Tais respostas podem ser analisadas em termos de sobrevivência celular, indução de apoptose e expressão gênica em larga escala, utilizando-se a técnica de micro-arranjos de cDNA.

Os objetivos específicos são:

- 1- Realizar testes de citotoxicidade e sobrevivência celular após o tratamento das linhagens U343 MG-a (glioma) e MRC-5 (fibroblastos humanos normais transformados por SV40) com concentrações variadas de cisplatina (12,5 a 300 μ M).
- 2- Estudar a indução de apoptose pela cisplatina nas linhagens MRC-5 e U343 MG-a.
- 3- Analisar os perfis de expressão gênica em larga escala apresentados pela linhagem U343 MG-a após o tratamento com a cisplatina.

MATERIAL E MÉTODOS

Sistemas celulares

Foram utilizadas no presente trabalho as seguintes linhagens celulares:

Linhagem de fibroblastos humanos transformados por SV-40: MRC-5 (células normais), cedida pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck (ICB-USP, São Paulo, SP).

Linhagem de astrocitoma maligno: U343 MG-a gentilmente cedida pelo Prof. James T. Rutka (The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Centre, Canadá) e repassada pelo Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior (Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas-FMRP-USP).

Agente antitumoral

Cisdiclorodiaminoplatina (*Sigma*)

A cisplatina, um agente alquilante com atividade antineoplásica, apresenta a seguinte fórmula molecular: $Pt(NH_3)_2 Cl_2$.

Cultivo celular

As linhagens celulares foram estocadas em nitrogênio líquido (-195 °C) em alíquotas de 1×10^6 células/ml em uma solução de congelamento (50% meio de cultura, 40% soro bovino fetal e 10% DMSO). Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de cultura de 25 cm² (*Corning*) com 10 ml de meio de cultura (DEM + F10 - *Sigma*) suplementado com 15% de soro bovino fetal (*Cultilab*) e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂, até atingirem o estado de confluência ($\sim 5 \times 10^6$ células) quando necessitam de sub-cultivo.

Tratamento com o antitumoral cisplatina

Todos os experimentos para o presente trabalho foram realizados com as células cultivadas entre a quinta e a décima passagem após o descongelamento das mesmas.

O tratamento com a cisplatina foi realizado da seguinte maneira: primeiramente as células sofreram sub-cultivo, sendo semeadas em vários frascos de cultivo (*Corning*) para o tratamento. Aproximadamente 24 h após, essas células foram tratadas com a cisplatina (previamente diluída em água destilada estéril) sendo que a

droga permaneceu no meio de cultura até a colheita. As culturas, mantidas em estufa a 37°C, foram colhidas em tempos variáveis após o tratamento (24, 48 e 72 h), sendo posteriormente processadas as análises de sobrevivência e morte celular (apoptose). Para a análise da expressão gênica, as células foram colhidas após 48 h de tratamento com a cisplatina.

Teste de citotoxicidade e sobrevivência celular

Para a realização destes experimentos foi utilizado o *Cell Proliferation Kit II (XTT)* da Roche. O princípio da técnica é baseado na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas formando um corante formazam alaranjado. Dessa forma, essa conversão somente ocorre nas células viáveis. Portanto, esse experimento tem a finalidade de determinar a quantidade de células sobreviventes após o tratamento com várias concentrações de cisplatina.

As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (*Corning*). O tratamento com as diversas concentrações de cisplatina (12,5; 25; 50; 75; 150 e 300 µM) foi realizado 24 h após essa semeadura. Foram semeadas quantidades diferentes de células de acordo com o tipo de teste a ser realizado.

Para o teste de citotoxicidade, após o tratamento com a cisplatina, as células foram incubadas com o Kit XTT por no mínimo 45 minutos. Após esse período de incubação, a solução de formazam alaranjado é formada, a qual é quantificada no espectrofotômetro (*Amersham*). O resultado da absorbância, medida em 492 e 690 nm, é proporcional ao número de células viáveis na amostra.

No caso do teste de sobrevivência celular, as células previamente tratadas com a cisplatina foram incubadas em estufa a 37 °C durante cinco dias. Após esse período, procedeu-se à incubação com o Kit XTT da mesma maneira relatada para o teste de citotoxicidade.

Detecção morfológica de células apoptóticas empregando diferentes corantes

As células apoptóticas foram reconhecidas pela aparição de cromatina nuclear condensada e núcleo fragmentado. Para a visualização dessas características nas células apoptóticas, três corantes fluorescentes foram empregados: o Hoechst 33342, Iodeto de propídeo (PI) e Diacetato de fluoresceína (DAF) (*Sigma*). Hoechst 33342 é um corante fluorescente usado para corar DNA em células viáveis. Devido ao fato de que o PI pode somente penetrar em células com uma membrana celular rompida, este agente pode ser utilizado como um corante de DNA e concomitantemente para determinar a integridade da membrana celular. DAF é utilizado como um marcador da

viabilidade celular, e ele se acumulará no citoplasma das células que possuem uma membrana intacta.

As células, previamente tripsinizadas, centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em meio de cultura foram simultaneamente incubadas com Hoechst 33342 (10 μ l), PI (25 μ l) e DAF (50 μ l) por 5 minutos a 37° C e visualizadas com microscópio de fluorescência (*Carl Zeiss*) equipado com filtro triplo para DAPI, FITC e Rodamina. Foram analisadas 500 células por lâmina sendo discriminadas as células normais, apoptóticas e necróticas que apresentaram coloração diferenciada, permitindo uma fácil identificação. Os critérios adotados foram:

- 1) Células normais: núcleo íntegro, corado em azul e citoplasma verde;
- 2) Células apoptóticas: núcleo azul com corpos apoptóticos e citoplasma verde;
- 3) Células necróticas: núcleo vermelho íntegro, esférico ou em vesículas, e citoplasma vermelho.

As concentrações de cisplatina utilizadas para este ensaio foram 12,5, 25 e 50 μ M e as células foram colhidas após 24, 48 e 72 h de tratamento. Foram realizados três experimentos para cada linhagem, MRC-5 e U343 MG-a.

Análise Estatística

Para a análise de apoptose, os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade e posteriormente ao teste t. A probabilidade de erro foi fixada abaixo de 0,05 ($p \leq 0,05$).

Extração do RNA total e avaliação das amostras

Para as extrações de RNA total foi utilizado o reagente *Trizol (Invitrogen)* de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro *Genequant II (Amersham)*. Após proceder à quantificação, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose com formaldeído para a avaliação da qualidade do RNA obtido, uma vez que este deve estar em ótimo estado para ser utilizado como sonda complexa nas membranas de micro-arranjos.

Utilizou-se uma concentração de 25 μ M de cisplatina e as células U343 MG-a foram colhidas 48 h após o tratamento, procedendo-se a extração de RNA para a análise de expressão gênica.

Micro-arranjos de cDNA

Preparação das membranas

As membranas contendo os micro-arranjos de DNA foram preparadas pela deposição dos clones usando-se o aparelho *Generation III Microarrays Spotter* (Amersham) em membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham) fixada em lâmina de vidro, sendo depositados 936 pontos únicos em duplicata em cada membrana, consistindo em um total de 1872 pontos arranjados em cada filtro. Dos 936 pontos, 186 são controles de qualidade distribuídos no decorrer da membrana e 750 pontos são clones provenientes da biblioteca humana de cDNAs, validada, provenientes do Consórcio IMAGE.

O tratamento das membranas foi feito um dia após a deposição dos clones, sendo estas colocadas sobre papel *Whatman* umedecido com solução de denaturação preparada a fresco (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram transferidas sobre papel *Whatman* umedecido em solução de neutralização (Tris Hcl pH 7,4 1M NaCl 1,5M) por 20 minutos, sendo posteriormente lavadas em solução 2x SSC, secadas sobre papel de filtro (*Whatman*) e transferidas para forno a 80° C por 2 h. Em seguida, realizou-se o *crosslink* por 1,5 minutos em luz ultra-violeta. As membranas foram estocadas em sacos plásticos à temperatura ambiente.

Hibridação com sonda oligo-vetor

A hibridação com um oligo-vetor tem por finalidade determinar a quantidade exata de DNA retido em cada ponto do micro-arranjo. A sonda oligo-vetor foi marcada utilizando-se 1 µl da solução de oligonucleotídeo (1 µg/ml) com sequência específica para o vetor, 4 µl de tampão 5x, 1 µl da enzima T4 kinase (*Invitrogen, Life Technologies*), 3 µl de γ ³³P ATP (5000 Ci/mM) (*Amersham*) e água estéril q.s.p. 20 µl. A sonda foi incubada por 45 minutos a 37° C. Em seguida, foram acrescentados 80 µl de água estéril e a sonda foi purificada em coluna de sephadex G25. A radioatividade da sonda marcada foi quantificada em leitor de cintilografia líquida (*TriCarb, Packard*), sendo utilizados 200.000 cpm por ml de tampão de hibridação.

Para a pré-hibridação, cada membrana foi transferida para um frasco de hibridação e umedecida em solução de 2x SSC. Em seguida, acrescentaram-se 4 ml de tampão de hibridação (5x SSC, solução Denhardt's 5x, SDS 0,5% pré-aquecido à 65° C) e 100 µg/ml (concentração final) de DNA de esperma de salmão. As membranas foram submetidas à incubação (*overnight*) a 65° C, em forno de hibridação. Após esse período de pré-hibridação, acrescentou-se a sonda e o material

foi incubado por 48 h a 65° C. O passo seguinte após a hibridação foi a lavagem das membranas. Estas foram transferidas para um recipiente contendo solução de SSC 20x e SDS 20% a 68° C, mantidas em banho a 68° C sob agitação por 3 h, sendo a solução trocada a cada uma hora. Após essa lavagem, as membranas são retiradas da solução e colocadas em recipientes com SSC 2x para remoção de quaisquer impurezas, sendo colocadas sobre papel filtro (*Whatman*). Depois de secas, as membranas foram expostas contra uma placa sensível à radiação por 72 h, sendo os sinais de hibridação capturados utilizando-se aparelho leitor de fósforo radioativo incorporado (*Cyclone Storage Phosphor Screen, Packard*).

Hibridação com sonda complexa

Antes da reação de marcação foi realizada uma etapa anterior para eliminar a estrutura secundária do RNA e para saturar os sítios de poli A. Preparou-se um *mix* com 10 µg de g de RNA, 8 µg de dT25, água estéril q.s.p. 12 µl. O material foi incubado a 70° C por 8 minutos e em um gradiente de 70 a 42° C por 30 minutos. Em seguida foi realizada a reação com a transcriptase reversa, onde foram acrescentados ao *mix* (42° C) 1 µl de RNAsin (40 U/ µl-*Promega*), 6 µl de tampão 5x (*BRL*), 2 µl de DDT (0,1M), 0,6 µl de dATG (20 mM), 0,6 µl de dCTP (120 µM), 3 µl de $\alpha^{33}\text{P}$ dCTP (10 µCi/ µl), 1 µl de transcriptase reversa (*Superscript Rnase H free RT, Invitrogen*, 200 U/ µl), 2,8 µl de água estéril. O *mix* foi incubado por 1 h a 42° C em termociclador, sendo acrescentado 1 µl de transcriptase reversa e novamente incubado por 1 hora a 42° C em termociclador.

Para a degradação de mRNA e rRNA acrescentou-se 1 µl de SDS 10%, 1 µl de EDTA 0,5 M, 3 µl NaOH 3M e a sonda foi incubada por 30 minutos a 68° C em banho-maria e 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, acrescentaram-se 10 µl de TRIS 1M, 3 µl de HCl 2N e água estéril q.s.p. 100 µl.

A sonda foi purificada transferindo-se todo o volume da sonda para uma coluna de sephadex G25 que foi centrifugada. O material eluído foi quantificado em cintilografia líquida (*Tricarb, Packard*). Foram acrescentados 2 µg de A80, a sonda foi denaturada por 5 minutos a 100° C. Após isso, acrescentou-se 1 ml de tampão de hibridação pré-aquecido.

Análise da expressão gênica

Após a aquisição das imagens de hibridação em aparelho leitor de fósforo incorporado, os valores numéricos brutos de cada *spot* do micro-arranjo foram obtidos utilizando-se o software BZscan (Rougemont e Hingamp, 2003).

Filtragem, normalização e análise dos dados de micro-arranjos de cDNA

Após a quantificação, realizou-se a filtragem dos dados, a partir dos dados brutos obtidos da hibridação com as sondas complexas. Os procedimentos de filtragem dos dados consistiram em dois passos: o primeiro visava subtrair os valores de *background* dos valores brutos obtidos na hibridação e o segundo, a filtragem de genes em que o valor de hibridação das duplicatas tivesse sofrido um desvio muito grande. No primeiro passo, o *background* foi quantificado em 24 regiões (blocos) diferentes da membrana, sendo calculado o valor médio e o desvio (do *background*) para cada uma delas. Em seguida, o valor do *background* mais 2 vezes o desvio padrão de cada região foi subtraído dos *spots* dessa região. O acréscimo do desvio padrão é utilizado para que não permaneçam resquícios do *background* nos valores de quantificação. No segundo passo, calculou-se a razão entre os valores de hibridação das duplicatas de cada membrana, sendo que os *spots* onde a razão variou mais do que 4 vezes foram eliminados dos passos posteriores de análise.

Adicionalmente, outro teste de qualidade foi realizado. Após o cálculo do valor mediano de expressão de cada gene para os cinco experimentos, os valores de expressão individuais de cada membrana foram comparados aos valores medianos (de todos os experimentos), utilizando o cálculo de correlação de Pearson. Essa comparação visa detectar membranas que possam ter sofrido alterações que comprometam os procedimentos de normalização (ex. manchas, saturação ou desvios na intensidade total de marcação dos elementos da membrana).

A normalização consistiu em dividir todos os valores de um experimento pelo valor mediano de expressão de cada experimento, de tal forma que todos os valores de expressão dos genes das membranas fossem re-distribuídos ao redor de uma mediana de valor 1,0. Assim, as membranas que se encontravam com intensidades de marcação diferentes puderam ser comparadas (normalização global pela intensidade total de marcação, segundo Quackenbush (2002)). Todos os procedimentos de filtragem, comparações por correlação de Pearson e normalização foram realizados em planilhas do programa Excel (Windows).

Após os procedimentos de filtragem e normalização, os dados foram submetidos a duas análises diferentes. Primeiramente, realizou-se o agrupamento dos genes e dos experimentos de acordo com o perfil de expressão com o programa "Cluster 3.0" (<http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>) e "Java Treeview" (<http://genetics.stanford.edu/~alok/TreeView/>). A análise foi feita utilizando o método de clusterização hierárquica pela distância euclidiana, conforme Eisen *et al.* (1998). Após essa análise, os dados também foram submetidos à análise estatística utilizando o programa SAM 2.0 ("Significance Analysis of Microarrays") (Tusher *et al.*, 2001). Nesse caso, os dados foram submetidos a uma análise pareada.

Após as comparações, 35 genes foram diferencialmente expressos, considerando um FDR (*False Discovery Rate*) de 0.046 e *q-values* para os genes com valores menores ou iguais a 0,05.

Nomenclatura dos genes

Devido à dificuldade em traduzir corretamente o nome de todos os genes mencionados nesse trabalho, optou-se por utilizar o nome dos genes em inglês, de acordo com as normas do *Human Genome Organization* (HUGO) (www.hugo-international.org).

RESULTADOS

Citotoxicidade e Sobrevivência Celular

Foram realizados três experimentos independentes com cada uma das linhagens em estudo (MRC-5 e U343 MG-a), usando o *Cell Proliferation Kit II (XTT)* para determinar a citotoxicidade e sobrevivência celular após o tratamento com diversas concentrações (12,5; 25; 50; 75; 150 e 300 μM) do antitumoral cisplatina.

Para o teste de citotoxicidade, as células permaneceram por 24 h em presença da cisplatina, sendo empregado o Kit XTT logo em seguida para a quantificação das células viáveis. Nos experimentos de sobrevivência celular, as células foram tratadas por cinco dias com a cisplatina em placa de cultura.

Após 24 h do tratamento com a cisplatina, observou-se uma grande redução na sobrevivência nas concentrações testadas de 12,5 a 300 μM (Figura 4), assim como uma redução acentuada na sobrevivência celular após cinco dias do tratamento com a cisplatina (Figura 5). Neste teste, uma inibição máxima foi alcançada na concentração de 25 μM . Portanto, foram construídas as curvas de sobrevivência para várias concentrações. Os resultados desses experimentos mostraram que ambas as linhagens sofreram uma grande redução na porcentagem de células viáveis após o tratamento com a cisplatina.

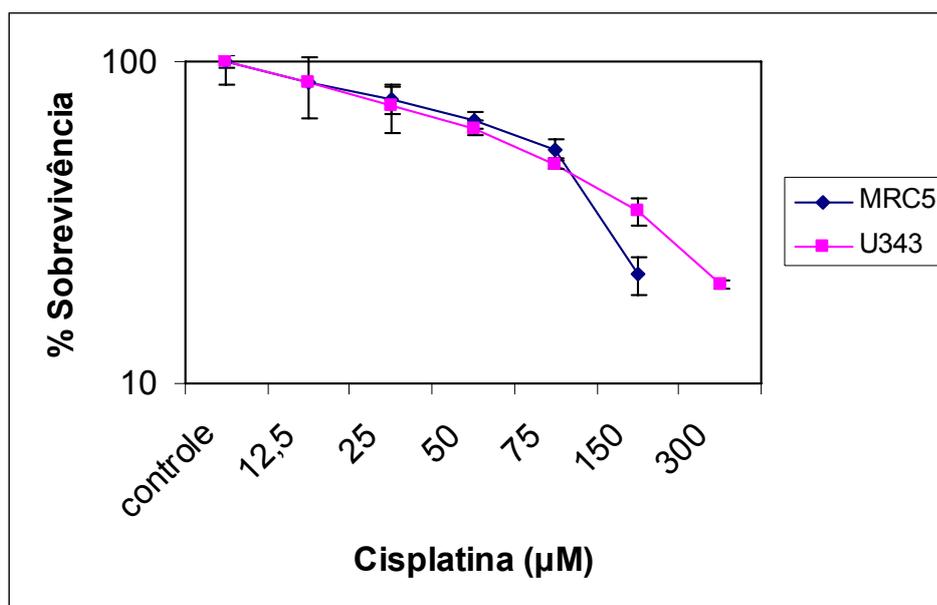


Figura 4: Resposta citotóxica das linhagens MRC-5 e U343 MG-a ao tratamento com várias concentrações de cisplatina (12,5; 25; 50; 75; 150 e 300 µM) nas células colhidas 24h após o tratamento. O gráfico representa a média \pm desvio-padrão (média \pm D.P.) de três experimentos independentes.

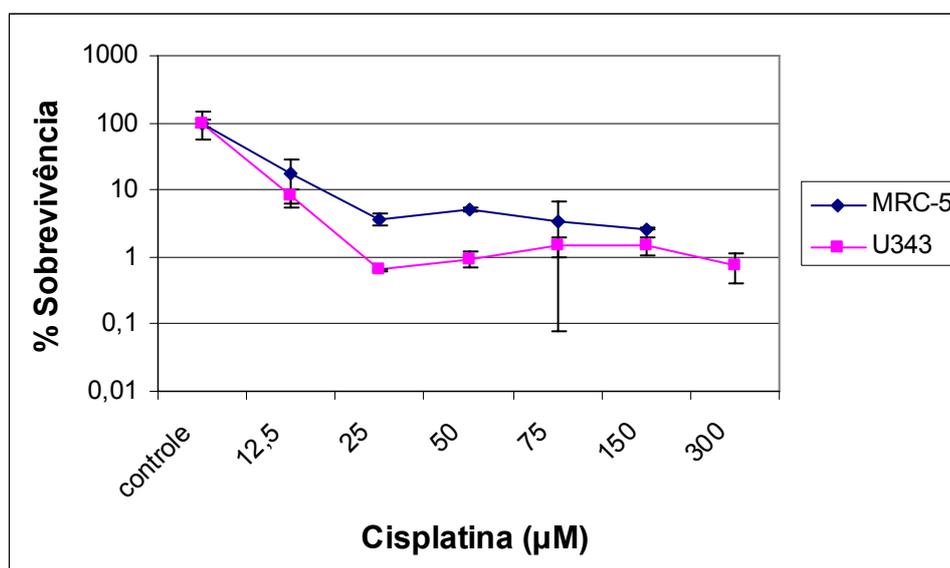


Figura 5: Sobrevivência celular das linhagens MRC-5 e U343 MG-a após o tratamento com várias concentrações de cisplatina (12,5; 25; 50; 75; 150 e 300 µM). As células foram colhidas cinco dias após o tratamento. O gráfico representa a média \pm desvio-padrão (média \pm D.P.) de três experimentos independentes

Deteção Morfológica de Apoptose e Necrose

A indução de apoptose foi verificada, para ambas as linhagens em várias condições de tratamento (12,5, 25 e 50 μM e 24, 48 e 72 h de tratamento), pela técnica de detecção morfológica empregando três corantes diferentes, Hoechst 33342, PI e DAF (Figuras 6 e 7). Foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem.

A análise estatística realizada (teste t) demonstrou que, para a linhagem U343 MG-a (Figura 6), houve um aumento significativo na frequência de células apoptóticas nos tempos de 24h para as concentrações de 12,5 μM (1%), 25 μM (2,9%) e 50 μM (3,5%) e 72h para as concentrações de 25 μM (20,4%) e 50 μM (16%) ($p \leq 0,05$). A maior porcentagem de apoptose encontrada para esta linhagem foi de 20,4% após o tratamento com 25 μM de cisplatina por 72h. Já a linhagem MRC-5 (Figura 7) apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) nos tempos de 24h para a concentração de 50 μM (3%), 48h para a concentração de 50 μM (11,0%) e 72h para as concentrações de 25 μM (3%) e 50 μM (6,6%) de cisplatina. Assim, para essa linhagem, a maior porcentagem de apoptose alcançada foi de 11,0% após o tratamento com 50 μM por 48h.

Ambas as linhagens, portanto, sofreram apoptose após o tratamento com cisplatina, sendo que a U343 MG-a apresentou uma maior frequência de apoptose (20,4%) comparada à linhagem MRC-5 (11,0%).

As frequências de células necróticas também foram analisadas após o tratamento com a cisplatina (Tabelas 1 e 2). A linhagem U343 MG-a apresentou uma frequência de necrose estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) para os seguintes tratamentos: 25 μM por 48 h (16%), 50 μM por 72 h (12%) e 50 μM por 72 h (18%). A maior frequência de necrose observada foi de 18% no tratamento de 50 μM por 72 h ($p \leq 0,05$). Já a linhagem MRC-5 não apresentou uma indução de células necróticas estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$).

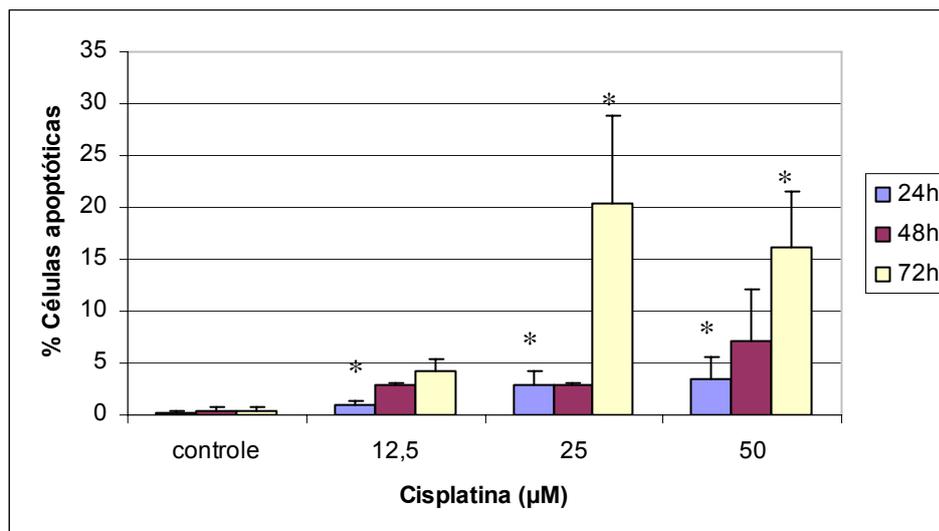


Figura 6: Porcentagem de células apoptóticas em culturas de células U343 MG-a expostas a várias concentrações de cisplatina (12,5; 25 e 50 µM). Os resultados foram obtidos nos tempos de 24, 48 e 72 h após o tratamento, empregando diferentes corantes, Hoechst 33342, PI e DAF. Foram analisadas 500 células por experimento. As barras representam o erro padrão. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$).

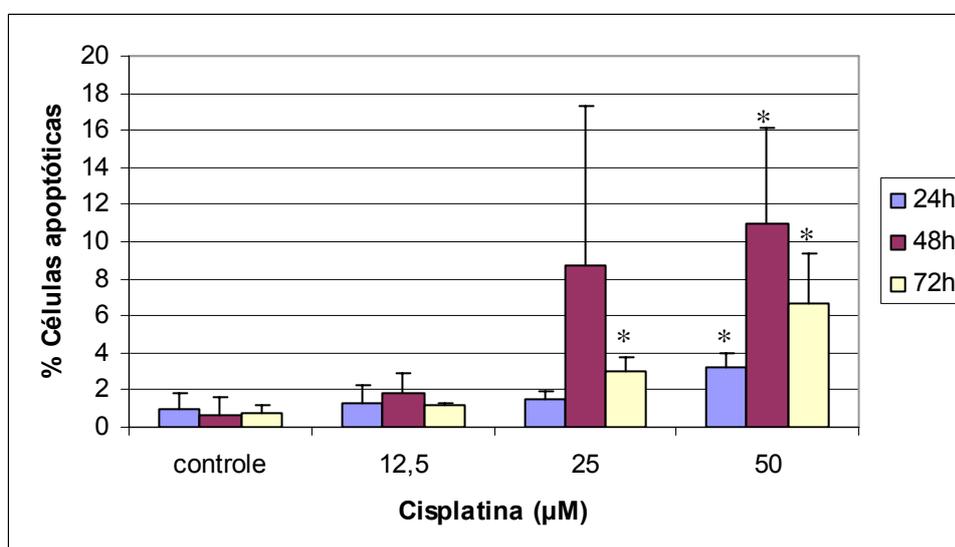


Figura 7: Porcentagem de células apoptóticas em culturas de células MRC-5 expostas a várias concentrações de cisplatina (12,5; 25 e 50 µM). Os resultados foram obtidos nos tempos de 24, 48 e 72 h após o tratamento, empregando diferentes corantes, Hoechst 33342, PI e DAF. Foram analisadas 500 células por experimento. As barras representam o erro padrão. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 1: Porcentagens de células apoptóticas e necróticas em culturas de células da linhagem U343 MG-a obtidas com o uso de três corantes (Hoescht 33342, PI e DAF). Os resultados foram obtidos em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com 12,5, 25 e 50 μM de cisplatina. Foram realizados três experimentos independentes.

Tempo após o tratamento (h)	% células apoptóticas				% células necróticas			
	Controle	12,5 μM	25 μM	50 μM	controle	12,5 μM	25 μM	50 μM
24	0,13	1*	2,93*	3,53*	14,5	19	15	21
48	0,4	2,8	2,9	7,2	13,5	11,4	16,6*	21,4
72	0,46	4,4	20,4*	16,2*	19,2	17,4	12,6*	18,7*

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$)

Tabela 2: Porcentagens de células apoptóticas e necróticas em culturas de células da linhagem MRC-5 obtidas com o uso de três corantes (Hoescht 33342, PI e DAF). Os resultados foram obtidos em 24, 48 e 72 horas após o tratamento com 12,5, 25 e 50 μM de cisplatina. Foram realizados três experimentos independentes.

Tempo após o tratamento (h)	% de células apoptóticas				% de células necróticas			
	Controle	12,5 μM	25 μM	50 μM	controle	12,5 μM	25 μM	50 μM
24	0,93	1,33	1,46	3,2*	10,5	5,73	6,66	10,8
48	0,66	1,86	8,7	11*	20,13	13,93	12,26	11,53
72	0,73	1,13	3*	6,66*	9,13	9,66	11,8	8,86

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$)

Análise da Expressão Gênica em Larga Escala

Foram realizados cinco experimentos com a linhagem U343 MG-a para extração de RNA total o qual foi utilizado como sonda complexa nas membranas de micro-arranjos. As células foram tratadas com 25 μ M de cisplatina por 48 h, procedendo-se, em seguida, a extração do RNA. A qualidade deste foi avaliada por meio de um gel de agarose (Figura 8) em que as duas bandas representam as duas subunidades do rRNA, 28S e 18S, notando-se a ausência de contaminação com DNA genômico. As sondas complexas marcadas com 32 P (provenientes de mRNA obtidos de células tratadas com 25 μ M de cisplatina, com controle pareado, colhidas 48 h após o tratamento) foram hibridadas com os micro-arranjos, sendo posteriormente processada a leitura dos sinais (Figura 9).

Os resultados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o programa SAM. Foi demonstrado que para um delta de 0,78 e FDR de 0,046 (4,6%) (Figura 10) foram encontrados 35 genes reprimidos e nenhum gene induzido (Tabela 3). Desses 35 genes reprimidos, 14 serão discutidos neste trabalho.

Para verificar os processos associados aos genes diferencialmente expressos, estes também foram submetidos ao programa *FATIGO* (www.fatigo.org), o qual classifica os genes de acordo com a função especificada pelo *Gene Ontology* (processos biológicos nível 3) (Figura 11). De acordo com os resultados dessa análise, esses genes estão relacionados com as seguintes funções: comunicação celular (*GNB1*, *MARK1*, *PASK*, *FZD4*, *CCBP2* e *CD84*), diferenciação sexual (*RQCD1*), metabolismo (*DYRK3*, *MARK1*, *MOCS2*, *PASK*, *TBCD*, *P4HB*, *LIMK2*, *DLX6*, *SMC1L1* e *GTF3C1*), morfogênese e desenvolvimento de órgãos (*DLX6*), morte celular (*BCL2 LIKE1*), secreção (*VDP*), regulação negativa de processos biológicos (*NFKBIE* e *Bcl2l1*), regulação de processos fisiológicos e celulares (*NFKBIE*, *BCL2 LIKE1*, *DLX6* e *SMC1L1*), processos fisiológicos do organismo (*PX19* e *CCBP2*), processos fisiológicos celulares (*DYRK3*, *COG4*, *NFKBIE*, *MARK1*, *MOCS2*, *PASK*, *TBCD*, *P4HB*, *BCL2 LIKE1*, *VDP*, *LIMK2*, *DLX6*, *SMC1L1*, *AP3S2* e *GTF3C1*), resposta a estímulo (*PX19*, *CCBP2*, *CD84* e *SMC1L1*) e localização (*COG4*, *NFKBIE*, *VDP* e *AP3S2*).

Os genes também foram agrupados de acordo com os perfis de expressão empregando os programas “Cluster” e “Treeview” (Figura 12). No primeiro agrupamento (correlação = 0,81) encontram-se os genes *MMP12*, *MARK1*, *MAPK9*, *TIMP2* e *CALU* (Figura 13). No segundo (correlação = 0,87), foram obtidos os genes *INSR*, *SMC1L1* e *GNB1* (Figura 14). No agrupamento 3 (correlação = 0,86) estão presentes os seguintes genes: *TNFRSF108*, *NEDD5*, *CRADD* e *SRPK2* (Figura 15).

Já no agrupamento 4 (correlação = 0,81) encontram-se os genes *BCL2 LIKE 1*, *ARHA* e *RRAS* (Figura 16). Nos agrupamentos 1, 2 e 4 estão apenas genes reprimidos após o tratamento com a cisplatina, enquanto que o agrupamento 3 inclui apenas genes induzidos.

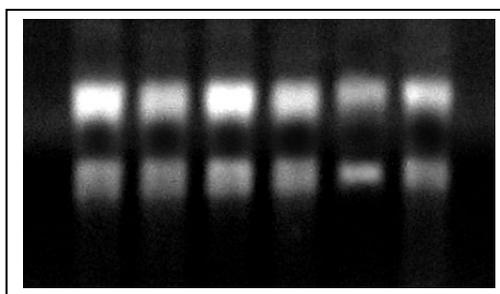


Figura 8: Gel de agarose com formaldeído para checagem da qualidade do RNA extraído das amostras de células U343 MG-a após o tratamento com 25 µM de cisplatina por 48 horas. As bandas equivalem às subunidades 28S e 18S do rRNA.

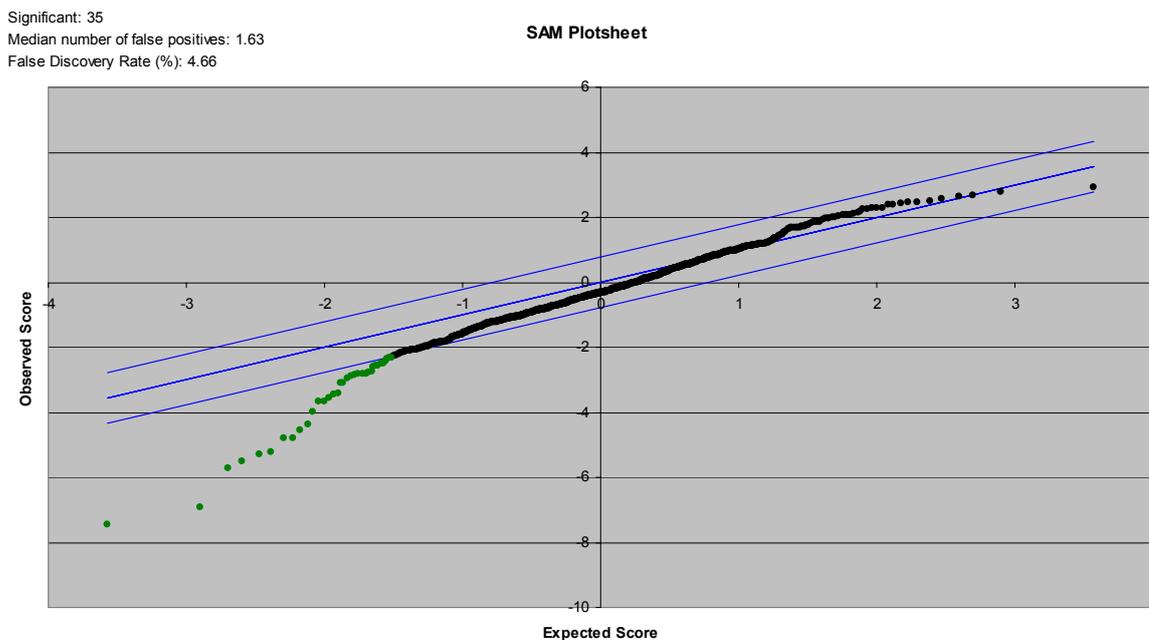


Figura 10: Comparação entre a distância relativa observada $D(i)$ e esperada $D(e)$. Gráfico de dispersão da diferença relativa observada $d(i)$ pela diferença relativa esperada $d_E(i)$. A linha azul central é a região onde $d(i) = d_E(i)$. As linhas azuis superior e inferior são cortes a uma distância Δ da linha contínua. Os pontos verdes representam genes que se afastaram da linha $d(i) = d_E(i)$ a uma distância $> \Delta$, sendo considerados genes significativamente reprimidos.

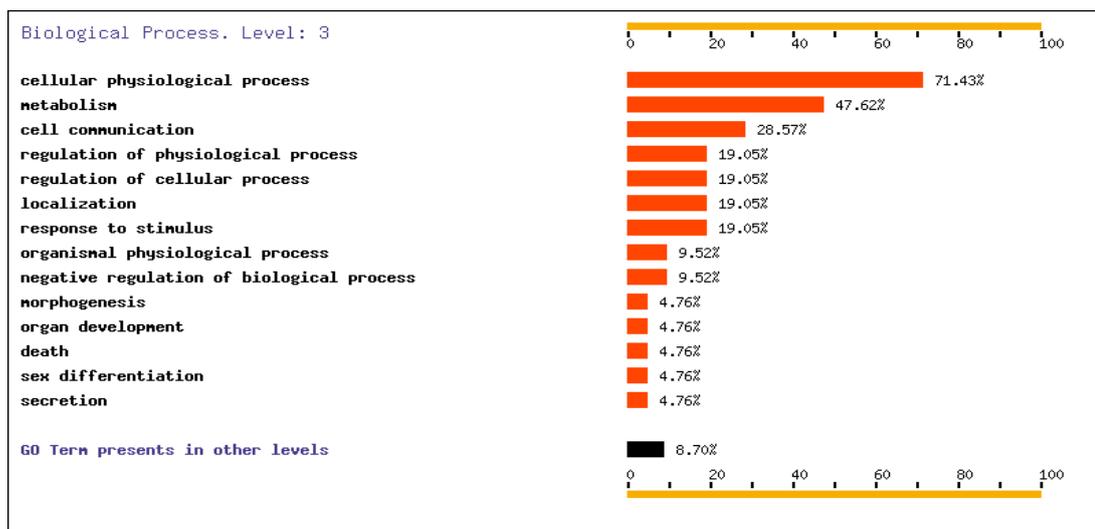


Figura 11: Distribuição dos genes significativamente reprimidos de acordo com os processos biológicos envolvidos. As funções são especificadas pelo *Gene Ontology*.

Tabela 3: Genes reprimidos em resposta ao tratamento das células U343 MG-a com 25 μ M de cisplatina por 48 h. A análise foi realizada pelo programa SAM.

Gene	Nome	Clone ID	Fold Change	q-value (%)	Função
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	138147	-3.944	0.000	Inibidor de MMP2
AP3S2	Adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit	135085	-1.697	0.000	Componente da maquinaria intracelular; se associa a vesículas de transporte
TBCD	Tubulin specific chaperone d	24417	-2.212	0.000	Envolvido na via que leva ao folding de beta-tubulina
GNB1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	24300	-2.263	0.000	Via de transdução de sinal
ARHA	Ras homolog gene family, member A	131734	-1.966	0.000	Regula via de transdução de sinal; organização do citoesqueleto
LIMK2	Lim Kinase 2	140191	-1.557	0.000	Organização do citoesqueleto
GTF3C1	General transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	53322	-2.635	0.000	Fator de transcrição
CALU	Calumenin	143860	-2.699	0.000	Envolvida na regulação dos níveis de Ca ²⁺ celular
NFKBIE	Inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells, epsilon	36215	-2.124	0.000	Apoptose
BCL2-L1	BCL2 like 1	4187517	-1.617	0.033	Apoptose
ING1	Inhibitor of growth family, member 1	140732	-2.247	0.033	Apoptose Supressor tumoral
DYRK3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	30342	-1.508	0.047	Relacionada com crescimento e desenvolvimento celular
PASK	Pas domain-containing serine/threonine kinase	23545	-2.393	0.000	Regula vias de sinalização intracelular em resposta a estímulos intrínsecos e extrínsecos
CDA08	T cell immunomodulatory protein	139662	-3.530	0.000	Função desconhecida
MAGP2	Microfibrillar associated protein 5	138496	-2.086	0.000	Constituinte da matriz extracelular
DLX6	Distal-less homeobox 6	21760	-2.365	0.000	Papel no desenvolvimento craniofacial
FZD4	Frizzled homolog 4 (Drosophila)	133114	-2.109	0.000	Codifica proteínas transmembrana
SMC1L1	Structure maintenance chromosome 1-like 1	31914	-2.574	0.000	Reparo do DNA

Gene	Nome	Clone ID	Fold Change	q-value (%)	Função
P4HB	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase-associated 1)	132702	-2.810	0.000	Envolvida na ubiquitinação Ajuda no folding de proteínas no RE
CD84	CD84 antigen (leucocyte antigen)	138815	-1.615	0.000	Interações de adesão entre linfócitos T e células acessórias
RQCD1	RCD1 required for cell differentiation1 homolog (S. pombe)	131380	-1.598	0.033	Função desconhecida
CCBP2	Chemokine binding protein 2	133672	-1.498	0.033	Crítica para o recrutamento de células imune efectoras
PX19	Px19-like protein	134404	-1.509	0.033	Papel na hematopoiese e linfopoiese
MARK1	Microtubule affinity-regulating kinase 1	21522	-1.683	0.033	Envolvida na estabilização de microtúbulos
COG4	Component of oligomeric golgi complex 4	41976	-1.549	0.033	Determinantes da estrutura, capacidade para transporte intracelular e modificação de glicoproteínas do complexo de Golgi
MOCS2	Molybdenum cofactor synthesis 2	132987	-1.179	0.047	Cofator de molibdênio
VDP	Vesicle docking protein p115	135226	-1.443	0.047	Manutenção da arquitetura do complexo de Golgi

COLOCAR FIGURA CLUSTER TOTAL figura 12

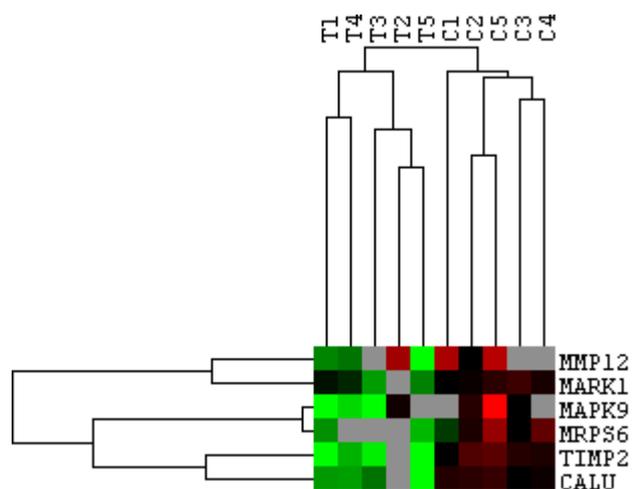


Figura 13: Agrupamento hierárquico (agrupamento 1) dos resultados de cinco experimentos (colunas) pelo padrão de expressão gênica (linhas) para células tratadas com 25 μ M cisplatina por 48h (T) comparadas com células não tratadas (C). O valor da expressão normalizada para cada gene é representado pelas cores: vermelho indica níveis de expressão maiores que a mediana; verde indica níveis de expressão menores que a mediana; cinza indica valores excluídos.

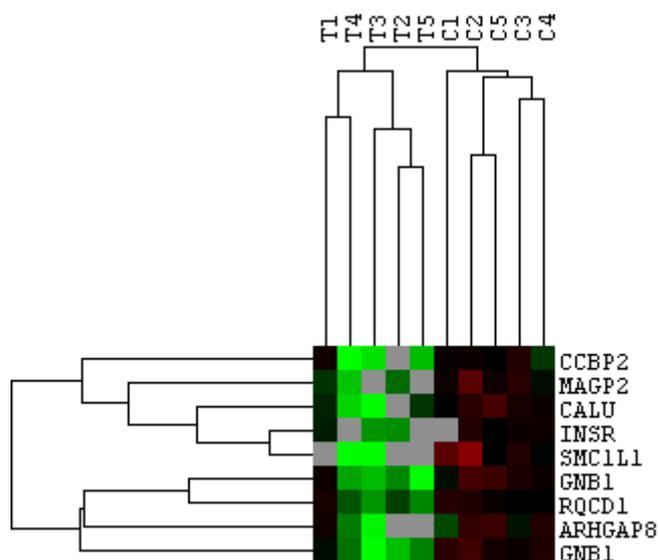


Figura 14: Agrupamento hierárquico (agrupamento 2) dos resultados de cinco experimentos (colunas) pelo padrão de expressão gênica (linhas) para células tratadas com 25 μ M cisplatina por 48h (T) comparadas com células não tratadas (C). O valor da expressão normalizada para cada gene é representado pelas cores: vermelho indica níveis de expressão maiores que a mediana; verde indica níveis de expressão menores que a mediana; cinza indica valores excluídos.

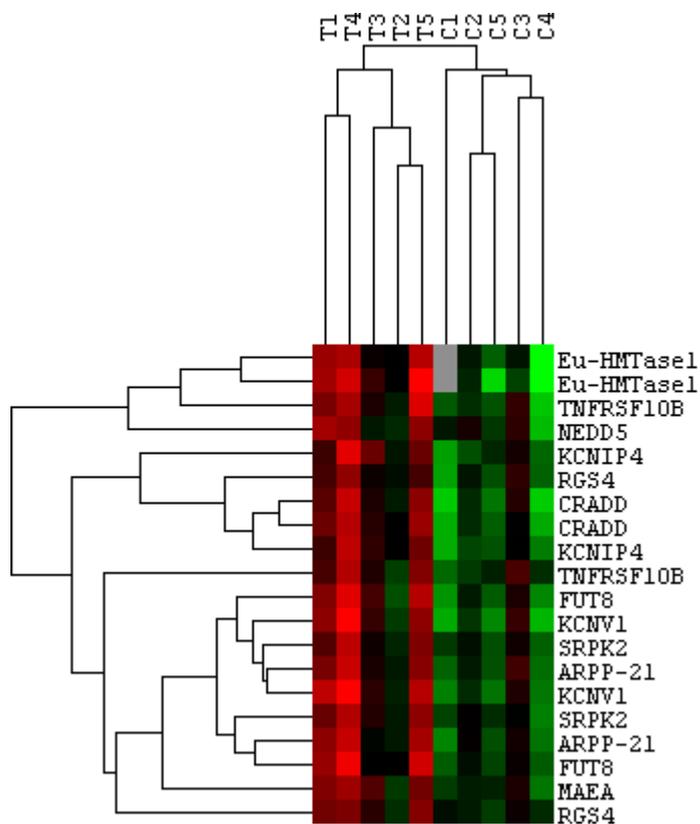


Figura 15: Agrupamento hierárquico (agrupamento 3) dos resultados de cinco experimentos (colunas) pelo padrão de expressão gênica (linhas) para células tratadas com 25 μ M cisplatina por 48h (T) comparadas com células não tratadas (C). O valor da expressão normalizada para cada gene é representado pelas cores: vermelho indica níveis de expressão maiores que a mediana; verde indica níveis de expressão menores que a mediana; cinza indica valores excluídos.

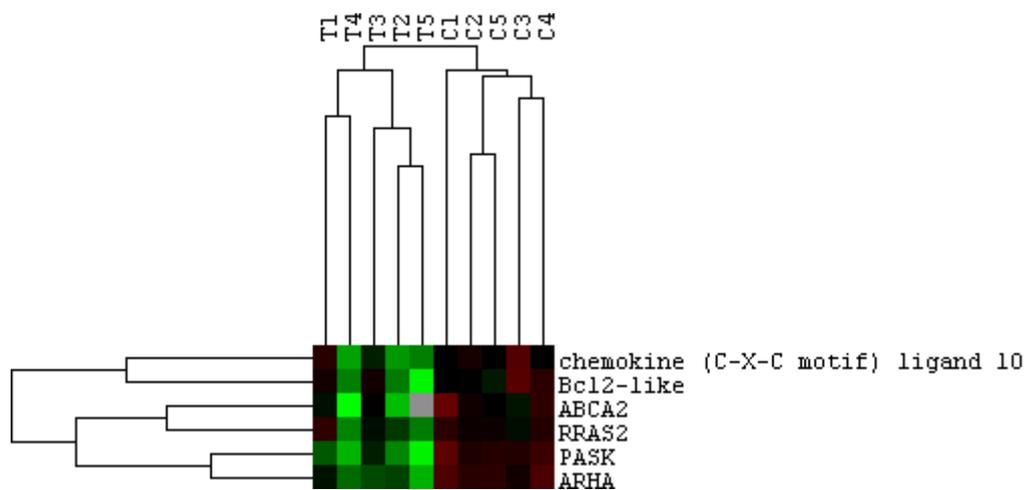


Figura 16: Agrupamento hierárquico (agrupamento 4) dos resultados de cinco experimentos (colunas) pelo padrão de expressão gênica (linhas) para células tratadas com 25µM cisplatina por 48h (T) comparadas com células não tratadas (C). O valor da expressão normalizada para cada gene é representado pelas cores: vermelho indica níveis de expressão maiores que a mediana; verde indica níveis de expressão menores que a mediana; cinza indica valores excluídos.

DISCUSSÃO

Uma variedade de agentes genotóxicos endógenos e exógenos é capaz de induzir danos no material genético e evocar respostas como o bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA, senescência prematura induzida por estresse ou apoptose. A resposta inicial das células é o bloqueio no ciclo em uma tentativa de reparar o dano, no entanto, se esse dano for muito extenso ou comprometer o metabolismo do DNA, uma cascata de sinalização aciona mecanismos alternativos que inibem a proliferação das células e acionam vias de morte. Portanto, é crucial que as células sejam capazes de reconhecer o grau de severidade da lesão e simultaneamente ativar as respostas apropriadas, pois, de outra maneira, mutações poderão ser introduzidas nos genomas e estes eventualmente poderão ser propagados (Berardi *et al.*, 2004).

Uma terapia do câncer bem-sucedida deve garantir a erradicação de todas as células tumorais clonogênicas do organismo, pois as células cancerosas sofrem divisão ilimitada e mesmo uma única célula pode vir a ser fonte de um clone que originará um tumor. O teste de sobrevivência é um método clássico para testar a sensibilidade celular a diferentes concentrações dos agentes anticâncer *in vitro* (Kumala *et al.*, 2003). Portanto, o conhecimento prévio sobre a sensibilidade tumoral a drogas anticâncer é muito importante.

De acordo com Kumala *et al.* (2003), linhagens de melanoma humano (Me-45) foram extremamente sensíveis quando expostas a diversas concentrações de cisplatina (1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$) e a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ foi capaz de reduzir a fração clonogênica em cinco ordens de magnitude. Fehlauer *et al.* (2000) relataram que o tratamento de linhagens de glioma humano com concentrações de cisplatina que variavam de 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$ foi letal para 10-30% das células, enquanto que no trabalho de Wolff *et al.* (1999), 1,1 $\mu\text{g/ml}$ da droga foi letal para 50% das células de glioma.

No presente trabalho, as concentrações de cisplatina utilizadas (12,5 a 300 μM) reduziram fortemente a sobrevivência das células MRC-5 (~ 1%) e das células U343 MG-a (< 1%) após cinco dias de tratamento, sendo que o tratamento das mesmas células por 24 h com iguais concentrações de cisplatina reduziu a sobrevivência em cerca de 20-80% (teste de citotoxicidade). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que ambas as linhagens utilizadas (MRC-5 e U343 MG-a) sofreram uma acentuada diminuição na sobrevivência celular após o tratamento com a cisplatina. No caso de tratamentos prolongados por cinco dias com a cisplatina (teste de sobrevivência celular), os resultados indicaram que a linhagem U343 MG-a se mostrou levemente mais sensível que a linhagem MRC-5 (transformada por SV40) sob as mesmas condições de tratamento.

A inibição da proliferação celular detectada por testes de toxicidade de curto período não permite uma previsão da sobrevivência por longo período. As células que não morrem imediatamente após o tratamento acumulam danos os quais impedem a sua sobrevivência após várias gerações (Ceraline *et al.*, 2003), ou seja, após uma ou mais tentativas de divisão celular.

Um dos mecanismos de citotoxicidade de compostos de platina é a indução de apoptose. A suscetibilidade diminuída à apoptose induzida pela cisplatina está associada com a resistência a essa droga (Servidei *et al.*, 2001). Ambas as linhagens foram submetidas ao tratamento com diversas concentrações de cisplatina (12,5; 25 e 50 μM) a fim de determinar a porcentagem de morte celular por apoptose.

A análise das frequências de apoptose induzidas pelo tratamento com a cisplatina indicou que as células U343 MG-a e principalmente as células MRC-5 sofreram uma baixa indução de apoptose apesar do acentuado efeito antiproliferativo evidenciado pelos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade e sobrevivência celular. Em adição à apoptose, as células podem ser eficientemente eliminadas após o dano no DNA por necrose, catástrofe mitótica, autofagia, assim como por senescência prematura, que é caracterizada por uma parada irreversível da divisão celular (Abend, 2003; Okada e Mak, 2004; Brown e Attardi, 2005). Dessa maneira, nota-se que outros tipos de morte, além da apoptose, podem ser induzidas após o tratamento com a cisplatina.

Vários fatores parecem determinar a forma de morte celular induzida por um determinado agente, tais como o tipo celular, o genótipo da célula, o tipo de dano induzido no DNA e a concentração do agente utilizado (Brown e Attardi, 2005). Os resultados apresentados indicam que a indução de apoptose não é a única resposta na terapia do câncer e que mecanismos de morte não apoptótica são frequentemente responsáveis pela morte das células tumorais induzida pelo tratamento empregado (Okada e Mak, 2004).

Ao comparar as duas linhagens utilizadas, nota-se que a linhagem U343 MG-a apresentou uma frequência máxima de apoptose de 20,4% após o tratamento com a cisplatina e a linhagem MRC-5 apresentou 11,0% de apoptose. Embora o índice apoptótico tenha sido baixo, essas duas linhagens apresentaram uma grande redução na sobrevivência celular após cinco dias de tratamento. Steel (2001) enfatizou a falta de correlação entre a extensão da morte apoptótica e a perda da integridade reprodutiva evidenciada pelo teste de sobrevivência clonogênica.

Uma questão importante com relação às respostas celulares ao dano no material genético é como a extensão da lesão é reconhecida como excessiva pelas células, acionando a mudança do reparo para apoptose (Bernstein *et al.*, 2002). A percepção geral é que a extensão do dano e/ou a capacidade de reparo pode ser o principal fator nesta decisão e isto parece ser dependente da concentração da droga

(Offer *et al.*, 2002). Os resultados mostraram que as células U343 MG-a tratadas com uma alta concentração de cisplatina (25 μM) sofreram 20,4% de apoptose após 72 h, muito embora os tratamentos com concentrações que variaram de 12,5 a 300 μM tenham reduzido consideravelmente a sobrevivência celular após 24 h, ou seja, cerca de 20-80% (teste de citotoxicidade), enquanto a fração de sobrevivência foi reduzida a menos que 1% após cinco dias de tratamento (sobrevivência celular). Tais resultados demonstram a complexidade das respostas em termos de indução de morte celular, que pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependentes do tipo de lesão e das interações droga-DNA.

A indução de apoptose foi demonstrada por Choi *et al.* (2004) em células de glioma A172 tratadas com altas concentrações de cisplatina (300 μM). Foi relatado que a cisplatina pode induzir duas principais vias apoptóticas distintas: a primeira é a apoptose dependente de TP53 (via mitocôndria), a qual começa com a translocação do Bax induzido pelo TP53, do citosol para a mitocôndria, seguida pela liberação do citocromo c e ativação das caspases 9 e 3; a segunda via é a cascata apoptótica dependente de Fas/Fas ligante e caspase 8 (Torigoe *et al.*, 2005).

Astrocitomas são os mais comuns neoplasmas do sistema nervoso central, compreendendo mais de 60% dos tumores cerebrais primários. Alterações genéticas freqüentemente relatadas em astrocitomas incluem a mutação do gene TP53, amplificação/rearranjo do gene EGFR e a perda da heterozigosidade envolvendo 10p e 10q. Muitas evidências indicam que as mutações no gene TP53 estão intimamente associadas com a progressão tumoral, transformação maligna e recorrência dos astrocitomas (Iwadate *et al.*, 1996). No entanto, Fujiwara *et al.* (1994) mostraram que a expressão de TP53 selvagem foi capaz de tornar as células tumorais mais sensíveis ao tratamento com drogas anticâncer.

Gliomas malignos com um prognóstico relativamente pobre constituem um desafio significativo para modalidades de tratamento convencionais de cirurgia, radioterapia e quimioterapia adjuvante. Dado o importante papel do TP53 no processo apoptótico, a mutação e conseqüente perda da função desse gene podem desempenhar um papel crucial na tumorigênese e desenvolvimento de resistência a regimes terapêuticos em glioma e outros tumores humanos (Iwadate *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 2004). O gene TP53 é encontrado mutado em mais de 40% dos gliomas, entretanto, a linhagem de astrocitoma utilizada no presente trabalho é proficiente para o gene TP53 (Shu *et al.*, 1998). Em um estudo paralelo no presente laboratório, foi observado que uma outra droga, a temozolomida, não induz apoptose em células U343 MG-a, mesmo em concentrações elevadas. Datta *et al.* (2004) sugerem que a apoptose induzida pela quimioterapia, por meio da anulação da função da proteína TP53, pode ser uma estratégia terapêutica viável em muitos casos. Portanto, o *status* dessa proteína não parece ser o único fator importante; enquanto a deficiência desta

pode gerar diferentes respostas em células tratadas com a cisplatina, a natureza do quimioterápico (implicando em diferentes mecanismos de interação droga-DNA) também é um fator importante, conforme demonstrado pelas diferentes respostas obtidas para as duas drogas, temozolomida e cisplatina.

As células cancerosas são caracterizadas por um crescimento celular descontrolado, capacidade para invadir tecidos normais vizinhos e para sofrer metástase. O desenvolvimento de câncer é um processo complexo e de muitas etapas no qual alterações progressivas culminam na desregulação da proliferação em células somáticas, acarretando alterações na expressão de numerosos genes (Qi *et al.*, 2002). As alterações genéticas são heterogêneas mesmo em tumores do mesmo tipo histológico, o que faz com que os tumores individuais respondam heterogeneamente aos agentes anticâncer empregados (Iwadate *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas muitas técnicas para análise de expressão gênica diferencial têm sido desenvolvidas, na tentativa de facilitar a identificação de produtos gênicos mostrando expressão alterada em células de uma população comparadas à outra. O desenvolvimento da técnica de micro-arranjos de cDNA marcou uma nova era em pesquisas envolvendo a análise da expressão gênica em larga escala (Qin *et al.*, 2002; Mischel *et al.*, 2004). A disponibilidade de novas tecnologias tem aberto a possibilidade de explorar múltiplas vias e ainda, pode auxiliar na identificação de novos alvos para melhorar a estratificação de pacientes e geração de novas estratégias terapêuticas (Ranuncolo *et al.*, 2004).

Neste trabalho a análise de expressão gênica foi realizada somente para a linhagem astrocítica e os resultados foram obtidos culturas tratadas com 25 μ M de cisplatina por 48 h. As alterações na expressão gênica induzidas pela droga foram avaliadas pela metodologia de micro-arranjos de cDNA, que detecta a expressão diferencial de genes sob situações distintas, no caso, em células tratadas e não-tratadas. Os resultados mostraram uma alteração significativa nos perfis de expressão de vários genes na linhagem astrocítica. Os resultados quantitativos da análise de expressão gênica utilizando o programa SAM indicaram a repressão de 27 genes: *TIMP2*, *AP3S2*, *TBCD*, *ARHA (RHOA)*, *GTF3C1*, *LIMK2*, *GNB1*, *CALU*, *NFKBIE*, *PASK*, *CDA08*, *MAGP2*, *DLX6*, *P4HB*, *FZD4*, *SMC1L1*, *CD84*, *RQCD1*, *BCL2-like (BCL-XL)*, *CCBP2*, *PX19*, *MARK1*, *ING1*, *COG4*, *MOCS2*, *VDP* e *DYRK3*. Para o delta de corte utilizado (0,78), não foram encontrados genes induzidos.

Esses genes pertencem a várias classes e podem ser agrupados da seguinte maneira de acordo com os processos nos quais eles estão envolvidos e/ou a localização celular: apoptose ou sobrevivência (*BCL2-XL*, *ING1*, *RHOA*, *VDP*, *TIMP2*, *DYRK3* e *NFKBIE*), via RHO GTPases (*LIMK2*, *RHOA*), complexo de Golgi (*COG4*, *VDP*, *AP3S2* e *CALU*), retículo endoplasmático (*P4HB* e *CALU*), metástase (*LIMK2*,

TIMP2 e *CALU*), reparo do DNA (*SMC1L1*), sistema imune (*CDA08*, *CD84* e *CCBP2*), citoesqueleto (*TBCD*, *RHOA*, *LIMK2* e *MARK1*), fator de transcrição (*NFKBIE* e *GTF3C1*), vias de transdução de sinal (*GNB1*, *PASK* e *DYRK3*), metabolismo (*DYRK3*, *MARK1*, *MOCS2*, *PASK*, *TBCD*, *P4HB*, *LIMK2*, *DLX6*, *SMC1L1* e *GTF3C1*). Alguns genes não serão discutidos neste trabalho por não apresentarem uma função conhecida ou por não ser aparentemente relacionados aos processos que serão discutidos.

Conforme mencionado, foi encontrado um grande número de genes envolvidos no metabolismo celular (*DYRK3*, *MARK1*, *LIMK2*, *SMC1L1*, *VDP*, *CALU* e *P4HB*), o que suporta o fato de que os danos causados pela cisplatina comprometem a maquinaria celular como um todo, desde que genes relacionados com o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, por exemplo, foram reprimidos após o tratamento com o antitumoral cisplatina.

Assim, o retículo endoplasmático pode constituir-se em um alvo não-nuclear da cisplatina. Essa organela desempenha uma função importante na manutenção da homeostase do cálcio intracelular, síntese protéica, modificações pós-traducionais e processamento (*folding*) apropriado de proteínas, assim como distribuição e tráfego de macromoléculas. Alterações na homeostase do cálcio e acúmulo de proteínas não processadas (*unfolded*) no retículo endoplasmático causam estresse nessa organela. Uma variedade de agentes, incluindo agentes químicos tóxicos, inibidores de glicosilação de proteínas, ionóforos de cálcio e outros agentes que causam estresse oxidativo e alteram a homeostase do cálcio, podem induzir estresse no retículo endoplasmático seguido por morte celular. A cisplatina foi capaz de induzir estresse oxidativo em uma variedade de linhagens celulares (Mandic *et al.*, 2003). Os autores sugeriram que a droga poderia induzir apoptose (mesmo na ausência de dano no DNA), através de perturbações no retículo endoplasmático. O tratamento com a cisplatina induziu a ativação de calpaína, uma protease dependente de cálcio, a qual ativou as caspases 3 e 12, esta última específica do retículo endoplasmático em citoplastos.

Em células de mamíferos, o complexo de Golgi sofre extensiva fragmentação durante a apoptose. A proteína p115 (também conhecida por *VDP-vesicle docking protein*) é essencial para a manutenção da organização estrutural do Golgi. É possível que outras proteínas celulares adicionais que normalmente não possuem funções relacionadas à apoptose, possam atuar como fatores pró-apoptóticos, uma vez clivadas (Chiu *et al.*, 2002). Vários estudos sugerem que o complexo de Golgi pode ter um papel durante a apoptose, já que moléculas pró-apoptóticas como a caspase 2 e muitos receptores de morte foram encontrados acumulados nessa organela (Mancini *et al.*, 2000).

A platinação do genoma causado pelo tratamento com a cisplatina aciona respostas celulares envolvendo muitas vias, incluindo reparo do DNA, inibição da transcrição, bloqueio do ciclo celular e apoptose, todas as quais requerem remodelamento das propriedades estrutural e dinâmica da cromatina. A cisplatina causa acetilação da histona H3 na serina-10 (Wang e Lippard, 2004). A acetilação de histonas correlaciona bem com a ativação transcricional de muitos genes, presumivelmente por aumentar a acessibilidade de regiões genômicas particulares para complexos protéicos remodeladores ou ativadores da transcrição, além de facilitar o reparo de DNA (Wang e Lippard, 2004).

A apoptose está intimamente relacionada com alterações significativas no citoesqueleto, desde que muitas proteínas deste, como actina e laminina, são clivadas durante o processo apoptótico. As alterações morfológicas características da apoptose (como encolhimento da célula, condensação das organelas, vesiculação da membrana e fragmentação da cromatina) também sugerem mudanças substanciais na estrutura do citoesqueleto (DeMeester *et al.*, 1998). Esses mesmos autores sugeriram que a apoptose induzida por estresse em células endoteliais é, em parte, consequência do rearranjo crítico do citoesqueleto.

Na maioria das células os sinais apoptóticos ativam alterações no citoesqueleto de actina que resultam na liberação da matriz extracelular, vesiculação na membrana e condensação em corpos apoptóticos em uma maneira seqüencial. A reorganização e degradação da actina já foram visualizadas como uma consequência tardia ocorrendo somente após a célula ter sofrido apoptose. Entretanto, há evidências de que a própria perturbação do citoesqueleto de actina possa iniciar eventos que levam a célula a cometer apoptose (Moore *et al.*, 2004).

No presente trabalho foram encontrados muitos genes inibidos relacionados com o citoesqueleto (*LIMK2*, *RHOA* e *MARK1*), implicando que a apoptose está relacionada com alterações drásticas no citoesqueleto induzidas pelo tratamento com o antitumoral cisplatina nas células astrocíticas. Tulub e Stefanov (2001) demonstraram que a cisplatina causa uma dramática alteração no processo de montagem e funções de sinalização da tubulina.

Esses resultados demonstram que a cisplatina não afeta apenas o DNA, mas pode também causar alterações estruturais em organelas celulares adicionalmente ao ataque primário ao DNA. Provavelmente, essas interações adicionais intensificam o efeito antiproliferativo e desta forma, contribuindo para alcançar o importante efeito citotóxico da cisplatina contra as células tumorais (Kopf-Maier e Muhlhausen, 1992).

As vias apoptóticas induzidas pela cisplatina são complexas, já que esta pode causar diferentes tipos de estresse celular, tais como lesão no DNA, dano oxidativo e alterações ao nível do retículo endoplasmático. Vários sinais de estresse induzidos pelo tratamento com a cisplatina podem ativar vias diferentes por meio de fatores de

transcrição específicos que atuam em última instância, como o alvo final da droga. A sobrevivência ou a morte da célula em resposta à droga poderia ser dependente da intensidade relativa dessas vias de sinalização e também do intercruzamento entre as mesmas (Torigoe *et al.*, 2005).

O mecanismo de sinalização do dano para a morte celular é atualmente matéria de intensa investigação. Existem dados que demonstram que, em células epiteliais humanas e células leucêmicas, o Fas está envolvido na apoptose induzida pela cisplatina. Em muitos outros sistemas celulares, a via mitocondrial parece desempenhar o papel principal, o que é caracterizado pela expressão alterada de proteínas apoptóticas como BCL-2, BAK, BAX e BAD (Brozovic *et al.*, 2004).

BCL-X é um membro da família de proteínas BCL-2, a qual está envolvida na regulação da apoptose em resposta à quimioterapia. A super-expressão de *BCL-2* ou *BCL-XL* causa um atraso ou inibição da apoptose e, em muitos casos, gera uma vantagem em termos de sobrevivência após diversos estímulos, incluindo as drogas antitumorais, a radiação-gama e a privação de fatores de crescimento. A diminuição do nível de *BCL-XL* foi observada em linhagens de hepatoma após o tratamento com alta concentração de cisplatina (16 µg/ml), mas não com uma baixa concentração (4 µg/ml) (Qin e Ng, 2002). No presente trabalho, em que foi testada uma alta concentração de cisplatina (25 µM), esta causou uma diminuição significativa na expressão de *BCL-XL*.

A suscetibilidade das células ao sinal de morte parece ser determinada, pelo menos em parte, pela ação antagônica entre proteínas pró- e anti-apoptóticas. A apoptose é induzida pela ativação de fatores pró-apoptóticos assim como pela inativação de fatores anti-apoptóticos da família BCL-2 (Qin *et al.*, 2002). Um importante papel das proteínas BCL-XL e BCL-2 como reguladoras da apoptose é a capacidade de inibir a transição da permeabilidade mitocondrial e bloquear a liberação do citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF) da mitocôndria, dessa forma, promovendo a sobrevivência celular. Embora BCL-XL e BCL-2 atuem como supressores da apoptose dependente da mitocôndria, a capacidade destes em promover a sobrevivência parece ser diferente e pode variar entre os tipos celulares. A inibição forçada de BCL-XL aumentou a sensibilidade de três linhagens de câncer de ovário à cisplatina e paclitaxel (Dodier e Piche, 2005). Da mesma maneira, Williams *et al.* (2005) demonstraram que a expressão de *BCL-XL* está associada à quimio-resistência e recorrência da doença em carcinoma de ovário. A expressão de proteínas anti-apoptóticas como BCL-XL e BCL-2 foi detectada na maioria dos tumores sólidos. A inibição farmacológica da expressão de *BCL-XL* e *BCL-2* aumentou a apoptose em células de mesotelioma (Hopkins-Donaldson *et al.*, 2003).

No presente estudo, a inibição do gene BCL-XL (função anti-apoptótica) se correlacionou com a ativação do programa de morte por apoptose induzida pelo

tratamento com 25 μ M de cisplatina. O balanço da expressão de vários membros da família BCL-2 pode determinar a extensão na qual a morte é promovida ou impedida. No presente caso, a repressão de um fator anti-apoptótico pode ter contribuído, juntamente com a ação de outros fatores, para a indução de apoptose nas células U343 MG-a.

A compreensão dos fatores genéticos que regulam o balanço entre apoptose e sobrevivência celular é fundamental no sentido de elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a cisplatina exerce a sua atividade citotóxica (Qin *et al.*, 2002). Esta resulta da inibição da duplicação do DNA pelos aductos formados pela interação da droga com o DNA. Entretanto, os eventos sucessivos ao tratamento com a cisplatina, capazes de mediar o processo de morte celular (incluindo-se a apoptose) não são ainda compreendidos, podendo envolver a regulação da expressão de múltiplos genes atuando de forma coordenada.

Em mamíferos, a má regulação ou a perda de certos genes não previamente relacionados com a manutenção da estabilidade do genoma foram mostrados contribuir para a instabilidade genômica, indicando que proteínas do reparo do DNA e ciclo celular não são as únicas mediadoras desta função vital para as células (Snyder e Morgan, 2005). No presente trabalho, foi observada uma repressão de genes pertencentes a diferentes classes, muitos não previamente associados a respostas ao estresse genotóxico.

Em face à indução de aductos no DNA, foi relatado que as células são incapazes de continuar os processos metabólicos normais, como a duplicação (Heiger-Bernays *et al.*, 1990; Oswald *et al.*, 1990) e a transcrição (Tornaletti *et al.*, 2003; Cullinane *et al.*, 1999), até o reconhecimento e a tentativa de remoção dessas lesões pelos mecanismos de reparo do DNA. Alternativamente, algumas células proficientes para a síntese translesão são capazes de tolerar tais tipos de danos. (Vaisman *et al.*, 1999; Mamenta *et al.*, 1994). O modelo de reparo dos *crosslinks* baseia-se essencialmente em HR e NER (Cole *et al.*, 1976; Thompson, 1996; De Silva *et al.*, 2000; Mu *et al.*, 2000). Entretanto, estudos recentes demonstraram a participação de proteínas, tais como a CHK1 (Sorensen *et al.*, 2005), CHK2 (Zhang *et al.*, 2004) e CDKs (Esashi *et al.*, 2005, Aylon *et al.*, 2004, Ira *et al.*, 2004), que não são diretamente relacionadas ao reparo do DNA, mas participam na localização dos sítios de danos e possivelmente na ativação do reparo HR.

Um aumento na eficácia do tratamento de tumores cerebrais pode resultar da identificação de diferenças intrínsecas e induzíveis entre células normais e malignas. Alvos potenciais para esta estratégia de explorar a vulnerabilidade molecular incluem genes e proteínas de resistência que são ativados nas células tumorais pela exposição à quimio- ou radioterapia. Muitas drogas antitumorais utilizadas contra tumores cerebrais, como agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase, causam danos no

DNA ou bloqueiam a duplicação e o reparo do mesmo. Em consequência, dependendo da extensão das alterações, as células podem sofrer apoptose ou outros tipos de morte celular, que podem ser manipuladas (Weaver *et al.*, 2003).

Muitos genes envolvidos no processo de apoptose ou sobrevivência celular foram modulados após o tratamento com a cisplatina neste trabalho. Alguns desses genes não possuem uma função apoptótica diretamente, mas regulam processos ou vias que possam culminar na apoptose ou sobrevivência indiretamente. Além da análise empregando o programa SAM, o qual nos revelou apenas genes reprimidos sob o tratamento com a cisplatina, também foi realizada a análise de agrupamento dos genes por semelhança de perfis de expressão, ou seja, de tal forma que genes que co-expressam encontram-se no mesmo agrupamento; dessa maneira, quatro agrupamentos principais foram considerados, sendo que estes retratam as respostas das células U343 MG-a ao tratamento com 25 μ M de cisplatina por 48 h. Os genes selecionados pelo SAM que não se encontram em nenhum dos agrupamentos selecionados, mas por possuírem funções semelhantes ou participarem de uma mesma via, serão discutidos juntamente com os genes agrupados.

No primeiro agrupamento escolhido (Figura 13) encontram-se os genes *MMP12*, *MARK1*, *MAPK9 (JNK2)*, *TIMP2* e *CALU*. Esses genes estão relacionados com os processos de invasão ou metástase (*MMP12*, *MARK1*, *TIMP2* e *CALU*) e com apoptose ou sobrevivência (*JNK2*). Todos foram reprimidos, sendo que os genes *MARK1*, *TIMP2* e *CALU* foram apontados como estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) pelo programa SAM.

Muitos processos biológicos normais, incluindo reprodução, desenvolvimento fetal e cicatrização são criticamente dependentes da degradação controlada da matriz extracelular (ECM). Entretanto, a degradação excessiva dos componentes da matriz também ocorre em certas condições como o câncer. O papel biológico de *MMP12* (*matrix metalloproteinases 12*) na progressão tumoral ainda não é claramente compreendido, mas este parece estar envolvido na degradação de componentes da membrana basal. Em câncer de células escamosas, a ausência de *MMP12* está relacionada a um bom prognóstico. A super-expressão de *MMP12* foi detectada em câncer cervical, sugerindo que este gene participa do processo de invasão nesse tipo de tumor (Vazquez-Ortiz *et al.*, 2005). *MMP12* já foi relacionado à gliomas, mas ainda é necessário mais estudos para entender o papel desse gene no processo de invasão nessas células (Nakada *et al.*, 2003).

A degradação proteolítica da matriz extracelular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer e um evento chave na angiogênese e metástase tumoral. As metaloproteinases de matriz (MMPs) degradam a membrana basal e a matriz extracelular, facilitando a migração celular, invasão tumoral e metástase (Ross *et al.*, 2003), o que contribui para a progressão do tumor. Todas as MMPs são produzidas

em uma forma latente (pró-MMP), requerendo ativação para exercerem atividade catalítica, um processo que é geralmente acompanhado pela remoção do domínio propeptídeo (Toth *et al.*, 2000). TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) são os principais reguladores endógenos das MMPs e consistem de quatro membros homólogos (TIMP1-4). TIMPs são proteínas multifuncionais que inibem a invasão celular *in vitro* e a tumorigênese e metástase *in vivo*. A expressão de *TIMP* foi associada tanto com a supressão tumoral ou efeitos anti-metastáticos quanto com promoção tumoral em certos tipos de câncer (Ross *et al.*, 2003). No presente trabalho, *TIMP2* foi reprimido após o tratamento com a cisplatina.

Foi relatado que muitos TIMPs podem diretamente afetar o crescimento celular e a sobrevivência, independentemente das suas ações sobre as MMPs (Baker *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2003; Kuvaja *et al.*, 2005). *TIMP2* estimula o crescimento de células de linfoma e fibroblastos (Baker *et al.*, 2002). Muitos TIMPs estão associados com a progressão tumoral, embora, paradoxalmente, outros possam suprimir a formação de tumor. TIMPs também apresentam efeitos divergentes em termos de morte celular. Por exemplo, *TIMP2* pode promover apoptose em um modelo de câncer colo-retal *in vivo*, mas protege células de melanoma B16 quanto à apoptose (Baker *et al.*, 2002). A estimulação do crescimento celular pelos TIMPs parece ser mediada pela ativação dependente de cAMP da proteína quinase A e aumento da fosforilação da tirosina (Ross *et al.*, 2003).

TIMP1 e *TIMP2* atuam como fatores de crescimento e fatores anti-apoptóticos em muitos tecidos e linhagens celulares normais e malignas, além de possuírem atividade anti-angiogênica (Pennanen *et al.*, 2004). Entretanto, segundo os autores, não é claro se *TIMP1* e *TIMP2* possuem um papel protetor contra a disseminação do tumor ou se eles contribuem para o crescimento tumoral. De acordo com Ross *et al.* (2003), a alta expressão de *TIMP2* está relacionada com um pobre prognóstico para pacientes com câncer de próstata, o que é contrário ao papel de supressor tumoral originalmente proposto para os TIMPs.

A característica patológica das células de glioma maligno é a sua capacidade para extensivamente invadir o parênquima cerebral nas regiões circunvizinhas do tumor, particularmente a matéria branca, tornando, dessa maneira, as terapias focais incapazes de controlar o crescimento tumoral, resultando em uma recorrência inevitável (Nakada *et al.*, 2003). As células de glioma parecem penetrar no tecido cerebral normal adjacente por meio do rompimento de componentes da matriz extracelular (Nakada *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004). Embora avanços significativos em termos de tratamentos dos pacientes com gliomas tenham emergido recentemente, o seu impacto na resposta clínica de pacientes tem sido ainda insignificante.

Resultados conflitantes são encontrados na literatura no que diz respeito à expressão de *TIMP2* em gliomas. Alguns autores demonstraram um baixo nível de

expressão em glioblastomas (Kachra *et al.*, 1999; Hur *et al.*, 2000) enquanto outros não mostraram nenhuma correlação entre o nível de *TIMP2* e o grau do tumor (Nakada *et al.*, 2001; Groft *et al.*, 2001). Entretanto, dados de que a super-expressão de *TIMP2* diminui a capacidade de invasão das células de glioma sugere que *TIMP2* pode ser um regulador chave na capacidade de invasão das células de glioma (Hoshi *et al.*, 2000). Nakada *et al.* (2003) mostraram que um baixo nível de produção de *TIMP2* está correlacionado com uma baixa sobrevivência dos pacientes acometidos pelo glioblastoma. Lu *et al.* (2004) sugeriram que *TIMP2* reduziu o potencial invasivo de células de glioma U87 possivelmente através da inibição da atividade de MMP2 e MMP9. De acordo com os autores, os níveis de MMPs são positivamente correlacionados ao grau dos gliomas malignos, apesar de que os níveis de *TIMP2* são negativamente correlacionados.

O forte caráter infiltrante, aliado à dificuldade da remoção cirúrgica completa é um dos mais importantes fatores relacionados ao pobre prognóstico para pacientes portadores de glioma, embora esse tipo de tumor raramente leve à metástase. Assim, a morbidade e mortalidade para casos de glioma de alto grau estão diretamente associadas à capacidade desses tumores de invadir e infiltrar-se nos tecidos vizinhos (Lu *et al.*, 2004).

Componentes do micro-ambiente tumoral como a matriz extracelular e outros fatores (fatores de crescimento, hormônios) podem influenciar a resposta das células às drogas antineoplásicas. Há evidências sugerindo que o contato célula-célula pode afetar a resistência a drogas (St Croix e Kerbel, 1997). Esses dados sugerem que as células cancerosas podem ativamente rearranjar seu ambiente para criar interações favoráveis com a matriz extracelular e diminuir a sua sensibilidade a apoptose (Wernyj e Morin, 2004). Muitas formas de resistência a drogas são diretamente atribuídas ao micro ambiente tumoral (Mellor *et al.*, 2005).

Um grupo de proteínas ligadas ao cálcio parece ser fortemente modulado em resposta à cisplatina, de acordo com o estudo realizado por Castagna *et al.* (2004). Calumenina, pertencente à subfamília CREC de proteínas ligadas ao cálcio, está envolvida na regulação dos níveis de cálcio celular. As proteínas CREC são encontradas na via secretora e a maioria destas possuem função de chaperona (Wajih *et al.*, 2004). Esta proteína está inserida no retículo endoplasmático e contém sete sítios de ligação ao cálcio de baixa afinidade. Embora seu preciso papel biológico não esteja claro, Castagna *et al.* (2004) relataram que a sua presença exclusivamente em células resistentes poderia sugerir um papel importante durante o início da quimio-resistência. O cálcio liberado do retículo endoplasmático sob condições de estresse é um mecanismo bem conhecido para indução de apoptose, baseado na ativação enzimática da caspase 12, mediado pela calpaína, uma cisteína-protease dependente de cálcio. Desse modo, seria razoável supor que os níveis aumentados de calumenina

nas células resistentes à cisplatina poderiam ser responsáveis pelo seqüestro de cálcio e, por conseqüência, relacionados com a redução da apoptose (Castagna *et al.*, 2004). Uma modulação similar de calumenina foi encontrada por Wu *et al.* (2002) em carcinomas de cabeça e pescoço.

CALUP (precursor de calumenina) também foi identificada como uma proteína associada à metástase, a qual é reprimida em linhagens celulares altamente metastáticas de câncer de cabeça e pescoço. No entanto, uma vez que os gliomas raramente sofrem metástase, possivelmente neste trabalho a repressão deste gene está mais relacionada com a ativação da apoptose do que com a metástase. Os níveis diminuídos de CALUP também foram detectados em células MHCC97-H. Entretanto, o mecanismo de envolvimento dessa proteína no processo de metástase tumoral permanece desconhecido (Ding *et al.*, 2004).

MARK1 é um membro da família MARK (*microtubule affinity regulating kinase*). Estudos prévios sugeriram que MARK poderia fosforilar proteínas associadas à microtúbulos (tais como tau, MAP2 e MAP4) em seus domínios de ligação e causar a sua dissociação e um aumento da dinâmica dos mesmos. A expressão de *MARK1* parece ser mais elevada em tecidos fetais comparada a tecidos adultos (Sun *et al.*, 2004). Esses autores relataram que *MARK1* pode muito possivelmente desempenhar um papel na diferenciação e desenvolvimento de malignidades no pulmão. O gene *MARK1* também foi encontrado reprimido após o tratamento com a cisplatina neste trabalho.

JNKs são ativadas por uma variedade de sinais de estresse, muito embora a conseqüência funcional dessa ativação dependa do tipo celular (Hochedlinger *et al.*, 2002). JNK1 e JNK2 são membros da família das MAPKs, a qual ainda inclui ERK e p38 (MacCorkle e Tan, 2004). Os principais substratos de JNK incluem o fator de transcrição c-Jun, ATF-2, Elk-1 e TP53 (Potapova *et al.*, 2000).

A ativação de JNK levou à indução de apoptose ou proliferação celular e transformação, dependendo do tipo celular e estímulo (Sabapathy *et al.*, 2004). A inibição de *JNK2* causou uma substancial elevação das freqüências de apoptose em células HeLa (MacCorkle e Tan, 2004). *JNK2* tem um papel mais significativo na progressão de tumores gliais primários que as outras isoformas de JNK (Tsuiki *et al.*, 2003). A inibição de *JNK2* aumenta a apoptose e impede a progressão no ciclo celular em linhagem de glioblastoma T98G (Potapova *et al.*, 2000). Em um trabalho anterior, esses autores mostraram que a indução de *JNK* após o dano causado pela cisplatina pode estar relacionada à ativação de mecanismos de reparo em células de glioma e a um conseqüente aumento da viabilidade dessas células (Potapova *et al.*, 1997). Portanto, pode-se sugerir que, no presente trabalho, a repressão de *JNK2* pode ser correlacionada com a indução de apoptose pelo tratamento com a cisplatina nas células de glioma U343 MG-a.

No agrupamento 2 (Figura 14) encontram-se os genes *INSR*, *SMC1L1* e *GNB1*, os quais foram reprimidos após o tratamento com a cisplatina. Esses genes participam do mecanismo de reparo de DSBs induzidas pelo tratamento com a cisplatina (*INSR* e *SMC1L1*) e com a transdução de sinal (*GNB1*). Todos esses genes, com exceção do *INSR*, foram apontados como genes reprimidos (análise pelo SAM).

O gene *INSR* (*insulin receptor*) é expresso em várias regiões do cérebro adulto e em desenvolvimento. A ligação da insulina leva a uma rápida autofosforilação do receptor de insulina, seguido pela fosforilação da tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS), o qual induz a ativação de vias *downstream* como a PI3K e a MAPK. Insulina e IGF-1 têm um papel na sobrevivência neuronal *in vitro* e *in vivo*. A insulina inibe a apoptose neuronal via ativação da PKB (Plum *et al.*, 2005). Hartmann *et al.* (2005) mostraram um importante papel do IGF-II no controle da proliferação em células de meduloblastomas. A via PI3K é uma das mais potentes vias de sinalização pró-sobrevivência. A ativação desta está intimamente associada ao aumento do grau do tumor, diminuição da apoptose e com as respostas clínicas adversas em pacientes com glioma (Chakravarti *et al.*, 2004).

Foi relatado que o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), que é a principal molécula sinalizadora do IGF-IR, interage diretamente com Rad51, levando a um aumento de HR através de um sinal de IGF-IR ativado por um mecanismo que controla a translocação de Rad51 para o sítio do dano. Células com um baixo nível de IGF-IR ou que expressam um mutante que falha ao fosforilar IRS-1, retêm Rad51 dentro do compartimento perinuclear e mostram significativamente menos reparo por HR. O IGF-IR (*receptor for insulin growth factor*) é uma tirosina quinase associada à membrana. O receptor ativado por ligante envia fortes sinais anti-apoptóticos e mitogênicos suportando o crescimento normal e patológico da célula (Trojanek *et al.*, 2003). O trabalho desses autores aponta para o papel direto do IRS-1 no reparo de DSBs induzidas pela cisplatina por meio do mecanismo HR.

Merkel *et al.* (2003) demonstraram que a ativação do receptor de insulina produz um aumento na expressão gênica e acúmulo de proteína XPD (esta proteína está relacionada ao reparo tipo NER). Os autores também mostraram que a insulina regula a síntese de XPD primariamente através da via de sinalização dependente de RAS. Esses dados são consistentes com relato mostrando que a ativação do receptor IGF-1 aumenta a proteção celular contra a radiação UV e aumenta a capacidade das células em reparar os danos causados por esse agente (Heron-Milhavet *et al.*, 2001).

O gene *SMC1L1* foi reprimido após o tratamento com a cisplatina, de acordo com a análise empregando o programa SAM e encontra-se no agrupamento 2. As proteínas SMC (*structural maintenance of chromosomes*) são altamente conservadas em eucariotos e elas formam três heterodímeros em combinações específicas: SMC1 e SMC3 constituem o cerne de complexos coesinas e SMC2 e SMC4 são

componentes dos complexos condensina. SMC5 e SMC6 fazem parte de um complexo relacionado com o reparo do DNA e respostas a *checkpoints* (Losada e Hirano, 2005). Essas proteínas são essenciais para a coesão da cromátide-irmã e atuam na condensação cromossômica, compensação de dose gênica e no reparo do DNA (Schar *et al.*, 2004). Há um grande conjunto de evidências de que a ação conjunta de coesinas e condensinas contribua para a segregação fidedigna dos cromossomos durante o ciclo mitótico. As coesinas estabelecem a coesão entre as cromátides-irmãs, isto é, entre as fitas de DNA em duplicação na fase S (Losada e Hirano, 2005).

Em células de mamíferos, SMC1 é fosforilada por ATM em resposta à radiação ionizante. Células de murino expressando uma forma não fosforilada de SMC1 mostrou uma sobrevivência diminuída somente após o dano no DNA, sugerindo que esta modificação da coesina é requerida para o seu papel no reparo do DNA, mas não para a sua função essencial na coesão (Kitagawa *et al.*, 2004). SMC1 é requerida para o eficiente e acurado reparo de uma variedade de DSBs e lesões no DNA por meio de um mecanismo que afeta o engajamento e resposta de HR e NHEJ (*non homologous end joining*) (Schar *et al.*, 2004). Os autores demonstraram o requerimento de SMC1 no reparo de DSBs induzidas pelo dano no DNA causado pela cisplatina e radiação ionizante.

A cisplatina predominantemente induz *crosslinks* intracadeia no DNA, sendo que frequentemente, esses aductos são eliminados pelo sistema de reparo NER. Entretanto, se estes escaparem da remoção pelo NER, irão bloquear a duplicação do DNA e, portanto, gerar estruturas de DNA que requerem a resolução por recombinação. Ainda, foi verificado que mutantes *smc1-2* são hiper-sensíveis à cisplatina. A hiper-sensibilidade do duplo mutante *smc1-2 rad52Δ* foi aditivamente aumentada (Rad52 faz parte do reparo homólogo) concluindo que o efeito aditivo do duplo mutante *smc1-2 rad52Δ* na sensibilidade à cisplatina reflete o funcionamento deficiente de vias de reparo de DNA diferentes do NER (Schar *et al.*, 2004). Portanto, as interações genéticas implicam um papel para Smc1p no reparo ou tolerância aos aductos de cisplatina-DNA por uma via adicional ao reparo homólogo dependente de rad52p.

No presente trabalho, observou-se uma repressão significativa do gene *SMC1L1* e indução de apoptose nas células U343 MG-a. O sistema de reparo homólogo também participa da remoção dos danos causados pela cisplatina, já que esta droga também induz DSBs. SMC1, como mencionado acima, toma parte no reparo de DSBs induzidas no DNA. O dano causado pelo tratamento com uma alta concentração de cisplatina pode ter sido excessivo, já que inibiu a expressão de *SMC1* (envolvido no reparo), e dessa maneira, converteu a resposta ao tratamento em morte celular por apoptose.

Um outro gene significativamente reprimido pela cisplatina foi *GNB1*. O gene *GNB1* (*Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1*), o qual atua na via de sinalização do receptor de acetilcolina e pode, portanto, estar relacionado com a transdução de sinal em células neurais; este foi encontrado inibido em linhagens de neuroblastoma (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2004). As células devem ter a capacidade para transmitir informações da sua membrana para o núcleo, como uma forma de responder aos estímulos externos. A transmissão de informação, referida como transdução de sinal, ocorre através de uma complexa rede de membranas ligadas e moléculas, incluindo proteínas, lipídeos e íons. Um dos mais bem caracterizados grupos de proteínas de sinalização é o grupo das proteínas de ligação a guanosina tri-fosfato (GTP) ou proteínas G. Essas proteínas citoplasmáticas estão envolvidas na iniciação e regulação de um número de diferentes vias de sinalização intracelular que controlam uma variedade de respostas celulares, tais como proliferação, migração e diferenciação. Devido ao fato dessas proteínas serem componentes de muitas vias de sinalização envolvendo sinais mitogênicos ou de crescimento, a regulação anormal da sinalização das proteínas G frequentemente resulta em transformação celular. O fato de que muitos diferentes tumores neurais possuem sinalização da proteína G anormal atesta a importância destas na regulação dos sinais mitogênicos. As proteínas G RAC e RHO são conhecidas por estarem relacionadas com a migração das células tumorais cerebrais e movimentos do citoesqueleto (Woods *et al.*, 2002).

No agrupamento 3 (Figura 15) destacam-se alguns genes envolvidos com o processo de apoptose, como *TNFRSF108 (DR5)*, *SRPK2* e *CRADD*, além do gene *NEDD5* que está relacionado com a citocinese em células de tumores cerebrais. Interessantemente, neste trabalho todos esses genes foram induzidos em resposta ao tratamento com a cisplatina, conforme demonstrado pela análise de agrupamento.

DR5 (death receptor 5) está relacionado com a indução de apoptose (Jin *et al.*, 2005). O estímulo apoptótico, incluindo genotoxinas, ativa a expressão de *DR5*, sensibilizando as células à morte por apoptose Shetty *et al.* (2005) determinaram que genotoxinas aumentam a expressão de *DR5* através da ativação dos fatores de transcrição TP53 e NFκB. Esses autores verificaram que TP53 e NFκB são requeridos para a expressão de *DR5* induzida por etoposide em células derivadas de epitélio. O NFκB está envolvido na sobrevivência celular e apoptose. Foi relatado que essa função contraditória poderia ser devida a subunidades diferencialmente reguladas do NFκB. A subunidade p65 é requerida para a expressão do gene *BCL-XL* e a subunidade c-Rel é requerida para a ativação de *DR5* (Chen *et al.*, 2003; Shetty *et al.*, 2005). Em condições apoptóticas, a subunidade p65 se liga aos promotores de *BCL-XL* e *XIAP*, diminuindo a expressão desses genes. Nagane *et al.* (2000) mostraram que agentes que causam danos no DNA como cisplatina e VP16 levaram à ativação

de *DR5* na maioria das células de glioma testadas, similarmente aos resultados observados no presente trabalho.

CRADD (*casp2 and ripk1 domain-containing adaptor with death domain*) também está envolvido no processo de apoptose, com papel na ativação de caspases (Ahmad *et al.*, 1997). A super-expressão de *CRADD* em células de mamíferos induziu apoptose e a ausência de expressão pode contribuir para a apoptose alterada em células de linfoma (Hofmann *et al.*, 2001). Esses dados indicam que as células U343 MG-a induziram sinais direcionados para a morte celular em resposta à cisplatina.

SRPKs desempenham um importante papel nas vias de sinalização governando a apoptose. SRPK1 e SRPK2 (*SFRS protein kinase 2*) são eficientemente clivadas *in vivo* durante a apoptose em uma maneira dependente de caspase, sendo esta clivagem inibida *in vivo* pela super-expressão de *BCL-2* ou *BCL-XL*. A clivagem de moléculas sinalizadoras por caspases ou outras proteases em resposta ao estresse celular tem um papel importante em muitos aspectos do fenótipo apoptótico (Kamachi *et al.*, 2002).

As septinas são uma família de GTPases do citoesqueleto possuindo um papel durante a citocinese. *NEDD5* é uma septina de mamíferos conhecida por associar-se com estruturas baseadas em actina, como fibras de estresse. Esse gene é expresso em uma série de linhagens celulares de tumores cerebrais (Sakai *et al.*, 2002).

O agrupamento 4 (Figura 16) envolve os genes *BCL2 like* (*BCL-XL*), *RRAS2* e *AHRA* (*RHOA*). Estes também estão relacionados com a apoptose. *BCL-XL* e *RHOA* foram significativamente reprimidos após o tratamento com a cisplatina, e se agruparam juntamente com o gene *RRAS2*. O gene *BCL-XL* já foi discutido anteriormente. O gene *RRAS2* (*related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2*) também conhecido por *TC21*, faz parte da família RAS de GTPases (Sharma *et al.*, 2005). Esses autores sugeriram que *TC21* pode estar envolvido na regulação nuclear de PI3K. A via PI3K tem um importante papel na transformação mediada pelo *TC21* e sobrevivência celular (Arora *et al.*, 2005). *TC21* está relacionado com estágios iniciais da tumorigênese no esôfago (Sharma *et al.*, 2005).

RHO GTPases (*Ras homolog*) são os principais reguladores da dinâmica do citoesqueleto em células eucarióticas e, conseqüentemente, têm um papel crucial em processos biológicos envolvendo o citoesqueleto, tais como controle da forma e motilidade celular. Além disso, as RHO GTPases afetam outras respostas celulares, como a regulação da transcrição, proliferação celular e transformação. Dessa forma, o papel de RHO GTPases como reguladores positivos da progressão do ciclo celular e transformação celular está firmemente estabelecido (Villalonga *et al.*, 2004).

As proteínas RAS e RHO GTPases constituem mediadores importantes dos processos celulares em resposta a diversos estímulos, tais como crescimento celular, apoptose, metabolismo de lipídeos, cito-arquiterura, tráfego através de membranas e

regulação transcricional. Entretanto, o aspecto negativo dessas proteínas multifuncionais está relacionado à ativação constitutiva destas (por mutações de ponto ou super-expressão), tornando-as insensíveis a sinais regulatórios. Neste caso, essas GTPases acionam sinais específicos que levam a um crescimento celular descontrolado, aumento da angiogênese, inibição da apoptose e instabilidade genética, o que resulta em desenvolvimento tumoral (Aznar e Lacal, 2001).

Há evidências de que RHOA estimula múltiplos eventos de sinalização, cuja relativa contribuição para o crescimento celular e transformação está longe de ser completamente compreendida. Foi demonstrado que *RHOA* pode promover a expressão de c-jun e que a atividade das proteínas Jun é requerida para a transformação celular induzida por *RHOA*. *RHOA* estimula uma cascata de quinases resultando na ativação de JNK através de ROCK (*RHO Kinase*), em paralelo à sua capacidade de regular o citoesqueleto de actina. JNK, por sua vez, regula eventos nucleares por meio da fosforilação direta de fatores de transcrição ligados ao promotor c-jun. A capacidade de ROCK em estimular JNK provê um mecanismo celular pelo qual *RHOA* e seus GEFs (*guanine exchange factors*) possam estimular JNK (Marinissen *et al.*, 2004).

Hippenstiel *et al.* (2002) mostraram que proteínas RHO são essenciais para a ativação de NFκB dependente de TNF-α em células endoteliais humanas. Além disso, a inibição da proteína RHO não bloqueou a degradação de IκBα ou IκBβ dependente de TNF-α mas reduziu a translocação de NFκB, a ligação ao DNA e a transcrição gênica dependente de NFκB. Rattan *et al.* (2003) mostraram que *RHOA* pode negativamente regular NFκB, ou seja, a inibição de *RHOA* leva à ativação de NFκB via ativação de IKKα e indução de iNOS. Esses autores relataram que a repressão de *RHOA* ativa a via NFκB-CBP/p300, a qual induz a expressão de iNOS em células de glioma C6.

Kang *et al.* (2005) demonstraram que *RHOA* regula E2F-1 em carcinoma de próstata (PC-3), dessa forma liberando as células do bloqueio em G1/S. Adicionalmente à perturbação no ciclo celular, os autores também verificaram que *RHOA* regula a via apoptótica, a qual inclui clivagem da caspase 8, BID, caspase 3 e PARP. Especificamente, *RHOA* e *caRHOA* aumentaram a resistência à apoptose induzida por etoposide, 5-fluoruracil (5-FU) e taxol, enquanto aumentaram a sensibilidade à vincristina, o que claramente demonstra um padrão diferencial de mecanismo de ação das drogas. Portanto, *RHOA* pode atuar como um modulador diferencial da morte celular induzida por agentes antitumorais, o que pode gerar informações importantes para o desenvolvimento de protocolos de tratamento. Ader *et al.* (2003) mostraram que a inibição de RHO leva a uma radio-sensibilização em células de glioblastoma. No presente trabalho, a inibição de *RHOA*, causada pelo

tratamento com a cisplatina, pode estar relacionada com a sensibilização das células U343 MG-a a essa droga.

A inibição de ROCK e o conseqüente desarranjo das fibras de estresse têm sido relacionados com a indução de apoptose em vários tipos celulares (Moore *et al.*, 2004). Além das alterações do citoesqueleto, outras modificações próprias do processo apoptótico, como externalização da fosfatidilserina, vesiculação, arredondamento e destacamento das células podem ser causadas pela inibição de ROCK ou de RHO GTPases (Spano *et al.*, 2000). Além disso, Moore *et al.* (2004) demonstraram que a inibição de ROCK rompe o citoesqueleto de actina e gera apoptose em células epiteliais do trato respiratório. Da mesma maneira, o trabalho de Agarwal *et al.* (2002) sugere que lovastatina, um inibidor de RHOA, pode induzir apoptose em células epiteliais intestinais.

Recentemente, um número de trabalhos tem mostrado que a expressão de *RHOA* foi aumentada em alguns tipos de tumores, como câncer de mama, ovário e gástrico (Fritz *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004) e que o nível de expressão de *RHOA* parece estar positivamente correlacionado com o progresso desses carcinomas, sugerindo que *RHOA* possa ter uma função importante na tumorigênese e progressão tumoral. De acordo com Liu *et al.* (2004), a inibição da expressão de *RHOA* por siRNA poderia suprimir o crescimento celular de câncer gástrico e aumentar a sensibilidade dessas células à drogas quimioterapêuticas.

A expressão de outras GTPases, como *RAB5* e *RAC1*, além de *RHOA*, as quais são reguladores da maquinaria endocítica, foi reduzida em células resistentes à cisplatina, KB-CP20 (derivada de carcinoma epidérmico humano) e 7404-CP20 (derivada de carcinoma de fígado humano) (Shen *et al.*, 2004). Em células de glioma U343 MG-a, utilizadas no presente trabalho, o gene *RHOA* foi significativamente reprimido após o tratamento com a cisplatina (25 μ M por 48 h).

O gene *LIMK2*, o qual não faz parte de nenhum dos agrupamentos mencionados, mas está na mesma via de *RHOA*, também foi significativamente reprimido (análise pelo programa SAM) após o tratamento com a cisplatina, e, portanto, será discutido a seguir. *LIMK2* é especificamente ativado por ROCK *downstream* a *RHOA* (Maekawa *et al.*, 1999; Sumi *et al.*, 2001). Recentes estudos sugerem que *LIMK2* é ativado por RHO e ROCK e induz a formação de fibras de estresse, adesão focal e vesiculação na membrana durante o processo apoptótico. Inibidores de caspase bloqueiam a condensação da cromatina e a fragmentação nucleossômica, mas não a formação de vesículas na membrana, sugerindo que esta é regulada independentemente de vias induzidas por caspase. Entretanto, o mecanismo molecular pelo qual *LIMK2* é ativado *downstream* a RHO permanece a ser elucidado (Amano *et al.*, 2001). *LIMK1* e *LIMK2* são predominantemente expressados em tecidos neurais fetal e adulto, tais como cérebro, cordão espinhal e órgãos sensores, o que

sugere que LIMK exerce um papel importante no desenvolvimento neural (Yang *et al.*, 2004).

A contração dinâmica e formação de vesículas da membrana vistas em células apoptóticas são dependentes da força intracelular gerada pelo citoesqueleto de actina-miosina. Esses eventos morfológicos são controlados por ROCK I, efetor de *RHO*. Substratos adicionais de ROCK que podem contribuir para a contratilidade de actina-miosina são LIMK1 e LIMK2 (Sumi *et al.*, 2001; Croft *et al.*, 2005). A super-expressão de *LIMK2* induziu a formação de fibras de estresse e de vesículas na membrana (Amano *et al.*, 2001), sugerindo que a ativação de *LIMK1/2* deva contribuir para a morfologia apoptótica (Croft *et al.*, 2005). As fibras de estresse e as adesões focais (as quais ligam as fibras de estresse à matriz extracelular) são muito importantes para a adesão das células ao substrato ou às células vizinhas, e, geralmente, as fibras de estresse são perdidas quando as células rompem o contato com o substrato (Riento e Ridley, 2003).

LIMK2 é ativado especificamente por *RHOA* e *CDC42*, pertencentes à família RHO GTPases (Sumi *et al.*, 2001), e portanto, a repressão de *RHOA* após o tratamento com a cisplatina pode ter levado a uma repressão de *LIMK2*.

Células metastáticas têm propriedades tais como adesão a camadas celulares hospedeiras e subsequente migração transcelular, o que envolve ação integrada de muitos produtos gênicos, a maioria dos quais culminam em modular o citoesqueleto de actina, que é crucial para a morfogênese celular, motilidade, adesão e citocinese (Suyama *et al.*, 2004). A motilidade celular é essencial para que as células tumorais malignas sejam capazes de invadir tecidos vizinhos (Matsumoto *et al.*, 2001), sendo que o glioblastoma é caracterizado por uma agressiva invasão tumoral, tornando a remoção cirúrgica completa quase impossível (Lu *et al.*, 2004). A via RHO/ROCK/LIMK está provavelmente envolvida com as propriedades metastáticas de tumores. Suyama *et al.* (2004) mostraram que a redução da proteína LIMK2 restringe as propriedades metastáticas das células sem afetar a sua proliferação. Esses resultados sugerem que a via RHO/ROCK/LIMK pode ser considerada um alvo potencial para a terapia anti-metástase.

Os genes *ING1*, *NFκBIE*, *DYRK3* e *P4HB*, os quais foram significativamente reprimidos sob análise pelo SAM, não se agruparam com os genes descritos acima, mas como são relacionados à apoptose ou sobrevivência celular, serão discutidos a seguir.

ING1 é raramente mutado, mas sua expressão é frequentemente reduzida em tumores humanos (Cheung e Li, 2001; Gong *et al.*, 2005). Há evidências de que a família de proteínas *ING1* apresenta funções regulatórias na oncogênese, apoptose, reparo do DNA, regulação do ciclo celular e angiogênese (Tallen *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005). *P33ING1* (*inhibitor of growth 1*) foi identificado em um sistema de seleção

para genes cuja inativação promove a transformação neoplásica (Cheung e Li, 2001; Goeman *et al.*, 2005). P33ING1 é uma proteína nuclear que interage com o supressor tumoral TP53, sendo que a sua super-expressão inibe a progressão do ciclo celular na fase G1 de uma maneira dependente de TP53 (Goeman *et al.*, 2005). A expressão aberrante ou mutações no gene *P33ING1* foram relatadas em tumores primários e linhagens tumorais de diferentes origens, incluindo neuroblastoma, linhagens celulares linfóides, câncer de mama, câncer gástrico e carcinomas de cabeça e células escamosas. Além disso, *P33ING1* parece participar na regulação da longevidade celular. Os níveis de *P33ING1* são aumentados em fibroblastos e células epiteliais humanas senescentes, enquanto a inibição da expressão gênica de *ING1* levou a uma extensão do tempo de vida replicativo de fibroblastos humanos primários (Goeman *et al.*, 2005). Esses autores mostraram que a expressão ectópica de *P33ING1* é suficiente para induzir um bloqueio do ciclo celular em fibroblastos humanos primários com muitas características de senescência celular, sugerindo um importante papel deste gene na implementação do bloqueio da senescência.

Desde que vários estudos têm relacionado o *P33ING1b* na regulação da TP53, a inibição de *P33ING1b* em gliomas astrocíticos pode contribuir para a perda do controle do crescimento e imortalização, mesmo naqueles tumores com uma função intacta do TP53 (Tallen *et al.*, 2004). Embora a expressão de *P33ING1b* e TP53 não seja diretamente correlacionada, estas mostram uma sobreposição funcional nos processos de apoptose e bloqueio no ciclo celular. Além disso, a super-expressão de *P33ING1b* pode ativar genes alvos de TP53, incluindo *CDKN1A* (p21^{WAF1}) e *BAX*. Esses dados sugerem que *ING1* pode parcialmente exercer seu efeito inibidor do crescimento em cooperação com o TP53 (Gong *et al.*, 2005). Qin *et al.* (2002) mostraram que em células Hep3B (carcinoma hepatocelular) o gene *P33ING1* foi induzido após o tratamento com 16 µg/ml de cisplatina por 12 h, contrário ao ocorrido no presente trabalho, onde esse gene foi reprimido após o tratamento por 48 h com a cisplatina (25 µM).

Uma outra maneira pela qual a proteína P33ING1b poderia exercer os seus efeitos biológicos é por meio de seu *motif* PIP, permitindo uma ligação ao PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), induzida por dano no DNA. Isso poderia promover a apoptose por alterar a função do PCNA através do deslocamento de proteínas específicas envolvidas no controle do ciclo celular e reparo do DNA, tais como GADD45 ou CDKN1A (Scott *et al.*, 2001; Tallen *et al.*, 2004). Tallen *et al.* (2004) avaliaram 100 pacientes com tumores do sistema nervoso central com relação ao locus *ING1* e verificaram que a expressão de *ING1* em todos os tumores astrocíticos estudados (graus de I a IV de acordo com a OMS) foi mais baixa que em tecidos controle do lobo temporal.

Assim, o principal papel das proteínas ING1 relaciona-se à manutenção da estabilidade genômica por meio da orientação da resposta celular ao insulto genotóxico em direção à parada do crescimento e reparo ou, caso o dano seja demasiado severo, a indução de morte celular (Gong *et al.*, 2005).

NFκB é um fator de transcrição nuclear que é ativado em certos tipos de câncer e em resposta à quimioterapia e radiação. NFκB normalmente reside no citoplasma como uma forma inativa, em um complexo com IκBα (proteína inibidora). A fosforilação de IκBα por quinases *upstream* promove a sua degradação, permitindo que NFκB transloque rapidamente para o núcleo e induza genes alvos que estão envolvidos na progressão do ciclo celular, apoptose, sobrevivência celular, adesão/angiogênese celular, tumorigênese e respostas imune/inflamatórias (Mabuchi *et al.*, 2004; Ravi e Bedi, 2004; Ghobrial *et al.*, 2005).

As quinases IκB (IKKs) são responsáveis pela fosforilação de IκB. IKK1 (IKKα) e IKK2 (IKKβ) mediam a fosforilação sítio específica de IκBs, o que aciona a degradação desses inibidores de NFκB. Um dos genes ativado pelo NFκB é o *IκBα*, sendo que a resultante síntese *de novo* de IκBα restaura o nível intracelular desse inibidor, o qual diminui durante o curso de ativação de NFκB (Chen e Greene, 2004).

A forma de quimioterapia usada poderia determinar se NFκB possui um efeito pró- ou anti-apoptótico. Por exemplo, a maioria dos agentes quimioterápicos induz muitas formas de dano no DNA e a inibição da ativação de NFκB promove morte celular. Entretanto, foi proposto que NFκB poderia ser requerido para a morte celular induzida por taxol e que a indução de morte celular por peróxido de hidrogênio requer NFκB (Mabuchi *et al.*, 2004). Isto é consistente com os estudos que sugerem o papel pró-apoptótico de NFκB, dependendo do tipo de estímulo ao qual as células são expostas.

Sob condições fisiológicas, a ativação de NFκB induz resistência ao estímulo apoptótico por meio da ativação de muitas proteínas incluindo fator associado ao receptor TNF, IAP e XIAP. No entanto, em resposta a certos estímulos, a ativação de NFκB pode levar à indução de apoptose, o que pode ser explicado pela ativação de muitas proteínas pró-apoptóticas como IRF1 (*interferon-regulated factor-1*), c-myc, TP53 e caspases, tais como a caspase 1. Em muitas infecções virais a indução de apoptose pelo vírus é dependente da ativação de NFκB (Ghobrial *et al.*, 2005). No presente trabalho, o gene *NFKBIE* (inibidor de NFκB) foi significativamente reprimido. Essa repressão pode estar relacionada à ativação do gene *NFKB* que, neste caso, teve um efeito pró-apoptótico induzindo morte nas células de glioma U343 MG-a.

DYRK3 foi reprimido após o tratamento com a cisplatina neste trabalho. DYRK são subfamílias de proteínas quinase relacionadas às MAPK (Li *et al.*, 2002). As DYRK quinases desempenham um papel na proliferação celular, sobrevivência e desenvolvimento (Zhang *et al.*, 2005). A expressão de *DYRK3* em células

hematopoiéticas FDCW2 dependentes de citocina levou a uma inibição da morte celular programada, sugerindo o papel dessas proteínas em outras rotas de sinalização (Li *et al.*, 2002). Entre as múltiplas isoformas de DYRK de mamíferos (descritas em ratos, camundongos e humanos) somente DYRK1A foi bem estudada (Zhang *et al.*, 2005). No presente trabalho, a indução de apoptose nas células astrocíticas pode, também, estar correlacionada à inibição de *DYRK3*.

A super-expressão do gene *PDI* (*P4HB*) tem um efeito neuroprotetor contra hipóxia em células neuronais, ou seja, significativamente suprimiu a apoptose induzida por isquemia no hipocampo (Tanaka *et al.*, 2000). Em resumo, esses autores demonstraram que o gene *PDI* é regulado em resposta à hipóxia ou isquemia transitória em astrócitos. Um outro trabalho mostra que a super-expressão de *PDI* (*protein disulfide isomerase*) resulta na atenuação da perda da viabilidade celular induzida por hipóxia em uma linhagem de neuroblastoma humano (SK-N-MC). Este gene é localizado no retículo endoplasmático e, portanto, é regulado em resposta a estresse nesta organela, como hipóxia, por exemplo (Nomura, 2004). As células de glioma U343 MG-a apresentaram uma repressão de *P4HB*, o que pode ser relacionado à indução de apoptose.

Estudos recentes com gliomas sugerem que a regulação da expressão gênica em tumores poderia ser alterada logo no início do processo de progressão neoplásica, adquirindo funções alteradas e distintas dos mecanismos regulatórios normais (Noble e Dietrich, 2004). Os gliomas são tumores geneticamente heterogêneos, sugerindo que um conjunto de múltiplos produtos gênicos é responsável por regular o comportamento e a resposta desses tumores (Rich *et al.*, 2005). Há expectativas de que os perfis moleculares dos pacientes com glioma, relativos a dados de expressão gênica, possam prever a resposta destes. Essas análises têm gerado grandes conjuntos de genes diferencialmente modulados, os quais podem em potencial, regular o processo de progressão tumoral (Bassi *et al.*, *dados não publicados*; Rich *et al.*, 2005). Konopka e Bonni (2003) mantêm a visão de que tratamentos eficientes poderão ser desenvolvidos uma vez que fatores genéticos e moleculares, responsáveis pelo desenvolvimento desses tumores, sejam elucidados.

Alguns trabalhos têm mostrado que a ativação crônica de vias de sinalização intracelular poderia ser crucial para a formação e progressão de tumores cerebrais. A ativação crônica das vias PI3K e Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), por exemplo, promovem a formação e progressão de glioma em camundongos modelos. Novas abordagens estão sendo desenvolvidas, cujo alvo terapêutico reside em proteínas ou vias de sinalização específicas que estejam alteradas em células tumorais, dessa maneira gerando tratamentos potencialmente mais eficazes e menos tóxicos, contribuindo para aumentar e melhorar a sobrevivência de pacientes portadores de tumores (Mischel *et al.*, 2004).

Muitos dos genes com expressão alterada após o tratamento com a cisplatina (indicados no presente estudo) não têm sido descritos na literatura como sendo genes diretamente associados a respostas ao estresse genotóxico, quer sejam em células normais, quanto em linhagens tumorais. O advento da tecnologia de micro-arranjos de cDNA e sua capacidade para simultânea sondagem do genoma em arranjos de alta densidade permitem a análise do padrão de expressão de um grande número de genes e produz uma enorme quantidade de dados válidos, indicando genes potencialmente envolvidos em determinados mecanismos. Embora o mRNA não seja o último produto de um gene, a transcrição é o primeiro passo na regulação gênica, sendo que informações sobre níveis de transcrição são válidas na compreensão das redes regulatórias gênicas.

Assim, em conjunto, os resultados mostram um sério comprometimento do metabolismo celular como um todo, em resposta aos danos causados pela cisplatina, o que provavelmente justifica os dados sobre a repressão transcricional de genes de múltiplas classes, principalmente ligadas ao metabolismo, alterações no citoesqueleto, apoptose ou sobrevivência, regulação de processos fisiológicos e respostas a estímulos.

Portanto, os dados apresentados neste trabalho caracterizam alguns aspectos dos mecanismos de ação da cisplatina, demonstrando que esta interfere marcadamente na capacidade proliferativa das células, reduzindo drasticamente a sobrevivência das mesmas, conforme os resultados apresentados nos testes de citotoxicidade e sobrevivência celular. Segundo a literatura, a droga causa aductos no DNA, que podem bloquear a duplicação, a transcrição e induzir apoptose. No presente trabalho, a cisplatina induziu uma certa frequência de apoptose nas células MRC-5 e U343 MG-a, mas não de forma acentuada. Os resultados de expressão gênica para as células de glioma apontam para um comprometimento, principalmente do metabolismo dessas células, já que muitos genes envolvidos nesse processo foram reprimidos, além de alterações drásticas no citoesqueleto, o que é compatível com a indução de apoptose e de outros tipos de morte. Além disso, genes envolvidos no processo de apoptose ou sobrevivência celular foram modulados em resposta à cisplatina, sendo encontrados genes anti-apoptóticos (*BCL-XL*) reprimidos e genes pró-apoptóticos (*DR5* e *CRADD*, por exemplo) sendo induzidos pela droga.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho sobre as respostas das células U343 MG-a e MRC-5 aos danos causados pelo agente antitumoral cisplatina possibilitaram as seguintes conclusões, em termos de sobrevivência celular, indução de apoptose e análise da expressão gênica pelo método de micro-arranjos de cDNA, este último somente para a linhagem U343 MG-a.

1- As concentrações de cisplatina utilizadas (12,5 a 300 μM) reduziram fortemente a sobrevivência das células MRC-5 (a cerca de 1%) e das células U343 MG-a (a menos que 1%) após cinco dias de tratamento, sendo que o tratamento das mesmas células por 24 h com iguais concentrações de cisplatina reduziu a sobrevivência em cerca de 20-80% (teste de citotoxicidade).

2- Ambas as linhagens utilizadas sofreram apoptose após o tratamento com diversas concentrações de cisplatina (12,5, 25 e 50 μM); a linhagem U343 MG-a apresentou uma frequência máxima de 20,4% de apoptose, induzida pelo tratamento com 25 μM por 72 h e a MRC-5 mostrou uma frequência de 11,0% (50 μM de cisplatina por 48 h). Os índices de apoptose induzida nas duas linhagens não justificam a grande redução na sobrevivência celular após cinco dias de tratamento com a cisplatina, indicando que outras formas de morte celular podem ser ativadas em resposta ao tratamento com a droga.

3- Os genes envolvidos principalmente com o metabolismo celular (*DYRK3*, *MARK1*, *LIMK2*, *VDP* e *P4HB*), alterações no citoesqueleto (*RHOA*, *LIMK2* e *MARK1*), invasão ou metástase (*LIMK2*, *TIMP2* e *CALU*) e apoptose ou sobrevivência celular (*BCL-XL*, *ING1*, *RHOA*, *VDP*, *TIMP2*, *DYRK3* e *NFKBIE*) foram significativamente ($p \leq 0,05$) reprimidos em resposta ao tratamento com 25 μM de cisplatina por 48 h nas células U343 MG-a, reforçando o fato de que a cisplatina causa danos não somente ao material genético, mas também em outras estruturas celulares como citoesqueleto e organelas, por exemplo. Além disso, as alterações no citoesqueleto são compatíveis com os processos de morte celular, inclusive por apoptose. A indução dos genes *CRADD*, *DR5* e *SRPK2* pode também ter sido relacionada à indução de apoptose nas células astrocíticas, já que esses são genes envolvidos no processo apoptótico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abend, M. (2003). "Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy." *Int J Radiat Biol* **79**(12): 927-41.
- Ader, I., C. Delmas, J. Bonnet, P. Rochaix, G. Favre, C. Toulas e E. Cohen-Jonathan-Moyal (2003). "Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts." *Oncogene* **22**(55): 8861-9.
- Agarwal, B., B. Halmos, A. S. Feoktistov, P. Protiva, W. G. Ramey, M. Chen, C. Pothoulakis, J. T. Lamont e P. R. Holt (2002). "Mechanism of lovastatin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells." *Carcinogenesis* **23**(3): 521-8.
- Ahmad, M., S. M. Srinivasula, L. Wang, R. V. Talanian, G. Litwack, T. Fernandes-Alnemri e E. S. Alnemri (1997). "CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP." *Cancer Res* **57**(4): 615-9.
- Al-Mohanna, M. A., P. S. Manogaran, Z. Al-Mukhalafi, A. A.-H. K e A. Aboussekhra (2004). "The tumor suppressor p16(INK4a) gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin." *Oncogene* **23**(1): 201-12.
- Amano, T., K. Tanabe, T. Eto, S. Narumiya e K. Mizuno (2001). "LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505." *Biochem J* **354**(Pt 1): 149-59.
- Arora, S., A. Matta, N. K. Shukla, S. V. Deo e R. Ralhan (2005). "Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma." *Mol Carcinog* **42**(2): 97-108.
- Aylon, Y., B. Liefshitz e M. Kupiec (2004). "The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle." *Embo J* **23**(24): 4868-75.
- Aznar, S. e J. C. Lacal (2001). "Rho signals to cell growth and apoptosis." *Cancer Lett* **165**(1): 1-10.
- Baker, A. H., D. R. Edwards e G. Murphy (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." *J Cell Sci* **115**(Pt 19): 3719-27.
- Bartek, J. e J. Lukas (2001). "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 738-47.
- Bartek, J., J. Lukas e J. Bartkova (1999). "Perspective: defects in cell cycle control and cancer." *J Pathol* **187**(1): 95-9.
- Bassi, C. L. (2004). "Cellular responses to the genotoxic stress induced by the chemotherapeutic-drug Temozolomide in U343 MG-a glioma cell line." *Dados não Publicados*.
- Beljanski, V., L. G. Marzilli e P. W. Doetsch (2004). "DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs." *Mol Pharmacol* **65**(6): 1496-506.
- Berardi, P., M. Russell, A. El-Osta e K. Riabowol (2004). "Functional links between transcription, DNA repair and apoptosis." *Cell Mol Life Sci* **61**(17): 2173-80.

- Bernstein, C., H. Bernstein, C. M. Payne e H. Garewal (2002). "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis." *Mutat Res* **511**(2): 145-78.
- Bohm, I. e H. Schild (2003). "Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death." *Mol Imaging Biol* **5**(1): 2-14.
- Brabec, V. e J. Kasparkova (2005). "Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs." *Drug Resist Updat* **8**(3): 131-46.
- Brandes, A. A., L. M. Pasetto, F. Vastola e S. Monfardini (2000). "Temozolomide in patients with high grade gliomas." *Oncology* **59**(3): 181-6.
- Brown, J. M. e L. D. Attardi (2005). "The role of apoptosis in cancer development and treatment response." *Nat Rev Cancer* **5**(3): 231-7.
- Brozovic, A., G. Fritz, M. Christmann, J. Zisowsky, U. Jaehde, M. Osmak e B. Kaina (2004). "Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance." *Int J Cancer* **112**(6): 974-85.
- Castagna, A., P. Antonioli, H. Astner, M. Hamdan, S. C. Righetti, P. Perego, F. Zunino e P. G. Righetti (2004). "A proteomic approach to cisplatin resistance in the cervix squamous cell carcinoma cell line A431." *Proteomics* **4**(10): 3246-67.
- Ceraline, J., G. Deplanque, F. Noel, S. Natarajan-Ame, J. P. Bergerat e C. Klein-Soyer (2003). "Sensitivity to cisplatin treatment of human K1 thyroid carcinoma cell lines with altered p53 function." *Cancer Chemother Pharmacol* **51**(1): 91-5.
- Chakravarti, A., G. Zhai, Y. Suzuki, S. Sarkesh, P. M. Black, A. Muzikansky e J. S. Loeffler (2004). "The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas." *J Clin Oncol* **22**(10): 1926-33.
- Chaney, S. G., S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu e M. Faldu (2004). "Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function." *J Inorg Biochem* **98**(10): 1551-9.
- Chen, L. F. e W. C. Greene (2004). "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 392-401.
- Chen, X., K. Kandasamy e R. K. Srivastava (2003). "Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling." *Cancer Res* **63**(5): 1059-66.
- Cheung, K. J., Jr. e G. Li (2001). "The tumor suppressor ING1: structure and function." *Exp Cell Res* **268**(1): 1-6.
- Chiu, R., L. Novikov, S. Mukherjee e D. Shields (2002). "A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis." *J Cell Biol* **159**(4): 637-48.
- Choi, B. K., C. H. Choi, H. L. Oh e Y. K. Kim (2004). "Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in A172 human glioma cells." *Neurotoxicology* **25**(6): 915-24.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, W. P. Roos e B. Kaina (2003). "Mechanisms of human DNA repair: an update." *Toxicology* **193**(1-2): 3-34.

- Cohen, S. M. e S. J. Lippard (2001). "Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **67**: 93-130.
- Cole, R. S., D. Levitan e R. R. Sinden (1976). "Removal of psoralen interstrand cross-links from DNA of Escherichia coli: mechanism and genetic control." *J Mol Biol* **103**(1): 39-59.
- Croft, D. R., M. L. Coleman, S. Li, D. Robertson, T. Sullivan, C. L. Stewart e M. F. Olson (2005). "Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration." *J Cell Biol* **168**(2): 245-55.
- Cullinane, C., S. J. Mazur, J. M. Essigmann, D. R. Phillips e V. A. Bohr (1999). "Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cell extracts by cisplatin DNA damage." *Biochemistry* **38**(19): 6204-12.
- Datta, K., P. Shah, T. Srivastava, S. G. Mathur, P. Chattopadhyay e S. Sinha (2004). "Sensitizing glioma cells to cisplatin by abrogating the p53 response with antisense oligonucleotides." *Cancer Gene Ther* **11**(8): 525-31.
- De Silva, I. U., P. J. McHugh, P. H. Clingen e J. A. Hartley (2000). "Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **20**(21): 7980-90.
- DeMeester, S. L., Y. Qiu, T. G. Buchman, R. S. Hotchkiss, K. Dunnigan, I. E. Karl e J. P. Cobb (1998). "Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis." *Crit Care Med* **26**(9): 1500-9.
- Diaz, R., M. V. Jorda, G. Reynes, J. Aparicio, A. Segura, R. Amador, V. Calderero e A. Beltran (2005). "Neoadjuvant cisplatin and etoposide, with or without tamoxifen, prior to radiotherapy in high-grade gliomas: a single-center experience." *Anticancer Drugs* **16**(3): 323-9.
- Ding, S. J., Y. Li, X. X. Shao, H. Zhou, R. Zeng, Z. Y. Tang e Q. C. Xia (2004). "Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials." *Proteomics* **4**(4): 982-94.
- Dodier, P. e A. Piche (2005). "Bcl-X(L) is functionally non-equivalent for the regulation of growth and survival in human ovarian cancer cells." *Gynecol Oncol*.
- Doetsch, P. W., N. J. Morey, R. L. Swanson e S. Jinks-Robertson (2001). "Yeast base excision repair: interconnections and networks." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**: 29-39.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown e D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-8.
- Esashi, F., N. Christ, J. Gannon, Y. Liu, T. Hunt, M. Jasin e S. C. West (2005). "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair." *Nature* **434**(7033): 598-604.
- Fehlauer, F., A. D. Barten-Van Rijbroek, L. J. Stalpers, S. Leenstra, J. Lindeman, I. Tjahja, D. Troost, J. G. Wolbers, P. van der Valk e P. Sminia (2000). "Additive cytotoxic effect of cisplatin and X-irradiation on human glioma cell cultures derived from biopsy-tissue." *J Cancer Res Clin Oncol* **126**(12): 711-6.
- Fritz, G., I. Just e B. Kaina (1999). "Rho GTPases are over-expressed in human tumors." *Int J Cancer* **81**(5): 682-7.

- Fuertes, M. A., C. Alonso e J. M. Perez (2003). "Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance." *Chem Rev* **103**(3): 645-62.
- Fujiwara, T., E. A. Grimm, T. Mukhopadhyay, W. W. Zhang, L. B. Owen-Schaub e J. A. Roth (1994). "Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene." *Cancer Res* **54**(9): 2287-91.
- Furuta, T., T. Ueda, G. Aune, A. Sarasin, K. H. Kraemer e Y. Pommier (2002). "Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells." *Cancer Res* **62**(17): 4899-902.
- Gaya, A., J. Rees, A. Greenstein e J. Stebbing (2002). "The use of temozolomide in recurrent malignant gliomas." *Cancer Treat Rev* **28**(2): 115-20.
- Ghobrial, I. M., T. E. Witzig e A. A. Adjei (2005). "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." *CA Cancer J Clin* **55**(3): 178-94.
- Goeman, F., D. Thormeyer, M. Abad, M. Serrano, O. Schmidt, I. Palmero e A. Baniahmad (2005). "Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras." *Mol Cell Biol* **25**(1): 422-31.
- Gong, W., K. Suzuki, M. Russell e K. Riabowol (2005). "Function of the ING family of PHD proteins in cancer." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 1054-65.
- Groft, L. L., H. Muzik, N. B. Rewcastle, R. N. Johnston, V. Knauper, M. A. Lafleur, P. A. Forsyth e D. R. Edwards (2001). "Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas." *Br J Cancer* **85**(1): 55-63.
- Hanawalt, P. C. (2001). "Controlling the efficiency of excision repair." *Mutat Res* **485**(1): 3-13.
- Hartmann, W., A. Koch, H. Brune, A. Waha, U. Schuller, I. Dani, D. Denkhau, W. Langmann, U. Bode, O. D. Wiestler, K. Schilling e T. Pietsch (2005). "Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells." *Am J Pathol* **166**(4): 1153-62.
- Hartwell, L. H. e M. B. Kastan (1994). "Cell cycle control and cancer." *Science* **266**(5192): 1821-8.
- Heiger-Bernays, W. J., J. M. Essigmann e S. J. Lippard (1990). "Effect of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) and related platinum complexes on eukaryotic DNA replication." *Biochemistry* **29**(36): 8461-6.
- Hengstschlager, M., K. Braun, T. Soucek, A. Miloloza e E. Hengstschlager-Ottinad (1999). "Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle." *Mutat Res* **436**(1): 1-9.
- Heron-Milhavet, L., M. Karas, C. M. Goldsmith, B. J. Baum e D. LeRoith (2001). "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor activation rescues UV-damaged cells through a p38 signaling pathway. Potential role of the IGF-I receptor in DNA repair." *J Biol Chem* **276**(21): 18185-92.

- Hippenstiel, S., B. Schmeck, J. Seybold, M. Krull, C. Eichel-Streiber e N. Suttrop (2002). "Reduction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) related nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) translocation but not inhibitor kappa-B (Ikappa-B)-degradation by Rho protein inhibition in human endothelial cells." *Biochem Pharmacol* **64**(5-6): 971-7.
- Hochedlinger, K., E. F. Wagner e K. Sabapathy (2002). "Differential effects of JNK1 and JNK2 on signal specific induction of apoptosis." *Oncogene* **21**(15): 2441-5.
- Hofmann, W. K., S. de Vos, K. Tsukasaki, W. Wachsman, G. S. Pinkus, J. W. Said e H. P. Koeffler (2001). "Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray." *Blood* **98**(3): 787-94.
- Hopkins-Donaldson, S., R. Cathomas, A. P. Simoes-Wust, S. Kurtz, L. Belyanskaya, R. A. Stahel e U. Zangemeister-Wittke (2003). "Induction of apoptosis and chemosensitization of mesothelioma cells by Bcl-2 and Bcl-xL antisense treatment." *Int J Cancer* **106**(2): 160-6.
- Hoshi, M., A. Harada, T. Kawase, K. Uyemura e T. Yazaki (2000). "Antitumoral effects of defective herpes simplex virus-mediated transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene in malignant glioma U87 in vitro: consequences for anti-cancer gene therapy." *Cancer Gene Ther* **7**(5): 799-805.
- Huang, Z. Y., R. L. Baldwin, N. M. Hedrick e D. H. Gutmann (2002). "Astrocyte-specific expression of CDK4 is not sufficient for tumor formation, but cooperates with p53 heterozygosity to provide a growth advantage for astrocytes in vivo." *Oncogene* **21**(9): 1325-34.
- Hur, J. H., M. J. Park, I. C. Park, D. H. Yi, C. H. Rhee, S. I. Hong e S. H. Lee (2000). "Matrix metalloproteinases in human gliomas: activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may be correlated with membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression." *J Korean Med Sci* **15**(3): 309-14.
- Ira, G., A. Pellicoli, A. Balijja, X. Wang, S. Fiorani, W. Carotenuto, G. Liberi, D. Bressan, L. Wan, N. M. Hollingsworth, J. E. Haber e M. Foiani (2004). "DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1." *Nature* **431**(7011): 1011-7.
- Iwadate, Y., S. Fujimoto, M. Tagawa, H. Namba, K. Sueyoshi, M. Hirose e S. Sakiyama (1996). "Association of p53 gene mutation with decreased chemosensitivity in human malignant gliomas." *Int J Cancer* **69**(3): 236-40.
- Iwadate, Y., T. Sakaida, T. Saegusa, T. Hiwasa, M. Takiguchi, S. Fujimoto e A. Yamaura (2005). "Proteome-based identification of molecular markers predicting chemosensitivity to each category of anticancer agents in human gliomas." *Int J Oncol* **26**(4): 993-8.
- Janoueix-Lerosey, I., E. Novikov, M. Monteiro, N. Gruel, G. Schleiermacher, B. Loriod, C. Nguyen e O. Delattre (2004). "Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma." *Oncogene* **23**(35): 5912-22.
- Jin, F., X. Liu, Z. Zhou, P. Yue, R. Lotan, F. R. Khuri, L. W. Chung e S. Y. Sun (2005). "Activation of nuclear factor-kappaB contributes to induction of death receptors and apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in DU145 human prostate cancer cells." *Cancer Res* **65**(14): 6354-63.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli e S. W. Lowe (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* **108**(2): 153-64.

- Jordan, P. e M. Carmo-Fonseca (2000). "Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity." *Cell Mol Life Sci* **57**(8-9): 1229-35.
- Kachra, Z., E. Beaulieu, L. Delbecchi, N. Mousseau, F. Berthelet, R. Moumdjian, R. Del Maestro e R. Beliveau (1999). "Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors." *Clin Exp Metastasis* **17**(7): 555-66.
- Kamachi, M., T. M. Le, S. J. Kim, M. E. Geiger, P. Anderson e P. J. Utz (2002). "Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway." *J Exp Med* **196**(9): 1213-25.
- Kanduc, D., A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M. G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci e E. Farber (2002). "Cell death: apoptosis versus necrosis (review)." *Int J Oncol* **21**(1): 165-70.
- Kang, W. K., I. Lee, U. Ko e C. Park (2005). "Differential effects of RhoA signaling on anticancer agent-induced cell death." *Oncol Rep* **13**(2): 299-304.
- Kartalou, M. e J. M. Essigmann (2001). "Mechanisms of resistance to cisplatin." *Mutat Res* **478**(1-2): 23-43.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie e A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Kim, Y., J. McBride, R. Zhang, X. Zhou e D. T. Wong (2005). "p12(CDK2-AP1) mediates DNA damage responses induced by cisplatin." *Oncogene* **24**(3): 407-18.
- Kitagawa, R., C. J. Bakkenist, P. J. McKinnon e M. B. Kastan (2004). "Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway." *Genes Dev* **18**(12): 1423-38.
- Konopka, G. e A. Bonni (2003). "Signaling pathways regulating gliomagenesis." *Curr Mol Med* **3**(1): 73-84.
- Kopf-Maier, P. e S. K. Muhlhausen (1992). "Changes in the cytoskeleton pattern of tumor cells by cisplatin in vitro." *Chem Biol Interact* **82**(3): 295-316.
- Kumala, S., P. Niemiec, M. Widel, R. Hancock e J. Rzeszowska-Wolny (2003). "Apoptosis and clonogenic survival in three tumour cell lines exposed to gamma rays or chemical genotoxic agents." *Cell Mol Biol Lett* **8**(3): 655-65.
- Kunwar, S., G. Mohapatra, A. Bollen, K. R. Lamborn, M. Prados e B. G. Feuerstein (2001). "Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival." *Cancer Res* **61**(20): 7683-8.
- Kuvaja, P., A. Talvensaaari-Mattila, P. Paakko e T. Turpeenniemi-Hujanen (2005). "The absence of immunoreactivity for tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), but not for TIMP-2, protein is associated with a favorable prognosis in aggressive breast carcinoma." *Oncology* **68**(2-3): 196-203.
- Li, K., S. Zhao, V. Karur e D. M. Wojchowski (2002). "DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival." *J Biol Chem* **277**(49): 47052-60.

- Liu, N., F. Bi, Y. Pan, L. Sun, Y. Xue, Y. Shi, X. Yao, Y. Zheng e D. Fan (2004). "Reversal of the malignant phenotype of gastric cancer cells by inhibition of RhoA expression and activity." *Clin Cancer Res* **10**(18 Pt 1): 6239-47.
- Lonardi, S., A. Tosoni e A. A. Brandes (2005). "Adjuvant chemotherapy in the treatment of high grade gliomas." *Cancer Treat Rev* **31**(2): 79-89.
- Losada, A. e T. Hirano (2005). "Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins." *Genes Dev* **19**(11): 1269-87.
- Lu, K. V., K. A. Jong, A. K. Rajasekaran, T. F. Cloughesy e P. S. Mischel (2004). "Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line." *Lab Invest* **84**(1): 8-20.
- Lu, W., X. Zhou, B. Hong, J. Liu e Z. Yue (2004). "Suppression of invasion in human U87 glioma cells by adenovirus-mediated co-transfer of TIMP-2 and PTEN gene." *Cancer Lett* **214**(2): 205-13.
- Mabuchi, S., M. Ohmichi, Y. Nishio, T. Hayasaka, A. Kimura, T. Ohta, M. Saito, J. Kawagoe, K. Takahashi, N. Yada-Hashimoto, M. Sakata, T. Motoyama, H. Kurachi, K. Tasaka e Y. Murata (2004). "Inhibition of NFkappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models." *J Biol Chem* **279**(22): 23477-85.
- MacCorkle, R. A. e T. H. Tan (2004). "Inhibition of JNK2 disrupts anaphase and produces aneuploidy in mammalian cells." *J Biol Chem* **279**(38): 40112-21.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno e S. Narumiya (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* **285**(5429): 895-8.
- Maher, E. A., F. B. Furnari, R. M. Bachoo, D. H. Rowitch, D. N. Louis, W. K. Cavenee e R. A. DePinho (2001). "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter." *Genes Dev* **15**(11): 1311-33.
- Mamenta, E. L., E. E. Poma, W. K. Kaufmann, D. A. Delmastro, H. L. Grady e S. G. Chaney (1994). "Enhanced replicative bypass of platinum-DNA adducts in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines." *Cancer Res* **54**(13): 3500-5.
- Mancini, M., C. E. Machamer, S. Roy, D. W. Nicholson, N. A. Thornberry, L. A. Casciola-Rosen e A. Rosen (2000). "Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis." *J Cell Biol* **149**(3): 603-12.
- Mandic, A., J. Hansson, S. Linder e M. C. Shoshan (2003). "Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling." *J Biol Chem* **278**(11): 9100-6.
- Marinissen, M. J., M. Chiariello, T. Tanos, O. Bernard, S. Narumiya e J. S. Gutkind (2004). "The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis." *Mol Cell* **14**(1): 29-41.
- Matsumoto, Y., K. Tanaka, K. Harimaya, F. Nakatani, S. Matsuda e Y. Iwamoto (2001). "Small GTP-binding protein, Rho, both increased and decreased cellular motility, activation of matrix metalloproteinase 2 and invasion of human osteosarcoma cells." *Jpn J Cancer Res* **92**(4): 429-38.

- Mellor, H. R., S. Snelling, M. D. Hall, S. Modok, M. Jaffar, T. W. Hambley e R. Callaghan (2005). "The influence of tumour microenvironmental factors on the efficacy of cisplatin and novel platinum(IV) complexes." *Biochem Pharmacol* **70**(8): 1137-46.
- Merkel, P., N. Khoury, C. Bertolotto e R. Perfetti (2003). "Insulin and glucose regulate the expression of the DNA repair enzyme XPD." *Mol Cell Endocrinol* **201**(1-2): 75-85.
- Mischel, P. S., T. F. Cloughesy e S. F. Nelson (2004). "DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy." *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 782-92.
- Moore, M., B. A. Marroquin, W. Gugliotta, R. Tse e S. R. White (2004). "Rho kinase inhibition initiates apoptosis in human airway epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**(3): 379-87.
- Mu, D., T. Bessho, L. V. Nechev, D. J. Chen, T. M. Harris, J. E. Hearst e A. Sancar (2000). "DNA interstrand cross-links induce futile repair synthesis in mammalian cell extracts." *Mol Cell Biol* **20**(7): 2446-54.
- Nagane, M., G. Pan, J. J. Weddle, V. M. Dixit, W. K. Cavenee e H. J. Huang (2000). "Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo." *Cancer Res* **60**(4): 847-53.
- Nakada, M., D. Kita, K. Futami, J. Yamashita, N. Fujimoto, H. Sato e Y. Okada (2001). "Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma." *J Neurosurg* **94**(3): 464-73.
- Nakada, M., Y. Okada e J. Yamashita (2003). "The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion." *Front Biosci* **8**: e261-9.
- Noble, M. e J. Dietrich (2004). "The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity." *Trends Neurosci* **27**(3): 148-54.
- Nomura, Y. (2004). "Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum-related proteins." *Biol Pharm Bull* **27**(7): 961-3.
- Norbury, C. J. e B. Zhivotovsky (2004). "DNA damage-induced apoptosis." *Oncogene* **23**(16): 2797-808.
- Offer, H., N. Erez, I. Zurer, X. Tang, M. Milyavsky, N. Goldfinger e V. Rotter (2002). "The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA." *Carcinogenesis* **23**(6): 1025-32.
- Ohgaki, H. (2005). "Genetic pathways to glioblastomas." *Neuropathology* **25**(1): 1-7.
- Okada, H. e T. W. Mak (2004). "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells." *Nat Rev Cancer* **4**(8): 592-603.
- Osborne, R. H., M. P. Houben, C. C. Tijssen, J. W. Coebergh e C. M. van Duijn (2001). "The genetic epidemiology of glioma." *Neurology* **57**(10): 1751-5.

- Oswald, C. B., S. G. Chaney e I. H. Hall (1990). "Inhibition of DNA synthesis in P388 lymphocytic leukemia cells of BDF1 mice by cis-diamminedichloroplatinum(II) and its derivatives." *J Pharm Sci* **79**(10): 875-80.
- Papouli, E., P. Cejka e J. Jiricny (2004). "Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells." *Cancer Res* **64**(10): 3391-4.
- Pennanen, H., O. Kuittinen, Y. Soini e T. Turpeenniemi-Hujanen (2004). "Clinicopathological correlations of TIMP-1 and TIMP-2 in Hodgkin's lymphoma." *Eur J Haematol* **72**(1): 1-9.
- Persengiev, S. P. e M. R. Green (2003). "The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis." *Apoptosis* **8**(3): 225-8.
- Plum, L., M. Schubert e J. C. Bruning (2005). "The role of insulin receptor signaling in the brain." *Trends Endocrinol Metab* **16**(2): 59-65.
- Poppenborg, H., M. M. Knupfer, R. Preiss, J. E. Wolff e H. J. Galla (1999). "Cisplatin (CDDP)-induced radiation resistance is not associated with CDDP resistance in 86HG39 and A172 malignant glioma cells." *Eur J Cancer* **35**(7): 1150-4.
- Potapova, O., M. Gorospe, R. H. Dougherty, N. M. Dean, W. A. Gaarde e N. J. Holbrook (2000). "Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1713-22.
- Potapova, O., A. Haghighi, F. Bost, C. Liu, M. J. Birrer, R. Gjerset e D. Mercola (1997). "The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin." *J Biol Chem* **272**(22): 14041-4.
- Qi, Z. Y., Y. Li, K. Ying, C. Q. Wu, R. Tang, Z. X. Zhou, Z. P. Chen, G. Z. Hui e Y. Xie (2002). "Isolation of novel differentially expressed genes related to human glioma using cDNA microarray and characterizations of two novel full-length genes." *J Neurooncol* **56**(3): 197-208.
- Qin, L. F., T. K. Lee e I. O. Ng (2002). "Gene expression profiling by cDNA array in human hepatoma cell line in response to cisplatin treatment." *Life Sci* **70**(14): 1677-90.
- Qin, L. F. e I. O. Ng (2002). "Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells." *Cancer Lett* **175**(1): 27-38.
- Quackenbush, J. (2002). "Microarray data normalization and transformation." *Nat Genet* **32 Suppl**: 496-501.
- Ranuncolo, S. M., M. Varela, A. Morandi, J. Lastiri, S. Christiansen, E. Bal de Kier Joffe, M. G. Pallotta e L. Puricelli (2004). "Prognostic value of Mdm2, p53 and p16 in patients with astrocytomas." *J Neurooncol* **68**(2): 113-21.
- Rattan, R., S. Giri, A. K. Singh e I. Singh (2003). "Rho A negatively regulates cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase expression in brain-derived transformed cell lines: negative regulation of IKKalpha." *Free Radic Biol Med* **35**(9): 1037-50.

- Ravi, R. e A. Bedi (2004). "NF-kappaB in cancer--a friend turned foe." *Drug Resist Updat* **7**(1): 53-67.
- Reifenberger, G. e V. P. Collins (2004). "Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas." *J Mol Med* **82**(10): 656-70.
- Rich, J. N., C. Hans, B. Jones, E. S. Iversen, R. E. McLendon, B. K. Rasheed, A. Dobra, H. K. Dressman, D. D. Bigner, J. R. Nevins e M. West (2005). "Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival." *Cancer Res* **65**(10): 4051-8.
- Riento, K. e A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 446-56.
- Ross, J. S., P. Kaur, C. E. Sheehan, H. A. Fisher, R. A. Kaufman, Jr. e B. V. Kallakury (2003). "Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer." *Mod Pathol* **16**(3): 198-205.
- Rougemont, J. e P. Hingamp (2003). "DNA microarray data and contextual analysis of correlation graphs." *BMC Bioinformatics* **4**: 15.
- Sabapathy, K., K. Hochedlinger, S. Y. Nam, A. Bauer, M. Karin e E. F. Wagner (2004). "Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation." *Mol Cell* **15**(5): 713-25.
- Sakai, K., M. Kurimoto, A. Tsugu, S. L. Hubbard, W. S. Trimble e J. T. Rutka (2002). "Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors." *J Neurooncol* **57**(3): 169-77.
- Schar, P., M. Fasi e R. Jessberger (2004). "SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways." *Nucleic Acids Res* **32**(13): 3921-9.
- Scott, M., P. Bonnefin, D. Vieyra, F. M. Boisvert, D. Young, D. P. Bazett-Jones e K. Riabowol (2001). "UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis." *J Cell Sci* **114**(Pt 19): 3455-62.
- Sedletska, Y., M. J. Giraud-Panis e J. M. Malinge (2005). "Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways." *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **5**(3): 251-65.
- Servidei, T., C. Ferlini, A. Riccardi, D. Meco, G. Scambia, G. Segni, C. Manzotti e R. Riccardi (2001). "The novel trinuclear platinum complex BBR3464 induces a cellular response different from cisplatin." *Eur J Cancer* **37**(7): 930-8.
- Sharma, R., N. Sud, T. K. Chattopadhyay e R. Ralhan (2005). "TC21/R-Ras2 upregulation in esophageal tumorigenesis: potential diagnostic implications." *Oncology* **69**(1): 10-8.
- Shen, D. W., A. Su, X. J. Liang, A. Pai-Panandiker e M. M. Gottesman (2004). "Reduced expression of small GTPases and hypermethylation of the folate binding protein gene in cisplatin-resistant cells." *Br J Cancer* **91**(2): 270-6.
- Shetty, S., B. A. Graham, J. G. Brown, X. Hu, N. Vegh-Yarema, G. Harding, J. T. Paul e S. B. Gibson (2005). "Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1." *Mol Cell Biol* **25**(13): 5404-16.

- Shu, H. K., M. M. Kim, P. Chen, F. Furman, C. M. Julin e M. A. Israel (1998). "The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14453-8.
- Siddik, Z. H. (2003). "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." *Oncogene* **22**(47): 7265-79.
- Smith, J. S. e R. B. Jenkins (2000). "Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications." *Front Biosci* **5**: D213-31.
- Smits, V. A. e R. H. Medema (2001). "Checking out the G(2)/M transition." *Biochim Biophys Acta* **1519**(1-2): 1-12.
- Snyder, A. R. e W. F. Morgan (2005). "Lack of consensus gene expression changes associated with radiation-induced chromosomal instability." *DNA Repair (Amst)* **4**(9): 958-70.
- Sorensen, C. S., L. T. Hansen, J. Dziegielewski, R. G. Syljuasen, C. Lundin, J. Bartek e T. Helleday (2005). "The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair." *Nat Cell Biol* **7**(2): 195-201.
- Spano, A., L. Sciola, G. Monaco e S. Barni (2000). "Relationship between actin microfilaments and plasma membrane changes during apoptosis of neoplastic cell lines in different culture conditions." *Eur J Histochem* **44**(3): 255-67.
- St Croix, B. e R. S. Kerbel (1997). "Cell adhesion and drug resistance in cancer." *Curr Opin Oncol* **9**(6): 549-56.
- Steel, G. G. (2001). "The case against apoptosis." *Acta Oncol* **40**:968.
- Sumi, T., K. Matsumoto e T. Nakamura (2001). "Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **276**(1): 670-6.
- Sun, W., K. Zhang, X. Zhang, W. Lei, T. Xiao, J. Ma, S. Guo, S. Shao, H. Zhang, Y. Liu, J. Yuan, Z. Hu, Y. Ma, X. Feng, S. Hu, J. Zhou, S. Cheng e Y. Gao (2004). "Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization." *Cancer Lett* **212**(1): 83-93.
- Suyama, E., R. Wadhwa, H. Kawasaki, T. Yaguchi, S. C. Kaul, M. Nakajima e K. Taira (2004). "LIM kinase-2 targeting as a possible anti-metastasis therapy." *J Gene Med* **6**(3): 357-63.
- Tallen, G., I. Kaiser, S. Krabbe, U. Lass, C. Hartmann, G. Henze, K. Riabowol e A. von Deimling (2004). "No ING1 mutations in human brain tumours but reduced expression in high malignancy grades of astrocytoma." *Int J Cancer* **109**(3): 476-9.
- Tanaka, S., T. Uehara e Y. Nomura (2000). "Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death." *J Biol Chem* **275**(14): 10388-93.
- Thompson, L. H. (1996). "Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways." *Mutat Res* **363**(2): 77-88.

- Torigoe, T., H. Izumi, H. Ishiguchi, Y. Yoshida, M. Tanabe, T. Yoshida, T. Igarashi, I. Niina, T. Wakasugi, T. Imaizumi, Y. Momii, M. Kuwano e K. Kohno (2005). "Cisplatin resistance and transcription factors." *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **5**(1): 15-27.
- Tornaletti, S., S. M. Patrick, J. J. Turchi e P. C. Hanawalt (2003). "Behavior of T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II at site-specific cisplatin adducts in the template DNA." *J Biol Chem* **278**(37): 35791-7.
- Toth, M., M. M. Bernardo, D. C. Gervasi, P. D. Soloway, Z. Wang, H. F. Bigg, C. M. Overall, Y. A. DeClerck, H. Tschesche, M. L. Cher, S. Brown, S. Mobashery e R. Fridman (2000). "Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2." *J Biol Chem* **275**(52): 41415-23.
- Tremeau-Bravard, A., T. Riedl, J. M. Egly e M. E. Dahmus (2004). "Fate of RNA polymerase II stalled at a cisplatin lesion." *J Biol Chem* **279**(9): 7751-9.
- Trojanek, J., T. Ho, L. Del Valle, M. Nowicki, J. Y. Wang, A. Lassak, F. Peruzzi, K. Khalili, T. Skorski e K. Reiss (2003). "Role of the insulin-like growth factor I/insulin receptor substrate 1 axis in Rad51 trafficking and DNA repair by homologous recombination." *Mol Cell Biol* **23**(21): 7510-24.
- Tsuiki, H., M. Tnani, I. Okamoto, L. C. Kenyon, D. R. Emler, M. Holgado-Madruga, I. S. Lanham, C. J. Joynes, K. T. Vo e A. J. Wong (2003). "Constitutively active forms of c-Jun NH2-terminal kinase are expressed in primary glial tumors." *Cancer Res* **63**(1): 250-5.
- Tulub, A. A. e V. E. Stefanov (2001). "Cisplatin stops tubulin assembly into microtubules. A new insight into the mechanism of antitumor activity of platinum complexes." *Int J Biol Macromol* **28**(3): 191-8.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani e G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5116-21.
- Vaisman, A., S. E. Lim, S. M. Patrick, W. C. Copeland, D. C. Hinkle, J. J. Turchi e S. G. Chaney (1999). "Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts." *Biochemistry* **38**(34): 11026-39.
- Vazquez-Ortiz, G., P. Pina-Sanchez, K. Vazquez, A. Duenas, L. Taja, P. Mendoza, J. A. Garcia e M. Salcedo (2005). "Overexpression of cathepsin f, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer." *BMC Cancer* **5**(1): 68.
- Villalonga, P., R. M. Guasch, K. Riento e A. J. Ridley (2004). "RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation." *Mol Cell Biol* **24**(18): 7829-40.
- Wajih, N., D. C. Sane, S. M. Hutson e R. Wallin (2004). "The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats." *J Biol Chem* **279**(24): 25276-83.
- Wang, D. e S. J. Lippard (2004). "Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4." *J Biol Chem* **279**(20): 20622-5.

- Wang, D. e S. J. Lippard (2005). "Cellular processing of platinum anticancer drugs." *Nat Rev Drug Discov* **4**(4): 307-20.
- Weaver, K. D., S. Yeyeodu, J. C. Cusack, Jr., A. S. Baldwin, Jr. e M. G. Ewend (2003). "Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor kappa B in human gliomas." *J Neurooncol* **61**(3): 187-96.
- Wernyj, R. P. e P. J. Morin (2004). "Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel." *Drug Resist Updat* **7**(4-5): 227-32.
- Williams, J., P. C. Lucas, K. A. Griffith, M. Choi, S. Fogoros, Y. Y. Hu e J. R. Liu (2005). "Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease." *Gynecol Oncol* **96**(2): 287-95.
- Wolff, J. E., T. Trilling, G. Molenkamp, R. M. Egeler e H. Jurgens (1999). "Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis." *J Cancer Res Clin Oncol* **125**(8-9): 481-6.
- Woods, S. A., E. Marmor, M. Feldkamp, N. Lau, A. J. Apicelli, G. Boss, D. H. Gutmann e A. Guha (2002). "Aberrant G protein signaling in nervous system tumors." *J Neurosurg* **97**(3): 627-42.
- Wozniak, K. e J. Blasiak (2002). "Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts." *Acta Biochim Pol* **49**(3): 583-96.
- Wu, W., X. Tang, W. Hu, R. Lotan, W. K. Hong e L. Mao (2002). "Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry." *Clin Exp Metastasis* **19**(4): 319-26.
- Yamada, M., E. O'Regan, R. Brown e P. Karran (1997). "Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins." *Nucleic Acids Res* **25**(3): 491-6.
- Yang, E., H. Kim, J. Lee, J. S. Shin, H. Yoon, S. J. Kim e I. H. Choi (2004). "Overexpression of LIM kinase 1 renders resistance to apoptosis in PC12 cells by inhibition of caspase activation." *Cell Mol Neurobiol* **24**(2): 181-92.
- Yu, J. e L. Zhang (2004). "Apoptosis in human cancer cells." *Curr Opin Oncol* **16**(1): 19-24.
- Zamble, D. B. e S. J. Lippard (1995). "Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy." *Trends Biochem Sci* **20**(10): 435-9.
- Zhang, D., K. Li, C. L. Erickson-Miller, M. Weiss e D. M. Wojchowski (2005). "DYRK gene structure and erythroid-restricted features of DYRK3 gene expression." *Genomics* **85**(1): 117-30.
- Zhang, J., H. Willers, Z. Feng, J. C. Ghosh, S. Kim, D. T. Weaver, J. H. Chung, S. N. Powell e F. Xia (2004). "Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair." *Mol Cell Biol* **24**(2): 708-18.
- Ziegler, U. e P. Groscurth (2004). "Morphological features of cell death." *News Physiol Sci* **19**: 124-8.
- Zimmermann, K. C. e D. R. Green (2001). "How cells die: apoptosis pathways." *J Allergy Clin Immunol* **108**(4 Suppl): S99-103.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)