

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

Ana Paula de Lima Montaldi

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR MEDIADA PELO
QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA ASSOCIADA AO INIBIDOR DO
REPARO DO DNA METOXIAMINA EM LINHAGENS DE
GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Genética.

Orientadora: **Elza Tiemi Sakamoto Hojo**

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Montaldi, Ana Paula de Lima

Avaliação da resposta celular mediada pelo quimioterápico temozolomida associada ao inibidor do reparo do DNA metoxiamina em linhagens de glioblastoma. Ribeirão Preto, 2009.

62 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Hojo, Elza Tiemi Sakamoto.

1. Glioblastoma; 2. Temozolomida; 3. BER; 4. Resistência ao tratamento; 5. Metoxiamina.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES;
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA – FMRP/USP;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP;
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pela orientação desse trabalho, pelo apoio, amizade e por colaborar imensamente com meu amadurecimento profissional. Muito obrigada!

À **Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi** pelo apoio, carinho e por sempre proporcionar momentos de descontração no laboratório com lanchinhos oportunos.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo Silva Passos Junior** pela simpatia e por permitir a utilização de equipamentos de seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP e à ex-chefe do departamento, **Prof^a. Dr^a. Nilce Maria Martinez Rossi**.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, coordenador do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da FMRP-USP pelo apoio e dedicação à pós-graduação, e à ex-coordenadora **Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Martelli**.

Às funcionárias do Departamento de Genética da FMRP-USP, **Maria A. Elias, Susie A. Nalon, e Silvia H. Costa** pela atenção e apoio prestados.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Citogenética e Mutagênese, **Sueli A. Neves e Luiz Augusto da Costa Junior** pela grande amizade, carinho, companheirismo e apoio, sempre!

À técnica **Tânia Defina** do laboratório da Dr^a Angela Kaysel Cruz por ceder o equipamento e disponibilidade na realização dos experimentos de real time.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese: **Aline** (altos papos), **Ana Claudia, Bollor, Cristiano** (Filosofia e churras), **Daily, Flavinha, Giovana, Gustavo, Igor, Leo, Patrícia** (te dei trabalho, hem!), **Paulo, Raquel** (sempre atenciosa), **Vinícius e Xitão**. Agradeço a todos pelos ensinamentos e ótimos momentos vividos.

Aos colegas que passaram por este laboratório: **Ana Lúcia, Carla, Carmen** (doçura de pessoa), **Cássia e Cleide** (não tem como não citá-las juntas-muito queridas), **Clara, Douglas, Gilmara, Gustavo** (cabeção), **Juliana, Luciana, Marcelo, Maria Sol, Mônica** (companheira de sol) e **Sté**.

Em especial a **Aline e Pati** por me agüentar nos finalmente e pela amizade. Valeu colegas!!!

À querida **Maria Sol** pela amizade, apoio, ensinamentos e muito incentivo. Muito obrigada!

À amiga **Marjori**, que sempre estará no meu coração.

Aos colegas do laboratório de Bioinformática.

Aos companheiros do laboratório de Imunogenética Molecular.

À **Adriana** (companheira de café), **Betânia e Lúcia** por cuidarem com carinho do laboratório.

Aos membros da diretoria dos churrascos: **Aline, Sol, Breve, Cristiano, Daniel e Luiza, Luciano, Renato, Gabi, Paulo e Carol, Junior, Cidinha & CIA, Igor e Fernanda**. Espero que ainda continue.

A todos meus amigos e familiares pela amizade, incentivo, momentos de descontração e desabafos (não dá para citar todos).

À minha sogra **Márcia**, a inicializadora de tudo isto. Obrigada pelo grande incentivo.

Ao **Prof. Dr. Dalton de Souza Amorim** pelo carinho com que me recebeu e me mostrou os caminhos que percorri.

Às minhas queridas irmãs **Fernanda e Sarah**, por todo apoio e por sempre levantar minha auto-estima (coisas de irmã). Amo Vocês!

À minha querida mãe **Marlene**, por simplesmente fazer parte da minha vida e ao meu pai **Fernando**, que se tivesse aqui estaria muito feliz em ver seu sonho realizado. Amos vocês para sempre!

Ao meu marido **Daniel**, para quem não tenho palavras em dizer o quanto sou grata por todo amor, compreensão, paciência, incentivo e tudo mais que sempre me dedicou. TE AMO!

Novamente, um muito obrigada a todos aqueles que participaram e colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho e no crescimento da minha vida.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)	01
1.2 Temozolomida (TMZ)	03
1.3 Reparo Por Excisão de Base (BER)	06
1.4 Metoxiamina (MX): Inibidor da via de reparo BER	09
2. OBJETIVOS	12
2.1 Gerais	12
2.2 Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Linhagens Celulares	14
3.2. Agentes antitumorais	14
3.3. Cultivo Celular	15
3.4 Tratamento com o Antitumoral TMZ	15
3.5. Análise da sobrevivência celular utilizando o KIT XTT (Roche Molecular Biochemicals/ Mannhein, DE	16
3.6. Teste de Sobrevivência Clonogênica	16
3.7. Detecção de danos no DNA por meio do Ensaio Cometa	17
3.8. Detecção morfológica de células apoptóticas	18
3.9. Experimentos para avaliação da expressão gênica transcricional	19
3.9.1 Extração de RNA total e preparação dos cDNAs	19
3.9.2 Avaliação da expressão do gene MGMT por RT-PCR	19
3.9.3 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real	20
3.10. Avaliação da expressão protéica por Western blot	21
3.10.1 Extração de proteínas com Solução de Lise	21

3.10.2 Eletroforese de proteínas	22
3.10.3 Transferência eletroforética	22
3.10.4 Imunodeteção e visualização das proteínas	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Citotoxicidade e Sobrevivência Celular	24
4.2. Sobrevivência Clonogênica	29
4.3. Ensaio Cometa	31
4.4. Apoptose	32
4.5. Expressão gênica transcricional (RT-PCR)	34
4.6. Expressão gênica transcricional analisada por q-PCR em tempo real	34
4.7. Expressão protéica por Western blot	37
5. DISCUSSÃO	40
5.1 Citotoxicidade e Sobrevivência celular em resposta à TMZ	41
5.2 Avaliação de danos no DNA em células T98G	44
5.3 Avaliação de morte celular por apoptose	45
5.4 Expressão gênica e protéica	46
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	54

RESUMO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR MEDIADA PELO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA ASSOCIADA AO INIBIDOR DO REPARO DO DNA METOXIAMINA EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

Os gliomas compreendem mais de 70% de todos os tumores cerebrais primários. Mesmo com tratamento agressivo, a média de sobrevivência relatada para estes tumores é geralmente menor do que 1 ano após o diagnóstico. A quimioterapia baseada em agentes alquilantes, como a temozolomida (TMZ), tem mostrado, em média, uma modesta resposta e pequeno aumento da sobrevida. As principais lesões causadas pela TMZ são os aductos N⁷-metil-G e N³-metil-A, que são processados pelo reparo por excisão de base (BER), compreendendo mais de 80% das lesões induzidas no DNA pela TMZ. Há evidência de que a resistência a este quimioterápico pode ser causada em parte por um eficiente processo de reparo via BER, mas poucos estudos têm focalizado essa abordagem. Metoxiamina (MX) é um inibidor do reparo via BER que tem sido atualmente investigado como um possível aliado no combate a vários tipos de tumores, aumentando os efeitos citotóxicos de drogas, tais como a TMZ. No presente trabalho, foram avaliadas as respostas celulares de células de glioblastoma (GBM) ao tratamento com a TMZ, associada ou não à MX. Foram analisados parâmetros como citotoxicidade (24 h, Kit XTT), sobrevivência celular (120 h, Kit XTT) e clonogênica (10 dias após o tratamento), danos no DNA pelo Ensaio Cometa (2, 6, 12 e 24 h), a indução de apoptose (24, 48 e 72 h) e alterações na expressão gênica e transcricional (24, 48 e 72h) de genes envolvidos na via de reparo por BER. Sob tratamento das linhagens de GBM (U87, U343, U251, U138 e T98G) a diferentes concentrações de TMZ (100 a 1000 µM), o efeito citotóxico foi observado em células analisadas após 120 h, sendo que a linhagem T98G foi a mais resistente ao tratamento com TMZ e foi a única a apresentar diferenças significativas entre o tratamento sozinho e combinado ($p \leq 0,05$). Assim, foi selecionada a linhagem T98G para os demais experimentos e estudar as possíveis vias implicadas na resistência a essa droga. A sobrevivência clonogênica das células T98G foi reduzida, sob tratamento com a TMZ (100 a 800 µM), com diferenças significativas para as concentrações superiores a 400 µM. Observou-se que o efeito da TMZ foi acentuado quando associada ao inibidor, com diferenças significativas para todas as concentrações testadas. A droga induziu uma maior porcentagem de danos no DNA (Ensaio Cometa) para ambos os tratamentos (400 e 600 µM) e nos tempos de 2 e 6 h, com diferenças significativas entre os tratamentos (TMZ e TMZ+MX), somente na concentração de 600 µM/2 h. Entretanto esses danos se equipararam nos tempos seguintes. A indução de apoptose analisada

nas células T98G mostrou a frequência máxima de 24,2% no tempo de 72h, na concentração de 600 μ M de TMZ, enquanto que uma maior indução de apoptose (47,7%) foi observada para a mesma concentração no tratamento combinado (TMZ + MX), resultando em diferenças significativas. A análise de expressão gênica realizada para os genes *APE1*, *FEN1* e *XRCC1*, mostraram que houve uma menor indução dos genes *APE1* e *FEN1* no tratamento combinado. A expressão da proteína APE1 (analisada por *Western blot*) foi menos intensa em todos os tempos de tratamento combinado (TMZ + MX), possivelmente pelo bloqueio dos sítios AP causado pelo inibidor MX. A proteína FEN1 mostrou-se menos expressa na comparação dos tratamentos, nos tempos de 48 e 72 h, indicando uma inibição de proteínas da via BER *downstream* à remoção de sítios AP por APE1, possivelmente pela ligação de MX. PCNA teve sua expressão protéica aumentada no tratamento combinado, nos tempos de 24 h, e principalmente em 48 h, sugerindo uma indução devida a um aumento de danos no DNA. Portanto, os resultados dos ensaios realizados com a associação da TMZ à MX demonstraram a influência do tratamento combinado sobre a expressão de proteínas envolvidas no reparo via BER, o que contribuiu para uma redução da capacidade proliferativa das células T98G em decorrência da maior indução de danos por aductos DNA-MX não reparados, resultando também em aumento de morte celular apoptótica. Esses dados mostram que a modulação do reparo via BER pode constituir uma estratégia promissora para aumentar a eficácia do tratamento com a TMZ, o que poderá futuramente embasar a escolha de procedimentos terapêuticos que resultem numa maior eficácia do tratamento de gliomas com agentes alquilantes.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF CELLULAR RESPONSES MEDIATED BY TEMOZOLOMIDE COMBINED WITH METOXIAMINA, AN INHIBITOR OF DNA REPAIR, IN GLIOBLASTOMA CELL LINES

Gliomas represent more than 70% of primary brain tumors. Even following an aggressive therapies, the mean survival rate of patients with these tumors is less than one year after diagnosis. Chemotherapy based on alkylating agents, such as temozolomide (TMZ) has been reported to increase the survival rate. N⁷-methyl-G and N³-methyl-A adducts comprise more than 80% of the DNA lesions induced by TMZ and are processed by the base excision repair process (BER). There is evidence in the literature suggesting that the resistance to TMZ could be caused, in part, by an efficient repair by BER pathway, although few studies have focused on this subject. Metoxiamine (MX) is an effective BER inhibitor, which has been investigated as a conceivable treatment for different kinds of tumor, due to its synergistic effect with antitumoral drugs, such as TMZ. In the present study, the cellular responses to TMZ treatment associated or not with MX were evaluated in glioblastoma (GBM) cell lines. Several parameters were analyzed, such as cytotoxicity (24 h), cellular survival (120 h) and clonogenic efficiency (10 days after treatment), DNA damage and repair kinetics (after 2, 6, 12 and 24 h of recovery time), apoptosis induction (24, 48 and 72 h) and alterations in gene expression (24, 48 e 72h) for genes playing role in BER pathway. The treatment with TMZ 100 -1000 μ M (during 24 h) was cytotoxic for all GBM cell lines tested (U87, U343, U251, U138 and T98G), as analyzed after 120 h, with the T98G cell line being the most resistant to TMZ; besides, T98G was the only one to present significant differences ($p \leq 0,05$) in survival rates measured between TMZ treatment and TMZ combined with MX. Thus, T98G cells were selected for the subsequent experiments and for the study of the pathways implicated in TMZ resistance. The clonogenic efficiency of T98G cells was reduced under TMZ treatment (100 - 800 μ M) with significant differences for treatments above 400 μ M. In addition, the combined treatment TMZ plus MX significantly increased the cytotoxic effects, even for the lowest concentration. The comet assay showed higher percentage of DNA damage for both treatment modalities (TMZ and TMZ+MX) at 2 and 6 h of recovery, with significant differences between treatments for 2 h. Following 12 and 24 h of recovery, the amount of DNA damage reached the control levels, indicating the repair of DNA breaks. Apoptosis induction in T98G cells showed the highest frequency (24.2%) at 72h for 600 μ M TMZ, while the highest apoptosis induction (47.7%) was observed for the same concentration

combined to MX. Quantitative gene expression analysis performed for three genes, *APE1*, *FEN1* and *XRCC1*, showed a reduced expression of *APE1* and *FEN1* for the combined treatment. Western blot analysis demonstrated that *APE1* was less expressed for all kind of treatments, probably due to AP-sites blockade caused by the inhibitor MX. In addition, *FEN1* showed low levels of expression at 48h and 72h, indicating the inhibition of BER pathway downstream to the AP removal by *APE1*. On the other hand, *PCNA* expression was higher for the combined treatment (24h and mainly 48h), suggesting its induction probably due to increased DNA damage. Therefore, the present results demonstrated that the association of TMZ with MX interfered with the expression of proteins involved in BER, thus, reducing the clonogenic efficiency of T98G cells, probably as a consequence of the high production of unrepaired DNA-MX adducts, leading to cell death, including apoptosis. These data show that the modulation of BER is a promising strategy for magnifying the therapeutic impact of TMZ, and in the next future, this strategy may embrace the option to establish novel and efficient therapy protocols for the treatment of gliomas with alkylating agents.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)

O desenvolvimento tumoral é geralmente o resultado de múltiplas alterações em genes críticos de controle do ciclo celular ou de manutenção da homeostase celular. Os tumores cerebrais são classificados em gliomas, tumores neurais, neoplasias mal-diferenciadas e meningiomas. A distribuição etária desses tumores é bimodal, com um primeiro pico em crianças e um segundo, muito maior, em adultos na faixa etária de 45 a 70 anos (Reifenberger e Collins, 2004; Santarius *et al.*, 1997).

Os gliomas malignos são tumores cerebrais mais comuns, correspondendo a mais de 70% de todas as neoplasias do sistema nervoso central (Ohgaki, 2009). Os gliomas de origem neuroepitelial, incluindo glioblastoma multiforme (GBM), são tumores astrocíticos de alto grau (*World Health Organization* [WHO] grau IV), quase sempre debilitante e rapidamente fatais para os pacientes. Outros tumores astrocíticos menos malignos são os astrocitomas anaplásicos (WHO grau III) e os astrocitomas pilocíticos (WHO grau I). Mesmo com tratamento agressivo consistindo em cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a média de sobrevivência relatada para estes tumores em geral é menor do que 1 ano após o diagnóstico (Avgeropoulos e Batchelor, 1999).

Há tendência de maior incidência de gliomas em regiões altamente desenvolvidas, os países industrializados, havendo dados que indicam uma maior incidência em caucasianos, comparadas aos africanos ou asiáticos (Ohgaki, 2009).

As vias genéticas que podem conduzir ao desenvolvimento do GBM primário ou secundário podem advir de duas formas. O GBM pode se desenvolver *de novo* (GBM primário), ou pela progressão de um astrocitoma anaplásico (GBM secundário), sendo tais subtipos originados pelo acúmulo de diferentes alterações genéticas (Kleihues e Ohgaki, 2000; Ohgaki, 2005; Tso *et al.*, 2006; Ohgaki e Kleihues, 2007). O GBM primário apresenta características que incluem LOH (*Loss of Heterozygosity*; perda de heterozigosidade) do cromossomo 10q (70%), assim como outras alterações genéticas, tais como a amplificação do gene *EGFR*

(36%), mutações no gene *TP53* (28%), deleção do *p16^{INK4}* (31%) e mutações no gene *PTEN* (25%). A mutação no gene *TP53* é uma alteração genética precoce e freqüente na via de desenvolvimento do GBM secundário, com mutações em torno de 65%, bem como LOH do cromossomo 10q (63%), entre outras (**Figura-1**) (Ohgaki e Kleihues, 2007).

A quimioterapia baseada em agentes alquilantes tem mostrado freqüentemente, uma modesta resposta quanto ao tempo de sobrevida, quando empregada como um adjuvante para cirurgia e radioterapia (Shapiro e Shapiro 1998; Prados e Russo, 1998). O agente cloroetilante BCNU3 (carmustine) e 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU, lomustine) e os agentes metilantes procarbazina e temozolomida (TMZ), utilizados sozinhos ou em regimes de combinação, são as drogas mais comumente empregadas para o tratamento de gliomas malignos (Prados e Russo, 1998; Prados, 2001).

A citotoxicidade da maioria das drogas antitumorais, bem como das radiações ionizantes, está diretamente relacionada com a capacidade destas em causar danos no DNA. Existem várias respostas celulares com possíveis potenciais de citotoxicidade, incluindo indução de apoptose, modulação da progressão do ciclo celular, tolerância ao dano e indução de reparo no DNA. Estas respostas determinarão se as células sobreviverão ou se iniciarão a via de morte celular programada ou outras vias de morte. Respostas das células aos danos induzidos que promovem a sobrevivência celular têm um impacto negativo na eficácia do tratamento e conduzem à resistência às terapias (Madhusudan e Hickson 2005).

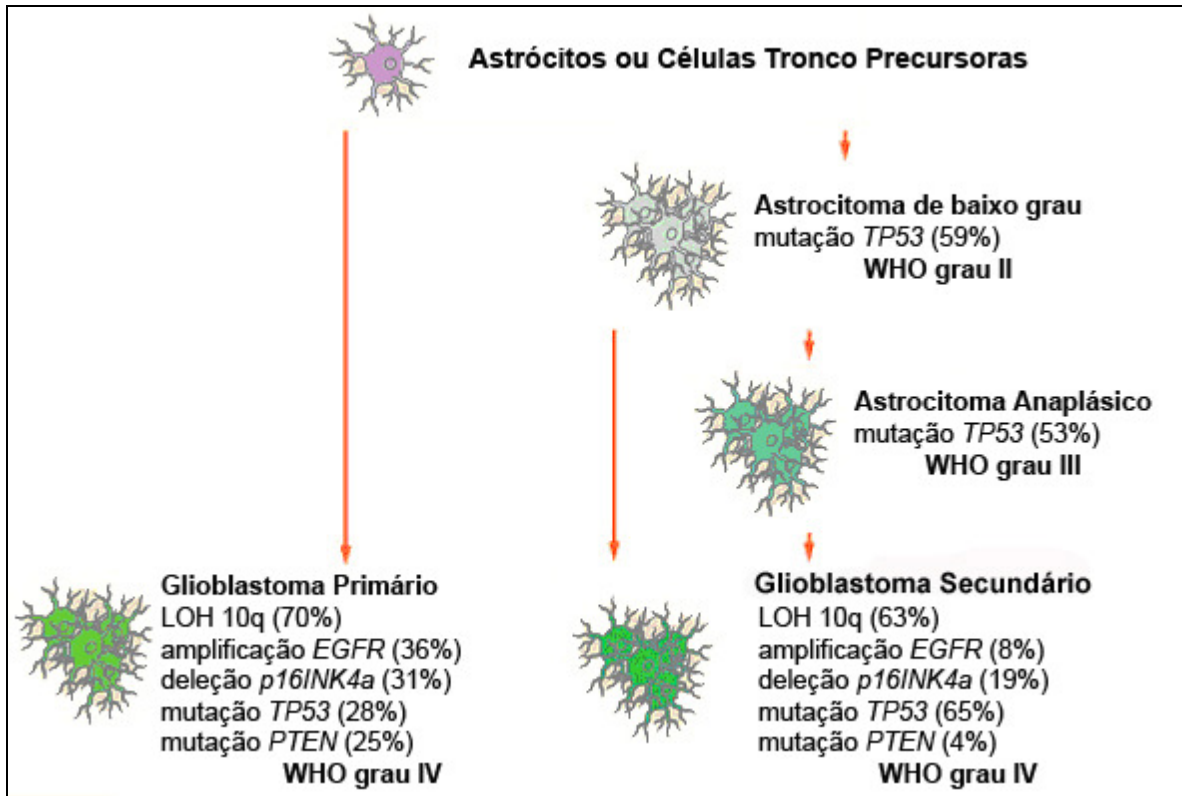


Figura 1: Vias genéticas que direcionam para GBM primário e secundário em nível populacional. A perda de heterozigidade 10q é a alteração mais freqüente em GBM primário e secundário. Amplificação *EGFR* e mutação no *PTEN* são alterações típicas do GBM primário, enquanto que mutações no *TP53* são alterações genéticas freqüentes e iniciais na via que direciona para o GBM secundário (Ohgaki e Kheihues, 2007; adaptado).

1.2 Temozolomida (TMZ)

Ensaio clínicos e pré-clínicos com derivados de imidazotetrazinona, como a TMZ, enfatizam uma importância potencial destes agentes metilantes em terapias, os quais têm se mostrado relativamente eficazes em pacientes diagnosticados com gliomas recorrente de alto grau (O'Reilly *et al.*, 1993; Friedman *et al.*, 2000; Mason e Cairncross, 2005).

A TMZ demonstrou modesta eficácia clínica, com um perfil aceitável de segurança e moderada melhora na qualidade de vida dos pacientes com GBM recorrente (Brada *et al.*, 2001). Em estudos pré-clínicos essa droga demonstrou distribuição em todos os tecidos, baixa toxicidade relativa quando comparada com

o composto similar (mitozolomide) e atividade antitumoral contra vários tipos de tumores, incluindo glioma, melanoma, mesotelioma, sarcoma, linfoma, leucemia, carcinoma de cólon e ovário (Stevens *et al.*, 1987; Wedge *et al.*, 1997). A TMZ também apresentou a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, e isso se tornou de especial interesse no que diz respeito à sua atividade em tumores do SNC (Patel *et al.*, 2003).

A metilação do DNA parece ser o principal mecanismo responsável pela citotoxicidade da TMZ em células malignas. Uma vez administrada, a TMZ é hidrolisada de uma maneira não enzimática, não requerendo metabolismo hepático, formando um composto ativo, o monometil triazeno imidazol carboxamida (MTIC), em pH fisiológico. Ativado, o MTIC metila o DNA nas posições N⁷ e O⁶ da guanina e N³ da adenina (70%, 5% e 9%, respectivamente) (Mutter e Stupp, 2006). Embora a vasta maioria dos aductos formados seja na posição N⁷ da guanina, a O⁶-metilguanina (O⁶-metil-G) é responsável pelo efeito biológico mais severo provocado por agentes alquilantes, os quais incluem mutagenicidade e toxicidade (Beranek, 1990).

A lesão O⁶-metil-G é reparada pela O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), uma proteína de reparo do DNA que é freqüentemente expressa em altos níveis em tumores, assim, tornando-se um importante fator de risco na resistência a drogas, diminuindo a eficácia de agentes alquilantes e cloroetilantes (Pegg, 1990; Pegg *et al.*, 1995). Uma alta atividade de MGMT foi encontrada em cânceres de cólon, pulmão, mama e ovário (Kaina e Christmann, 2002), mas em GBM, a porcentagem de tumores com deficiência de MGMT é particularmente elevada (Kaina e Christmann, 2002; Silber *et al.*, 1998).

Uma das lesões mais importantes originadas no DNA em resposta a vários agentes genotóxicos são as quebras de fita dupla (DSB – *Double-Strand Break*). Essas quebras, no entanto, não são induzidas diretamente em resposta ao dano provocado pela TMZ, mas pode advir como lesões secundárias resultantes das tentativas mal-sucedidas de reparo da O⁶-metil-G induzida pela droga (Drablos *et al.*, 2004; Triverdi *et al.*, 2005).

A formação de O⁶-metil-G também pode ser reparada pelo mecanismo de reparo mismatch (MMR - *DNA mismatch repair*), que identifica uma timidina (T) incorporada erroneamente na fita oposta no momento da duplicação do DNA. O

sistema MMR faz uma incisão na fita contendo a T, retirando-a juntamente com outras bases circundantes gerando uma falha (gap), a qual é preenchida em seguida via síntese. Contudo, uma vez que T é novamente incorporada em oposição a O⁶-metil-G ainda presente, o sítio é novamente reconhecido pelo sistema MMR e uma nova tentativa de reparo é realizada. Essas tentativas podem fazer com que haja quebras na fita de DNA na próxima fase de duplicação (fase S do ciclo celular), gerando as DSBs e ainda acionando outras vias de reparo e/ou vias apoptóticas (Fink *et al.*, 1998; Bignami *et al.*, 2000).

As vias de sinalização que desencadeiam o processo apoptótico são complexas, sendo que duas delas são mais estudadas. A via extrínseca é mediada por receptores de morte na superfície celular, como FAS, TNFR (receptor de fator de necrose tumoral) ou receptores TRAIL (Ashkenazi e Dixit, 1998; Jin e El-Deiry, 2005; Elmore, 2007); por outro lado, a via intrínseca, é mediada por diversos estímulos que convergem na mitocôndria (citocromo c, Smac/DIABLO, IAP, caspase-9) (Jin e El-Deiry, 2005; Elmore, 2007). Ambas as vias convergem para a ativação de caspase-3, que induzem a clivagem de proteínas quinases, proteínas do citoesqueleto, assim, afetando as vias de sinalização e por fim, induzindo à manifestações morfológicas da apoptose. (Ghobrial *et al.*, 2005).

Roos *et al* (2007) demonstraram que o gene *TP53* está envolvido na determinação da resposta citotóxica e apoptótica em células de glioma após tratamento com agentes metilantes e que a deficiência de *TP53* prediz um aumento na sensibilidade à TMZ (Hermisson *et al.*, 2006). Entretanto, em linhagem de câncer ovariano, o *status* do *TP53* não afetou a citotoxicidade induzida pela TMZ (Fishel *et al.*, 2007). Segundo alguns autores, as células de glioma respondem à TMZ ativando um bloqueio em G2/M, com poucas células sofrendo apoptose, sendo o principal tipo de morte a autofagia (Kanzawa *et al.*, 2004). Estudos em células de melanoma também indicam que as vias de morte por apoptose não são ativadas por TMZ e, de fato, a viabilidade reduzida é resultado do bloqueio em G2/M e indução de senescência celular (Mhaidat *et al.*, 2007).

O reparo da lesão O⁶-metil-G por MGMT não é o único mecanismo responsável pela resistência a agentes alquilantes (Bobola *et al.*, 1996). Aductos

N⁷-metil-G (N⁷-metilguanina) e N³-metil-A (N³-metiladenina) são processados através do reparo por excisão de base (BER - *Base excision repair*), um mecanismo multiprotéico iniciado por diversas glicosilases dano-específicas (Denny *et al.*, 1994; Willson, 1998). Interessantemente, tais lesões compreendem mais de 80% das lesões induzidas pela TMZ no DNA (Tentori e Graziani, 2002; Sobol e Wilson, 2001). Assim, a resistência a este quimioterápico pode ser causada em parte por um eficiente processo de reparo via BER, mas poucos estudos têm focalizado essa abordagem (Liu e Gerson, 2004).

1.3 Reparo Por Excisão de Base (BER)

Bases oxidadas, deaminadas, alquiladas ou etanoaductos exocíclicos gerados por agentes endógenos, exógenos e drogas antitumorais são geralmente reparados pela via BER (Adhikari *et al.*, 2008). Essa via é um mecanismo de reparo do DNA predominante em células de mamíferos, capaz de processar as lesões de bases, estimadas em cerca de 10⁴ eventos por célula, por dia (Lindahl, 1993; Nakamura *et al.*, 1998; Lindahl e Barnes, 2000).

Os aductos N⁷-metil-G e N³-metil-A, gerados após a exposição a agentes alquilantes (como a TMZ), são processados via BER. Por esta via, as bases danificadas são removidas por DNA glicosilases bi-funcionais que além de remover a base, pela sua atividade de liase 3'AP, remove também o açúcar-fosfato. Alternativamente, a base pode ser removida por uma DNA glicosilase monofuncional e o açúcar fosfato sofre remoção por uma enzima endonuclease AP (endonuclease apurínica/apirimidínica), como a APE1 (*AP endonuclease 1*). A remoção do açúcar-fosfato, pelas duas formas, resulta em um grupo 3'-OH e 5'-deoxiribose fosfato (5'dRP) livre (Baute e Depicker, 2008). As lacunas são preenchidas por dois percursos: a via curta (*Short Patch* - SP-BER) ou a via longa (*Long Patch* - LP-BER), em que apenas 1 ou 2-13 nucleotídeos são substituídos, respectivamente (Sobol *et al.*, 1996), pela DNA polimerase β (pol β) no reparo pela via curta ou pela pol β, δ ou ε no reparo pela via longa (Dogliotti *et al.*, 2001). Participantes adicionais no reparo pela via longa são RFC (*replication factor C*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), FEN1 (*flap endonuclease-1*) e PARP (poli (ADP-ribose) polimerase). PARP liga-se a quebras de fita simples (SSBs –

Single-Strand Breaks) e há evidências de que essa ligação protege da conversão em DSBs, assim preservando o substrato para o BER (Woodhouse *et al.*, 2008). Em adição, PARP é necessária para a estimulação da síntese e liberação da fita, facilitando o reparo de longos trechos de DNA (Prasad *et al.*, 2001). O caminho final de ligação é operado pelo complexo XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing 1*)/DNA ligase III (LIG3) ou DNA ligase I (LIG1), nas vias curta e longa, respectivamente (Dogliotti *et al.*, 2001; Almeida e Sobol, 2007; Baute e Depicker, 2008) (**Figura-2**).

Os agentes alquilantes produzem aductos de bases que são precursores de sítios abásicos, e estes impedem a síntese de DNA por DNAs polimerases, bloqueando a duplicação, contribuindo para a toxicidade (Loeb e Preston, 1986; Sutton e Walker, 2001). Consistente com estas considerações, bactérias (Demple e Harrison, 1994) e leveduras mutantes (Memisoglu e Samson, 2000), que são geneticamente deficientes para atividade de endonuclease AP, são hipersensíveis à morte induzida por agentes alquilantes.

Ape1 inicia o reparo de sítios AP potencialmente letais causados por agentes alquilantes e radiações (Demple e Harrison, 1994; Evans *et al.*, 2000). Tipicamente, esta apresenta, em células de mamíferos, atividade de reparo estimada em aproximadamente 95% (Evans *et al.*, 2000), deste modo, contribuindo para a resistência a agentes alquilantes utilizados para tratamento de gliomas (Silber *et al.*, 2002; Bobola *et al.*, 2004), podendo predizer a resposta em terapias adjuvantes.

Estudos pré-clínicos confirmaram que a modulação de componentes da via BER está associada ao aumento da sensibilidade a agentes alquilantes (Liu e Gerson, 2004; Boiteux e Guillet, 2004), sendo que esse fato pode aumentar a eficácia dessas drogas (Trivedi *et al.*, 2005). Inibidores de BER e de PARP podem aumentar a citotoxicidade da TMZ mesmo em células deficientes para MMR, posto que os aductos N⁷-metil-G e N³-metil-A contribuem para esta resposta (Liu *et al.*, 1999). Da mesma forma, a inibição da pol β , juntamente com o aumento da expressão da DNA glicosilase AAG (*alkiladenine DNA glycosylase*), mostrou um aumento significativo na eficácia da TMZ (Trivedi *et al.*, 2005).

Considerando que a via BER contribui significativamente para o reparo dos danos induzidos pela TMZ e que a modulação deste mecanismo de reparo pode

aumentar a eficiência terapêutica dessa droga, torna-se interessante investigar se linhagens de GBM resistentes a TMZ podem ser sensibilizadas através da inibição desta via de reparo.

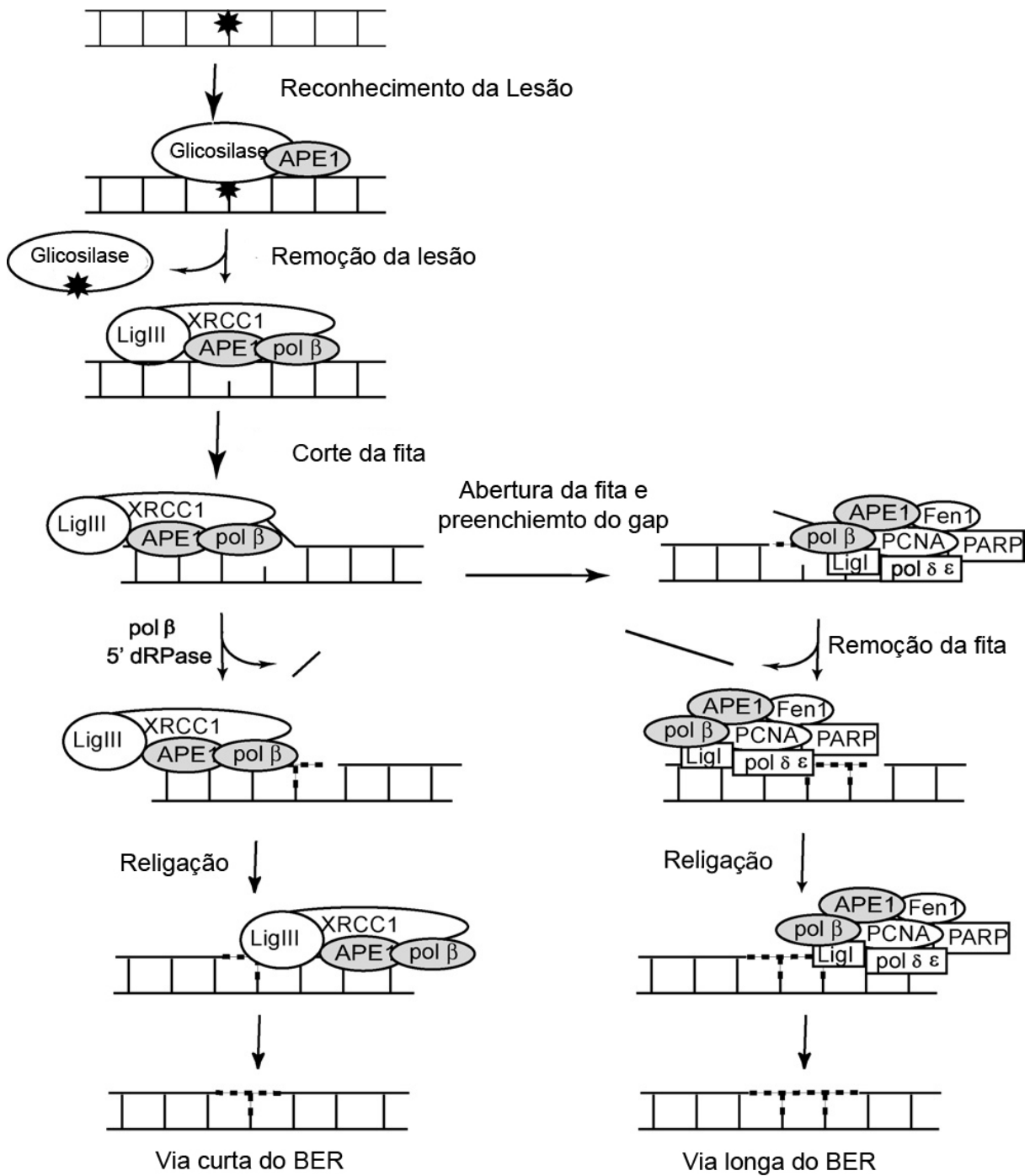


Figura 2: Representação esquemática mostrando a via curta (esquerda) e longa (direita) do reparo via BER (Almeida e Sobol, 2007; adaptado).

1.4 Metoxiamina (MX): Inibidor da via de reparo BER

A MX é uma pequena molécula derivada do alkoxiamino, tendo como alvo específico o reparo pela via BER (Talpaert-Borle e Liuzzi, 1983; Liuzzi Talpaert-Borle, 1985). Essa molécula reage covalentemente com o átomo C1' aldeídico em sítios AP do DNA, gerados pela remoção da base danificada por DNA glicosilases, que são refratários à eliminação pelo mecanismo β -dRP liase (Fortini *et al.*, 1993; Horton *et al.*, 2002). A reação de MX com sítios AP é mais rápida do que a reação de APE1 (Rosa *et al.*, 1991) e o bloqueio do reparo por MX ocorre pela modificação química dos sítios AP (Liuzzi e Talpaert-Borle, 1985).

A inibição química de BER por MX é uma estratégia válida para aumentar a citotoxicidade de agentes quimioterápicos metilantes, tais como a TMZ, ou para superar a resistência à droga (Liu *et al.*, 1999; Taverna *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002).

A formação de aductos DNA-MX nos sítios AP pode interromper o reparo pela via BER e prolongar a indução de danos por agentes alquilantes. Quando ligado, MX é resistente à remoção enzimática por APE1 (Horton *et al.*, 2000), fazendo com que ocorra o acúmulo de sítios potencialmente tóxicos (Liu e Gerson, 2004). Incompletamente reparados, tais sítios AP bloqueados pela ligação à MX conduzem a um aumento de SSBs e DSBs, bem como à morte celular (Rinne *et al.*, 2004; Taverna *et al.*, 2001).

A ação de agentes causadores de danos pode ser potencializada por MX, conforme demonstrado em estudos *in vitro*; em células de câncer ovariano, a atividade de agentes quimioterápicos como a TMZ foi modulada, via tratamento com MX (Fishel *et al.*, 2007) (**Figura-3**) e ainda, a citotoxicidade do metilmetanosulfonato e TMZ também foram potencializadas pela ação desse inibidor em células de câncer de mama (Rinne *et al.*, 2004). Concentrações não tóxicas de MX, combinadas com TMZ, tanto para células de câncer de cólon proficientes e deficientes para MMR, resultaram em um significativo efeito antitumoral, sendo que o gene *TP53* não foi requerido para indução de apoptose, observada em 46-50% das células (Liu *et al.*, 2002).

Células de câncer ovariano, quando tratadas com TMZ associada à MX, apresentaram um aumento significativo de DSBs, detectadas pelo anticorpo

específico contra gama-H2AX (Fishel *et al.*, 2007). O mesmo foi observado em células deficientes para pol β (Trivedi *et al.*, 2005), mostrando que o acúmulo de intermediários do BER induzidos pela TMZ conduz à fosforilação de H2AX (gama-H2AX). H2AX é fosforilada em resposta a DSBs (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004), contudo, o aumento da sua fosforilação, observada em resposta ao tratamento com TMZ associada a MX, provavelmente é devida a sítios AP não reparados (Fishel *et al.*, 2007).

Vários trabalhos na literatura têm focado a via de reparo BER como alvo potencial para radio e quimio-sensibilização (Adhikari *et al.*, 2008; Johannessen *et al.*, 2008; Fishel *et al.*, 2007; Fishel e Kelley 2007; O'Connor *et al.*, 2007; Trivedi *et al.*, 2005; Taverna *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002). Entretanto, as informações sobre o papel do BER nas respostas à TMZ em gliomas ainda são escassas (Liu e Gerson, 2004).

Os mecanismos pelos quais intermediários da via BER (por ex. 5' dRP) causam bloqueio da síntese de DNA e induz morte celular ainda não foram elucidados (Sobol *et al.*, 2003), o que estimula a pesquisa sob esse enfoque visando, em última instância, investigar as vias genéticas que conduzem à resistência das células de GBM. Esses resultados podem, futuramente, embasar a escolha de procedimentos terapêuticos que resultem numa maior eficácia do tratamento de gliomas com agentes alquilantes.

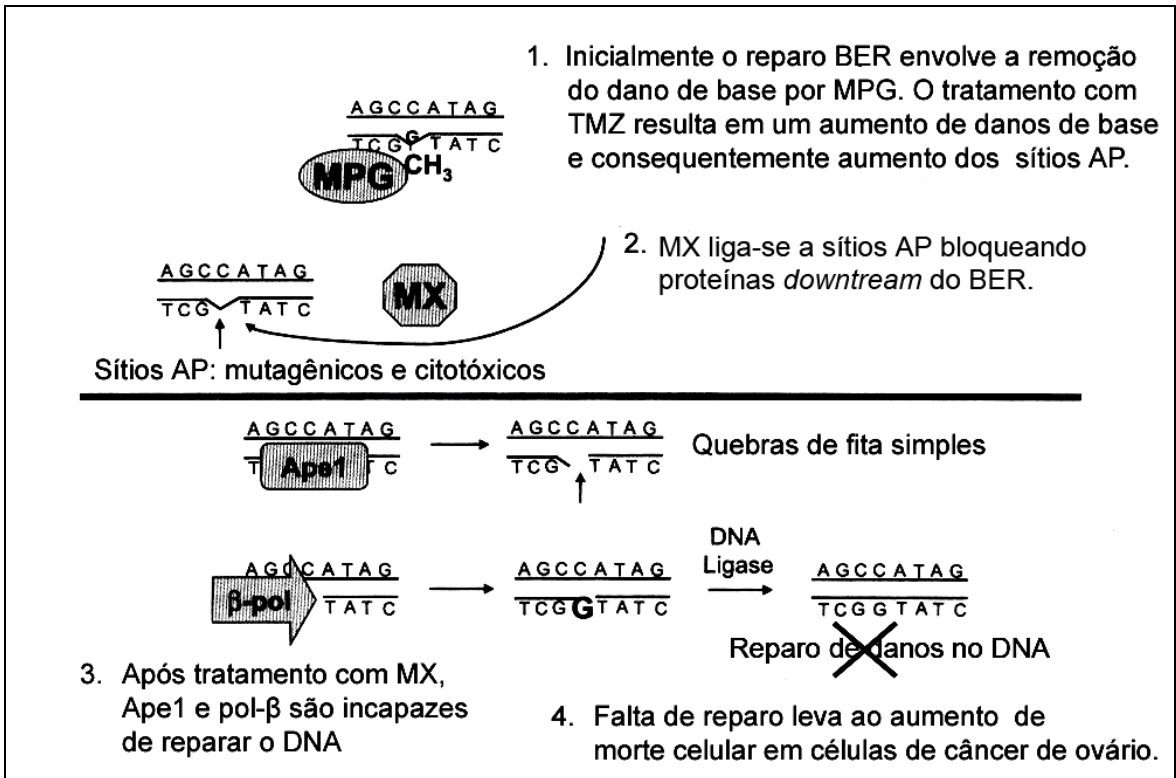


Figura 3: Esquema mostrando o mecanismo pelo qual MX pode aumentar a citotoxicidade da TMZ em células de câncer ovariano. MX bloqueia a via de ligação a sítios AP bloqueando a ação de Ape1/Ref-1 e polimerase β (Fishel *et al.*, 2007; adaptado).

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente trabalho objetivou avaliar as respostas celulares mediadas pelo quimioterápico temozolomida em combinação com o inibidor de reparo por excisão de base, metoxiamina, em linhagens de glioblastoma resistentes, visando testar a hipótese de que a via BER de reparo contribui para a quimio-resistência dessas células. Além de avaliar a possível existência de efeito sinérgico do tratamento combinado (TMZ + MX), foi proposto estudar os efeitos de MX sobre a expressão transcricional e protéica de alguns genes representantes da via BER de reparo do DNA.

2.2 Específicos

- a) Determinar entre as linhagens celulares de glioblastoma (U138MG, U251MG, T98G, U87MG e U343MG-a), quais são resistentes ao tratamento com diversas concentrações de TMZ, por meio dos testes de citotoxicidade e sobrevivência celular, bem como verificar os efeitos da associação de TMZ com a MX.
- b) Analisar a expressão transcricional do gene *MGMT* nas linhagens de glioblastoma.
- c) Avaliar a sobrevivência clonogênica da linhagem T98G (resistente à TMZ), mediante o tratamento com o quimioterápico TMZ em combinação com o inibidor MX.
- d) Analisar a indução de danos no DNA e a cinética de reparo destes, na linhagem T98G em resposta ao tratamento com TMZ combinada ou não à MX.
- e) Investigar a indução de apoptose nas células T98G, em resposta ao tratamento com a droga TMZ combinada ou não à MX.

f) Analisar a expressão transcricional de genes envolvidos na via de reparo por BER (*APE1*, *FEN1*, *XRCC1*) em resposta ao tratamento com a TMZ associada ou não à MX.

g) Analisar a expressão das proteínas envolvidas na via de reparo BER (*APE1*, *FEN1*, PCNA) em resposta ao tratamento com a TMZ associada ou não à MX.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Celulares

A linhagem U343MG-a foi doada pelo Prof.Dr. Carlos G. Carlotti Jr., do Departamento de Cirurgia e Anatomia (HC-FMRP/USP), enquanto que as linhagens T98G e U87MG, pela Prof. Dra. Mari Cleide Sogayar (IQ-USP). As linhagens U138MG e U251MG foram cedidas pelo Prof.Dr. Guido Lenz da UFRGS.

As linhagens U251MG, U138MG e T98G apresentam mutações nos genes *TP53*, *p16*, *p14ARF* e *PTEN*, enquanto que as linhagens U87MG e U343MG-a apresentam mutações para três dos genes mencionados acima, sendo selvagem apenas para o gene *TP53*.

3.2. Agentes antitumorais

Temozolomida: princípio extraído do medicamento Temodal® (Schering Plough). O conteúdo da cápsula foi diluído em água deionizada, agitada a 37°C por 30 minutos e em seguida, filtrada em filtro Millipore (0,45 µ) e estocado a -80°C (Figura 4).

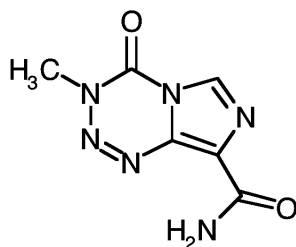


Figura 4: Estrutura química do quimioterápico temozolomida (C₆H₆N₆O₂).

Inibidor Cloridrato de Metoxiamina (CH₃ONH₂.HCl) (Sigma): este é um inibidor de BER que se liga a sítios AP, impedindo a remoção dos mesmos pelas AP endonucleases. Para os tratamentos em cultura, a droga foi dissolvida em água deionizada (pH 7,4), filtrada em filtro Millipore (0,45 µ) e as alíquotas foram estocadas a -80°C (Figura 5).

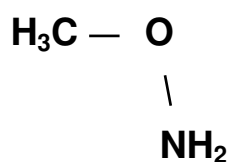


Figura 5: Estrutura química do inibidor metoxiamina.

3.3. 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, 50% soro bovino fetal e 10% glicerol). Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² (Corning) com 10 mL de meio de cultura (DEM + F10 - Sigma) suplementado com 10% 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.

3.4 Tratamento com o Antitumoral TMZ

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

Primeiramente as células foram sub-cultivadas e semeadas em vários frascos de cultivo, sendo incubadas para o tratamento. Aproximadamente 24 h após o início do cultivo, uma determinada quantidade de células foram semeadas e tratadas, com várias concentrações de TMZ ou TMZ combinada a 20 mM de MX, dependendo do teste empregado. A droga permaneceu no meio de cultura por 24 h, sendo posteriormente retirada e as culturas foram lavadas para a remoção da droga. Os tempos de colheita dos experimentos também variaram de acordo com o teste empregado.

3.5. Análise da sobrevivência celular utilizando o KIT XTT (Roche Molecular Biochemicals/ Mannheim, DE)

O ensaio com o kit-XTT possibilita detectar células viáveis, com base no princípio de que a clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas forma 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 TMZ. Foram semeadas 6×10^4 células para o teste de citotoxicidade e $1,5 \times 10^4$ células para o teste sobrevivência celular, em placas de cultivo com 12 poços (Corning) por 24 h, quando então foram tratadas com a combinação TMZ (100, 200, 400, 800, 1000 μ M) mais MX (20 mM) e TMZ sozinha. Após tratamento de 24 h, as células foram lavadas, permanecendo em cultura por 24 h para avaliação da citotoxicidade e 120 h para observar a sobrevivência celular. O kit XTT foi utilizado no momento da colheita, permanecendo em cultura por cerca de meia hora, até o momento da leitura colorimétrica em um espectrofotômetro, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem dos poços, 60 μ L da solução XTT/electron (preparada de acordo com as instruções do fabricante) foi utilizada. O resultado da absorbância, medida em 492 e 690 nm, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra.

Na análise estatística, a média das duplicatas dos três experimentos independentes foram comparadas pelo teste One Way RM ANOVA seguido pelo método de comparação de Bonferroni.

3.6. Teste de Sobrevivência Clonogênica

Foram semeadas 1×10^6 células/frasco, sendo os tratamentos realizados após 24 h. As concentrações de TMZ testadas foram: 100, 200, 400, 800, 1000 μ M, combinada ou não a 20 mM de MX, durante 24 h; após o tratamento, as células foram lavadas e tripsinizadas, sendo semeadas 300 células por frasco de cultivo, para cada tratamento (diferentes concentrações da droga) e em triplicata.

Aproximadamente após 10 dias do tratamento, foram contadas as colônias com mais de 50 células, coradas com Giemsa e analisadas com o auxílio de uma lupa.

Nesse ensaio, a média das triplicatas de cada um dos três experimentos independentes foram comparadas através do teste estatístico One Way RM ANOVA, seguido pelo método de comparação de Bonferroni.

3.7. Detecção de danos no DNA por meio do Ensaio Cometa

A linhagem T98G foi sub-cultivada e semeada (5×10^4) em placas de cultivo de 6 poços (Corning) e incubadas por 24 h, seguindo-se o tratamento com as concentrações de 400 e 600 μM de TMZ combinada ou não a 20 mM de MX por 24 h. Posteriormente ao tratamento, as células foram lavadas com solução de PBS, sendo adicionado o meio de cultura completo, seguido de reincubação a 37°C. O processamento das amostras foi feito de acordo com o protocolo descrito por Singh *et al* (1988) com algumas adaptações realizadas no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. As células foram colhidas nos tempos de 2, 6, 12 e 24 h após o tratamento, sendo 500 μL de suspensão celular transferidos para um microtubo de 1,5 mL, e então submetidos à centrifugação de 1.000 rpm, a 4°C, por 5 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet*, sendo acrescentados 160 μL de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) 0,5%, misturando-se levemente. O material de cada microtubo foi transferido para duas lâminas recém-preparadas com a primeira camada de agarose de ponto de fusão normal 1,5%. Foram colocadas as lamínulas sobre o material e, em seguida, estas foram levadas à geladeira por 5 minutos, quando as lamínulas foram retiradas. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) por 72 horas, permanecendo em geladeira durante todo o tempo. As lâminas foram retiradas da solução e mergulhadas em solução tampão de eletroforese (NaOH 0,3 M e Na₂EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos a 4°C, sendo assim, levadas para a cuba de eletroforese. Transcorridos 20 minutos em corrente eletroforética (25 V [1 V/cm, 300 mA] a 4°C), as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos. Após a neutralização, as

lâminas foram secas à temperatura ambiente, e então, fixadas em etanol 100%. Para a coloração do material, foram adicionados 30 µL de solução de brometo de etídio (concentração final de 0,2 mg/mL) sobre a lâmina, sendo esta recoberta por uma lamínula.

O material foi analisado em microscópio de fluorescência (ZEISS, filtro 516-560 nm e barreira de filtro de 590 nm), em aumento de 40x. Foram analisadas 50 células/cultura, sendo observadas as células com contorno circular (núcleos sem danos de DNA) ou em forma de “cometa” (núcleos com danos no DNA), no qual a extensão da cauda reflete a distância de migração dos fragmentos de DNA, seguida de captura de imagem digital (Câmera Axiovision Zeiss). As imagens obtidas foram analisadas pelo programa TryTek Comet Score™, FreeWare v1.5, onde se obtém o valor da porcentagem de DNA na cauda, baseado nos pixels dos fragmentos de DNA. Os resultados gerados pelo programa foram transferidos para uma planilha, sendo realizado então o teste estatístico One Way RM ANOVA seguido pelo método de comparação de Bonferroni.

3.8. Detecção morfológica de células apoptóticas

As células da linhagem T98G foram sub-cultivadas e semeadas (5×10^4 células) em placas de cultivo de 6 poços e incubadas por 24 h, seguindo-se o tratamento com as concentrações de 400 e 600 µM de TMZ combinada ou não a 20 mM de MX por 24 h. A coleta das células para análise foi realizada nos tempos de 24, 48 e 72 h após o final do tratamento. A técnica empregada permite a detecção diferencial de células normais, apoptóticas e necróticas pelo uso de três corantes: Hoechst 33342, Iodeto de propídio (PI) e Diacetato de fluoresceína (DAF), todos da empresa Sigma-Aldrich (USA). As células apoptóticas foram reconhecidas pela característica típica de cromatina nuclear condensada e núcleo fragmentado, enquanto que as necróticas, pela aparência de núcleo íntegro e corado em vermelho, devido à entrada de PI.

Foi empregado o do teste estatístico One Way RM ANOVA seguido pelo método de comparação de Holm-Sidak, sendo analisados os dados provenientes de três experimentos independentes.

3.9. Experimentos para avaliação da expressão gênica transcricional

3.9.1 Extração de RNA total e preparação dos cDNAs

Nos experimentos de análise de expressão gênica, foram semeadas 4×10^6 células por frasco de cultivo de 75 cm² (Corning). As células da linhagem T98G foram tratadas por 24 h com as concentrações de 600 µM de TMZ combinada ou não a 20 mM de MX, sendo colhidas em tempos variáveis (24, 48 e 72 h) após o tratamento. Para verificar a integridade do RNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose com formaldeído.

Para a preparação do cDNA a ser utilizado nas reações de PCR inversa e quantitativa em tempo real, foi removido o DNA das amostras de RNA, usando-se o Kit *Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (Invitrogen).

Na reação de RT-PCR foi utilizado o *Kit Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), adicionando 1 µL de *oligo DT* (250ng/µL) aos RNAs provenientes da amostra da reação dom DNase e incubados a 70°C por 10 minutos e, ao final, as amostras foram colocadas no gelo. Adicionou-se então aos tubos um mix contendo 4 µL de *First-strand buffer 5X*, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de dNTP 10 mM e 1 µL de *Superscript III RT* 200U/µL, incubando-se as amostras primeiramente por 50 minutos a 50°C e finalmente a 70°C por 15 minutos. Ao final da reação, foi realizada uma PCR convencional para um gene constitutivo, a Actina-β, a fim de testar a integridade das amostras de cDNAs, que posteriormente foram estocadas a -20°C até sua utilização nos ensaios de PCR inversa e quantitativa em tempo real.

3.9.2 Avaliação da expressão do gene *MGMT* por RT-PCR

Foi avaliada a expressão transcricional do gene *MGMT* visando identificar quais linhagens de GBM (U343MG-a, U87MG, U138MG, T98G e U251MG) seriam capazes de expressar esse gene. Deste modo, foi realizada uma PCR, sendo o mix preparado de acordo com as seguintes proporções: 2,5 µL de MgCl₂ (2 mM), 0,5 µL dNTPs (10 mM), 2,5 µL de 10X PCR Buffer e 0,2 µL de Taq polimerase (5U/µL), todos da Invitrogen, 0,5 µL do primer *forward* 5'-

CCGTTTGCGACTTGGTACTT -3' (solução estoque de 10 µM), 0,5 µL do primer *reverse* 5'- CTCACAACCAGACAGCTCCA -3' (solução estoque de 10 µM) do gene *MGMT* e 0,75 µL do cDNA obtido da reação de transcriptase reversa. A reação foi completada para um volume final de 25 µL. As condições de incubação e ciclagem foram: 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (40 segundos a 59°C) e extensão (30 segundos a 72°C) e por fim, 72°C por 10 minutos. Posteriormente, foi preparado um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, para a aplicação das amostras e detecção das bandas (101 pb) provenientes da amplificação do RNAm do gene *MGMT*.

3.9.3 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real

Inicialmente, para determinar a quantidade inicial do número de cópias do gene de interesse, foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram realizadas num volume de 15 µL. Para este volume o mix foi preparado de acordo com as seguintes proporções: 7,5 µL de *PCR Master Mix (SYBR Green – Applied Biosystems, Foster City)*, 0,75 µL do primer *forward* (solução estoque de 10 µM), 0,75 µL do primer *reverse* (solução estoque de 10 µM), 5,4 µL de água livre de RNase e 0,6 µL do cDNA. As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (*Applied Biosystems, Foster City*), onde foram adicionados a mistura da reação e as amostras de cDNA. Após a montagem das reações de PCR, as placas foram seladas. Foram feitas a incubação e a ciclagem, utilizando-se o seguinte programa: incubação (2 minutos a 50°C), ativação da Taq (15 minutos a 95°C) e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95°C), anelamento (30 segundos a 56°C) e extensão (30 segundos a 72°C). Após esse programa, ainda foi realizada a curva de dissociação/fusão.

Foram utilizados os iniciadores para os genes *FEN1*, *APE1*, *XRCC1*, além de Actina β, um gene constitutivo, que tem por finalidade normalizar os dados de expressão gênica (**Tabela-1**). Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html).

As amostras de RNA provenientes de três experimentos foram utilizadas para determinar a quantidade inicial do número de cópias do gene de interesse, utilizando-se o método de curva-padrão relativa para cada gene, através da diluição seriada de uma amostra conhecida. Mais especificamente, foi utilizado o método de C_T comparativo, ou $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen 2001).

Tabela 1: Lista de iniciadores utilizados nas reações de qPCR em tempo real. Os iniciadores do gene ACTINA β também foram utilizado na PCR convencional para a confirmação da integridade do cDNA produzido por RT-PCR.

Primer	Seqüência	Posição	Tamanho do produto de PCR (pb)
ACTINA β - forward	5' - GATGAGATTGGCATGGCTTT - 3'	57	141
ACTINA β - reverse	5' - ATTGTGAACTTTGGGGGATG - 3'	197	
XRCC1 - forward	5' - TCCTCTGTGTCCCCAGAATC - 3'	1479	111
XRCC1 - reverse	5' - CCCTGAAGAGACCAAAGCAG - 3'	1589	
FEN1 - forward	5' - CCAGCTCTTCTTGGAACTG - 3'	1212	120
FEN1 - reverse	5' - AGATCCTCAGAGAACTGCTT - 3'	1331	
APE1 - forward	5' - ATATTGCTTCGGTGGGTGAC - 3'	279	115
APE1 - reverse	5' - GCTCTGTCCTGAGCTCATCC - 3'	393	

3.10. Avaliação da expressão protéica por Western blot

3.10.1 Extração de proteínas com Solução de Lise

Foi utilizado o reagente ProteoJT™ Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas Life Sciences) para extração de proteínas das células T98G tratadas com 600 μ M de TMZ e TMZ + MX (20 mM). Os tempos de colheita foram: 24, 48 e 72 h após o tratamento de 24h com as drogas. Brevemente, as células foram tripsinizadas e lavadas uma vez com PBS gelado. Posteriormente, foi adicionada a solução de lise gelada (100-200 μ L/10⁶ células) com 1% do cocktail de inibidor de proteases Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Scientific). As células

foram ressuspensas em vórtex e permaneceram por 10 minutos no shaker (1200 rpm). Logo após, as células foram centrifugadas a 18.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e estocado a -80°C. As proteínas foram quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão obtida para uma proteína conhecida (por exemplo: soro albumina bovina) utilizando-se o kit BSA (*Pierce*).

3.10.2 Eletroforese de proteínas

O perfil das proteínas foi analisado por SDS-PAGE utilizando-se géis Bis-Tris ou Tris-Acetato (*Invitrogen*). As amostras foram preparadas com 40 µg de proteína para 2,5 µL de tampão da amostra (tris-glicina SDS – *Invitrogen*). Em seguida, as proteínas foram denaturadas a 70°C por 10 minutos e posteriormente aplicadas ao gel. A eletroforese foi realizada em cuba (XCell *SureLock*TM Mini-Cell/*Invitrogen*) contendo tampão apropriado (*Invitrogen*) de acordo com o gel utilizado, sendo aplicados em média 200V por 35-50 minutos, podendo haver variações nestes parâmetros de acordo com o peso molecular da proteína a ser estudada.

3.10.3 Transferência eletroforética

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas Invitrolon PVDF (*Invitrogen*) utilizando-se o sistema XCell IITM Blot Module (*Invitrogen*). Os componentes da transferência foram previamente imersos em tampão de transferência antes de serem colocados na cuba. A voltagem aplicada foi de 30 V constantes por 2-4 h, podendo haver variações nestes parâmetros de acordo com o peso molecular da proteína a ser estudada. Para a confirmação da transferência das proteínas, as membranas foram coradas por 12 minutos com corante SimplyBlueTM SafeStain (*Invitrogen*). Posteriormente, as mesmas foram lavadas com metanol e submetidas à imunodeteção.

3.10.4 Imunodeteccão e visualização das proteínas

A imunodeteccão e a visualização das proteínas foram realizadas utilizando-se o kit “Western Breeze Chromogenic” (*Invitrogen*). A membrana foi imersa em 10 mL de solução bloqueadora e incubada durante 1 h em um agitador rotatório. Em seguida, a mesma foi lavada com 20 mL de água destilada durante 5 minutos e incubada com 10 mL da solução de anticorpo primário *overnight*. A diluição de cada anticorpo foi determinada em experimentos preliminares, sendo: FEN1, APE1 e PCNA e β -actina diluídos 1:1000. Após esse passo, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos. A membrana foi incubada em 10 mL da solução de anticorpo secundário proveniente do Kit “WesternBreeze Chromogenic” (*Invitrogen*) por 30 minutos, sendo em seguida, novamente lavada 3 vezes por 5 minutos com solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados 2 banhos com 20 mL de água destilada por 2 minutos. Após este último, a membrana foi incubada com 5 mL de substrato cromogênico até o aparecimento de bandas roxas em sua superfície. Finalmente, as membranas foram lavadas duas vezes (com água destilada) e secadas com papel de filtro. Os marcadores de peso molecular empregados foram: MagicMark™ XP Western Protein Standard e SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, ambos da *Invitrogen*. As bandas foram quantificadas utilizando-se o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade e Sobrevivência Celular

Foram realizados experimentos com as linhagens U343MG-a, T98G, U87MG, U251MG e U138MG utilizando o *Cell Proliferation Kit II* (XTT) para analisar a citotoxicidade (24 h) e a sobrevivência celular (120 h), em resposta ao tratamento com diversas concentrações do antitumoral TMZ (100, 200, 400, 800 e 1000 μM). Nesses testes, as células permaneceram por 24 h na presença da droga, sendo posteriormente lavadas e reincubadas.

Para todas as linhagens estudadas, os resultados dos ensaios de citotoxicidade, avaliados após 24 h da exposição à droga, demonstraram que não houve diferenças significativas nas porcentagens de células viáveis em todas as concentrações testadas, quando comparadas com as apresentadas pelo grupo controle (**Figura-6, Tabela-2**), indicando a ausência de efeito citotóxico imediato.

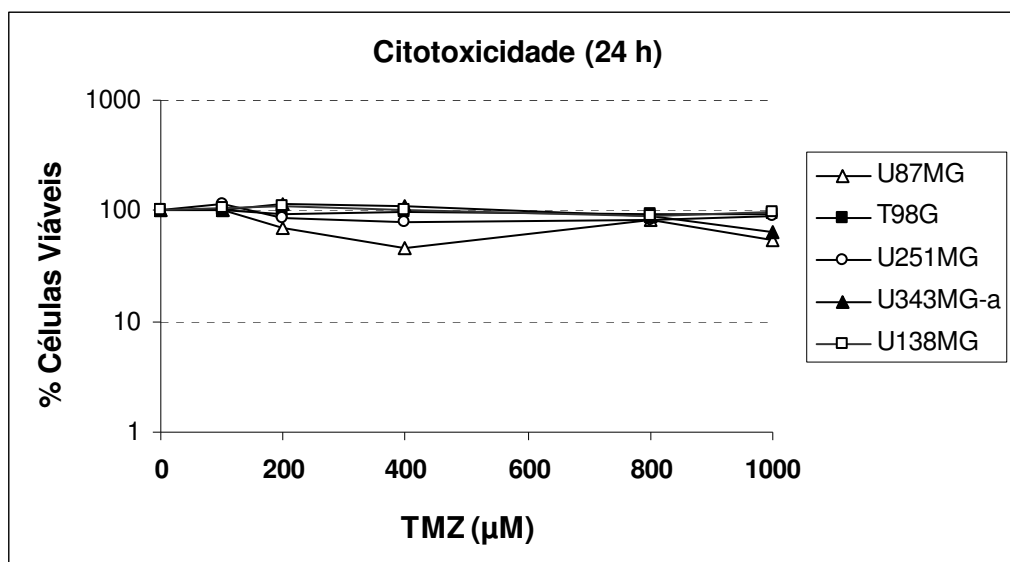


Figura 6: Resposta aos tratamentos (24 h) com cinco concentrações de TMZ (100, 200, 400, 800 e 1000 μM) realizados para diferentes linhagens GBM: U87MG, T98G, U251MG, U343MG-a e U138MG. As células foram colhidas 24h após o tratamento, sendo analisadas pelo *Cell Proliferation Kit II* (XTT). Foram realizados três experimentos independentes.

Tabela 2: Porcentagens de células sobreviventes nos ensaios realizados com as linhagens U343MG-a, U251MG, U87MG, U138MG e T98G, tratadas por 24 h com cinco concentrações de TMZ (100, 200, 400, 800 e 1000 μ M) e TMZ associada a 20 mM MX. Os resultados foram obtidos após 24 h de tratamento, utilizando o *Cell Proliferation Kit II (XTT)*. Foram realizados três experimentos independentes.

Linhagens	Citotoxicidade (%)					
	0 μ M TMZ	100 μ M TMZ	200 μ M TMZ	400 μ M TMZ	800 μ M TMZ	1000 μ M TMZ
U87MG	100,0	102,3	69,3	46,6	81,3	54,0
T98G	100,0	102,7	94,9	96,8	92,5	95,2
U251MG	100,0	115,5	87,5	77,8	83,1	89,1
U343MG-a	100,0	99,6	113,9	111,8	89,1	65,4
U138MG	100,0	107,1	109,5	100,1	89,8	97,2

A sobrevivência celular foi também analisada após 120 h, em três experimentos independentes e para as mesmas linhagens de GBM, utilizando novamente o *Cell Proliferation Kit II (XTT)*, sendo submetidas aos mesmos tratamentos com TMZ associada ou não a 20 mM do inibidor MX (**Figura-7, Tabela-3**). Nesses ensaios, diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram encontradas para todas as concentrações testadas de TMZ, associadas ou não ao inibidor, em relação ao controle. Nas linhagens U343, U251 e U87, porém, não houve diferenças entre os tratamentos realizados com a TMZ sozinha e TMZ combinada ao inibidor MX. Essas linhagens apresentaram uma queda (~50%) nas taxas de sobrevivência em resposta ao tratamento com a TMZ, mas em concentrações superiores a 200 μ M não houve diferenças acentuadas entre os tratamentos.

Para a linhagem U138, diferenças estatisticamente significativas foram observadas, em relação ao controle, para os tratamentos com a droga sozinha nas concentrações de 400, 800 e 1000 μ M, porém, no tratamento combinado ao inibidor, diferenças foram observadas para concentrações superiores a 200 μ M ($p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa em relação aos tratamentos somente com a TMZ e TMZ + MX. Esta linhagem mostrou-se pouco mais resistente em

relação às linhagens acima mencionadas, sendo que a concentração capaz de induzir morte em aproximadamente 50% das células foi de 400 μM .

A linhagem T98G mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) após 120 h de tratamento nas concentrações superiores a 400 μM de TMZ; no tratamento combinado (TMZ + MX), todas as concentrações testadas (100 a 1000 μM) mostraram diferenças significativas na comparação com o controle e com o tratamento somente com a TMZ, o que não foi observado para as outras linhagens. Além disso, as células T98G mostraram-se extremamente resistentes aos tratamentos, sendo que a maior concentração testada não alcançou sequer uma redução de pelo menos 50% na porcentagem de células viáveis, sendo observada uma proporção de 75,8%. Entretanto, o tratamento combinado reduziu significativamente a porcentagem de sobrevivência (31,1%) para concentrações $>800 \mu\text{M}$. Essa linhagem foi então selecionada para os demais ensaios, com base na observação de que a mesma se mostrou mais resistente ao tratamento com a TMZ (**Figura-8**), além de mostrar diferenças significativas entre os tratamentos isolados e combinados (TMZ e TMZ + MX), permitindo o estudo das possíveis vias implicadas na resistência à TMZ.

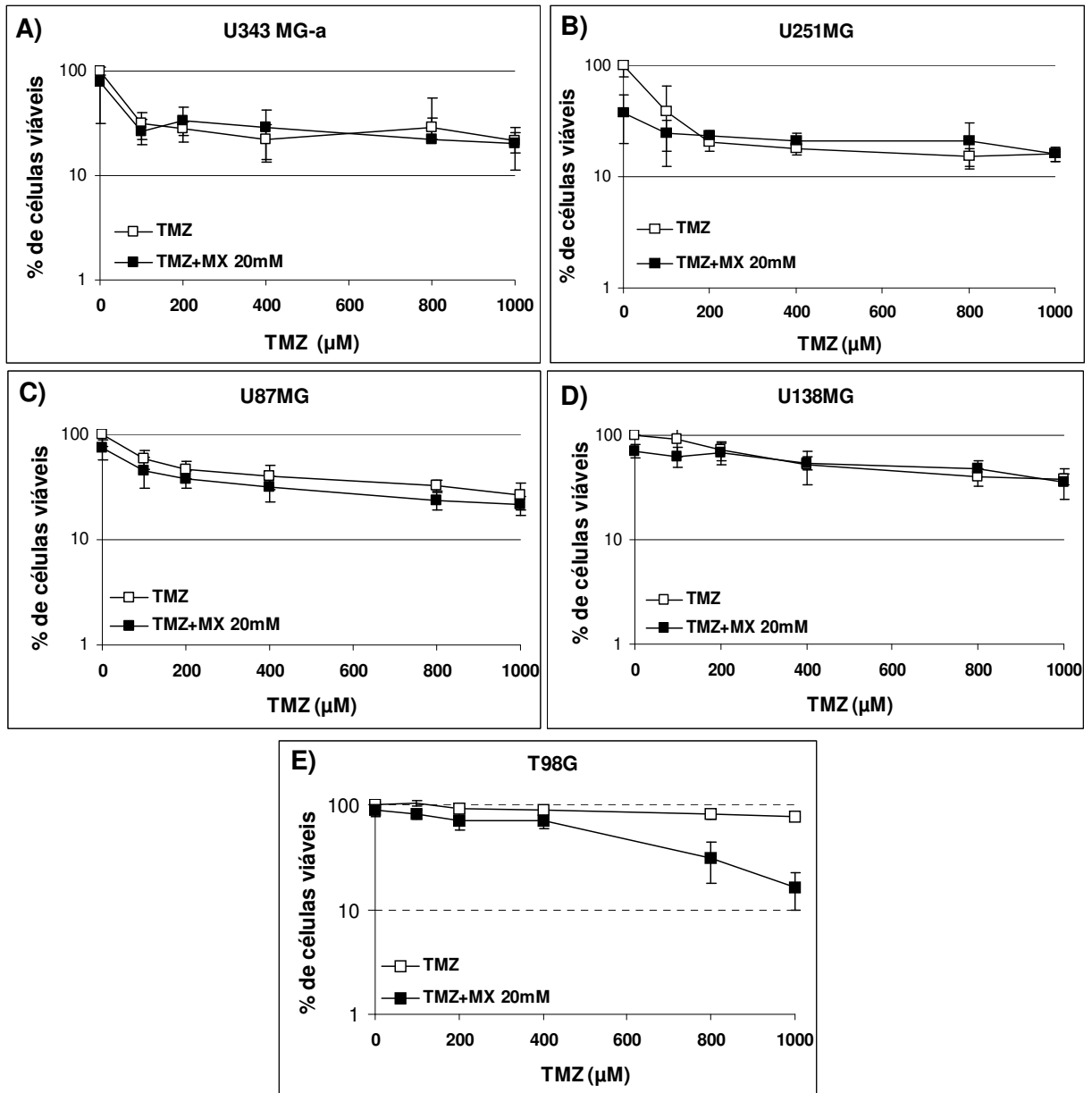


Figura 7: Sobrevivência celular das linhagens U343MG-a (A), U251MG (B), U87MG (C), U138MG (D) e T98G (E), após o tratamento com cinco concentrações de TMZ (100 200, 400, 800 e 1000 μM) e TMZ associada a 20 mM MX. As células foram colhidas cinco dias (120 h) após o tratamento, sendo analisadas pelo *Cell Proliferation Kit II* (XTT). Cada ponto no gráfico representa a média (± D.P.) de três experimentos independentes.

Tabela 3: Porcentagens de células sobreviventes em linhagens U343MG-a, U251MG, U87MG, U138MG e T98G, tratadas com cinco concentrações de TMZ (100, 200, 400, 800 e 1000 μ M) e TMZ associada a 20 mM MX. Os resultados foram obtidos após 5 dias de tratamento, utilizando o *Cell Proliferation Kit II (XTT)*. Foram realizados três experimentos independentes, sendo apresentadas as médias obtidas.

Linhagens	Tratamentos	Sobrevivência Celular (%)					
		0 μ M	100 μ M	200 μ M	400 μ M	800 μ M	1000 μ M
U343MG-a	TMZ	100	31,2 *	28,3 *	22,1 *	28,8 *	21,3 *
	TMZ + MX (20 mM)	78,4 *	26,9 *	33,3 *	28,5 *	22,3 *	20,2 *
U251MG	TMZ	100	38,5 *	20,5 *	17,7 *	15,3 *	15,9 *
	TMZ + MX (20 mM)	37,3 *	24,5 *	23,3 *	21,2 *	21,0 *	16,2 *
U87MG	TMZ	100	61,3 *	49,5 *	41,2 *	34,0 *	27,7 *
	TMZ + MX (20 mM)	73,2 *	45,3 *	39,8 *	32,1 *	25,8 *	24,5 *
U138MG	TMZ	100	90,7	71,5	51,5 *	39,9 *	37,6 *
	TMZ + MX (20 mM)	70,6 *	63,1	67,9 *	54,0 *	48,3 *	35,7 *
T98G	TMZ	100	102,6	92,5	88,1*	80,6*	75,8*
	TMZ + MX (20 mM)	90,0	80,8**	71,0**	69,8**	31,1**	16,1**

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

(**) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

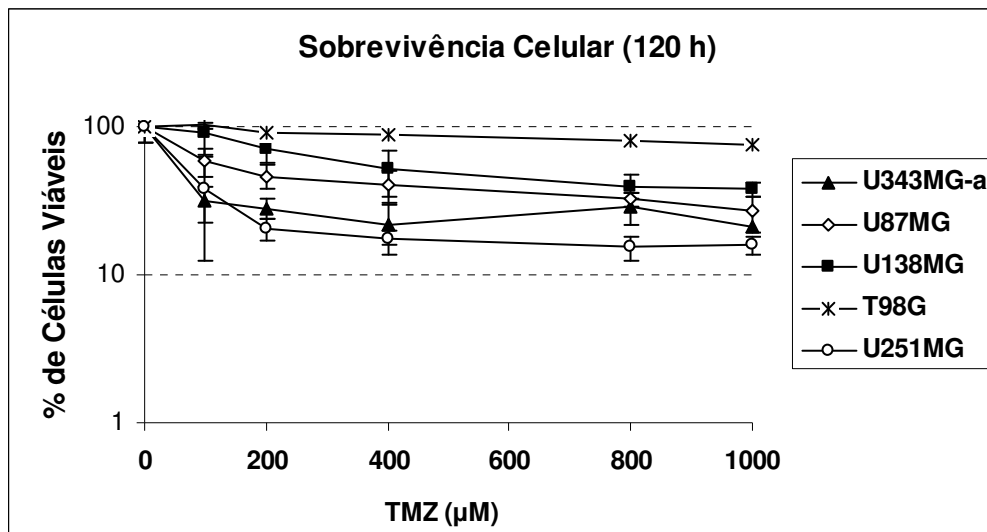


Figura 8: Sobrevivência celular analisada para diferentes linhagens GBM: U343MG-a, U87MG, U138MG, T98G e U251MG, tratadas por 24 h com várias concentrações de TMZ (100, 200, 400, 800 e 1000 µM) e colhidas cinco dias após o tratamento; a análise foi realizada com o *Cell Proliferation Kit II (XTT)*. Cada ponto no gráfico representa a média (\pm D.P.) de três experimentos independentes.

4.2. Sobrevivência Clonogênica

A linhagem T98G foi também analisada pelo ensaio de sobrevivência clonogênica, em células coletadas 10 dias após o tratamento. Nesse ensaio, as colônias com mais de 50 células são contadas, sendo possível avaliar a capacidade reprodutiva das células tratadas. A eficiência de clonagem (EC) calculada pela fórmula $EC = n^\circ \text{ de colônias contadas} / n^\circ \text{ de células semeadas}$ apresentou um valor de 0,52. A fração de colônias sobreviventes foi calculada [$SF = n^\circ \text{ de colônias contadas} / (EC * n^\circ \text{ células semeadas} / 100\%)$], sendo que os valores médios obtidos variaram de 100,6% a 44,9% no tratamento somente com a TMZ e, no tratamento associado ao inibidor, os valores médios variaram de 78,1% a 6,6%. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) no tratamento com a TMZ em relação ao controle para as concentrações de 400, 600 e 800 µM. A associação com o inibidor também mostrou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para todas as concentrações testadas, comparadas ao controle e ao tratamento com a TMZ, mostrando um resultado semelhante ao obtido no teste de sobrevivência celular (5 dias), mas com uma curva de resposta

a diferentes concentrações melhor definida, seguindo um padrão linear, $R^2 = 0,9063$ e $R^2 = 0,8116$, para os tratamentos com a TMZ e TMZ + MX, respectivamente (**Figura-9, Tabela-4**).

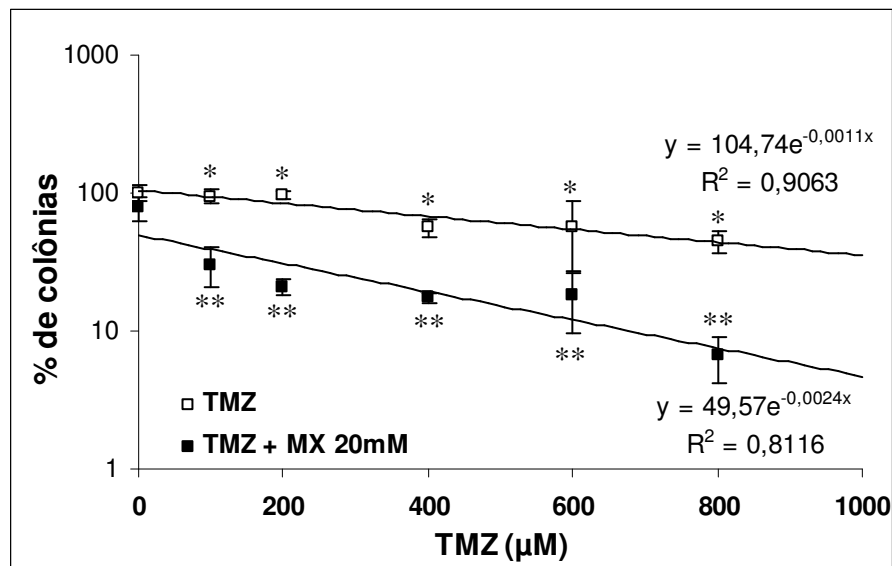


Figura 9: Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem T98G após tratamento com a droga TMZ (100, 200, 400, 600 e 800 μM) por 24 h, combinada ou não ao inibidor MX (20 mM). Foram calculadas as médias (± D.P.) dos resultados de três experimentos independentes. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$); (**) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

Tabela 4: Porcentagens (± Desvio Padrão) de colônias apresentadas pela linhagem T98G submetidas ao tratamento com diversas concentrações de TMZ (100, 200, 400, 600 e 800 μM) e TMZ associada a 20 mM MX. As colônias foram contadas após ±10 dias de tratamento. Foram calculadas as médias (± D.P.) dos resultados de três experimentos independentes.

Tratamentos	Sobrevivência Clonogênica (%) (± Desvio Padrão)					
	0 μM	100 μM	200 μM	400 μM	600 μM	800 μM
TMZ	100,6 ± 12,8	95,1 ± 11,2	97,6 ± 7,5	56,7 ± 8,1*	57,0 ± 29,8*	44,9 ± 8,2*
TMZ + MX (20 mM)	78,1 ± 16,5	30,6 ± 9,7**	21,0 ± 2,9**	17,5 ± 1,7**	18,2 ± 8,5**	6,6 ± 2,3**

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

(**) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

4.3. Ensaio Cometa

O princípio do Ensaio Cometa baseia-se na capacidade de fragmentos de DNA denaturados ou clivados migrarem para fora da célula sob a influência de uma corrente elétrica. O DNA íntegro migra mais lentamente e permanece dentro dos limites do núcleo quando uma corrente é aplicada.

Assim, foram avaliadas as porcentagens de DNA na cauda das células T98G em diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 h) de recuperação após serem submetidas a 24 h de tratamento com 400 e 600 μM de TMZ e TMZ + MX (20 mM). Houve um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) na porcentagem de DNA na cauda apenas nos tempos de 2 e 6 h após o tratamento para ambas as concentrações e tratamentos testados, havendo diferenças entre o tratamento combinado (TMZ + MX) e TMZ sozinha apenas no tratamento com TMZ a 600 μM por 2 h. Em geral, após 12 h de recuperação, os níveis de quebras no DNA praticamente retornaram aos níveis normais. Os dados obtidos nos experimentos foram representados em termos de % DNA \pm Desvio Padrão (**Figura-10, Tabela-5**).

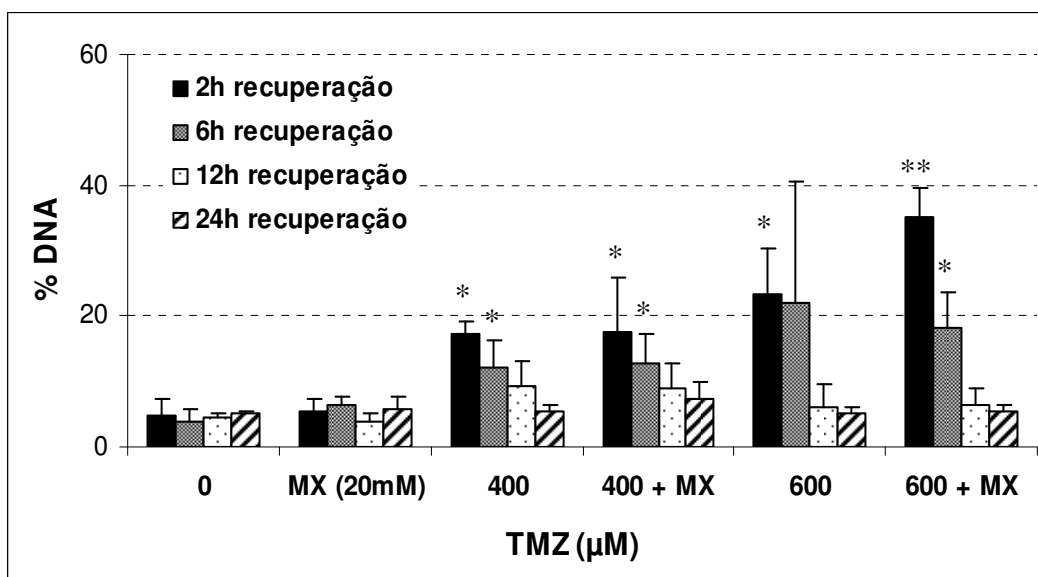


Figura 10: Porcentagem de DNA na cauda avaliada pelo Ensaio Cometa realizado para as células T98G, nos tempos de 2, 6, 12 e 24 h de recuperação após 24h de tratamento com 400 e 600 μM de TMZ e TMZ associada a 20 mM de MX. As imagens foram quantificadas pelo programa TryTek Comet Score TM, FreeWare v.1.5. Os dados estão representados como Médias \pm Desvio Padrão. Foram realizados três experimentos independentes. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle; (**) $p \leq 0,05$ em relação ao controle e entre os tratamentos.

Tabela 5: Estimativa de dano no DNA avaliado em diferentes tempos de recuperação (2, 6, 12 e 24 h) por meio do Ensaio Cometa realizado para as células T98G, sob condições de tratamento com as concentrações de 400 e 600 μM de TMZ associada ou não a 20 mM de MX. Foram realizados três experimentos independentes e os dados estão representados como Médias \pm Desvio Padrão.

Tratamentos	% DNA na cauda (\pm Desvio Padrão)			
	2 h	6 h	12 h	24 h
Controle	4,9 \pm 2,4	3,8 \pm 1,9	4,6 \pm 0,5	5,1 \pm 0,4
MX (20 mM)	5,5 \pm 1,9	6,3 \pm 1,4	3,9 \pm 1,1	5,6 \pm 1,9
TMZ (400 μM)	17,1 \pm 2,0	12,1 \pm 4,1	9,3 \pm 3,7	5,5 \pm 0,7
400 μM + MX	17,5 \pm 8,3	12,7 \pm 4,6	8,8 \pm 4,0	7,3 \pm 2,6
TMZ (600 μM)	23,3 \pm 7,0	22,1 \pm 18,4	6,2 \pm 3,3	5,2 \pm 0,9
600 μM + MX	35,1 \pm 4,4	18,2 \pm 5,4	6,3 \pm 2,7	5,4 \pm 1,0

4.4. Apoptose

A indução de apoptose na linhagem T98G foi estudada em três experimentos, sendo calculadas as frequências de células apoptóticas nos tratamentos com 400 e 600 μM de TMZ combinada ou não à MX (20 mM) e analisadas nos tempos de 24, 48 e 72 h (**Figura-11, Tabela-6**)

A indução de apoptose foi observada em 24, 48 e 72 h após os tratamentos. Foram observadas diferenças estatísticas significativas em todas as concentrações e tempos testados, em relação ao controle ($p \leq 0,05$), havendo uma maior indução no tempo de 72 h. A concentração mais elevada de TMZ (600 μM) associada à MX foi mais eficaz quanto à indução de apoptose nos tempos de 48 e 72 h ($p \leq 0,05$), com um pico de apoptose observado em 72 h (47,7%). O inibidor sozinho não foi capaz de induzir apoptose nas células T98G.

No mesmo ensaio foram avaliadas as porcentagens de células necróticas, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativa nos tempos e concentrações testadas.

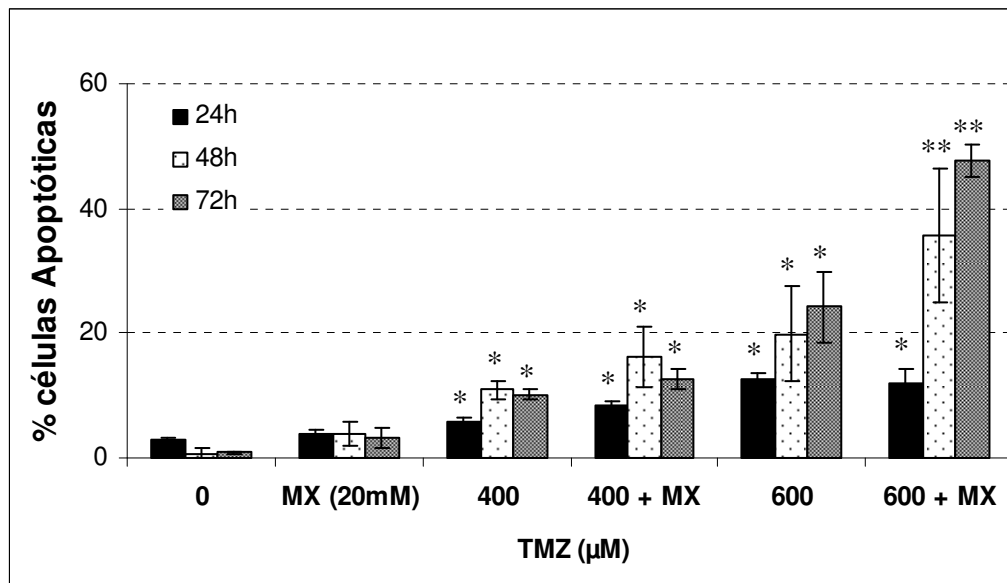


Figura 11: Porcentagens de células apoptóticas (\pm Desvio Padrão) observadas em células T98G, avaliadas após 24, 48 e 72 h do tratamento com 400 e 600 μ M de TMZ associada ou não a 20 mM de MX. (*) $p \leq 0,05$ em relação ao controle; (**) $p \leq 0,05$ em relação ao controle e entre os tratamentos.

Tabela 6: Porcentagens de células apoptóticas (\pm Desvio Padrão) em células T98G, avaliadas após 24, 48 e 72 h do tratamento com 400 e 600 μ M de TMZ associada ou não à 20 mM de MX.

Tempos	% de células Apoptóticas \pm (Desvio Padrão)				
	Controle	400 μ M TMZ	400 μ M TMZ + MX (20 mM)	600 μ M TMZ	600 μ M TMZ + MX (20 mM)
24 h	2,8 \pm 0,4	5,9 \pm 0,5	8,5 \pm 0,6	12,7 \pm 0,9	12,1 \pm 2,0
48 h	0,8 \pm 0,7	10,9 \pm 1,5	16,2 \pm 5,0	19,9 \pm 7,7	35,6 \pm 10,7
72 h	0,9 \pm 0,2	10,1 \pm 0,8	12,7 \pm 1,6	24,2 \pm 5,7	47,7 \pm 2,6

4.5. Expressão gênica transcricional (RT-PCR)

A expressão do gene *MGMT*, verificada por RT-PCR, foi positiva para as linhagens U343, U138 e T98G, mas negativa para as linhagens U251 e U87 (**Figura-12**). Esses dados são importantes, visto que o *status* desse gene tem sido correlacionado com a resistência das células ao tratamento.

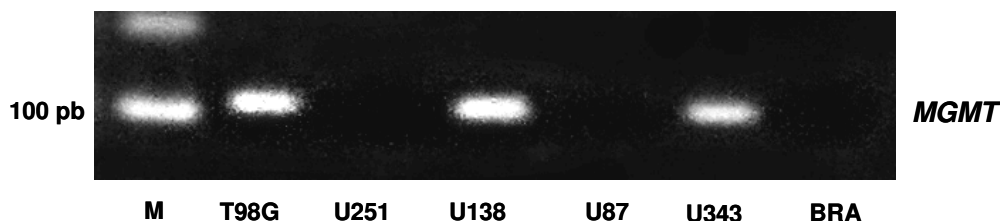


Figura 12: Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando a banda correspondente ao RNAm do gene *MGMT* (101pb) resultante da análise de amostras de cinco linhagens de GBM (T98G, U251MG, U138MG, U87MG, U343MG-a) analisadas por RT-PCR.

4.6. Expressão gênica transcricional analisada por q-PCR em tempo real

Nos experimentos realizados com a linhagem T98G, a análise dos resultados de expressão gênica por q-PCR em tempo real foi analisada empregando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para os genes *APE1*, *FEN1* e *XRCC1* (via de reparo BER). Essa análise foi realizada comparativamente às células não tratadas, sendo que os *Fold Change* (FC) representam a modulação da expressão gênica relativa aos controles (**Figura-13, Tabela-7**).

Foi observada uma indução de *APE1* no tratamento com a MX nos tempos de 24 h (FC= 0,36) e 48 h (FC= 1,02), mas esse gene foi reprimido em 72 h (FC= -0,42). No tratamento com a TMZ, houve repressão até 48 h (FC= -0,17 e -0,55, para 24 e 48 h, respectivamente), com uma leve indução em 72 h (FC= 0,15). Verificou-se que nos três tempos analisados, o gene *APE1* encontrou-se reprimido nos tratamentos combinados TMZ + MX (FC=-0,21; -0,42; -0,27).

O gene *FEN1* mostrou-se fortemente induzido pela MX em 72 h (FC=1,02) e também no tratamento combinado TMZ + MX (FC= 0,92) no mesmo tempo; A TMZ sozinha induziu levemente a expressão desse gene em todos os tempos

(24, 48 e 72 h) (FC=,041; 0,02 e 0,19, respectivamente). Entretanto, a repressão transcricional desse gene foi observada em 24 e 48 h após o tratamento com MX (FC= -0,75 e -0,74) e nos mesmos tempos para o tratamento combinado (FC= -0,22 e -0,67).

O gene *XRCC1* sofreu indução na maior parte dos tratamentos realizados: no tratamento com MX os FCs foram de 0,84; 0,56 e 0,12, nos tempos de 24, 48 e 72 h, respectivamente; no tratamento com a TMZ foi observado FC= 0,50 nos tempos de 48 e 72h. Finalmente, para os três tempos no tratamento combinado, os FCs foram de 0,30; 0,38 e 0,52, respectivamente. A repressão do gene foi observada apenas em 24 h no tratamento com a TMZ (FC= -0,14).

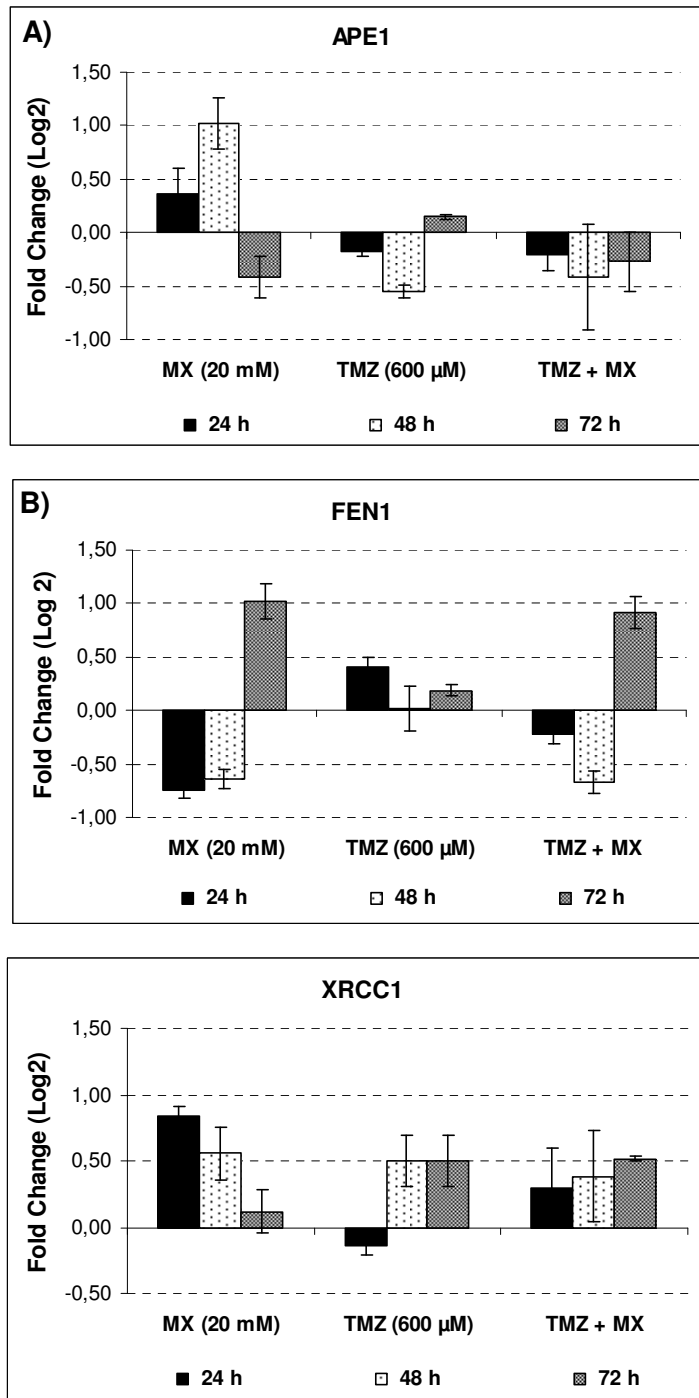


Figura 13: Avaliação da expressão gênica transcricional por q-PCR em tempo real em células T98G tratadas com 600 μM de TMZ combinada ou não a 20 mM de MX, para os genes *APE1* (A), *FEN1* (B) e *XRCC1* (C). Os resultados obtidos de expressão gênica relativa foram representados em *Fold-Change* (\log_2).

Tabela 7: Resultados da análise de expressão gênica por q-PCR em tempo real, analisados em três experimentos independentes realizados em células T98G; estas foram tratadas por 24 h com 600 μ M de TMZ combinada ou não a 20 mM de MX, sendo colhidas em três tempos diferentes: 24, 48 e 72h.

Genes	Tratamentos	Médias (Log2) de <i>Fold change</i>		
		24 h	48 h	72 h
APE1	MX (20 mM)	0,36	1,02	-0,42
	TMZ 600 μ M	-0,17	-0,55	0,15
	TMZ + MX	-0,21	-0,42	-0,27
FEN1	MX (20 mM)	-0,75	-0,64	1,02
	TMZ 600 μ M	0,41	0,02	0,19
	TMZ + MX	-0,22	-0,67	0,92
XRCC1	MX (20 mM)	0,84	0,56	0,12
	TMZ 600 μ M	-0,14	0,50	0,50
	TMZ + MX	0,30	0,38	0,52

4.7. Expressão protéica por Western blot

Nos experimentos realizados com as células T98G, a expressão protéica foi avaliada por *Western blot* para as proteínas APE1, FEN1 e PCNA, cujas funções estão relacionadas com a via de reparo BER, sendo que anteriormente, foi também estudada a expressão transcricional dos respectivos genes. Os valores de expressão relativos às intensidades das bandas estão representados na **Tabela-8**. A proteína APE1 mostrou variações nos níveis de expressão nas células tratadas, sendo observada uma redução mais acentuada na sua expressão na presença do inibidor MX (somente) analisada em 24 e 48 h, enquanto que no tratamento combinado TMZ + MX, a expressão de APE1 foi levemente reduzida em relação ao tratamento com a TMZ isoladamente (**Figura 14-A**).

A intensidade das bandas apresentadas pela proteína FEN1 indicou que os níveis de sua expressão foram reduzidos, tanto na presença de MX como no tratamento combinado TMZ + MX, nos tempos de 48 e 72 h (**Figura 14-B**). Por

outro lado, alterações na expressão da proteína PCNA foram observadas apenas nos tempos de 24 e 48 h, com uma leve indução nesses tempos no tratamento combinado (**Figura 14-C**).

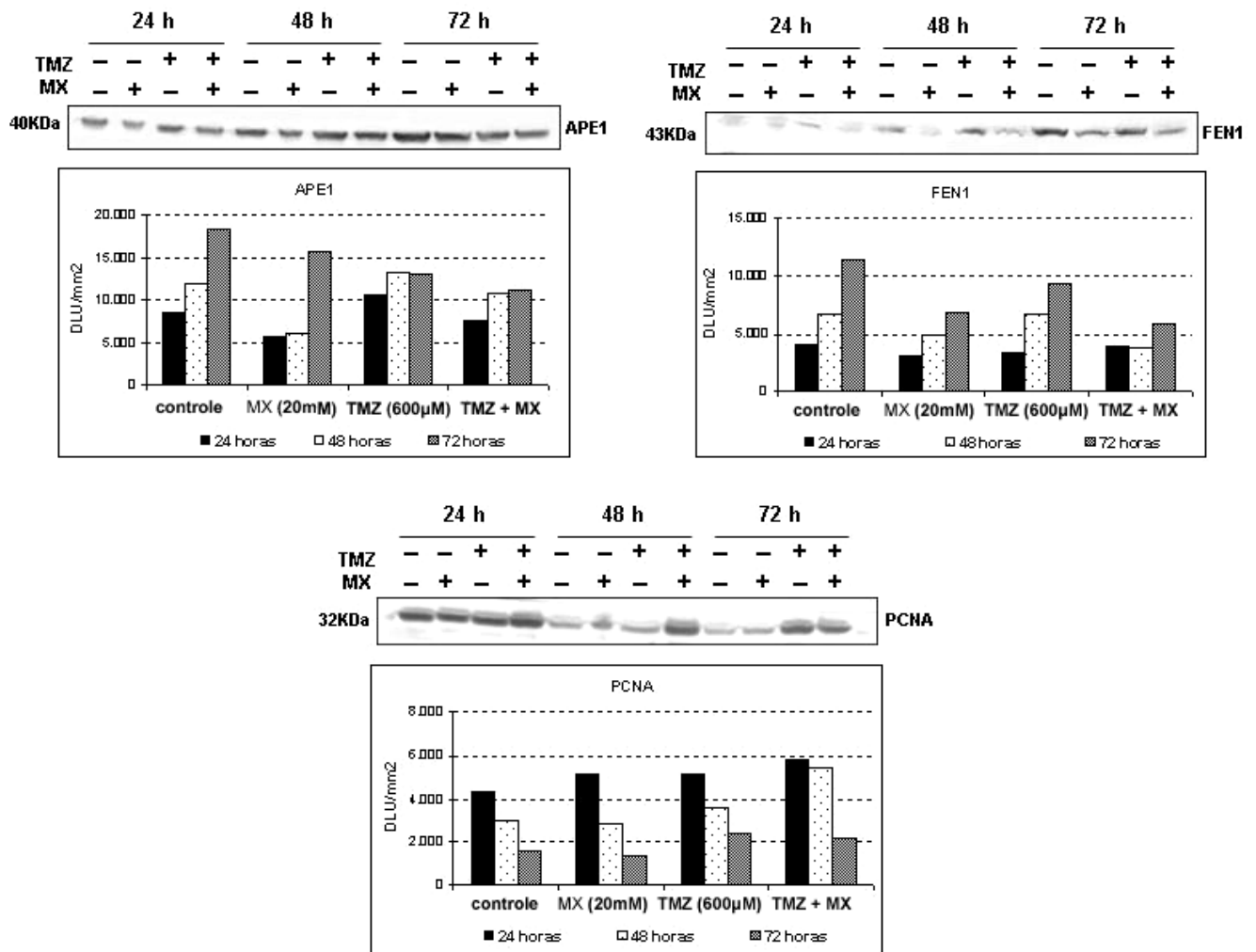


Figura 14: Expressão das proteínas APE1 (A), FEN1 (B), PCNA (C), analisadas por *Western blot*, nos tempos de 24, 48 e 72 h, em células T98G tratadas com 600 μ M de TMZ associada ou não a 20 mM de MX. Os gráficos mostram os valores de intensidade das bandas, obtidos pelo programa *Scion Image*.

Tabela 8: Expressão das proteínas APE1, FEN1 e PCNA, analisadas por *Western blot*, nos tempos de 24, 48 e 72 h, em células T98G tratadas com 600 μ M de TMZ associada ou não a 20 mM de MX. Os valores foram obtidos pelo programa *Scion Image*.

Proteínas	Tratamentos	Intensidade de pixel		
		24 h	48 h	72 h
APE1	0 μ M	8510,04	11912,04	18453,96
	MX (20 mM)	5775,84	6252,12	15689,52
	600 μ M TMZ	10767,96	13247,64	13204,80
	600 + MX	7648,20	10808,28	11234,16
FEN1	0 μ M	4051,75	6672,83	11367,38
	MX (20 mM)	3105,07	4916,32	6898,58
	600 μ M TMZ	3346,57	6788,06	9275,78
	600 + MX	3889,14	3790,70	5888,90
PCNA	0 μ M	4319,84	2978,88	1577,6
	MX (20 mM)	5150,4	2855,92	1350,24
	600 μ M TMZ	5148,08	3575,12	2396,56
	600 + MX	5837,12	5403,28	2190,08

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos de ação de drogas antitumorais envolvem complexas vias de respostas aos danos no DNA, que são ainda pouco compreendidas, apesar de uma extensa literatura. A diversidade de respostas dos tumores, além da resistência adquirida ou intrínseca a agentes citotóxicos continua sendo o principal obstáculo no tratamento do câncer (Sarkaria *et al.*, 2008).

O principal obstáculo no tratamento de GBM com o uso da TMZ é a resistência (Reinhard *et al.*, 2001), sendo que o principal mecanismo tem sido atribuído à proficiência da enzima MGMT (Baer *et al.*, 1993; Quinn *et al.*, 2005). Contudo, estudos ao nível molecular têm demonstrado que o benefício ao tratamento com TMZ é observado principalmente em pacientes cujo tumor apresenta metilação na região promotora do gene *MGMT*, sendo que nessas condições, estes se mostram incapazes de reparar parte dos danos no DNA induzido pela quimioterapia (Esteller *et al.*, 2000; Hegi *et al.*, 2004; Hegi *et al.*, 2005; Donson *et al.*, 2007).

Foi relatado que aproximadamente 50% dos GBM apresentam elevada expressão de MGMT (Silber *et al.*, 1999; Zawlik *et al.*, 2009). Assim, níveis elevados de MGMT em células tumorais correlacionam negativamente com a eficácia do tratamento com essa droga, o que impõe um obstáculo quanto à eficácia do tratamento com a TMZ (Kaina e Cristmann, 2002; Ross *et al.*, 2004; Jacinto e Esteller, 2007).

O uso de inibidores de reparo de BER constitui uma abordagem atrativa para a radio ou quimio-sensibilização (Madhusudan e Middleton, 2005; Parkinson *et al.*, 2007; Adhikari *et al.*, 2008; Johannessen *et al.*, 2008). Assim, neste trabalho, o objetivo foi tentar sobrepujar a resistência apresentada por células de GBM ao tratamento com a TMZ, pela inibição da via de reparo BER por MX, bem como avaliar seus efeitos através dos ensaios de morte celular, danos no DNA e apoptose. Além disso, foi também proposto um estudo envolvendo as vias de sinalização molecular, sendo escolhidos alguns genes da via de reparo BER para a análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real e expressão protéica por *Western blot*.

5.1 Citotoxicidade e Sobrevivência celular em resposta à TMZ

O teste de sobrevivência é um método clássico utilizado para testar a sensibilidade celular a diferentes concentrações dos agentes anticâncer *in vitro* (Kumala *et al.*, 2003). O conhecimento prévio sobre a sensibilidade tumoral a drogas anticâncer e sobre os mecanismos moleculares de ação destas é muito importante, principalmente no caso de tumores resistentes. 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 gerar um clone que originará um tumor. Assim, torna-se relevante uma avaliação da citotoxicidade das drogas antitumorais pelos ensaios habituais, que também consideram a contagem de células sobreviventes alguns dias após o tratamento, o que possibilita a detecção de células remanescentes que resistiram ao tratamento.

O teste de citotoxicidade com as cinco linhagens de GBM (U87, U251, U343, T98G e U138) mostrou que o tempo de 24 h não foi suficiente para demonstrar a citotoxicidade da TMZ. As linhagens U87, U251, e U343 mostraram-se mais sensíveis após 120 h do tratamento, com aproximadamente 50% das células mortas na menor concentração testada (100 μ M). Esta sensibilidade é compatível com o relato de que a linhagem U251 (mutante para *TP53*) e U87 (proficiente para *TP53*) (Ishii *et al.*, 1999), não apresentam atividade da enzima MGMT (Hermisson *et al.*, 2006) e também com os resultados da falta de expressão da mesma, conforme comprovado no ensaio de RT-PCR realizado nesse estudo. No entanto, a linhagem U343 (proficiente para *TP53*), embora sensível, apresentou expressão do gene *MGMT*, ainda não relatada na literatura. Segundo Hermisson *et al.* (2006), células com *TP53* selvagem são mais sensíveis, facilitando a ação citotóxica da TMZ, enquanto células mutadas para *TP53* são mais resistentes à apoptose induzida por agentes metilantes. Provavelmente, a sensibilidade das células U343 à TMZ possa estar relacionada ao *status* do gene *TP53* ou ainda a outros fatores genéticos ainda não estudados, sendo que também seria importante comprovar a atividade da enzima *MGMT*. No entanto, a linhagem U251, que não expressa a *MGMT*, foi relativamente sensível à indução de morte celular pela TMZ. A linhagem U138 mostrou-se relativamente resistente,

com aproximadamente 50% de morte apenas a partir da concentração de 400 μM . Não foi observado nível de expressão protéica ou atividade para a enzima *MGMT* nessa linhagem (Hermisson *et al.*, 2006), apesar de apresentar RNAm do gene, como verificado por RT-PCR. Sua resistência pode ser justificada por ser uma linhagem que apresenta um alelo selvagem e outro mutado para o gene *TP53* (Ishii *et al.*, 1999).

Uma maior resistência foi observada para as células T98G quando avaliada após 120 h do tratamento com a TMZ, visto que somente concentrações elevadas (400, 800 e 1000 μM) foram capazes de reduzir significativamente as porcentagens de células sobreviventes, mas com uma redução máxima de ~24%. Esses resultados são compatíveis com a informação de que as células T98G são altamente resistentes a TMZ, mostrando a atividade da enzima *MGMT* como preditor dessa resistência (Kanzawa *et al.*, 2004), e a deficiência de MMR não influenciando nessa resposta (Maxwell *et al.*, 2008).

Assim, no presente trabalho, foi proposto testar se a via BER de reparo do DNA estaria implicada nos mecanismos de resistência à TMZ, com base em estudos anteriormente publicados na literatura sobre a sensibilização de células cancerosas a agentes alquilantes por meio da inibição de proteínas de reparo do DNA (Madhusudan e Middleton, 2005; Parkinson *et al.*, 2007; Adhikari *et al.*, 2008; Johannessen *et al.*, 2008). O inibidor MX é uma molécula capaz de bloquear o reparo via BER, reagindo com o grupo aldeído do açúcar acíclico ao lado do sítio AP, gerado após remoção enzimática do nucleotídeo danificado, por DNA glicosilases (Talpaert-Borle e Liuzzi, 1983; Liuzzi *et al.*, 1985).

Os aductos N⁷-metil-G e N³-metil-A são as lesões geradas pela TMZ que são reparadas por BER (Willson, 1998; Denny *et al.*, 1994). A lesão N⁷-metil-G parece ser a alteração mais inofensiva, porém N³-metil-A é a lesão mais citotóxica, bloqueando a replicação e transcrição, devido ao aberrante grupo metil projetado dentro do sulco menor da dupla hélice (Barnes e Lindahl, 2004; Sedgwick, 2004). A glicosilase responsável pela remoção destas lesões é a N-metilpurina-DNA-glicosilase (MPG) ou alquilpurina DNA N-glicosilase (APNG) (Lindahl 1976; Chakravarti *et al.*, 1991; Barnes e Lindahl, 2004). Células embrionárias deficientes para MPG mostraram-se sensíveis a agentes alquilantes

(Engelward *et al.*, 1996), sugerindo que a falta de remoção de aductos pode aumentar os efeitos citotóxicos destes agentes.

Como já mencionado, os aductos N⁷-metil-G e N³-metil-A compreendem aproximadamente 80% das lesões geradas pela TMZ, sendo removidos pelo reparo via BER (Triverdi *et al.*, 2005), promovendo citotoxicidade se não reparados. Assim, a resistência celular intrínseca, apresentada por algumas células de GBM ao tratamento com agentes alquilantes, pode ser devida, em parte, por um intenso reparo pela via BER.

Nos experimentos de sobrevivência celular após 120 h, as linhagens U87, U343, U251 e U138 não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com TMZ e TMZ combinada ao inibidor. Este resultado pode ter sido influenciado de alguma forma pelo *status* da proteína MGMT (exceto no caso da U343, que não se tem conhecimento). A linhagem T98G apresentou uma redução estatisticamente significativa na sobrevivência, em face ao tratamento com a TMZ associada a MX, após 120 h, em todas as concentrações testadas ($p \leq 0,05$). Esse tratamento reduziu o IC₅₀ (concentração capaz de eliminar 50% das células) da TMZ, que era acima de 1000 μM , também verificado por Kanzawa *et al.* (2004), para abaixo de 400 μM .

Adicionalmente, o ensaio de sobrevivência clonogênica mostrou um efeito mais acentuado dos tratamentos realizados, visto que a linhagem T98G apresentou taxas de sobrevivência significativamente reduzidas em todos os tratamentos com a TMZ sozinha ou associada ao inibidor.

O ensaio de sobrevivência clonogênica é considerado um teste mais acurado, pois leva em consideração a morte reprodutiva (incapacidade de formar colônias), que é um importante parâmetro a ser analisado. Com base nesse ensaio, a combinação de TMZ e MX reduziu o IC₅₀ da TMZ, que foi de aproximadamente 600 μM , para uma concentração abaixo de 100 μM , mostrando que esta associação potencializou os efeitos da droga. Este é um dado interessante, visto que a concentração plasmática atingida após a ingestão deste quimioterápico é de 50 μM (Hammond *et al.*, 2004). Resposta semelhante foi observada em células de câncer de cólon (Taverna *et al.*, 2001; Liu e Gerson, 2004) e de mama (Rinne *et al.*, 2004), em que a TMZ exibiu seus efeitos citotóxicos aumentados com a inibição do BER.

Assim, visando testar a hipótese de que a via BER pode exercer influência na resistência à TMZ, foram realizadas outras análises para a linhagem T98G, discutidas a seguir.

5.2 Avaliação de danos no DNA em células T98G

Para caracterizar as respostas das células T98G ao tratamento com a TMZ, combinada ou não à MX, foi avaliada a indução de danos no DNA por meio do Ensaio Cometa, sendo analisados vários tempos de recuperação. Foi observado um aumento na porcentagem de DNA na cauda, nos tempos de 2 e 6 h em relação às células controles, mas em tempos mais tardios, 12 e 24 h, os danos no DNA atingiram níveis semelhantes aos do controle, indicando o reparo das quebras geradas pelo tratamento. Foi anteriormente relatado que 5 horas após o tratamento, a TMZ causa o máximo de quebras no DNA (Danson e Middleton, 2001). Foi possível observar que a associação da droga ao inibidor causou uma maior porcentagem de danos no DNA após 2 h, na concentração de 600 µM, comparativamente ao tratamento com a TMZ sozinha. Porém, estes danos se equiparam ao controle em tempos maiores. Outros tipos de lesões, não detectáveis por este método, ou posteriores a estes tempos, podem ter conduzido as células à morte. Liu *et al* (2003) também observaram um aumento de 4 vezes nos danos no DNA após 2 h, quando as células foram tratadas com a associação de BCNU (1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) e MX, porém não foram avaliados tempos seguintes.

Em geral, sítios AP são rapidamente reparados em células de mamíferos (Wood, 1996), porém, sítios AP modificados estruturalmente por MX podem tornar-se tóxicos durante a duplicação do DNA (Loeb, 1985). Além disso, quando localizados dentro de sítios de clivagem de topoisomerase II (topo II), eles podem atuar como inibidores produzindo um “complexo clivável”, resultando em quebras permanentes no DNA e, portanto, sendo substratos suicida, pela ação dos sistemas de monitoramento do DNA (Kingma *et al.*, 1995; Wilstermann e Osheroff, 2001). Tais quebras também podem induzir eventos de recombinação,

acarretando a formação de translocações cromossômicas, ou podem ainda desencadear a morte celular (Ferguson e Baguley, 1996; Liu *et al.*, 1999).

De tal modo como foi observado com BCNU e MX, em tumores xenográficos (Liu *et al.*, 2003) e com TMZ e MX, em células de câncer de cólon (Liu *et al.*, 2002), a ocorrência de DSBs em tumores conduz à aberrações cromossômicas e à morte por apoptose.

5.3 Avaliação de morte celular por apoptose

O inibidor MX ligado a sítios AP é resistente à remoção enzimática por APE1 (Horton *et al.*, 2000), fazendo com que o acúmulo de sítios potencialmente tóxicos (Liu e Gerson, 2004) provoque um aumento nos efeitos citotóxicos da TMZ, levando a um aumento de SSBs e DSBs, bem como à morte celular (Rinne *et al.*, 2004; Taverna *et al.*, 2001). Assim, intermediários de BER não reparados são clastogênicos, atuando como fortes desencadeadores de apoptose (Kaina *et al.*, 2001).

No presente estudo com as células T98G, verificou-se que a apoptose ocorreu em todos os tratamentos e tempos avaliados. A combinação de TMZ e MX aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas, em relação ao tratamento apenas com a TMZ, nos tempos de 48 h (de 19,9% para 35,6%) e 72h (de 24,2% para 47,7%). É possível que a TMZ tenha induzido sítios AP que, não sendo adequadamente processados, podem ter gerado SSBs e DSBs, aumentando a citotoxicidade para as células em divisão, dados compatíveis com os de outros autores (Taverna *et al.*, 2001; Drablos *et al.*, 2004). Assim, tais quebras, que são reconhecidamente eventos críticos para a integridade celular, podem ter desencadeado o processo de apoptose nessas células.

Resultado semelhante foi observado por Fishel *et al* (2007) em células de câncer ovariano, mostrando que a combinação de TMZ e MX causou uma elevação da apoptose induzida pelo aumento de DSBs. Além disso, evidências experimentais indicaram que concentrações não tóxicas de MX combinadas com TMZ, tanto para células de câncer de cólon proficientes como deficientes para MMR, resultaram em um significativo efeito antitumoral, e que o gene *TP53* não

foi requerido para conduzir as células à morte por apoptose, observada em 46 a 50% das células (Liu *et al.*, 2002). Outro trabalho mostrou que a combinação de MX e manumicina-A, um inibidor da rasfarnesiltransferase (recentemente conhecido como indutor de espécies reativas do oxigênio - ROS), resultou em uma maior indução de apoptose em células leucêmicas (She *et al.*, 2005).

Foi também avaliado no mesmo ensaio a porcentagem de células necróticas, não sendo observadas diferenças significativas entre o tratamento somente com a TMZ e o combinado (TMZ + MX), indicando que a necrose não contribuiu para a indução de morte celular por esses agentes. Em células de glioma, foi relatado que a TMZ induziu um bloqueio em G2/M do ciclo celular dependente de TP53 seguido por senescência, ou ainda uma via independente de TP53, conduzindo à catástrofe mitótica (Hirose *et al.*, 2001). Em outro estudo, foi sugerido que a TMZ induz autofagia, mas não apoptose (Kanzawa *et al.*, 2004). Mais recentemente, Roos *et al* (2007) mostraram que células de glioma sofrem apoptose dependente da concentração e tempo de tratamento com agentes metilantes, e que esta é dependente do *status* de TP53 (selvagem ou mutado). Segundo esses mesmos autores, células de glioma mutadas para TP53, sofrem apoptose via mitocôndrial, antecedida do declínio de BCL-2 e ativação de caspase-9 e 3. Entretanto, células com TP53 selvagem sofrem apoptose via receptor Fas/CD95/Apo-1, com ativação de caspase-8.

Neste trabalho, a TMZ causou uma considerável indução (35,6%) de morte apoptótica nas células T98G, sendo que no tratamento associado à MX, houve um aumento para 47,7%. Entretanto, outros tipos de morte celular podem estar envolvidos na eliminação celular após tratamento com TMZ + MX, visto que no ensaio de sobrevivência clonogênica, as frações de sobrevivência foram reduzidas a 18,2% na concentração de 600 µM de TMZ associada à MX.

5.4 Expressão gênica e protéica

Estudos pré-clínicos em modelos experimentais demonstraram que a modulação da via de reparo BER está associada ao aumento da sensibilidade a agentes alquilantes (Madhusudan e Hickson, 2005). Células DT40 deficientes

para *FEN1* (Matsuzaki *et al.*, 2002), células de hamster mutantes para *XRCC1* (Op het Veld *et al.*, 1998) e fibroblastos humanos deficientes em *LIG1* (Teo *et al.*, 1983) foram sensíveis a agentes metilantes, sugerindo que N-metilações são tóxicas quando não reparadas ou quando reparadas de modo impreciso. Esses resultados demonstram que a via BER é potencialmente interessante como alvo de intervenção terapêutica.

O gene *APE1*, também conhecido como *APEX1* ou *APE1/REF-1*, localizado no cromossomo 14q11.2-q12, codifica uma proteína envolvida no reparo via BER e na regulação da expressão gênica como um co-ativador redox de diferentes fatores de transcrição, tais como TP53 e AP-1 (Tell *et al.*, 2005). No presente trabalho, uma elevada expressão de *APE1* foi observada nas células não tratadas, conforme observado por outros autores, que relataram um aumento da sua atividade como característica da gliomagenese humana, concomitantemente com sua expressão protéica em células em proliferação, refletida em parte, como uma resposta ao aumento do metabolismo oxidativo (Bobola *et al.*, 2001).

A análise da expressão transcricional do gene *APE1* indicou uma falta de indução da expressão desse gene nas células tratadas (TMZ e TMZ + MX), sendo que os valores de expressão basal desse gene foram relativamente elevados nos controles; isto pode ser resultado da necessidade da atividade de *APE1* durante a proliferação celular, bem como do metabolismo oxidativo, conforme sugerido por Bobola *et al.* (2001). Entretanto, as células tratadas somente com TMZ apresentaram uma expressão aumentada da proteína APE1 em todos os tempos analisados, relativamente ao tratamento combinado (TMZ + MX), indicando que muito provavelmente essa proteína deva ter sido requerida em resposta à geração de sítios AP causada pela TMZ. A expressão transcricional do gene *APE1* possivelmente deve ter ocorrido anteriormente em tempos precoces. Quando a TMZ foi associada ao inibidor, a expressão foi reduzida para todos os tempos, indicando a possível ação do inibidor MX, provavelmente no sentido de bloquear os sítios AP, impedindo o acesso de APE1. Em apoio a essa suposição, foi demonstrado que os sítios AP bloqueados por MX são pobres substratos para esta proteína (Liu *et al.*, 1999, 2002). Segundo alguns autores, APE1 foi provavelmente responsável pelo aumento na sensibilidade a agentes

quimioterápicos, sob condições de inibição da sua expressão por siRNA em osteosarcoma (Wang *et al.*, 2004), bem como em células de glioma proficientes e deficientes para *MGMT* transfectadas com oligonucleotídeos antisense para seu RNAm (Silber *et al.*, 2002).

No presente trabalho, a análise de expressão protéica de FEN1 revelou que esta se expressou em todas as condições testadas, em todos os tempos de análise, sendo que um maior nível de expressão basal foi verificado para as células não tratadas. Essa expressão parece ser compatível com o estado proliferativo das células, posto que esta enzima é muito importante para a própria duplicação do DNA, principalmente no processamento de fragmentos de Okazaki. (Rumbaugh *et al.*, 1999; Warbrick *et al.*, 1998). Por outro lado, as células tratadas com a TMZ + MX e somente MX mostraram uma expressão transcricional reduzida do gene *FEN1*, 24 e 48 h após o tratamento, sendo esse resultado compatível com a expressão protéica reduzida observada nos tempos de 48 e 72 h, comparadas às células tratadas somente com a TMZ. Assim, foi observado um efeito do inibidor MX na expressão de FEN1, supostamente pela inibição de proteínas da via BER, posteriores à remoção de sítios AP. Este evento pode ter acarretado um menor requerimento de FEN1, embora não tenha sido verificada correlação de sua expressão com o reparo no DNA (Warbrick *et al.*, 1998).

Também foi observado no presente trabalho que o inibidor MX testado isoladamente foi capaz de modular a expressão de APE1 e FEN1, porém, essas alterações não causaram efeitos observados ao nível celular (morte celular), bem como danos no DNA. Conforme já mencionado, o dano oxidativo basal pode ter sido responsável em parte pela modulação da expressão desses genes, sendo esse efeito incrementado pela ação de MX.

FEN1 é uma proteína nuclear que está associada à PCNA e polimerase α (Pol α) em *foci* de duplicação (Warbrick *et al.*, 1998), sendo essencial para o LP-BER que também envolve PCNA (Klungland e Lindahl, 1997; Kim *et al.*, 1998). Interessantemente, a proteína APE1 participa tanto da SP-BER como da LP-BER, enquanto que FEN1 participa da LP-BER. A decisão para proceder a uma ou outra via alternativa de BER é pouco entendida. Várias hipóteses existem para esta escolha e uma delas é que a SP-BER seja dependente da concentração relativa de ATP próxima ao sítio AP, ao contrário da LP-BER (Petermann *et al.*,

2003). Um segundo estudo sugere que a decisão pode ser traçada pelo intermediário 5'-dRP produzido pela atividade AP endonuclease (Klungland e Lindahl, 1997; Robertson *et al.*, 2009). Isso sugere que as duas vias podem ter sido comprometidas pela redução na expressão dessas proteínas em face ao tratamento combinado de TMZ e MX.

Na via BER, a proteína PCNA está envolvida na via longa (Klungland e Lindahl, 1997). Ela é identificada como um fator de processividade para as polimerases no DNA replicativo (Waga *et al.*, 1994a), sendo considerada como marcador de proliferação celular. Entretanto, a sua expressão pode ser induzida por danos no DNA (Hall *et al.*, 1993) e seus níveis podem ser elevados em células que não estão em proliferação (Hall *et al.*, 1990; 1994). No presente trabalho, observou-se um aumento da expressão de PCNA no tratamento combinado em relação ao tratamento somente com a TMZ nos tempos de 24 e 48 h, indicando que a sua indução tenha ocorrido em resposta aos danos no DNA e que estes ocorreram logo após a primeira duplicação posterior ao tratamento. O inibidor testado isoladamente não causou mudanças marcantes na expressão proteica de PCNA, nem alterações nos níveis de danos no DNA e morte celular.

A interação de PCNA com quinases envolvidas na maquinaria do ciclo celular sugere que esta possui um papel regulatório na progressão do ciclo celular. Além disso, tem sido demonstrado que PCNA é um componente fundamental de diversas vias de reparo do DNA, tais como NER (*nucleotide excision repair*), BER e MMR (revisado em Balajee e Geard, 2001; Maga e Hübscher, 2003). Assim, PCNA é um fator de “processividade” necessário para promover a síntese de DNA, com funções críticas durante a duplicação e na tolerância ao dano (Chang *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2007); essas funções dependem da sua interação com muitas outras proteínas relacionadas à metilação do DNA, regulação do ciclo celular, metabolismo da cromatina, coesão entre cromátides-irmãs e apoptose, além do papel central na regulação de atividades de reparo e duplicação do DNA nas células normais.

Os resultados obtidos quanto à expressão aumentada de PCNA nas células tratadas com a TMZ combinada à MX não descartam a possibilidade de que os efeitos da combinação possam ter ocorrido em termos de indução de bloqueio no ciclo celular, ou outras vias de reparo que são associadas a uma

elevação nos níveis de expressão de PCNA, sendo que isso requer estudos adicionais.

O gene *XRCC1* também foi estudado no presente trabalho. Sua proteína não possui atividade enzimática, porém, inicia um papel principal na coordenação do BER e reparo de quebras simples. Primeiramente, foi demonstrado que *XRCC1* interage com pol β e *LIG3 α* (Kubota, 1996). Posteriormente, foi demonstrada a sua interação com outras proteínas participantes de estágios iniciais do BER (DNA glicosilases, *APE1*, *PARP1* e 2) (Caldecott *et al.*, 1996; Marsin *et al.*, 2003; Campalans *et al.*, 2005). Na verdade, estas associações sugerem que *XRCC1* atua como uma proteína *scaffold* durante o reparo de danos no DNA por BER (Masson *et al.*, 1998).

Neste trabalho, foi observada uma indução da expressão transcricional do gene *XRCC1* em todos os tratamentos e tempos analisados (exceto uma leve repressão no tratamento com TMZ/24 h), possivelmente pelo fato deste gene interagir com as proteínas anteriormente mencionadas. A proteína *XRCC1* é uma das primeiras a serem recrutadas no sítio de corte gerado pela ação de glicosilases e/ou endonuclease AP no SP-BER (Kubota, 1996). Deste modo, os cortes no DNA e/ou quebras não reparadas, podem ter induzido a transcrição deste gene. Tentori *et al.* (1999) observaram uma elevação na expressão desse gene em células Jurkat tratadas com TMZ associada a um inibidor de *PARP*, assim correlacionando a re-síntese de *XRCC1* com a persistência de quebras no DNA.

Embora esses dados isolados de expressão transcricional e protéica mostrem a modulação desses genes, é importante ressaltar que, como em outras vias, o reparo BER é regulado também por modificações pós-traducionais que alteram as afinidades de ligação, taxa de *turnover* e localização subcelular, além da formação de complexos de proteínas (Fan e Wilson, 2005; Almeida e Sobol, 2007). Mas de forma geral, os resultados mostraram que realmente a via BER deve estar implicada nos mecanismos de respostas aos tratamentos efetuados.

De uma forma geral, é interessante ressaltar que a modulação do BER foi um evento que se sobressaiu ao reparo *MGMT* nas células T98G, indicando que lesões N⁷-metil-G e N³-metil-A são também tóxicas se não reparadas. *MGMT* e *TP53* são relatados serem os principais fatores de resistência no tratamento de

tumores (Roos *et al.*, 2007), entretanto um eficiente BER possivelmente também contribui para esta resistência, pelo menos em células com atividade da enzima MGMT e mutadas para *TP53*, como é o caso da linhagem T98G.

A modulação da via BER por MX constitui uma informação interessante em células que expressam MGMT, pelo fato de que mais de 50% dos gliomas humanos apresentam atividade detectável desta enzima (Silber *et al.*, 1999; Zawlik *et al.*, 2009), consistindo no principal fator de resistência ao tratamento. Os resultados do presente estudo poderão direcionar para o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais eficazes com o emprego de agentes alquilantes, tais como a TMZ, associados ao inibidor de reparo da via BER (MX), na expectativa de contornar os mecanismos de resistência desses tumores, pela obtenção de um efeito sinérgico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sobre as respostas das células GBM ao tratamento com o quimioterápico TMZ em combinação à MX (inibidor de reparo via BER), possibilitaram as seguintes conclusões, em termos de sobrevivência celular e clonogênica, danos no DNA, indução de morte por apoptose e análise de expressão gênica e protéica:

1. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que as células GBM U343MG-a, U87MG, U251MG, e U138MG se mostraram sensíveis aos tratamentos com a TMZ, com aproximadamente 50% das células mortas na menor concentração testada, após 5 dias do tratamento. Entretanto, a linhagem T98G foi a mais resistente. Esses dados sugerem que a atividade de MGMT e o *status* do gene *TP53* (mutado) parecem ser determinantes na resistência dessas células ao tratamento com a TMZ, requerendo estudo adicional com uma linhagem proficiente para MGMT e com *TP53* selvagem.

2. No tratamento associado (TMZ + MX), apenas a linhagem T98G apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. Na avaliação da capacidade de formação de colônias, nessas células, o tratamento combinado ao inibidor MX reduziu o IC_{50} da TMZ, de 600 μ M para uma concentração abaixo de 100 μ M.

3. Os tratamentos (TMZ e TMZ + MX) causaram uma indução de danos no DNA dependentes da concentração e tempo na linhagem T98G. O tratamento combinado causou uma maior porcentagem de danos no DNA após 2 h do tratamento com 600 μ M de TMZ, sendo que nos tempos de 12 e 24 h os valores atingiram níveis basais. Outros tipos de lesões, não detectáveis pelo método aqui avaliado (Ensaio Cometa), ou posteriores a estes tempos, podem ter contribuído para a eliminação das células.

4. Uma indução maior de apoptose foi verificada no tratamento associado (TMZ + MX), comparado ao tratamento com a TMZ sozinha. Entretanto, os

índices elevados de apoptose não justificam completamente a redução na sobrevivência clonogênica destas células, indicando que outras formas de morte podem ter ocorrido.

5. Os genes APE1 e FEN1, ambos envolvidos no reparo pela via BER mostraram-se modulados nos tratamentos combinados, com tendência a uma redução de expressão, tanto de seus transcritos, quanto de suas proteínas. Estes resultados indicam um possível bloqueio do acesso de APE1 aos sítios AP gerados pela TMZ (causado pelo inibidor MX), bem como um bloqueio *downstream* de proteínas de reparo implicadas na via BER, a qual inclui FEN1.

6. A expressão levemente aumentada da proteína PCNA nas células tratadas com a TMZ combinada à MX sugere que os efeitos da combinação podem ter induzido um bloqueio no ciclo celular, ou outras vias de reparo que são associadas a uma elevação nos níveis de expressão de PCNA, o que merece ser ainda investigado.

7. A expressão do gene *XRCC1* em todos os tempos e tratamentos (exceto no tempo de 24 h, no tratamento com a TMZ) sugere que este tenha sido induzido em decorrência dos cortes gerados por uma glicosilase e/ou quebras no DNA.

8. Em conjunto, os resultados mostram que a modulação da via de reparo BER por MX apresenta um considerável potencial em termos de aumentar a eficácia terapêutica da TMZ em tumores GBM, cujas células apresentam proficiência para enzima MGMT.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari S, Choudhury S, Mitra PS, Dubash JJ, Sajankila SP, Roy R. (2008) Targeting base excision repair for chemosensitization. **Anticancer Agents Med Chem.**;8(4):351-7.
- Almeida KH, Sobol RW. (2007) A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. **DNA Repair (Amst)**;6(6):695-711.
- Ashkenazi A, Dixit VM. (1998) Death receptors: signaling and modulation. **Science**.;281(5381):1305-8.
- Avgeropoulos NG, Batchelor TT. (1999) New treatment strategies for malignant gliomas. **Oncologist**;4: 209–224.
- Baer JC, Freeman AA, Newlands ES, Watson AJ, Rafferty JA, Margison GP. (1993) Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumors cells. **Br J. Cancer**;67(6):1299-302
- Balajee AS, Geard CR. (2001) Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells, **Nucleic Acids Res.**; 29(6):1341-51.
- Barnes DE, Lindahl T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annu Rev Genet.**;38:445-76.
- Baute J, Depicker A (2008) Base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Crit Rev Biochem Mol Biol.**;43(4):239-76.
- Beranek DT. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutat. Res.**;231(1):11-30.
- Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P. (2000) Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. **Mutat. Res.**;462(2-3):71-82.
- Bobola MS, Blank A, Berger MS, Stevens BA, Silber JR. (2001) Apurinic/aprimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas. **Clin Cancer Res.**;7(11):3510-8.
- Bobola MS, Emond MJ, Blank A, Meade EH, Kolstoe DD, Berger MS, Rostomily RC, Silbergeld DL, Spence AM, Silber JR. (2004) Apurinic endonuclease activity in adult gliomas and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy and after radiotherapy. **Clin. Cancer Res.**;10(23): 7875-7883.
- Bobola MS, Tseng SH, Blank A, Berger MS, Silber JR. (1996) Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in resistance of human brain tumor cell lines to the clinically relevant methylating agents temozolomide and streptozotocin. **Clin. Cancer Res.**;2: 735–41.
- Boiteux S e Guillet M. (2004) Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair (Amst.)**;3(1):1-12.
- Brada M, Hoang-Xuan K, Rampling R, Dietrich PY, Dirix LY, Macdonald D, Heimans JJ, Zonnenberg BA, Bravo-Marques JM, Henriksson R, Stupp R, Yue N, Bruner J, Dugan M, Rao S, Zaknoen S. (2001) Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. **Ann. Oncol.**;12(2): 259-266.

- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. **Nucleic Acids Res.**;24(22):4387-94.
- Campalans A, Marsin S, Nakabeppu Y, O'connor TR, Boiteux S, Radicella JP. (2005) XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. **DNA Repair (Amst)**.;4(7):826-35.
- Chakravarti D, Ibeanu GC, Tano K, Mitra S. (1991) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. **J. Biol. Chem.**;266: 15710–15715.
- Chang DJ, Lupardus PJ and Cimprich KA (2006) Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities, **J. Biol. Chem.**;281(43):32081-8.
- Danson SJ, Middleton MR. (2001) Temozolomide: a novel oral alkylating agent. **Expert Rev Anticancer Ther.**; 1(1):13-9.
- Demple B, Harrison L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. **Annu. Rev. Biochem.**;63: 915– 948.
- Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. **Biochemistry**;33(31):9045-51.
- Dogliotti E, Fortini P, Pascucci B e Parlanti E. (2001) Multiple pathways for DNA base excision repair. The mechanism of switching among multiple BER pathways. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**;68: 1–28.
- Donson AM, Addo-Yobo SO, Handler MH, Gore L, Foreman NK. (2007) MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. **Pediatric Blood Cancer**;48(4):403-7.
- Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug GE, Krokan HE. (2004) Alkylation damage in DNA end RNA – repair mechanisms and medical significance. **DNA Repair**;3: 1389-1407.
- Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.**;35(4):495-516.
- Engelward BP, Dreslin A, Christensen J, Huszar D, Kurahara C, Samson L (1996) Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing. **EMBO J.**;15: 945–952.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. **N Engl J Med.**; v. 9;343(19); p. 1350-4. Erratum in: *N Engl J Med.*; 343(23): 1740.
- Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. (2000) Going APE over ref-1. **Mutat Res.**;461: 83–108.
- Fan J, Wilson DM 3rd. (2005) Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. **Free Radic Biol Med.**;38(9):1121-38.
- Ferguson LR, Baguley BC. (1996) Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. **Mutat. Res.**;355(1-2):91-101.

- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. **DNA Repair (Amst)**;3(8-9): 959-67.
- Fink D, Aebi S e Howell SB. (1998) The role of DNA mismatch repair in drug resistance. **Clin. Cancer Res.**;4(1):1-6.
- Fishel ML e Kelley MR (2007) The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. **Mol. Aspects Med.**;28(3-4):375-95.
- Fishel ML, HE Y, Smith ML, Kelley MR. (2007) Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. **Clin. Cancer Res.**; 13(1): 260-267.
- Fortini P, Calcagnile A, Vrieling H, van Zeeland AA, Bignami M, Dogliotti E. (1993) Mutagenic processing of ethylation damage in mammalian cells: the use of methoxyamine to study apurinic/apyrimidinic site-induced mutagenesis. **Cancer Res.**; 53(5):1149-55.
- Friedman HS, Kerby T, Calvert H. (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clin Cancer Res.**;6(7):2585-97.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J Clin.**;55(3):178-94.
- Hall PA, Coates PJ, Goodlad RA, Hart IR, lane DP.(1994) Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors in vivo. **Br J. Cancer**;70(2):244-7.
- Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. (1993) High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. **Oncogene**; 8(1):203-7.
- Hall PA, Woods AL. (1990) Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. **Cell Tissue Kinet.**;23(6):505-22.
- Hammond LA, Eckardt JR, Kuhn JG, Gerson SL, Johnson T, Smith L, Drengler RL, Campbell E, Weiss GR, Von Hoff DD, Rowinsky EK. (2004) A randomized phase I and pharmacological trial of sequences of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and temozolomide in patients with advanced solid neoplasms. **Clin Cancer Res.**;10(5):1645-56.
- Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, De Tribolet N, Stupp R. (2004) Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. **Clin Cancer Res.**;10(6):1871-4.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in GBM. **N Engl J Med.**;352(10):997–1003.
- Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M. (2006) O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. **J. Neurochem.**; 96(3):766-76.
- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. **Cancer Res.**;61(5):1957-63.

- Horton JK, Baker A, Berg BJ, Sobol RW, Wilson SH. (2002) Involvement of DNA polymerase beta in protection against the cytotoxicity of oxidative DNA damage. **DNA Repair (Amst)**; 1(4):317-33.
- Horton JK, Prasad R, Hou E, Wilson SH. (2000) Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase β -dependent long patch base excision repair. **J. Biol. Chem.**;275:2211-2218.
- Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. (1999) Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. **Brain Pathol.**;9(3):469-79.
- Jacinto FV, Esteller M. (2007) MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. **DNA Repair (Amst)**;6(8):1155-60.
- Jin Z, El-Deiry WS. (2005) Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol Ther.**;4(2):139-63.
- Johannessen TC, Bjerkvig R, Tysnes BB (2008) DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? **Cancer Treat Rev.**; 34(6):558-67
- Kaina B, Christmann M. (2002) DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**; 40(8):354-67.
- Kaina B, Ochs K, Grösch S, Fritz G, Lips J, Tomicic M, Dunkern T, Christmann M. (2001) BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis. **Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**; 68: 41-54.
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. **Cell Death Differ.**;11(4):448-57.
- Kim K, Biade S, Matsumoto Y. (1998) Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. **J. Biol. Chem.**; 273(15):8842-8.
- Kingma PS, Corbett AH, Burcham PC, Marnett LJ, Osheroff N. (1995) Abasic sites stimulate double-stranded DNA cleavage mediated by topoisomerase II. DNA lesions as endogenous topoisomerase II poisons. **J. Biol. Chem.**; 270(37):21441-4.
- Kleihues P e Ohgaki H. (2000). "Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors." **Toxicol Pathol**, 28(1): 164-70.
- Klungland A, Lindahl T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). **EMBO J.**; 16(11):3341-8.
- Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schär P, Barnes DE, Lindahl T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. **EMBO J.**; 15(23):6662-70.
- Kumala S, Niemiec P, Wideł M, Hancock R, Rzeszowska-Wolny J. (2003) Apoptosis and clonogenic survival in three tumour cell lines exposed to gamma rays or chemical enotoxic agents. **Cell Mol Biol Lett.**;8(3):655-65.
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**; 362: 709-715.

- Lindahl T e Barnes DE. (2000) Repair of endogenous DNA damage. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.**; 65:127–134.
- Lindahl T. (1976) New class of enzymes acting on damaged DNA. **Nature**; 259 64–66.
- Liu L , Gerson SL. (2004) Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. **Curr. Opin. Investig. Drugs.**; 5:623–627
- Liu L, Nakatsuru Y, Gerson SL. (2002) Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. **Clin. Cancer Res.**; 8(9): 2985-2991.
- Liu L, Taverna P, Whitacre CM, Chatterjee S, Gerson SL. (1999) Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and –proficient colon cancer cells to methylating agents. **Clin. Cancer Res.**; 5: 2908-2917.
- Liu L, Yan L, Donze JR, Gerson SL. (2003) Blockage of abasic site repair enhances antitumor efficacy of 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in colon tumor xenografts. **Mol Cancer Ther.**; 2(10):1061-6.
- Liu M, Talpaert-Borle M. (1985) A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine. **J. Biol. Chem.**; 260: 5252–5258.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**; 25(4):402-8.
- Loeb LA (1985) Apurinic sites as mutagenic intermediates. **Cell**; 40(3):483-4.
- Loeb LA, Preston BD. (1986) Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. **Annu. Rev. Genet.**; 20: 201–230,
- Madhusudan S, Hickson ID (2005) DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. **Trends Mol. Med.**; 11(11): 503-511.
- Madhusudan S, Middleton MR. (2005) The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. **Cancer Treat Rev.**; 31(8):603-17
- Maga G, Hübscher U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **J Cell Sci.**; 116(Pt 15):3051-60.
- Marsin S, Vidal AE, Sossou M, Ménissier-de Murcia J, Le Page F, Boiteux S, de Murcia G, Radicella JP. (2003) Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. **J Biol Chem.**; 278(45):44068-74.
- Mason WP, Cairncross JG. (2005) Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma--impact of a recent trial. **Nat Clin Pract Neurol.**; 1(2):88-95.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Me´nissier-de Murcia J, de Murcia G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. **Mol Cell Biol.**; 18: 3563–3571.
- Matsuzaki Y, Adachi N, Koyama H. (2002) Vertebrate cells lacking FEN-1 endonuclease are viable but hypersensitive to methylating agents and H₂O₂. **Nucleic Acids Res.**; 30 (14): 3273–3277.
- Maxwell JA, Johnson SP, McLendon RE, Lister DW, Horne KS, Rasheed A, Quinn JA, Ali-Osman F, Friedman AH, Modrich PL, Bigner DD, Friedman HS. (2008) Mismatch repair deficiency does

- not mediate clinical resistance to temozolomide in malignant glioma. **Clin Cancer Res.**;14(15):4859-68.
- Memisoglu A e Samson L. (2000) Base excision repair in yeast and mammals. **Mutat. Res.**; 451: 39–51.
- Mhaidat NM, Zhang XD, Allen J, Avery-Kiejda KA, Scott RJ, Hersey P. (2007) Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. **Br J Cancer**; 97(9):1225-33.
- Mutter N e Stupp R (2006) Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? *Expert Rev.* **Anticancer Ther.**; 6(8):1187-1204.
- Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YWw, Swenberg JA. (1998) Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. **Cancer. Res.**; v. 58, p. 222–225.
- O'reilly SM, Newlands ES, Glaser MG, Brampton B, Rice-Edwards JMm, Illingworth RD, Richards PG, Kennard C, Colquhoun IR, Lewis P, Stevens MFG. (1993) Temozolomide: a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumors. **Eur. J. Cancer.**; 29A: 940-942.
- O'Connor MJ, Martin NM, Smith GC. (2007) Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. **Oncogene.**; 26(56):7816-24.
- Ohgaki H, Kleihues P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am. J. Pathol.**;170 (5):1445-53.
- Ohgaki, H. (2005). "Genetic pathways to glioblastomas." **Neuropathology**, 25(1): 1-7.
- Ohgaki, H. (2009) Epidemiology of brain tumors. **Methods Mol Biol.**; 472:323-42.
- Op het Veld CW, Jansen J., Zdzienicka MZ, Vrieling H, van Zeeland AA. (1998) Methyl methanesulfonate-induced hprt mutation spectra in the Chinese hamster cell line CHO9 and its xrc1-deficient derivative EM-C11. **Mutat. Res.**; 398 (1-2): 83–92.
- Parkinson JF, Wheeler HT, McDonald KL. (2008) Contribution of DNA repair mechanisms to determining chemotherapy response in high-grade glioma. **J Clin Neurosci.**;15(1):1-8.
- Patel M, McCully C, Godwin K, Balis F. (2003) Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of temozolomide in non-human primates. **J. Neurooncol.**; 61(3): 203-207.
- Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC. (1995) Structure, function and inhibition of O6-alkylguanine-DNA AGT. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**; 51: 167–233.
- Pegg AE. (1990) Properties of mammalian O6-alkylguanine-DNA transferases. **Mutat Res.**; 233(1-2):165-75.
- Petermann E, Ziegler M, Oei SL. (2003) ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. **DNA Repair (Amst).**;2(10):1101-14.
- Prados M. (2001) Temozolomide in combination with other cytotoxic agents. **Semin. Oncol.**; 28: 24–33.
- Prados MD, Russo C. (1998) Chemotherapy of brain tumors. **Semin. Surg. Oncol.**; 14: 88–95.

- Prasad R, Lavrik OI, Kim SJ, Kedar P, Yang XP, Vande Berg BJ, Wilson SH (2001) DNA polymerase β -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. **J. Biol. Chem.**; 276:32411– 32414.
- Quinn JA, Desjardins A, Weingart J, Brem H, Dolan ME, Delaney SM, Vredenburgh J, Rich J, Friedman AH, Reardon DA, Sampson JH, Pegg AE, Moschel RC, Birch R, McLendon RE, Provenzale JM, Gururangan S, Dancey JE, Maxwell J, Tourt-Uhlig S, Herndon JE 2nd, Bigner DD, Friedman HS. (2005) Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. **J Clin Oncol.**;23(28):7178-87.
- Reifenberger G, Collins VP. (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J. Mol. Med.**; 82(10): 656-670.
- Reinhard J, Hull WE, Von Der Lieth CW, Eichhorn U, Kliem HC, Kaina B, Wiessler M. (2001) Monosaccharide-linked inhibitors of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): synthesis, molecular modeling, and structure-activity relationships. **J Med Chem.**; 44(24):4050-61.
- Rinne M, Caldwell D, Kelley MR. (2004) Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells. **Mol. Cancer Ther.**; 3(8): 955-967.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. (2009) Base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol Life Sci.**
- Roos WP, Batista LFZ, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CFM, Kaina B. (2007) Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. **Oncogene**; 26:186-197.
- Rosa S, Fortini P, Karran P, Bignami M, Dogliotti E. (1991) Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo. **Nucleic Acids Res.**; 19(20):5569-74.
- Rumbaugh JA, Henricksen LA, DeMott MS, Bambara RA. (1999) Cleavage of substrates with mismatched nucleotides by Flap endonuclease-1. Implications for mammalian Okazaki fragment processing. **J. Biol. Chem.**; 274(21):14602-8.
- Santarius T, Kirsch M, Rossi ML., Black PM. (1997) Molecular aspects of neuro-oncology. **Clinical Neurology and Neurosurgery**; 99:184-195.
- Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M, Wick W. (2008) Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. **Clin Cancer Res.**; 14(10):2900-8.
- Sedgwick B. (2004) Repairing DNA methylation damage. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**; 5:148–57.
- Shapiro WR, Shapiro JR. (1998) Biology and treatment of malignant glioma. **Oncology**; 12: 233–240.
- She M, Pan I, Sun L, Yeung SC. (2005) Enhancement of manumycin A-induced apoptosis by methoxyamine in myeloid leukemia cells. **Leukemia**; 19(4):595-602.
- Silber JR, Blank A, Bobola MS, Ghatan S, Kolstoe DD, Berger MS (1999) O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. **Clin. Cancer Res.**; 5:807–814.

- Silber JR, Bobola MS, Blank A, Schoeler KD, Haroldson PD, Huynh MB, Kolstoe DD. (2002) The apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. **Clin. Cancer Res.**; 8(9):3008-18.
- Silber JR, Bobola MS, Ghatan S, Blank A, Kolstoe DD, Berger MS. (1998) O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. **Cancer Res.**; 58(5):1068-73.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**; 175(1):184-91.
- Sobel RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, Wilson SH. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase- β in base-excision repair. **Nature**; 379:183–186.
- Sobel RW, Kartalou M, Almeida KHH, Joyce DF, Engelward BP, Horton JK, Prasad R, Samson LD, Wilson SH. (2003) Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. **J Biol Chem.**; 278(41): 39951-9.
- Sobel RW, Wilson SH. (2001) Mammalian DNA β -polymerase in base excision repair of alkylation damage. **Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.**; 68:57–74.
- Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl- 3-methylimidazo[5,1-d]- 1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. **Cancer Res.**; 47:5846–5852.
- Sutton MD, Walker GC. (2001) Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 98: 8342–8349.
- Talpaert-Borlé M, Liuzzi M. (1983) Reaction of apurinic/apyrimidinic sites with [14 C]methoxyamine. A method for the quantitative assay of AP sites in DNA. **Biochim. Biophys Acta.**; 740(4):410-6.
- Taverna P, Hwang HS, Schupp JE, Radivoyevitch T, Session NN, Reddy G, Zarlign DA, Kinsella TJ (2003) Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. **Cancer Res.**; 63(4):838-46.
- Taverna P, Liu L, Hwang HS, Hanson AJ, Kinsella TJ, Gerson SL. (2001) Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. **Mutat. Res.**; 485:269–281.
- Tell G, Damante G, Caldwell D, Kelley MR. (2005) The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? **Antioxid Redox Signal.**; 7(3-4):367-84.
- Tentori L, Graziani G. (2002) Pharmacological strategies to increase the antitumor activity of methylating agents. **Curr. Med. Chem.**; 9:1285–1301.
- Tentori L, Turriziani M, Franco D, Serafino A, Levati L, Roy R, Bonmassar E, Graziani G. (1999) Treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors induces early apoptosis and increases base excision repair gene transcripts in leukemic cells resistant to triazene compounds. **Leukemia.**; 13(6):901-9.
- Teo IA, Broughton BC, Day RS, James MR, Karran P, Mayne LV, Lehmann AR. (1983) A biochemical defect in the repair of alkylated DNA in cells from an immunodeficient patient (46BR). **Carcinogenesis**; 4(5):559–564.

- Trivedi RN, Almeida KH, Fornsgaglio JL, Schamus S, Sobol RW. (2005) The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. **Cancer Res.**; 65(14): 6394-6400.
- Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liau LM, Cloughesy TF, Nelson SF. (2006) Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. **Cancer Res.**; 66(1):159-67.
- Waga S, Bauer G, Stillman B. (1994) Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. **J. Biol. Chem.**; 269(14):10923-34.
- Wang D, Luo M, Kelley MR. (2004) Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. **Mol. Cancer Ther.**; 3(6):679-86.
- Warbrick E, Coates PJ, Hall PA. (1998) Fen1 expression: a novel marker for cell proliferation. **J. Pathol.**; 186(3):319-24.
- Wedge SR, Porteous JK, Newlands ES. (1997) Effect of single and multiple administration of an O6-benzylguanine/temozolomide combination: an evaluation in a human melanoma xenograft model. **Cancer Chemother. Pharmacol.**; 40:266–272.
- Willson SH. (1998) Mammalian base excision repair and DNA polymerase β . **Mutat. Res.**; 407:203–215.
- Wilstermann AM, Osheroff N. (2001) Base excision repair intermediates as topoisomerase II poisons. **J. Biol. Chem.**; 276(49):46290-6.
- Wood A, Garg P and Burgers PM (2007) A Ubiquitin-binding motif in the translesion DNA polymerase rev1 mediates its essential functional interaction with ubiquitinated PCNA in response to DNA damage, **J. Biol. Chem.**; 282(28):20256-63.
- Wood RD. (1996) DNA repair in eukaryotes. **Annu Rev Biochem.**;65:135-67.
- Woodhouse BC, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL (2008) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. **DNA Repair**; 7:932–940.
- Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, Friedman AH, Bruner J, Yue N, Dugan M, Zaknoen S, Levin VA (1999) Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. **J. Clin. Oncol.**; 17(9):2762-71. Erratum in: *J Clin Oncol* (11):3693.
- Zawlik I, Vaccarella S, Kita D, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. (2009) Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study. **Neuroepidemiology**; 32(1):21-9.

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](#)