

Patricia de Oliveira Carminati

**Mecanismos envolvidos nas respostas celulares ao antitumoral
cisplatina associado ao inibidor de PI3K (LY294002) em linhagens
de glioma**

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RESUMO

Carminati, P.O. **Mecanismos envolvidos nas respostas celulares ao antitumoral cisplatina associado ao inibidor de PI3K (LY294002) em linhagens de glioma.** 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os gliomas malignos são os tumores primários do sistema nervoso central mais comuns, sendo os mais agressivos e mais difíceis de serem tratados. Dessa maneira, novas estratégias de tratamento, buscando aumentar a taxa de indução de morte celular, têm sido investigadas. Neste estudo, foram analisadas as respostas celulares ao tratamento com a cisplatina, associada ou não ao LY294002 (inibidor da família de proteínas PI3K e DNA-PK) em células de glioma, linhagens U343, U87 (ambas proficientes para *TP53*), além de MO59K e MO59J (proficiente e deficiente para DNA-PK, respectivamente). Os resultados mostraram que a cisplatina causou uma grande diminuição na porcentagem de células sobreviventes (linhagens U343 e U87), sendo que o LY294002 aumentou o efeito da cisplatina. As células U343 sofreram apoptose em resposta à cisplatina e cisplatina+LY294002, o que não foi observado nas células U87. Também foi detectado um leve bloqueio em S nas células U343 após o tratamento com a cisplatina. A linhagem MO59K foi resistente à cisplatina em comparação à MO59J, sendo observado um bloqueio na fase S do ciclo celular nas células MO59K. A análise dos níveis de expressão protéica revelou que TFIIP80 (função associada ao reparo do DNA) foi expressa em todos os tratamentos empregados. PCNA (duplicação e reparo do DNA) se expressou em todas as condições testadas (U343), apresentando um aumento de expressão dependente da concentração nas células MO59K após o tratamento com a cisplatina, condizente com o bloqueio em S. Por outro lado, não houve uma alteração na expressão de PCNA nas células MO59J. A expressão de SAPK/JNK apresentou níveis basais nas células não tratadas. As proteínas envolvidas na percepção e sinalização dos danos induzidos no DNA (como ATR, CHK1 e TP53) apresentaram uma maior expressão nas amostras tratadas com cisplatina e cisplatina+LY294002. Adicionalmente, verificou-se a formação de *foci* de γ H2AX nas células tratadas com cisplatina e cisplatina+LY294002, condizente com a geração de DSBs pela cisplatina como lesões secundárias. A análise da expressão gênica por *cDNA microarrays* mostrou 108 genes significativamente modulados (28 induzidos e 80 reprimidos) pelo tratamento com cisplatina; 274 genes (94 induzidos e 180 reprimidos) modulados pelo tratamento com cisplatina+LY294002, e 33 genes (6 induzidos e 27 reprimidos) modulados por LY294002. O tratamento combinado causou uma maior alteração transcricional nas células U343 relativamente aos demais tratamentos (cisplatina ou LY294002). Os genes modulados estão relacionados principalmente com os processos de

reparo do DNA (*RAD51D*, *RAD52*, *ATR*, *NBS1* e *PRKDC*), apoptose (*FOXO3A*, *CASP8AP2*, *BIRC2*, *CAVI* e *DUSP22*), controle do ciclo celular e proliferação (*CDC14A*, *SESNI*, *SRPK2*, *EGFR* e *MAPK6*), e adesão celular (*CDH13*, *ADAM12*, *SPP1* e *STOML2*). O gene *PRKDC*, o qual codifica a DNA-PK, foi reprimido nas células tratadas com cisplatina+LY294002 e LY294002, confirmando o efeito inibitório do LY294002. Os padrões de expressão de alguns genes (*PRKDC*, *DUSP22*, *FEN1*, *BTG2*, *CAVI* e *RAD52*) por PCR em tempo real foram similares aos perfis de expressão gerados pelo método de *microarrays*. Em conclusão, os resultados apresentados demonstraram que LY294002 associado à cisplatina aumentou os efeitos causados pela droga sozinha, fato que pode ser devido à inibição de DNA-PK, a qual está envolvida no reparo NHEJ (*non-homologous end joining*). Os resultados obtidos também indicam que a DNA-PK é um determinante crítico da sobrevivência celular após exposição à cisplatina, e a falta de um bloqueio em S nas células MO59J é provavelmente responsável pelo aumento de morte celular após o tratamento com a cisplatina. O presente estudo sugere que a DNA-PK constitui um alvo terapêutico eficiente para sensibilizar as células de glioma à cisplatina.

Palavras-chave: glioma, cisplatina, LY294002, reparo do DNA, expressão gênica

ABSTRACT

Carminati, P.O. **Mechanisms involved in cellular responses to cisplatin associated with LY294002 (an inhibitor of PI3K) in glioma cell lines.** 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Malignant gliomas are the most common primary tumors of the central nervous system, being among the most aggressive and difficult to treat. Thus, new treatment strategies, seeking to increase the rate of cell death, have been investigated. In this study we analyzed the cellular responses to cisplatin, combined or not with LY294002 (an inhibitor of PI3K protein family and DNA-PK) in glioma cell lines, U343 and U87 (both *TP53* proficient) and MO59K and MO59J (proficient and deficient for DNA-PK, respectively). The results showed that cisplatin caused a large decrease in the percentage of surviving U343 and U87 cells, and that LY294002 increased the effect of cisplatin. U343 cells were capable of undergoing apoptosis in response to cisplatin and cisplatin + LY294002, which was not observed for U87 cells. We also observed a slight S-phase arrest in U343 cells after cisplatin treatment. MO59K cells were resistant to cisplatin compared to MO59J cells, and a marked S-phase arrest was seen in MO59K cells. Analysis of protein expression levels revealed that TFIIP80 (associated with DNA repair) was expressed in all treatments. PCNA (replication and DNA repair) protein was expressed in all conditions tested (U343) and an increased expression in a dose-dependent manner was seen for MO59K cells, consistent with the S-phase blockage. Moreover, there was no change in the expression of PCNA in MO59J cells. The expression of SAPK/JNK showed basal levels in untreated cells, while the expression of proteins involved in the perception and signaling of DNA damage (such as ATR, CHK1 and TP53) showed increased levels in cells treated with cisplatin and cisplatin + LY294002. Additionally, the formation of γ H2AX *foci* in cells treated with cisplatin and cisplatin + LY294002 was consistent with the generation of DSBs (secondary DNA lesions) by cisplatin. Analysis of gene expression by *cDNA microarrays* showed 108 significantly modulated genes (28 up-regulated and 80 down-regulated) by treatment with cisplatin; 274 genes (94 up-regulated and 180 down-regulated) with cisplatin+LY294002 treatment and 33 genes (6 up-regulated and 27 down-regulated) with LY294002 treatment. The combined treatment caused a greater transcriptional change in U343 cells compared to cisplatin or LY294002 treatments, as seen by the large number of modulated genes. These genes are mainly related to DNA repair (*RAD51D*, *RAD52*, *ATR*, *NBS1* and *PRKDC*), apoptosis (*FOXO3A*, *CASP8AP2*, *BIRC2*, *CAVI* and *DUSP22*) cell cycle control and proliferation (*CDC14A*, *SESNI*, *SRPK2*, *EGFR* and *MAPK6*) and cell adhesion (*CDH13*, *ADAM12*, *SPP1* and *STOML2*). *PRKDC* gene, which encodes DNA-PK, was found

down-regulated in cells treated with cisplatin+LY294002 and LY294002, thus confirming the inhibitory effect of LY294002 on the expression of DNA-PK. The expression patterns of few genes by real-time PCR were also confirmed using the same RNA samples analyzed by the *microarray* method. In conclusion, the present results demonstrated that LY294002 combined to cisplatin enhanced the effects caused by the drug alone. This effect might be also due to the inhibition of DNA-PK, which is involved in NHEJ (*non-homologous end joining*) repair. Our results also indicates DNA-PK as a critical determinant of cell survival after cisplatin treatment and the lack of S-phase arrest in MO59J cells is presumably responsible for the increased cell death after cisplatin exposure. The present study suggests the possibility that DNA-PK can be an effective therapeutic target for sensitizing human gliomas to cisplatin.

Keywords: glioma, cisplatin, LY294002, DNA repair, gene expression

1. Introdução

Os gliomas primários constituem um dos maiores desafios da oncologia contemporânea. Embora novas modalidades de terapias tenham apresentado certo impacto no tratamento de muitos outros tipos de câncer, a sobrevivência de pacientes com gliomas malignos não tem se alterado por décadas. A incidência desse tipo de tumor é de 5 a 10 a cada 100.000 pessoas, mas tem aumentado na população de idade mais avançada (Rich e Bigner, 2004).

Os gliomas malignos são os mais comuns tumores primários do sistema nervoso central (SNC), perfazendo 78% de todos os tumores do SNC em adultos (Noda *et al.*, 2009). Esses tumores estão entre os mais agressivos e mais difíceis de se tratar. Apesar dos modernos tratamentos com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o prognóstico dos pacientes com glioblastoma multiforme permanece ruim, com uma sobrevivência média de aproximadamente 12 meses. Dado que a remoção cirúrgica completa não é alcançada, terapias adjuvantes possuem um importante papel no tratamento desses tumores (Furnari *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde classifica os gliomas em quatro graus baseados em características histológicas. Astrocitomas pilocíticos (grau I) são tumores relativamente benignos (>80% dos pacientes sobrevivem >20 anos após o diagnóstico) que geralmente ocorrem em crianças e adultos jovens. O tratamento desses tumores é por meio de cirurgia. Os astrocitomas difusos ou de baixo grau (grau II) são tumores de células bem diferenciadas que crescem vagarosamente, mas invadem difusamente as estruturas cerebrais normais. A sobrevivência é altamente variável, com uma média de 5 a 10 anos. Já os gliomas malignos ou de alto grau incluem os astrocitomas anaplásicos ou oligodendrogliomas anaplásicos (grau III) e glioblastomas (grau IV), os quais possuem histopatologia característica, definida pela presença de mitoses, núcleo e células atípicas e, nos glioblastomas, proliferação microvascular e necrose (Rich e Bigner, 2004).

Há muitas razões relacionadas ao mau prognóstico dos glioblastomas. Em primeiro lugar, embora as metástases sejam raras, as células de glioma se infiltram extensivamente no parênquima cerebral circundante, desse modo limitando a remoção total por meio de cirurgia. Em segundo, a barreira hemato-encefálica consiste em um obstáculo para o fluxo adequado de agentes quimioterapêuticos para os tumores cerebrais. E em terceiro lugar, os glioblastomas são refratários à maioria dos agentes anticâncer, sendo as respostas ocasionais freqüentemente de curta duração acompanhadas de um rápido desenvolvimento de resistência ao tratamento,

uma consequência direta da transformação genética e heterogeneidade tumoral características desses neoplasmas (Stupp *et al.*, 2007).

Uma das características mais conhecidas dos gliomas é a considerável heterogeneidade em termos de patologia e alterações genéticas, mesmo dentro de uma única amostra tumoral. Apesar desta heterogeneidade, há algumas alterações genéticas que são frequentemente observadas. Por exemplo, mutações no gene *TP53* e superexpressão dos ligantes e receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são frequentemente observadas em astrocitomas de baixo grau. A progressão para astrocitomas anaplásicos é marcada pelo acúmulo de outras anormalidades genéticas, como alterações nas vias regulatórias do ciclo celular, especialmente aquelas associadas com os genes retinoblastoma, p16INK4a ou pRB1 (*retinoblastoma susceptibility locus 1*), ou com a amplificação ou superexpressão do gene CDK4 e HDM2. Os glioblastomas secundários estão associados com a deleção do cromossomo 10, o qual inclui o gene supressor de tumor PTEN (Sathornsumetee e Rich, 2006; Ohgaki e Kleihues, 2005; Noda *et al.*, 2009).

Entretanto, a maioria dos glioblastomas é diagnosticada sem um tumor de baixo grau antecedente, sendo conhecidos por glioblastoma primário. Estes compartilham muitas alterações genéticas similares com os glioblastomas secundários, tais como perda de PTEN, deleção ou mutação em p16INK4a, e a amplificação de HDM2 ou CDK4. Por outro lado, há muitas alterações moleculares que distinguem os glioblastomas primários dos secundários. A característica marcante dos astrocitomas de baixo grau e, como consequência, dos glioblastomas secundários, inclui a perda de *TP53*, enquanto os glioblastomas primários frequentemente possuem amplificações do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), geralmente não vista nos glioblastomas secundários (Kleihues *et al.*, 1999; Noda *et al.*, 2009).

1.1. Via de sinalização PI3K (Fosfatidilinositol 3-quinase)

A resistência natural dos glioblastomas à radioterapia e quimioterapia é atribuída, pelo menos parcialmente, à via de sinalização PI3K/AKT. A atividade de PI3K/AKT é frequentemente elevada em tumores cerebrais devido a uma estimulação excessiva por receptores de fator de crescimento e Ras (Lefranc *et al.*, 2008). A ativação da via PI3K está associada ao aumento do grau tumoral, aos níveis diminuídos de apoptose e a uma resposta adversa à terapia em pacientes portadores de glioblastoma. PI3K é uma quinase lipídica que promove diversas funções biológicas incluindo proliferação celular, sobrevivência e

motilidade. A perda do PTEN é uma característica genética comum em glioblastomas que leva a uma ativação constitutiva da via PI3K. Uma vez ativada, PI3K fosforila vários efetores *downstream*, incluindo AKT, que regula o crescimento celular, proliferação e apoptose (Sathornsumetee *et al.*, 2007).

A via PI3K tem atraído muita atenção nos últimos anos pois ela abrange alvos considerados promissores para o desenvolvimento de novas drogas para a terapia do câncer, sendo que uma série de inibidores de PI3K estão atualmente em desenvolvimento (Opel *et al.*, 2008). Esse fato parece ter uma importância particular para os glioblastomas à medida que esses tumores evoluíram mecanismos alternativos de resistência ao tratamento, então a terapia baseada em apenas um agente poderia não atingir toda a população de células tumorais (Westhoff *et al.*, 2009). Alterações na via PI3K têm um papel importante em vários tumores, incluindo glioblastomas, nos quais a correlação entre a atividade dessa via com uma resposta clínica adversa e redução da apoptose já foi mostrada (Chakravarti *et al.*, 2004).

PI3K é uma rede de sinalização altamente complexa e ramificada que pode ativar numerosos efetores (Westhoff *et al.*, 2009). De particular interesse neste contexto é a interação desta via e drogas anticâncer, uma vez que muitas drogas agem danificando direta ou indiretamente o DNA, o qual, por sua vez, leva à ativação de vias de resposta ao dano (Christmann *et al.*, 2003). Por exemplo, o reparo do tipo NHEJ (*non-homologous end joining*) é ativado por DSBs (*double strand breaks*), e muitas proteínas envolvidas nesta via de reparo são geneticamente e estruturalmente similares à PI3K, tais como ATM e ATR, e provavelmente mais impressionantemente DNA-PK (Westhoff *et al.*, 2009). Esta proteína é responsável pela remoção de extremidade de DNA no local da quebra, um processo essencial para o início do reparo.

Inibidores de PI3K como wortmanina e LY294002 são comumente utilizados para inibir a proliferação das células cancerosas e o crescimento tumoral, sensibilizando as células tumorais ao tratamento com drogas e radiação (Jiang e Liu, 2007). LY294002 (um derivado de flavonóide) é um potente inibidor de quinases PI3K (Vlahos *et al.*, 1994; Osaki *et al.*, 2004; Bar, *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2006), frequentemente usado *in vitro* e apresenta propriedades anti-proliferativa e pró-apoptótica (Osaki *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005; Fujiwara *et al.*, 2006). Embora o LY294002 sozinho possa inibir a proliferação celular e/ou induzir apoptose nas células cancerosas através da inibição da via PI3K, o seu efeito pode ser adicionalmente aumentado pela radio ou quimioterapia (Osaki *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005; Ohta *et al.*, 2006). LY294002 é também considerado um inibidor de DNA-PK com eficiência comparável àquela observada para a inibição de PI3K (Kong *et al.*, 2009).

Enquanto DNA-PK foi inibida por LY294002, as outras proteínas sensoras de dano no DNA, ATM e ATR, permaneceram ativas (Stiff *et al.*, 2004).

Ohta *et al.* (2006) mostraram que a inibição da via PI3K/AKT aumentou a capacidade da cisplatina, tanto em inibir o crescimento tumoral, quanto em induzir apoptose *in vivo*. Inibidores de PI3K/AKT em combinação com o antitumoral cisplatina podem constituir uma estratégia terapêutica mais eficaz que o tratamento com um único agente. Nakamura *et al.* (2005) demonstraram que o tratamento com LY294002 em células de glioma U251MG induziu citotoxicidade de forma sinérgica quando combinado com a radiação ionizante. Os resultados de Fujiwara *et al.* (2006) indicaram que o tratamento com LY294002 aumentou seletiva e marcadamente a apoptose induzida por doxorrubicina em células tumorais. Fujiwara *et al.* (2007) mostraram que LY294002 aumentou significativamente a morte celular induzida pelo agente vincristina em células tumorais nas quais a via PI3K/AKT está constitutivamente ativada (linhagens de glioblastoma A172 e T98G; adenocarcinoma de próstata LNCaP, e de carcinoma de bexiga T24).

Em particular, dado que a via PI3K é um importante regulador da sobrevivência celular durante estresse, e que as células tumorais freqüentemente existem em ambientes intrinsecamente “estressantes” (com suprimentos limitados de oxigênio e nutrientes e baixo pH), espera-se que o bloqueio específico dessa via de sinalização possa gerar um efeito sinérgico em associação com agentes que aumentam o estresse celular, tais como drogas e radiação (Hennessy *et al.*, 2005; Fujiwara *et al.*, 2007). Em suporte a esta suposição, sabe-se que o bloqueio da via PI3K/AKT levou a uma sensibilização de vários tipos de células tumorais à morte celular por apoptose induzida por uma variedade de drogas anticâncer, como etoposide, paclitaxel, gencitabina e doxorrubicina. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na indução de apoptose pela combinação de um inibidor de PI3K/AKT e agentes antitumorais ainda permanecem desconhecidos (Fujiwara *et al.*, 2007; Sakamoto-Hojo e Balajee, 2008).

1.2. Cisplatina

Enquanto novas terapias do câncer estão sendo desenvolvidas baseadas nos recentes avanços da biologia celular e molecular, os agentes causadores de danos no DNA, como a radiação ionizante e a cisplatina, continuam a ter um papel de destaque no tratamento do câncer (Cruet-Hennequart *et al.*, 2008). A cisplatina é um agente quimioterápico descoberto em 1970 como um inibidor do crescimento de *E. coli* (Rosenberg *et al.*, 1969). O benefício

clínico da cisplatina como um agente quimioterápico foi reconhecido há mais de 30 anos. A quimioterapia baseada em cisplatina mostrou-se eficaz contra câncer de testículo, ovário, esôfago, carcinoma de bexiga, mama, cabeça, pescoço e pulmão (Kartalou e Essigmann, 2001; Chaney *et al.*, 2004; Brabec e Kasparkova, 2005; Kim *et al.*, 2005; Wang e Lippard, 2005) sendo também utilizada para o tratamento de gliomas (Massimino *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2005; Silvani *et al.*, 2009; Zustovich *et al.*, 2009).

Uma vez dentro da célula, a cisplatina sofre reações aquosas, convertendo-se em uma molécula positivamente carregada e altamente reativa, que interage com o DNA para formar os diversos tipos de aductos (Wang e Lippard, 2005). Diferentes tipos de lesões podem ser formadas nas bases do DNA: *crosslinks* intracadeia e *crosslinks* intercadeia. Quase todos os *crosslinks* são intracadeia, sendo a maioria *crosslinks* do tipo 1,2-d(GpG). Lesões adicionais no DNA incluem os *crosslinks* intercadeia (ICL) (Rabik e Dolan, 2006). Os *crosslinks* intracadeia são os aductos mais abundantes formados, enquanto que os *crosslinks* intercadeia são lesões menos frequentes, mas consideradas altamente citotóxicas (Brozovic *et al.*, 2009).

Os *crosslinks* destorcem a dupla fita de DNA, interferindo com a duplicação e/ou transcrição, resultando em dano no DNA que leva a um bloqueio no ciclo celular e morte celular (Wang e Lippard, 2005). Nas células tumorais, o dano induzido pela cisplatina tem sido reconhecido como a principal causa de injúria na célula e morte celular durante a quimioterapia, sendo o TP53 considerado o mediador central na resposta ao dano no DNA (Siddik, 2003; Wang e Lippard, 2005; Cepeda *et al.*, 2007).

O uso clínico da cisplatina está limitado pelo seu efeito tóxico e pelo desenvolvimento de resistência (Sedletska *et al.*, 2005; Wang e Lippard, 2005). Existem muitos mecanismos envolvidos na resistência à cisplatina, como a absorção reduzida da droga e aumento da taxa de reparo do DNA, assim como elevação do conteúdo da glutathione ou da atividade da glutathione-S-transferase, aumento nos níveis de proteínas anti-apoptóticas relacionadas à família BCL-2 e alterações na via de transdução de sinal envolvida na apoptose. Esses mecanismos celulares contribuem para modular a interação droga-alvo e a sensibilidade à droga (Muscella *et al.*, 2005; Sedletska *et al.*, 2005).

Apesar de toda informação existente sobre o mecanismo pelo qual a cisplatina age aos níveis celular e molecular, as vias de sinalização envolvidas no processamento das lesões induzidas por essa droga não são completamente compreendidas, sendo que a elucidação de tais mecanismos é de grande importância na tentativa de tornar as estratégias terapêuticas mais eficientes.

1.3. Respostas celulares aos danos causados pela cisplatina

Em eucariotos, as quinases relacionadas à PI3K (PIKK) iniciam as respostas ao estresse celular quando a integridade do genoma, a tradução do mRNA ou a disponibilidade de nutrientes estejam comprometidas. ATM, ATR e DNA-PKcs pertencem à família de proteínas quinase relacionadas a PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) e podem ser ativadas em resposta ao dano no DNA, desempenhando o papel de sensores de dano para diferentes tipos de lesões (Iliakis *et al.*, 2003; McGowan and Russell, 2004; Shiloh, 2006). Essa família de proteínas quinase é conservada e respondem a vários estresses por fosforilarem substratos em vias de sinalização apropriada (Shiloh, 2006).

Em resposta à indução de DSBs (*double strand breaks*), ATM é rapidamente ativada e fosforila vários substratos, dentre eles, TP53, H2AX, CHK2, RPA e BRCA1, cada qual sendo um fator chave na via de resposta ao dano (Iliakis *et al.* 2003; Shiloh 2003; Riballo *et al.* 2004). DNA-PK participa na via de reparo NHEJ (*non-homologous end joining*). Enquanto ATM e DNA-PK respondem primariamente a DSBs, ATR participa principalmente na transdução de sinal que emana de lesões causadas por UV, cisplatina e forquilhas de duplicação bloqueadas (Zhao e Piwnica-Worms, 2001; Helt *et al.*, 2005; Shiloh, 2006). Entretanto, essa quinase também responde a DSBs. Apesar de ATM e ATR compartilharem substratos na resposta a DSBs, eles mostram especificidade de substrato seletiva em resposta a diferentes estresses genotóxicos e indutores de DSBs (Helt *et al.*, 2005; Shiloh, 2006). DSBs também podem surgir como uma consequência do colapso de forquilhas de duplicação causado pela cisplatina (Yonetani *et al.*, 2005).

As proteínas ATM e ATR são essenciais para a ativação da proteína TP53, que por sua vez também é responsável pela trans-ativação de vários outros mecanismos. Após o dano no DNA, várias funções de TP53 são reguladas por uma série de eventos de fosforilação e acetilação pós-traducionais. A resposta inicial ao dano é a estabilização de TP53 a qual ocorre primariamente devido à sua fosforilação na porção N-terminal e o resultante rompimento da sua interação com o regulador negativo MDM-2 (Mujoo *et al.*, 2003; Sengupta *et al.*, 2005). Membros da família PI3K, tais como DNA-PKcs, ATM e ATR são conhecidos por fosforilarem TP53 na serina 15 (Mujoo *et al.*, 2003; Helt *et al.*, 2005), o que resulta na iniciação do checkpoint G1/S e aumento da viabilidade celular após insulto genotóxico. A ativação de TP53 é crucial para muitos processos celulares, incluindo reparo do DNA, bloqueio no ciclo celular e apoptose (Tokino e Nakamura, 2000; Helt *et al.*, 2005).

DNA-PK é uma proteína quinase formada pela subunidade catalítica, DNA-PKcs, e as subunidades Ku agindo como elementos regulatórios (Pawelczak *et al.*, 2005). A ativação de

DNA-PK, um passo essencial no processo de reparo, ocorre uma vez que essa proteína é montada no sítio de DSBs. A ativação de DNA-PK pode afetar outros componentes da via de sinalização do dano no DNA (Yang *et al.*, 2003). NHEJ é uma via de reparo responsável pela remoção de DSBs no DNA causadas, principalmente, pela radiação ionizante. Entretanto, ainda é pouco esclarecido o papel do NHEJ no reparo dos danos causados por outros agentes, como a cisplatina, por exemplo (Boeckman *et al.*, 2005). DNA-PK é a principal proteína iniciadora do processo de reparo via NHEJ (Pawelczak e Turchi, 2008).

O processamento dos danos induzidos pela cisplatina é bastante complexo. No caso dos *crosslinks* intercadeia (ICL), os quais se ligam covalentemente às duas fitas de DNA, várias proteínas de um número de vias celulares, incluindo NER (*nucleotide excision repair*), MMR (*mismatch repair*), HR (*homologous repair*) e o complexo FA (*Fanconi Anemia*) desempenham um papel na tentativa de reparar o dano no DNA (Cruet-Hennequart *et al.*, 2009; Wagner e Karnitz, 2009). Entretanto, o processamento dos ICL causados pela cisplatina pode levar à formação de lesões secundárias altamente citotóxicas, como as DSBs (Yonetani *et al.*, 2005; Brozovic *et al.*, 2009).

O NER é o principal mecanismo responsável pela remoção dos *crosslinks* intracadeia induzidos pela cisplatina (Rabik e Dolan, 2007; Brozovic *et al.*, 2009). Defeitos celulares no NER resultaram em hipersensibilidade à cisplatina (Cohen e Lippard, 2001; Furuta *et al.*, 2002; Siddik, 2003), sendo relatado que proteínas relacionadas ao NER, como ERCC1 e XPA, foram superexpressas em tumores de ovário resistente à cisplatina (Torigoe *et al.*, 2005).

Alguns autores demonstraram que proteínas do NER como XPC e XPA e as proteínas RPA, DNA-PK e HMGB1 teriam um papel fundamental no reconhecimento dos *crosslinks* (Furuta *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Além disso, relatou-se que o bloqueio da RNA polimerase II em um aducto de cisplatina também pode atuar como um sinal de reconhecimento de danos, disparando uma série de outros eventos, como a ativação do NER (Laine *et al.*, 2006). Entretanto, acredita-se que a proteína ATR seja a principal iniciadora e coordenadora dos processos de resposta aos danos causados pela cisplatina, sendo ativada juntamente com o complexo FANC durante a fase S, quando as DNA polimerases encontram os aductos causados pela cisplatina (Rosselli *et al.*, 2003; Pichierri *et al.*, 2004). Uma vez ativada, ATR bloqueia o ciclo celular por meio da fosforilação de CHK1 (Zhao *et al.*, 2001) e / ou CHK2 (Liang *et al.*, 2006) e a transdução de sinais ocorre pelas vias AKT, c-ABL, ERK, JNK e MAPK, além da proteína TP53, que pode ter um papel na indução dos mecanismos de reparo do DNA e apoptose (Wang *et al.*, 2005).

Os mecanismos envolvidos nas respostas celulares a drogas são muito importantes na tentativa de encontrar alvos moleculares eficazes para uma intervenção terapêutica. Entretanto, há muitos fatores que podem influenciar a eficiência do agente terapêutico quanto a causar a morte das células cancerosas. Entre eles, o *background* genético de cada tipo celular deve ser levado em conta, desde que múltiplas mutações são responsáveis pelo processo tumorigênico. Dessa forma, as respostas aos tratamentos, seja quimio ou radioterapia, podem diferir entre os pacientes, mesmo para o mesmo tipo de tumor, e essas considerações são relevantes em termos de resistência ou sensibilidade aos protocolos de tratamento, tanto convencionais ou terapias baseadas em alvos moleculares.

2. Objetivos

Gerais

O objetivo do presente estudo foi pesquisar os mecanismos envolvidos nas respostas aos danos no DNA em células de glioma tratadas com a cisplatina associada a um inibidor específico de PI3K e DNA-PK (LY294002). A hipótese testada neste trabalho é que a inibição de uma proteína de reparo do DNA pode contribuir para o aumento dos índices de morte celular induzida pelo tratamento das células com a droga cisplatina. Para isto, foram realizados ensaios de citotoxicidade, sobrevivência celular, apoptose, análise da cinética do ciclo celular, análise da expressão de proteínas de resposta ao dano e expressão gênica em larga escala por cDNA *microarrays*.

Específicos

- a) Avaliar as várias respostas celulares das linhagens U343, U87, MO59J e MO59K em termos de sobrevivência celular, indução de apoptose e sensibilidade ao tratamento com a cisplatina e/ou o inibidor LY294002.
- b) Analisar as alterações na cinética do ciclo celular mediante o tratamento com a cisplatina e/ou LY294002 nas linhagens de glioma (U343, U87, MO59J e MO59K).
- c) Estudar as alterações na expressão de algumas proteínas tais como, ATR, PCNA, TP53, TFIIP80, SAPK/JNK, CHK1 e H2AX, envolvidas na resposta celular aos danos causados pela cisplatina na linhagem U343, e verificar uma possível ação do inibidor LY294002.
- d) Analisar os perfis transcricionais da linhagem U343 após o tratamento com a cisplatina e/ou LY294002 utilizando-se o método de cDNA *microarrays*, visando identificar genes significativamente modulados pelos tratamentos, além de avaliar o efeito do tratamento combinado (cisplatina e LY294002) em relação ao tratamento somente com a cisplatina.
- e) Confirmar os resultados de expressão transcricional obtidos por *microarrays* para alguns genes por meio da técnica de PCR em tempo real.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens celulares e drogas utilizadas

Foram empregadas as seguintes linhagens celulares:

- Linhagem de glioma U343 MG-a (U343) gentilmente cedida pelo Prof. James T. Rutka (The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Centre, Canadá) e repassada pelo Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior (Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas-FMRP-USP).
- Linhagem de glioma U87MG (U87) gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar (Departamento de Bioquímica - Instituto de Química – USP, SP).
- Linhagens de glioma MO59K e MO59J, respectivamente proficiente e deficiente para *DNA-PK*.

As linhagens U343MG-a e U87MG apresentam mutações nos genes *p16*, *p14ARF* e *PTEN*, sendo selvagens para o gene *TP53*.

Agente antitumoral: Cisplatina (*Sigma*)

Inibidor de PI3K: LY294002 (*Sigma*)

3.2. Cultivo celular

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

3.3. Tratamento com cisplatina

O tratamento com a cisplatina foi realizado da seguinte maneira: primeiramente as células sofreram sub-cultivo, sendo semeadas em vários frascos de cultivo (*Corning*) para o tratamento. Após 24 h, essas células foram tratadas com a cisplatina (previamente diluída em água destilada estéril) sendo que a droga permaneceu no meio de cultura até a colheita. As

culturas, mantidas em estufa a 37°C, foram colhidas em tempos variáveis após o tratamento, sendo posteriormente processadas as análises de sobrevivência e morte celular (apoptose).

3.4. Tratamento com LY294002

As células foram previamente tratadas com o inibidor de PI3K LY294002 (50 µM) uma hora antes do tratamento com a cisplatina. Após esse período, as células foram tratadas com a cisplatina na concentração previamente determinada em cada ensaio, sendo que o inibidor permaneceu nas culturas até o momento da colheita. O LY294002 foi diluído em DMSO 0,1% e posteriormente adicionado ao meio de cultura alcançando a concentração desejada de 50 µM. Para todos os ensaios propostos, as células foram tratadas por uma hora com o inibidor LY294002, apenas variando o tempo de tratamento com a cisplatina de acordo com o experimento a ser realizado (tratamento associado).

3.5. Teste de citotoxicidade (24 h) e sobrevivência celular (5 dias)

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

As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços (*Corning*). O tratamento com as diversas concentrações de cisplatina (5; 10; 25; 50; 75 µM) e cisplatina associada a 50 µM LY294002 (5 µM + LY294002; 10 µM + LY294002; 25 µM + LY294002; 50 µM + LY294002 e 75 µM + LY294002) foi realizado durante 24 h após essa semeadura. Foram semeadas quantidades diferentes de células de acordo com o tipo de teste a ser realizado.

Para o teste de citotoxicidade, após o tratamento com a cisplatina, as células foram incubadas com o Kit XTT por no mínimo 45 minutos. Após esse período de incubação, a solução de formazam alaranjado é formada, a qual é quantificada no espectrofotômetro (*Amersham Biosciences*). O resultado da absorbância, medida em 492 e 690 nm, é proporcional ao número de células viáveis na amostra. No caso do teste de sobrevivência celular, as células previamente tratadas com a cisplatina foram incubadas em estufa a 37 °C durante cinco dias. Após esse período, procedeu-se à incubação com o Kit XTT da mesma maneira relatada para o teste de citotoxicidade.

3.6. Ensaio de proliferação celular usando o kit CyQuant

As células MO59K e MO59J foram semeadas em placas de 96 poços, numa quantidade de 20.000 células por poço. As células permaneceram na estufa e 24h após serem semeadas elas foram tratadas com várias concentrações de cisplatina (5, 10, 25, 50 e 75 μM). A colheita foi feita três dias após o tratamento. O kit CyQuant NF Cell Proliferation Assay (*Invitrogen*) foi preparado no momento da colheita, de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura foi removido dos poços e a solução do kit foi adicionada (50 μl por poço). A placa foi devolvida para a estufa e após 60 min procedeu-se à leitura em leitor de microplaca (*Biotek Synergy 2*). Foram realizadas 12 réplicas por experimento.

3.7. Detecção morfológica de células apoptóticas

As células apoptóticas foram reconhecidas por características morfológicas, tais como cromatina nuclear condensada e núcleo fragmentado. Para a visualização dessas características nas células apoptóticas, três corantes fluorescentes foram empregados: Hoechst 33342, Iodeto de propídeo (PI) e Diacetato de fluoresceína (DAF) (*Sigma*). Hoechst 33342 é um corante fluorescente usado para corar DNA em células viáveis. Devido ao fato de que o PI pode somente penetrar em células com uma membrana celular rompida, este agente pode ser utilizado para determinar a integridade da membrana celular. DAF é utilizado como um marcador da viabilidade celular, e ele se acumulará no citoplasma das células que possuem uma membrana intacta.

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

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

As concentrações dos agentes utilizados foram 10, 25 e 50 μM de cisplatina, 10 μM + LY294002, 25 μM + LY294002, 50 μM + LY294002 (tratamento associado com 50 μM de

LY294002), 50 μ M LY294002 e DMSO 0,1%. As células foram colhidas após 24, 48 e 72 h de tratamento com a cisplatina. Foram realizados três experimentos independentes.

3.8. Análise da Cinética do Ciclo Celular

As células MO59K e MO59J foram semeadas em placas de 10cm², numa quantidade de 250.000 células por placa. As células foram tratadas com cisplatina (5, 10 e 25 μ M) 24h após serem semeadas. Já as linhagens U343 e U87 foram tratadas com 25 μ M de cisplatina associada ou não ao LY294002. Para a análise da cinética do ciclo celular as células foram colhidas 24, 48 e 72h após o tratamento com a cisplatina.

No momento da colheita o meio foi removido e guardado, enquanto as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e coletadas com o meio previamente guardado. As células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 min. Neste momento o sobrenadante (meio de cultura) foi removido e o *pellet* foi lavado em PBS. As células foram novamente centrifugadas (1000 rpm por 5 min) e, após a centrifugação, o PBS foi removido e o *pellet* foi ressuscitado em 2ml de etanol 70% gelado, e mantido a -20° C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Antes de se proceder à leitura das amostras, o material armazenado a -20° C foi centrifugado (1000 rpm por 5 min) e o etanol 70% foi removido. O *pellet* foi ressuscitado em 3ml de PBS gelado e novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo anteriormente ditos. Seguido à centrifugação, o PBS foi removido e o *pellet* ressuscitado em 500 μ l de solução de iodeto de propídeo. Imediatamente o material foi transferido para o tubo de citometria de fluxo (*BD-Falcon, USA*) e mantido ao abrigo da luz até o momento da análise. As amostras foram analisadas usando um aparelho Becton Dickinson (*Franklin Lakes, NJ, USA*) FACSCalibur e pelo menos 10.000 eventos foram analisados para cada amostra. A porcentagem de células apoptóticas foi dada de acordo com a porcentagem de células em sub-G1.

3.9. Anticorpos

Os anticorpos primários empregados neste trabalho, assim como as diluições escolhidas foram os seguintes: anti-PCNA 1:2500 (*Abnova*), anti-SAPK/JNK 1:1000 (*Cell Signaling*), anti- γ H2AX 1:1000 (*Cell Signaling*), anti-fosfo p53 ser15 1:350 (ensaio de imunofluorescência) e 1:500 (*Cell Signaling*), anti-fosfo ATR 1:500 (*Abcam*), anti-fosfo CHK1 ser317 (*Cell Signaling*) e anti- β -actina 1:1000 (*Cell Signaling*).

3.10. Western Blot

3.10.1. Extração de proteínas

Foi utilizada uma solução de lise (*Lysis Solution, Fermentas*) para extração de proteínas das células tratadas com cisplatina e cisplatina + LY294002. Os tempos de colheita foram: 2, 3, 6, 12, 24 e 48 h após o tratamento com a cisplatina. Brevemente, as células foram tripsinizadas e lavadas uma vez com PBS gelado. Posteriormente, adicionou-se a solução de lise (200 µl/ 10⁶ células) acrescida de um coquetel de inibidores de protease (*Fermentas*). As células permaneceram por 10 minutos em agitação constante à temperatura ambiente. Logo após, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e a quantificação das proteínas foi feita empregando-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 50 µg de proteína para 2,5 µl de tampão da amostra (*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 três horas, 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 e submetidas à imunodeteção.

3.10.4. Imunodeteção e visualização das proteínas

A imunodeteção e a visualização das proteínas foram realizadas utilizando-se o kit “WesternBreeze Chromogenic” (*Invitrogen*). A membrana foi imersa em 10 ml de solução bloqueadora e incubada durante 30 minutos 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 por uma hora. 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 por uma hora, 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*.

3.11. Imunofluorescência

As células U343 foram crescidas sobre lamínula em placa de 24 poços. Após o tratamento com a cisplatina e LY294002 nos tempos e concentrações adequadas, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 20 min, lavadas com PBS e então permeabilizadas com PBS-Triton 0,3% por 15 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas com PBS e o bloqueio foi feito com PBS-BSA 1% + soro de galinha diluído 1:100 por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário (rabbit anti-fosfo p53 ser 15; rabbit anti- γ H2AX; rabbit anti-CHK1, todos da *Cell Signaling*) diluído 1:350, por 1 hora. Após esse tempo, as células foram incubadas com o anticorpo secundário chicken anti-rabbit-alexa 488 (coloração verde) diluído 1:350. A incubação foi por 1 hora. As células também foram incubadas com DAPI (1:8000) por 5 min ao abrigo da luz. Finalmente, as células foram lavadas com PBS e as lâminas foram montadas com Vectashield (*Vector Labs*) e analisadas em microscópio de fluorescência.

3.12. Expressão Gênica por *cDNA Microarrays*

3.12.1. Extração de RNA

A extração de RNA foi feita com o reagente Trizol (*Invitrogen*), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose denaturante.

3.12.2. Preparação das lâminas de *cDNA microarrays*

Para avaliação da expressão gênica em larga escala foram utilizadas lâminas de vidro (*Corning*) nas quais foram depositadas por meio de um robô Array Spotter Generation III (*Amersham Biosciences*) 4500 seqüências gênicas em duplicata, provenientes do “IMAGE Consortium” (<http://image.llnl.gov>), gentilmente cedidas pela Dra. Catherine Nguyen do Centr d’Immunologie Marseille – Luminy, Marseille, França.

3.12.3. Preparação das sondas de cDNA e hibridação na lâmina

As sondas complexas de cDNA foram preparadas a partir de amostras extraídas das células submetidas ou não a diferentes tratamentos. A transcrição reversa foi realizada com 10 µg de RNA/amostra utilizando-se o kit Amersham CyScribe Post-Labeling (*GE Healthcare*) e primers oligodT12-18. Para garantir que não ocorreram diferenças na incorporação do corante, um *pool* de referência composto de RNA extraído de 4 linhagens diferentes (*U343 MG-a*, linhagem de glioma humano; *HeLA*, carcinoma cervical; *Jurkat*, célula T-leucêmicas e *Hep-2*, células de tumor de faringe) foi adicionado e marcado de coloração diferente aos das amostras estudadas. Este *pool* se torna importante para a normalização dos dados, uma vez que possui a totalidade dos transcritos inseridos na lâmina de *microarray*.

Na preparação das sondas, foi utilizado o kit Amersham CyScribe Post-Labeling (*GE Healthcare*), marcando a amostra com o corante Cy3 e o *pool* de referência com Cy5. Dois processos estão envolvidos na confecção das sondas: o primeiro envolve a síntese de cDNA, adição de um nucleotídeo modificado (aminoalil-dUTP ou AA-dUTP), purificação do cDNA para remoção de nucleotídeos livres através de colunas CyScribe GFX (*GE Healthcare*). O segundo processo envolve a incorporação do corante no grupamento AA-dUTP (Cy3 para os grupos de estudo e Cy5 *pool* de referência).

A hibridação das sondas nas lâminas de *microarrays* foi realizada de forma automática, durante quinze horas a 42°C num processador *Lucidea Automated Slide Processor – ASP* (*Amersham Biosciences*). Os sinais da hibridação foram capturados por um scanner Generation III laser (*Amersham Biosciences*).

3.12.4. Análise da expressão gênica

As imagens obtidas foram processadas pelo software Spotfinder da TIGR (www.tm4.org/spotfinder), o qual quantificou os sinais obtidos em cada ponto, gerando arquivos de texto na extensão .tav. Estes foram submetidos ao ambiente estatístico R (www.r-project.org), que normalizou os dados, removendo diferenças de incorporação dos fluorocromos (Ihaka & Gentleman, 1996). Após normalização, os dados foram exportados na

extensão .mev e analisados pelo pacote estatístico MEV – *MultiExperiment Viewer*, da TIGR (www.tm4.org/mev). Os dados foram submetidos à análise estatística pelo programa SAM (*Significance Analysis of Microarray*), que possibilita a comparação entre grupos de estudo e seleciona os genes diferencialmente expressos com significância estatística. A lista de genes significativamente expressos foi obtida para um valor de FDR (*False Discovery Rate*) menor que 5%. O FDR é utilizado para quantificar o erro da amostra como um todo e posteriormente aplicado para ajustar os valores p estatísticos para expressão do erro (Smyth, 2004). As informações sobre a localização dos genes e suas funções biológicas foram obtidas a partir do SOURCE (source.stanford.edu), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), FatiGO (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/EntryPoint?loadForm=fatigo>) e DAVID-NIH (Dennis *et al.*, 2003).

3.13. Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

Foi utilizado o kit SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*) para a verificação dos níveis de expressão de alguns genes pré-selecionados no ensaio de *microarrays*. Foram empregadas as mesmas amostras de RNA utilizadas no método de *microarrays*. O mix de reação foi preparado da seguinte maneira: 7,5 µl de PCR Master Mix, 0,75 µl dos *primers forward* e *reverse* (solução estoque de 10 µM), 5,4 µl de água livre de RNase e 0,6 µl do cDNA proveniente da reação de transcriptase reversa. O volume final de cada reação foi de 15 µl. As reações foram montadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate - Applied Biosystems*), nas quais foram adicionados o mix de reação e as amostras de cDNA. Após a montagem, as placas foram devidamente seladas com o *Optical adhesive Covers (Applied Biosystems)*. O programa utilizado foi o seguinte: incubação (2 min a 50° C), ativação da Taq (10 min a 95° C) e 40 ciclos de denaturação (15 seg a 95° C), anelamento (1 min a 60° C) e então 4° C.

Os *primers* empregados foram os seguintes:

B2M – forward: 5'-AGG CTA TCC AGC GTA CTC CA-3'

B2M – reverse: 5'-TTC AAT GTC GGA TGG ATG AA-3'

PRKDC – forward: 5'-ATA GGT TTC AAC ATC GGA GAC-3'

PRKDC – reverse: 5'-GCT CCT CAA TGC TCT GTG-3'

DUSP22 – forward: 5'-GGT CCA TCA GTA TCG GCA GT-3'

DUSP22 – reverse: 5'-TCT TCT GAG AAA GGC CCA GA-3'

FEN1 – forward: 5'-CCA GCT CTT GGA ACC TG-3'

FEN1 – reverse: 5'-CGC TCC TCA GAG AAC TGC TT-3'

BTG2 – forward: 5'-TGG GTA GGG AGA GTG TTT GG-3'

BTG2 – reverse: 5'-CTT CCT CTA CCC CCA GGT TC-3'

CAVI – forward: 5'-CTC CTC CCC CAT CTT CTT TC-3'

CAVI – reverse: 5'-GCA CTT GCA ACC GTC TGT TA-3'

RAD52 – forward: 5'-TGG CCT GGT ACT CTT CTG CT-3'

RAD52 – reverse: 5'-TGG GAC TGA GGA AGC AAT TC-3'

3.14. Análise Estatística

Para a análise de sobrevivência celular e apoptose, os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade e posteriormente ao teste One Way ANOVA. A probabilidade de erro foi $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Citotoxicidade e Sobrevivência Celular

Foram realizados três experimentos independentes com as linhagens U343 e U87 usando o *Cell Proliferation Kit II (XTT)* para determinar a citotoxicidade e sobrevivência celular após o tratamento com diversas concentrações de cisplatina (5; 10; 25; 50; 75 μM) e cisplatina associada a 50 μM LY294002 (5 μM + LY294002; 10 μM + LY294002; 25 μM + LY294002; 50 μM + LY294002 e 75 μM + LY294002). Além disso, como o inibidor LY294002 é diluído em DMSO, este solvente foi utilizado como um controle na concentração na qual ele foi empregado (0,1%).

Para o teste de citotoxicidade, as células permaneceram por 24 h em presença da cisplatina, sendo empregado o Kit XTT logo em seguida para a quantificação das células viáveis. Nos experimentos de sobrevivência celular, as células foram tratadas por cinco dias com a cisplatina em placa de cultura. O LY294002 foi utilizado em um pré-tratamento de uma hora antes do tratamento com a cisplatina em todas as condições experimentais. Para a linhagem U343, após 24 h do tratamento com a cisplatina, observou-se uma redução na sobrevivência nas concentrações testadas de 85,6 a 64,8% (tratamento com cisplatina) e de 81,4 a 40,0% (tratamento combinado) (**Figura 1 e Tabela 1**). O tratamento com os mesmos agentes por cinco dias causou uma redução acentuada na sobrevivência celular após o tratamento com a cisplatina (de 46,3 a 4,1%) e cisplatina + LY204002 (de 27,1 a 5,4%) (**Figura 2 e Tabela 2**). O tratamento combinado com 50 μM de LY294002 acentuou ainda mais o efeito anti-proliferativo causado pela cisplatina (**Figura 2**).

As células da linhagem U87 sofreram uma redução na porcentagem de células vivas, nas concentrações testadas, de 99,4% para 64,6% após o tratamento com cisplatina por 24 h e uma redução de 71,2% para 41,6% após o tratamento combinado de cisplatina e LY294002 por 24 h (**Figura 3 e Tabela 3**). O tratamento por cinco dias com as mesmas concentrações de cisplatina e LY294002 levou a uma redução mais acentuada na sobrevivência das células, de 49,9% para 2,5% (tratamento com cisplatina) e uma diminuição de 15,9% para 2,1% (tratamento associado de cisplatina e LY294002) (**Figura 4 e Tabela 4**). Da mesma maneira que na linhagem U343, na linhagem U87, o tratamento combinado com o LY294002 aumentou o efeito causado pelo tratamento com o antitumoral cisplatina. O emprego de DMSO a 0,1% não causou uma diminuição significativa na sobrevivência das células U343 e U87.

4.2. Detecção Morfológica de Apoptose e Necrose

A indução de apoptose foi verificada nas linhagens U343 e U87 em várias condições de tratamento: cisplatina (10, 25 e 50 μM), tratamento combinado (10 μM + LY294002, 25 μM + LY294002, 50 μM + LY294002), 50 μM LY294002 e DMSO 0,1%. As células foram colhidas nos tempos de 24, 48 e 72 h após o tratamento com a cisplatina e analisadas por meio da técnica de detecção morfológica empregando os corantes Hoechst 33342, PI e DAF (**Figura 6**). Foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem.

Para os três tempos de colheita empregados (24, 48 e 72 h) houve uma baixa frequência de células U87 apoptóticas comparativamente à linhagem U343 (**Tabela 8**). Os tratamentos com 50 μM de LY294002 e 0,1% de DMSO não elevaram significativamente a frequência de apoptose em nenhum dos tempos de colheita analisados em ambas as linhagens testadas (**Figuras 7 e 8; Tabelas 6 e 8**). A análise da frequência de células apoptóticas para a linhagem U87 revelou que esta não apresentou uma significativa indução de apoptose sob as condições de tratamento empregadas (cisplatina e cisplatina+LY294002) comparado com a linhagem U343 (**Figura 8 e Tabela 8**).

As frequências de células necróticas também foram analisadas após o tratamento com a cisplatina e cisplatina associada ao inibidor LY294002. A linhagem U343 apresentou baixas frequências de necrose (**Tabela 7**), mas as diferenças com o controle foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) para os seguintes tratamentos no tempo de colheita de 48 h: 10 μM (3,7%), 10 + LY294002 (4,4%) e 25 + LY294002 (3,3%). Para a linhagem U87 (**Tabela 9**) as frequências de células necróticas diferiram significativamente do controle somente no tempo de 72 h para os seguintes tratamentos: 5 μM (2,9%), 10 μM (2,1%), 25 μM (6,5%), 10 + LY294002 (2,3%), 25 + LY294002 (3,4%), LY294002 (2,3%) e DMSO 0,1% (3,6%).

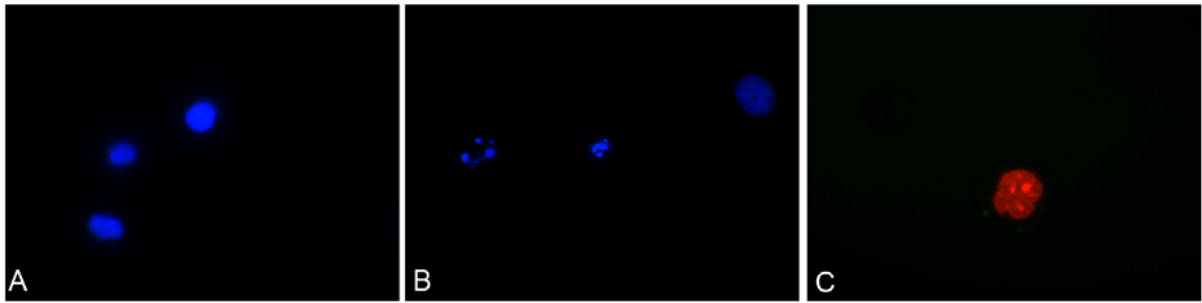


Figura 6: Morfologia das células U437 submetidas ao tratamento com cisplatina e cisplatina associada a LY294002 visualizada por microscopia de fluorescência. (A) células normais. (B) células apoptóticas com morfologia alterada. (C) células necróticas. Objetiva 40X.

4.3. Alterações na Cinética do Ciclo Celular

As células MO59K e MO59J foram tratadas com 5, 10 e 25 μM de cisplatina por 24, 48 e 72 h e com concentrações menores de 1, 2,5 e 10 μM de cisplatina por 3, 6 e 24 h com a finalidade de analisar a cinética do ciclo celular. Houve claramente uma diferença nas respostas das duas linhagens em relação aos danos causados pela cisplatina no que diz respeito ao ciclo celular.

O tratamento com concentrações menores de cisplatina (1, 2,5 e 10 μM) por tempos mais curtos não causou uma alteração drástica no ciclo celular da linhagem MO59J (**Figura 11**). As frequências de apoptose calculadas (medidas como uma população sub-G1) para as células MO59K e MO59J foram abaixo de 4% para os tratamentos como concentrações mais baixas de cisplatina e por tempos mais curtos (**Figuras 13 e 14**).

A progressão pela fase S foi atrasada nas células MO59K expostas à cisplatina. Enquanto que nas células proficientes para DNA-PK (MO59K) foi observado um bloqueio eficiente em S em todas as concentrações testadas, as células deficientes para DNA-PK (MO59J) mostraram somente um leve aumento na fase S na maior concentração de cisplatina empregada (25 μM) em 24 h (**Figura 12**), e responderam à cisplatina com um aumento na frequência de apoptose (**Figura 16**), verificado na forma de um grande aumento da população sub-G1 (43%, 72 h após o tratamento com 25 μM de cisplatina), conforme as células progrediam para a fase G2 do ciclo celular. As células MO59K não apresentaram uma indução de apoptose significativa (**Figuras 13 e 15**). Também foi verificado um grande número de células hiperplóides na linhagem MO59J, visualizadas como uma população de células abaixo da fase G2 (dados não apresentados), o que é uma característica intrínseca dessa linhagem.

As células U343 e U87 foram tratadas com 25 μM de cisplatina e/ou 50 μM de LY294002 por 24, 48 e 72 h. As alterações no ciclo celular apresentadas por essas duas linhagens foram menos intensas relativamente à linhagem MO59K. Foi observado um leve bloqueio na fase S após o tratamento das células U343 com a cisplatina e cisplatina combinada ao LY294002 nos tempos de 48 e 72 h (**Figura 17**). Já as células U87 apresentaram um certo acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular nos tratamentos utilizados em 24 h e, principalmente, em 48 e 72 h (**Figura 18**).

4.4. Expressão Protéica

A expressão das proteínas TFIHp80, SAPK/JNK, PCNA, TP53 ser15, ATR ser428, γ H2AX e CHK1 ser317 foram analisadas por Western blot ou imunofluorescência nas células U343 tratadas com 50 μ M de cisplatina, 50 μ M de cisplatina + LY294002 e LY294002 ou 25 μ M de cisplatina, 25 μ M de cisplatina + LY294002 e LY294002 por 2, 3, 6, 24 e 48 h. Também foi analisada a expressão de PCNA nas células MO59K e MO59J após o tratamento com 5, 10 e 25 μ M de cisplatina por 3 e 24 h. Foram realizados três experimentos independentes para cada proteína a ser detectada. O controle positivo utilizado foi a β -actina.

TFIHp80 (ou XPD) é um componente do fator de transcrição TFIH, envolvido no desenrolamento do DNA durante o reparo NER (Oksenyich *et al.*, 2009). Essa proteína se expressou em todos os tratamentos empregados, mas foi observada uma redução (cerca de 50%) na expressão desta no tempo de 24 h para o tratamento com cisplatina +LY294002 (**Figura 19**), em relação ao tratamento somente com a cisplatina. No tempo de 2 h, a queda no nível de expressão no tratamento combinado foi de 25%.

A quinase SAPK/JNK é mediadora da resposta ao estresse gerado por diversos estímulos. Como um importante fator na sinalização celular, SAPK/JNK está envolvida na sobrevivência celular, transformação oncogênica, crescimento, diferenciação e morte celular. O papel dessa proteína já foi relacionado às respostas celulares à cisplatina (Brozovic e Osmak, 2007).

A expressão de SAPK/JNK apresentou níveis basais nas células não tratadas, que variaram dependendo dos tempos de análise. As duas bandas representam o dímero SAPK/JNK. O tratamento com a cisplatina sozinha não causou alterações significativas em 2 ou 6 h, mas foi observada uma queda de expressão em 12 h não havendo uma influência do inibidor (**Figura 20-A**). Após 24 e 48 h, as células tratadas com a droga apresentaram uma marcada diminuição nos níveis de expressão comparada às não tratadas, enquanto que nas células tratadas por 2 a 12 h, a diferença não foi tão marcante. Somente nas células tratadas com cisplatina e LY294002 por 24 h e cisplatina por 48 h foi observado um leve aumento no nível de expressão dessa proteína em relação aos outros tratamentos, mas abaixo dos níveis dos controles (**Figura 20-B**).

As funções de PCNA não estão envolvidas somente com a duplicação do DNA, mas também com outros processos celulares vitais, como o reparo do DNA, controle do ciclo celular e remodelamento da cromatina (Stoimenov e Helleday, 2009). No presente trabalho, essa proteína se expressou em todas as condições testadas (U343), em todos os tempos de análise, sendo que um maior nível foi verificado para as células não tratadas, o que é

compatível com o estado proliferativo das células. As células tratadas com 50 μM de LY294002 apresentaram uma expressão reduzida de PCNA, comparada aos demais tratamentos, sendo que no tempo de 2 h foi observada uma redução de expressão, mas não havendo influência do inibidor associado à droga. Entretanto, em 6 h, o inibidor sozinho causou uma acentuada redução na expressão de PCNA e um moderado efeito de redução foi observado para a sua combinação com a cisplatina (**Figura 21-A**). Uma análise semelhante foi realizada em células colhidas 24 e 48 h após o tratamento. Após esses tempos, tanto a cisplatina como o inibidor, cada um isoladamente, reduziram a expressão de PCNA, mas o inibidor sozinho reduziu drasticamente os níveis dessa proteína em 48 h. Nesse tempo mais tardio foi também possível observar uma significativa interação entre a cisplatina e o inibidor no sentido de reduzir a expressão de PCNA (**Figura 21-B**).

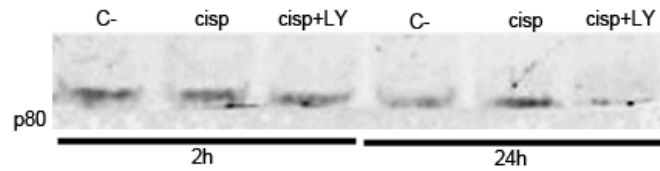


Figura 19: Expressão da proteína TFIIHp80 (80 KDa) analisada por Western blot com anticorpo específico. As células U343 foram tratadas com 50 μ M de cisplatina e cisplatina + LY294002 por 2 e 24 h, sendo comparadas às não tratadas (controle). A β -actina foi utilizada como controle.

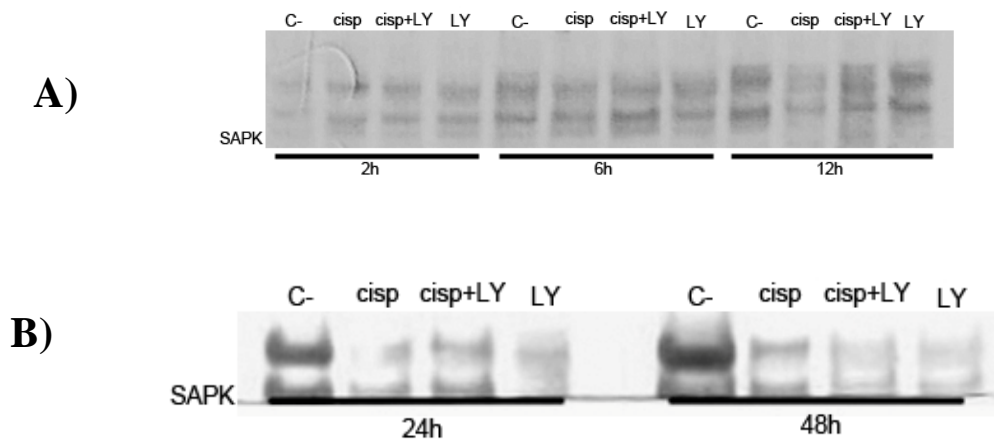


Figura 20: Expressão da proteína SAPK/JNK (54 e 46 KDa) analisada por Western blot com anticorpos específicos. As células U343 foram tratadas com 50 μ M de cisplatina, cisplatina + LY294002 e LY294002 por 2, 6 e 12 h (**A**), 24 e 48 h (**B**), sendo comparadas às não tratadas (controle).

4.5. Análise dos perfis de expressão gênica por *cDNA microarrays*

Foram realizados três experimentos com a linhagem U343 para extração de RNA total, o qual foi utilizado como sonda complexa nas lâminas de *microarrays*. Os resultados das hibridações obtidos nos experimentos com as células tratadas com 25 μM de cisplatina por 24 h foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o programa SAM. As análises foram feitas comparando-se o grupo controle com cada grupo de tratamento, sendo que todos os grupos foram comparados entre si, num total de seis comparações: Controle *versus* Cisplatina; Controle *versus* Cisplatina+LY294002; Controle *versus* LY294002; Cisplatina *versus* Cisplatina+LY294002; Cisplatina *versus* LY294002 e Cisplatina+LY294002 *versus* LY294002. Cada comparação resultou em uma lista de genes significativamente modulados para um FDR < 0,05. A identificação das funções ou processos biológicos associados aos genes significativamente expressos foi feita por meio dos programas DAVID-NIH (david.abcc.ncifcrf.gov), FATIGO (www.fatigo.org) e SOURCE (source.stanford.edu). De uma maneira geral, os genes encontrados em todas as comparações pertencem a várias classes, com papéis relacionados a processos metabólicos, regulação da transcrição, adesão celular, transdução de sinal, transporte de moléculas, resposta a estresse, morte celular, reparo do DNA e controle do ciclo celular (**Figura 27**).

Foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico da linhagem U343 após os diferentes tratamentos com a finalidade de visualizar e comparar o padrão de expressão gênica em cada tipo de tratamento empregado com relação às células não tratadas (controles). Esse agrupamento foi feito a partir dos genes selecionados pelo SAM (**Figura 28**). Também foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico para os genes significativamente modulados (FDR < 0,05) para todas as comparações estabelecidas. Portanto, para cada uma das comparações obteve-se um agrupamento específico, no qual é possível visualizar os perfis de expressão gênica transcricional exibidos pela linhagem U343 após os diversos tratamentos. O agrupamento hierárquico dos dados separou os diferentes tratamentos dos controles em todas as comparações.

A primeira comparação realizada (**Figura 29-A**), cisplatina *versus* controle, apresentou uma lista com 108 genes (**Tabela 10**), sendo 28 induzidos e 80 reprimidos pelo tratamento com a cisplatina.

A comparação feita entre controles e tratamento combinado (cisplatina+LY294002) (**Figura 29-B**) revelou uma lista de 274 genes (**Tabela 11**), entre os quais 94 foram induzidos enquanto 180 foram reprimidos pelo tratamento combinado.

A comparação entre o tratamento com LY294002 versus grupo controle (**Figura 30-A**) gerou uma lista com 33 genes (**Tabela 12**), entre os quais destacam-se o *ITGB2* (induzido) e vários genes reprimidos, como *PRKDC* (conforme esperado), *MAPK6*, *DUSP22* e *RAD52*, todos relacionados com os processos de adesão celular, reparo do DNA, ciclo celular e apoptose.

A comparação feita entre o grupo tratado com a cisplatina e o tratado com o LY294002 (**Figura 30-B**) nos mostrou uma lista de 163 genes (**Tabela 13**), dentre os quais podemos destacar os genes *FEN1*, *BTG2*, *PRKDC* e *RAD52* (induzidos), e *RAD51L3*, *DCLRE1C* (artemis), *RAD51AP1* e *MAP2K6* (reprimidos) que desempenham papéis nos processos de reparo e duplicação do DNA, apoptose e ciclo celular, principalmente.

Quando foi comparado o tratamento combinado de cisplatina+LY294002 ao tratamento somente com a cisplatina (**Figura 31-A** e **Tabela 14**) verificou-se um pequeno número de genes significativamente modulados (18 genes), dentre os quais destacamos os genes *RAD51AP1* e *MLLT4* (induzidos) envolvidos com o reparo do DNA e adesão celular, respectivamente. Esta lista nos revela aqueles genes que são exclusivamente modulados pelo efeito do inibidor LY294002 quando associado à cisplatina.

Para a última comparação realizada entre o grupo do tratamento combinado (cisplatina+LY294002) e o grupo do tratamento com o LY294002 (**Figura 31-B**) a análise gerou uma lista com 183 genes (**Tabela 15**), envolvidos principalmente com processamento de RNA, reparo do DNA, ciclo celular, modificação da cromatina, apoptose, resposta ao estresse, adesão celular entre outros.

Foi construído um diagrama de Venn o qual forneceu uma representação quantitativa das diferenças e similaridades dos perfis de expressão obtidos pelos tratamentos. Um total de 39, 14 e 199 genes exclusivamente modulados foram encontrados para os tratamentos com a cisplatina, LY294002 e cisplatina combinada ao LY294002, respectivamente (**Figura 32**). O tratamento combinado modulou uma maior quantidade de genes que o tratamento somente com a cisplatina.

5. Discussão

A necessidade de novas terapias para o tratamento de glioma é evidente, visto que esse tipo de tumor é um dos mais comuns que afetam o sistema nervoso central, sendo caracterizado por uma alta taxa de recorrência e associado a um alto índice de mortalidade. No presente estudo foram investigadas as respostas das células de glioma ao tratamento com a cisplatina associada ao inibidor de PI3K (LY294002), sendo avaliadas, especificamente, a indução de morte celular nas células, as alterações na cinética do ciclo celular mediante os tratamentos, a expressão de proteínas importantes implicadas nessas respostas e ainda, a análise da expressão gênica em larga escala por meio da metodologia de *cDNA microarrays*.

5.1. Morte celular induzida pela cisplatina e/ou LY294002

As concentrações de cisplatina utilizadas (5 a 75 μM) reduziram drasticamente a sobrevivência das células de glioma, linhagens U343 e U87, após 24 h e cinco dias de tratamento. Adicionalmente, o tratamento das mesmas culturas com 50 μM de LY294002 foi capaz de aumentar o efeito antiproliferativo da cisplatina. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as células U343 e U87 sofreram uma maior diminuição na sobrevivência celular após o tratamento com a cisplatina associada ao inibidor LY294002.

Skladanowski *et al.* (2007) mostraram que o tratamento com cisplatina associada a wortmanina ou a LY294002 causou um aumento de aproximadamente quatro vezes na citotoxicidade comparativamente ao tratamento com a cisplatina sozinha. O tratamento com LY294002 inibiu significativamente o crescimento de células A172 e T98G (glioblastoma), LNCaP (adenocarcinoma de próstata) e T24 (carcinoma de bexiga) (Fujiwara *et al.*, 2006). Um outro trabalho mostrou que a adição de LY294002 reduziu a fração de clones sobreviventes em todas as doses de radiação testadas em culturas de células de glioma U251 (Nakamura *et al.*, 2005). Esses autores, portanto, demonstraram um efeito sinérgico entre o inibidor de PI3K LY294002 e a radiação ionizante em células de glioma. Por outro lado, Ohta *et al.* (2006) mostraram que wortmannina, um outro conhecido inibidor de quinases PI3K, aumentou a eficiência da cisplatina em um modelo de câncer de ovário *in vivo*. Dessa forma, há evidências de que o emprego de inibidores de PI3K em combinação com a ação da cisplatina pode fornecer uma estratégia mais eficaz relativamente ao tratamento isolado com um único agente antitumoral.

O tratamento combinado (cisplatina e LY294002) levou a um aumento na frequência de células apoptóticas (linhagem U343). Entretanto, esse efeito em termos de morte por

apoptose não foi observado na linhagem U87 sob as mesmas condições de tratamento, indicando respostas distintas entre as linhagens de glioma, que mostram diferentes constituições genéticas. A apoptose induzida pela cisplatina é um evento tardio, iniciando 3-4 dias após o tratamento (Brozovic *et al.*, 2004). No presente trabalho, verificou-se um pico de células apoptóticas (51%) em 72 h de exposição à droga (linhagem U343).

Embora o tratamento com a cisplatina associada ao inibidor LY294002 não tenha aumentado significativamente a frequência de apoptose nas células U343, a porcentagem de células apoptóticas induzidas pelo tratamento combinado foi maior (51%) que o tratamento somente com a cisplatina (43%). Entretanto, Lee *et al.* (2005) mostraram que LY294002 causou um aumento significativo na morte celular induzida pela cisplatina em células de câncer de ovário resistentes a esse antitumoral. Já os resultados de Shingu *et al.* (2003) demonstraram que o tratamento com etoposide, cisplatina e BCNU em combinação com LY294002 não induziram um aumento na fragmentação do DNA (característica da apoptose) quando comparada com a resposta de cada agente sozinho. A administração de LY294002 potencializou a indução de morte pela cisplatina em células T24 (carcinoma de bexiga), mas não em células de glioma T98G (Fujiwara *et al.*, 2007).

Apesar da praticamente ausência de indução de apoptose, as células da linhagem U87 apresentaram uma redução no número de células viáveis após o tratamento com a cisplatina, conforme observado nos testes de sobrevivência celular avaliado 24 e 120 h após o tratamento com a droga. Esses testes avaliam a quantidade de morte total sofrida mediante um determinado tratamento sem, no entanto, discriminar entre os tipos de morte. De forma semelhante, os resultados obtidos em células U87 irradiadas revelaram uma baixa indução de apoptose após 24, 48 e 72 h, mesmo em doses elevadas (dados do laboratório, não publicados).

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com os dados de Nigro *et al.* (2007), que mostraram que a perda da clonogenicidade após a exposição em cultura à radiação e cisplatina não está associada com a indução de apoptose. Russell *et al.* (2003) também encontraram resultados semelhantes em linhagens de neuroblastoma, ou seja, a extensão da morte celular por apoptose não corresponde com a redução da clonogenicidade.

5.3. Expressão Protéica

Com base na hipótese de que a interferência na via de sinalização mediada por PI3K e DNA-PK pode potencialmente alterar as respostas ao dano no DNA, o efeito do LY294002 combinado à cisplatina foi analisado em termos de alvos moleculares que participam dos

mecanismos de sinalização do dano e reparo das lesões induzidas no DNA. Desta forma, foram testadas algumas proteínas envolvidas nas respostas às lesões induzidas no material genético, como TFIIHp80, SAPK/JNK, PCNA, TP53, ATR, CHK1 e γ H2AX.

No presente trabalho, a expressão da proteína TFIIHp80 foi observada em todos os tratamentos empregados, com exceção do tratamento combinado de cisplatina e LY294002 por 24 h, indicando que nesse tempo, o tratamento associado provavelmente interferiu de forma crítica no processo de transcrição. O fator de transcrição humano IIH (TFIIH) consiste de 10 subunidades. XPB, XPD (p80), p62, p52, p44, p34, e p8/TTDA formam o “core” do complexo, enquanto cdk7, MAT1, e ciclina H formam o sub-complexo “cdk-activating kinase” (CAK), ligado ao “core” via XPD (Coin *et al.*, 2007).

O NER é a principal via de reparo utilizada para a remoção de lesões no DNA geradas pela maioria dos insultos ambientais e drogas terapêuticas. Defeitos na maioria das proteínas do NER, como XPA, XPB, XPD, XPF e XPG levam a uma elevada sensibilidade das células a muitos agentes causadores de dano no DNA (Colton *et al.*, 2006). De acordo com Aloyz *et al.* (2002), a superexpressão de XPD em células de glioma SK-MG-4 levou à resistência à cisplatina, devido provavelmente a uma acelerada remoção dos *crosslinks* induzidos por essa droga.

A helicase XPD, um componente do fator de transcrição TFIIH, participa do desenrolamento do DNA para permitir a transcrição gênica pela RNA polimerase II e/ou a remoção das lesões do DNA (induzida por uma variedade de agentes genotóxicos, como UV e drogas anticâncer) pelo NER (Aloyz *et al.*, 2002). A expressão de XPD nas células não tratadas é justificável pelo fato de o complexo TFIIH ser requerido para o início da transcrição. A atividade ATPase de XPD não é necessária para o recrutamento do complexo para os sítios de dano, embora ela seja necessária para o reparo do DNA. Além disso, mutações na atividade ATPase de XPB ou XPD resultaram na incapacidade de remoção das lesões no DNA (Oksenyich *et al.*, 2009).

A ocorrência de danos no DNA resulta na ativação de muitas vias de sinalização, entre elas a via das MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*), a qual normalmente regula diversos processos vitais, como metabolismo, sobrevivência, mitose e apoptose. Em células de mamíferos há três grupos de MAPKs: SAPK/JNKs, p38 e ERKs. SAPK/JNK está envolvida na sobrevivência celular, transformação oncogênica, crescimento, diferenciação e morte celular (Brozovic e Osmak, 2007).

Neste trabalho, SAPK/JNK se expressou em todas as condições de tratamentos empregados. Em 2 a 6 h após a exposição à cisplatina, foi verificada uma ativação de

SAPK/JNK relativamente menor que nos demais tempos. Brozovic *et al.* (2009) mostraram que células CL-V5B que são supersensíveis a cisplatina sofreram uma ativação atenuada de SAPK/JNK nos tempos iniciais (2 a 6 h) após o tratamento com a cisplatina. Além disso, foi verificada uma fosforilação inicial diminuída de SAPK/JNK em resposta à exposição ao agente MMS em células deficientes para DNA-PKcs (Fritz e Kaina, 2006).

Após 24 e 48 h de tratamento foi observada uma redução nos níveis de expressão das células tratadas comparado às não tratadas no mesmo período. Esse resultado é compatível com a correlação observada entre a ativação decrescida dessas MAPKs e a indução de apoptose pela cisplatina em linhagens tumorais (Benhar *et al.*, 2001; Mandic *et al.*, 2001). Além disso, a inibição da atividade de kinases de estresse por inibidores específicos reduz a morte celular mediada pela cisplatina (Benhar *et al.*, 2001). Entretanto, Brozovic *et al.* (2004) demonstraram a ativação de SAPK/JNK após o tratamento de células de carcinoma cervical (HeLa) com a cisplatina, sendo que essa ativação foi visível até 72 h após a exposição à droga. De acordo com os autores, as células que adquiriram resistência à cisplatina apresentaram uma reduzida ativação de SAPK/JNK comparados à linhagem parental (não resistente). Nessa linhagem, a ativação de SAPK/JNK foi relacionada à apoptose induzida pela cisplatina enquanto a sua atenuação se associa à resistência à droga. Potapova *et al.* (1997) mostraram a ativação de SAPK/JNK em células de glioma (linhagem T98G) em resposta ao tratamento com a cisplatina, sendo que essa ativação foi requerida para o reparo e sobrevivência após o dano induzido pela cisplatina.

No presente trabalho, a combinação de cisplatina + LY294002 induziu um aumento de 50% na expressão de SAPK em 24 h, comparado ao observado para a cisplatina sozinha. Tal efeito provavelmente não deve estar associado à sinalização para apoptose, que ocorreu mais tardiamente. Entretanto, deve-se ressaltar que houve um leve efeito do inibidor sozinho em todos os tempos estudados, de 2 a 48 h. Tomita *et al.* (2003) demonstraram que o inibidor de PI3K wortmanina, em alta concentração, aumentou a fosforilação de SAPK/JNK causada por raios-X, sendo que essa ativação foi prolongada até 4 h após a irradiação. Sidhu *et al.* (2001) demonstraram que o tratamento de hepatócitos com wortmanina ou LY294002 causou a fosforilação de SAPK/JNK e p38MAPK. Assim, a ativação ou não da via SAPK/JNK deve depender dos tipos celulares, além das condições de tratamento, já que existem trabalhos na literatura mostrando que a via SAPK/JNK participa da apoptose induzida pela cisplatina ou que a ativação dessa via em resposta a cisplatina promove a sobrevivência celular (Cepeda *et al.*, 2007).

Foi verificado que PCNA se expressou em todos os tratamentos empregados (cisplatina, cisplatina + LY294002 e LY294002) e em todos os tempos de colheita (2, 6, 24 e 48 h), mas em geral, as células tratadas apresentaram um declínio na expressão comparativamente às não tratadas, fato que pode estar relacionado com o estado proliferativo das células. As células tratadas com cisplatina apresentaram uma expressão reduzida de PCNA, comparada aos demais tratamentos, sendo esta redução mais acentuada no tempo de 6 h, situação em que se verificou uma ação do inibidor de forma moderada. Em tempos mais tardios, 24 e 48 h após o tratamento, foi observado que tanto a cisplatina como o inibidor, testados isoladamente, reduziram a expressão de PCNA, indicando que esta proteína foi sensível ao tratamento.

A íntima associação de PCNA com quinases envolvidas na maquinaria do ciclo celular indica que esta possui um papel regulatório na progressão do ciclo celular. Além disso, tem sido demonstrado que PCNA é um componente integral de diversas vias de reparo do DNA, tais como NER (*nucleotide excision repair*), BER (*base excision repair*) e MMR (*mismatch repair*) (Balajee e Geard, 2001).

O papel mais importante de PCNA na duplicação e reparo do DNA parece residir na sua interação com as DNA polimerases, estimulando a sua processividade (Chang *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2007; Hashiguchi *et al.*, 2007). 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 reduzida de PCNA nas células tratadas com a cisplatina são compatíveis com tais informações da literatura e indicam que os efeitos da combinação da droga ao inibidor LY294002 são associados a uma queda nos níveis de expressão de PCNA.

Um dos mais críticos componentes na resposta ao dano no DNA é a proteína TP53, com funções de bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose. Em condições normais, os níveis desta são baixos devido à atividade de muitas ubiquitina ligases como MDM2. Em resposta às lesões no DNA, TP53 é liberado desse controle e se acumula em altos níveis, o que resulta na transcrição de genes alvos (Boehme *et al.*, 2008). O mecanismo primário pelo qual TP53 media a apoptose ocorre pela ativação transcricional e

repressão de diversos genes alvo. Vários pesquisadores têm identificado um número de genes apoptóticos que são seus alvos transcricionais, como os genes PUMA, p21 e caspases (Jiang e Dong, 2008).

Embora as vias de sinalização que levam à ativação de TP53 em resposta à cisplatina sejam ainda pouco compreendidas, as lesões no DNA (aductos) induzidas pela mesma são diretamente responsáveis pela ativação de TP53 (Siddik, 2003; Norbury e Zhitovskiy, 2004). Em geral, este dano pode ser detectado por várias proteínas quinase (como ATM, ATR, DNA-PK, CHK1, MAPK) que por sua vez estabilizam TP53 através de modificações pós-tradução, levando à sua ativação (Jiang e Dong, 2008).

Park *et al.* (2006) mostraram que a cisplatina causou um acúmulo de TP53 em células de glioblastoma A172. Segundo os autores, a expressão dessa proteína é essencial para o efeito tóxico da cisplatina em células de glioblastoma. A cisplatina também causou um aumento da expressão de TP53 após 8 e 24 h de exposição nas células H12.1 e 1411HP (tumor de células germinativas testiculares), de acordo com Dietrich *et al.* (2008). Similarmente, no presente trabalho, foi verificado que TP53 fosforilado na serina 15 se expressou nas células U343 tratadas com a cisplatina e no tratamento combinado de cisplatina e LY294002 nos tempos de 3, 24 e 48 h (observado por Western blot e imunofluorescência); no tempo de 3 h a expressão de TP53 foi menor comparada ao tempo de 24 h. O tratamento somente com o LY294002 não induziu a expressão dessa proteína em nenhum momento analisado. Entretanto, Xing *et al.* (2008) mostraram que LY294002 aumentou a expressão de TP53 e PUMA em células SGC7901 (câncer gástrico).

Pabla *et al.* (2008) observaram que TP53 é ativada em tempos iniciais (2 a 4 h) após o tratamento com cisplatina, e que o nível dessa proteína aumentou com o tempo. No presente trabalho, foi observado que TP53 foi ativado após 3 h de tratamento com a cisplatina, e essa ativação se acentuou em 24 h de tratamento. Esses resultados indicam que, juntamente com a cisplatina, LY294002 pode induzir citotoxicidade nessas células por meio da ativação de vias de sinalização mediada por TP53.

Há evidência de que a ativação inicial de TP53 pela cisplatina em células renotubulares é responsável por levar as células à apoptose (Pabla *et al.*, 2008). Assim, no presente trabalho, a indução de TP53 após 24 e 48 h de tratamento com a cisplatina deve possivelmente mediar o bloqueio das células nos checkpoints G1/S, sinalizando em direção à ativação das vias de reparo do DNA, ou alternativamente à apoptose. A importância da atuação de TP53 na resposta à cisplatina é bem demonstrada pelo fato de que a sua inativação

contribui para a hipersensibilidade, assim como para a resistência à cisplatina, dependendo do tipo de célula tumoral (Dietrich *et al.*, 2008).

Conforme já abordado, as células respondem ao dano no DNA por acionarem mecanismos de bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA ou morte celular. As proteínas relacionadas à PI3K ATM, ATR e DNA-PK são as principais sensoras iniciais das lesões que estimulam as respostas celulares subsequentes. Em face às lesões no DNA ou estresse genotóxico, essas proteínas quinase são recrutadas no sítio do dano, formando *foci* nucleares, seguido pelo recrutamento e ativação de outras moléculas de sinalização, incluindo CHK1 e CHK2, podendo acarretar em um bloqueio do ciclo celular ou apoptose. Vale lembrar que essas proteínas podem fosforilar e ativar TP53. ATR é geralmente ativado em resposta à UV e a agentes que bloqueiam a forquilha de duplicação, enquanto que ATM é ativado primariamente por DSBs (revisado em Myers *et al.*, 2009). Entretanto, ATR também pode ser ativada diretamente em resposta às DSBs. Nesse caso, as quebras-duplas são removidas para gerar DNA de fita simples, às quais a proteína RPA se liga, facilitando o recrutamento de ATR para o sítio de quebra. Por sua vez, ATR especificamente fosforila CHK1 (Tomimatsu *et al.*, 2009). Pabla *et al.* (2008) mostraram que a proteína ATR é ativada durante o tratamento de células renais com cisplatina. ATR tem um papel crucial na estabilização do genoma durante a duplicação do DNA e é essencial para a sobrevivência celular (Shiotani e Zou, 2009).

Stiff *et al.* (2004) mostraram que LY294002 é capaz de inibir a DNA-PK, enquanto ambos ATM e ATR permanecem ativos. No presente trabalho, o tratamento com a cisplatina sozinha e associada ao LY294002 levou a um aumento da expressão de ATR (24 h após o tratamento), sugerindo a participação dessa proteína na fase de percepção do dano causado pela cisplatina. Em concordância com essa observação, Yazlovitskaya e Persons (2003) mostraram que a cisplatina aumentou a expressão de ATR.

CHK1 desempenha diversos papéis na resposta ao dano no DNA, incluindo inibição da progressão de forquilhas de duplicação e estabilização de forquilhas bloqueadas, bem como a inibição de novas origens de duplicação. Cruet-Hennequart *et al.* (2009) verificaram que H2AX e CHK1 são fortemente ativadas em células expostas à cisplatina. Pabla *et al.* (2008) e Lewis *et al.* (2009) também mostraram que CHK1 é fosforilada na ser317 em resposta ao tratamento com a cisplatina. Evidências sugerem que CHK1 ser317 é um substrato específico de ATR (Stiff *et al.*, 2006).

A histona H2AX é uma variante da histona H2A envolvida na manutenção da estabilidade genômica. A indução de DSBs nas células aciona a sua fosforilação, a qual é

mediada por ATM, ATR e /ou DNA-PK, sendo que a forma fosforilada da H2AX é denominada γ H2AX (Huang *et al.*, 2004). A presença de γ H2AX também foi relacionada com a fragmentação do DNA controlada por caspases no processo de apoptose (Hsiao *et al.*, 2007). Rebbaa *et al.* (2006) demonstraram que o tratamento com cisplatina causou a ativação de H2AX em células de glioma associada com a indução de caspase 3. Os autores sugerem que H2AX ativada pode ser um evento inicial na via apoptótica iniciada pela exposição a agentes que causam danos no DNA. Portanto, DSBs geradas no curso da fragmentação do DNA em células apoptóticas também induzem a fosforilação de H2AX (Huang *et al.*, 2004).

A fosforilação de H2AX ocorre imediatamente após a geração de quebras no DNA e media a formação de aglomerados de proteínas no sítio do dano, os chamados *foci* de resposta ao dano no DNA. A formação de *foci* de γ H2AX também ocorre após a parada da forquilha de duplicação e quebras de fita simples no DNA. Neste caso, a fosforilação de H2AX é dependente de ATR, e não de ATM (Fragkos *et al.*, 2009). No presente trabalho, foram detectados *foci* de γ H2AX nas células U343 tratadas, tanto com a cisplatina quanto com a combinação de cisplatina e LY294002, por meio da técnica de imunofluorescência. A análise visual permitiu verificar um leve aumento na quantidade de *foci* nas células tratadas com cisplatina+LY294002, o que poderia indicar uma maior quantidade de lesões secundárias (DSBs) induzidas pela cisplatina.

Conforme trabalho de Brozovic *et al.* (2009), é pertinente que ATR esteja envolvida na fosforilação de H2AX induzida pela cisplatina, já que essa droga induz *crosslinks* no DNA, os quais são potentes lesões bloqueadoras da duplicação. Ademais, esses autores mostraram um aumento na fosforilação de H2AX, bem como no número de *foci* de γ H2AX após 16 a 24 h de exposição à cisplatina. Aparentemente, o processamento errôneo das lesões primárias causadas pela cisplatina pode ter resultado na formação de DSBs que acionaram a geração de *foci* de γ H2AX nos tempos tardios (24 h). Foi também demonstrado que *foci* de γ H2AX são formados em células expostas à cisplatina (Olive e Banath (2009) e à radiação ionizante associada ao LY294002 (Fuhrman *et al.*, 2008).

A ativação de H2AX em resposta à cisplatina foi consistente com a formação de quebras no DNA. Segundo Cruet-Hennequart *et al.* (2009), uma forte indução da fosforilação de H2AX ocorreu em 24 e 36 h após o tratamento com cisplatina, possivelmente devido a um colapso nas forquilhas de duplicação quando as células tentaram progredir através da fase S na presença de danos não reparados.

5.4. Expressão Gênica por cDNA *Microarrays*

Os estudos de expressão gênica em larga escala são capazes de fornecer uma enorme quantidade de informações a respeito da ativação ou repressão de importantes genes participantes da resposta ao estresse causado pelo emprego de um agente antitumoral, como a cisplatina, por exemplo, havendo a possibilidade de analisar centenas ou milhares de genes atuando simultaneamente em uma dada situação. Uma grande variedade de classes de genes pode ser estudada, relacionadas a vários processos, tais como controle do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose, transdução de sinal, metabolismo, entre outras classes envolvidas nas respostas celulares aos danos causados pelos agentes anticâncer (Sakamoto-Hojo *et al.*, 2003; Sakamoto-Hojo *et al.*, 2006; Duale *et al.*, 2007; Bassi *et al.*, 2008; Fachin *et al.*, 2009; Carminati *et al.*, *in press*). Os perfis de expressão gênica correspondem a assinaturas globais que refletem o estado biológico de um tumor ou os mecanismos de patogênese envolvidos, podendo ser empregados como marcadores para o uso em diagnóstico e tratamento (Furnari *et al.*, 2007).

A seguir serão discutidos os genes significativamente modulados ($FDR < 0,05$) nas células U343 em resposta aos tratamentos empregados (cisplatina e/ou LY294002). Cada uma das comparações realizadas gerou perfis de expressão gênica e os genes pertencentes a cada uma das comparações foram agrupados de maneira hierárquica. As funções relacionadas a cada classe de genes também serão discutidas juntamente, de acordo com as análises pelo FatiGO, SOURCE e DAVID-NIH.

5.5. Perfis de expressão gênica em resposta à cisplatina

O agrupamento hierárquico dos genes modulados pela cisplatina em comparação ao controle nos revelou um conjunto de genes envolvidos principalmente com os processos de reparo do DNA, apoptose, ciclo celular, resposta ao estresse e adesão celular. A cisplatina causou a modulação de um total de 108 genes (28 induzidos e 80 reprimidos) após 24 h de tratamento. O gene *BIRC2* é um inibidor de apoptose também conhecido por *cIAP1*. O nível de proteínas anti-apoptóticas BIRC no citosol desempenha um papel importante na inibição de caspases durante a apoptose (Karmakar *et al.*, 2007). MALT1 controla a ativação de caspase 8, favorecendo a proliferação em relação à apoptose (Kawadler *et al.*, 2008).

A superexpressão de *CUGBP2* resultou em um aumento da apoptose em células HCT-116 (câncer de colo) mediada pela ativação de caspase 3 (Subramaniam *et al.*, 2008). Adicionalmente, a expressão do gene *CUGBP2* foi elevada em células de câncer de colo (linhagem HT-29) expostas a UV ou radiação gama (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Similarmente, a expressão de *CUGBP2* foi aumentada nas células U343 tratadas com a

cisplatina comparadas ao controle. *BTG2*, um gene alvo de *TP53*, tem sido implicado em diversos processos celulares, como ciclo celular, proliferação e apoptose (Zhang *et al.*, 2009). Semelhantemente aos nossos resultados, o tratamento de células de câncer de próstata com flutamida elevou a expressão de *BTG2* (Wang *et al.*, 2005).

A cisplatina causou a modulação de vários genes relacionados ao processo de reparo do DNA, como é o caso do gene *POLH* (ou *XPV*), o qual se apresentou induzido pela cisplatina. Este gene codifica a polimerase eta, que representa um importante determinante das respostas celulares à cisplatina (Albertella *et al.*, 2005). A polimerase eta é capaz de duplicar o DNA na presença dos *crosslinks* 1,2-d(GpG) induzidos pela cisplatina (Wang e Lippard, 2005; Alt *et al.*, 2007). Mutações no gene *POLH* causam um aumento extremo na predisposição ao câncer de pele (Ziv *et al.*, 2009).

O gene *RAD51D* faz parte do reparo homólogo (HR) e é crítico para a manutenção da integridade cromossômica e para o acurado reparo de quebras duplas e *crosslinks* intercadeia (ICLs, *interstrand crosslinks*) (Smiraldo *et al.*, 2005). A linhagem celular de hamster 51D1 (deficiente para *RAD51D*) apresentou uma elevada sensibilidade ao agente causador de *crosslink* mitomicina C (Evans *et al.*, 2008). A cisplatina causa *crosslinks* no DNA, e a remoção das lesões causadas por essa droga também envolve o reparo homólogo. Além disso, foi observada a formação de *foci* nucleares contendo *RAD51* em resposta a uma variedade de agentes que causam danos no DNA, como a cisplatina (Cruet-Hennequart *et al.*, 2009). No presente trabalho, a cisplatina diminuiu a expressão de *RAD51D* (parálogo de *RAD51*) nas células U343, o que está relacionado com a sensibilidade dessas células ao tratamento com a cisplatina, sugerindo uma repressão do HR neste caso. *INTS3* codifica uma proteína que regula o recrutamento de *RAD51* para o sítio de quebras no DNA (Skaar *et al.*, 2009). A cisplatina diminuiu a expressão de *INTS3* nas células U343.

A repressão de *CAVI* sensibilizou células de tumor de próstata a apoptose, enquanto que a superexpressão de *CAVI* tornou essas células resistentes a apoptose (Karam *et al.*, 2007). Foi verificado que a expressão de *CAVI* em células de carcinoma oral resistentes à cisplatina foi diminuída comparada à linhagem parental (Nakatani *et al.*, 2005). De um modo geral, o papel de *CAVI* na apoptose permanece controverso (Zhao *et al.*, 2009). A repressão de *CAVI* também foi verificada por PCR em tempo real.

EGFR é superexpresso em aproximadamente 40-50% dos glioblastomas. Essa desregulação de EGFR pode contribuir para a natureza maligna dos gliomas de alto grau por estimular o crescimento tumoral, migração e invasão (Loew *et al.*, 2009; Drappatz *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009). A sinalização EGFR promove ativação da via PI3K e crescimento e

sobrevivência tumoral. (Lu *et al.*, 2009). Dessa maneira, EGFR é considerado um alvo para a terapia anticâncer, uma vez que inibidores de EGFR causaram uma inibição do crescimento de tumores e aumentaram a atividade de diversas drogas citotóxicas. Em resposta à cisplatina, o EGFR tem sido relacionado com a ativação de membros da família MAPK, por exemplo (Muscella *et al.*, 2009).

5.6. Perfis de expressão gênica em resposta ao tratamento combinado (cisplatina e LY294002)

A modulação de genes envolvidos com apoptose também foi detectada nas células U343 em resposta à cisplatina associada ao LY294002. *CASP8AP2*, *FOXO3A* e *PHLDA2* foram induzidos enquanto *BPY2IP1*, *YWHAZ* (14-3-3 zeta) e *PRKCD* foram reprimidos pelo tratamento. A caspase *CASP8AP2* atua na indução de apoptose via FAS (Imai *et al.*, 1999). *FOXO3A* é um mediador relevante dos efeitos antiproliferativos induzidos pela cisplatina em células de câncer de colo (Fernandez de Mattos *et al.*, 2008). Resultados similares aos nossos foram encontrados em células de câncer de mama (MDA-MB-468) e pâncreas (Panc-1), nas quais a inibição de PI3K por LY294002 sensibilizou as células à morte celular induzida pela cisplatina (Fernandez de Mattos *et al.*, 2008). A ativação de *FOXO3A* e a inibição de PI3K cooperam para limitar a proliferação das células (Lei e Quelle, 2009).

PHLDA2 participa da via apoptótica mediada por FAS (Qian *et al.*, 1997). *MAPS1* (*BPY2IP1*) media a comunicação entre o citoesqueleto de microtúbulos e a mitocôndria, especialmente no controle da morte celular (Wegrzyn *et al.*, 2009). A diminuição da expressão de *YWHAZ* (14-3-3 zeta) sensibilizou as células à apoptose induzida por estresse (Niemantsverdriet *et al.*, 2008). O gene *PRKCD* codifica a proteína quinase C delta, que possui um papel multifuncional em vários processos, incluindo inibição do crescimento, diferenciação e apoptose (Katakura *et al.*, 2009).

O padrão alterado de expressão de genes envolvidos no mecanismo apoptótico causados pelo tratamento com cisplatina e LY294002 pode estar implicado na quimiossensibilidade, conforme os resultados observados nos ensaios de sobrevivência celular e frequência de indução de apoptose. Duale *et al.* (2007) encontraram muitos genes relacionados à apoptose em tumores de células testiculares após a exposição à cisplatina, sugerindo a sensibilidade dessas células aos agentes quimioterápicos.

Alguns genes relacionados com o ciclo celular e proliferação celular apresentaram a expressão alterada em resposta à cisplatina associada ao LY294002 como os genes *CDC14A*, *SESNI* e *CCNG1* (induzidos) e *SRPK2*, *MAPK6*, *GAS2L1*, *TSC1* e *CREBL2* (reprimidos). A

regulação do ciclo celular tem uma função importante na proliferação, apoptose e diferenciação das células. CDC14 é um regulador da progressão do ciclo celular em células eucarióticas (Hansen *et al.*, 2008). A inibição da expressão de *SESNI* resultou em aumento do bloqueio do ciclo celular (Kopnin *et al.*, 2007). Similar aos nossos resultados, linhagens linfoblastóides apresentam uma expressão elevada de *SESNI* após a irradiação (Zschenker *et al.*, 2006).

A família de proteínas SRPK desempenha um papel na progressão do ciclo celular. Foi observado que a diminuição de SRPK2 causou um bloqueio na fase G1 do ciclo celular resultando na diminuição da proliferação, embora a superexpressão de SRPK2 substancialmente aumentou a fase G2/M (Jang *et al.*, 2009). MAPK6 (ou ERK3) pode atuar como regulador negativo da progressão do ciclo celular, uma vez que a superexpressão de MAPK6 causou um bloqueio na fase G1 em vários tipos celulares (Hansen *et al.*, 2008). TSC1 atua na regulação da via de sinalização PI3K, inibindo mTOR (*mammalian target of rapamycin*), desse modo regulando o ciclo celular, adesão e crescimento celular (Napolioni e Curatolo, 2008). Portanto, o estado de repressão desse gene é condizente com a inibição de PI3K por LY294002.

Vários genes envolvidos no processo de adesão e migração celular também foram significativamente modulados, como por exemplo, os genes *FAT4*, *CDH5*, *S100P*, *MLLT4* e *LAMC1* (induzidos) e os genes *MYH9*, *LAMC3*, *BTBD9*, *CDH13*, *BCAN*, *MSN*, *ADAM12*, *STOML2*, *COL20A1*, *SPP1* e *LRRN5* (reprimidos). Adesão celular e moléculas de adesão desempenham um papel importante na progressão tumoral (Zohrabian *et al.*, 2007). Uma das mais distintas características dos gliomas é o padrão de crescimento invasivo, o que impede a remoção cirúrgica total. A capacidade de infiltrar no parênquima cerebral normal adjacente está intimamente associada ao processo de adesão celular (Giese *et al.*, 2004).

S100P sensibilizou células de câncer de ovário a carboplatina e paclitaxel *in vitro* (Wang *et al.*, 2008), enquanto que a diminuição da expressão desse gene contribuiu para a resistência ao paclitaxel nas mesmas células (Gao *et al.*, 2008). A expressão alterada de CDH13 parece estar relacionada à tumorigênese e invasão de tumores (Piperi *et al.*, 2009). ADAM12 está envolvido na progressão tumoral e sinalização intracelular (Jacobsen e Wewer, 2009; Markowski *et al.*, 2009), e a superexpressão desse gene já foi descrita em gliomas (Kodama *et al.*, 2004). *STOML2* é frequentemente superexpresso em células tumorais e está envolvido na regulação do crescimento e adesão celular (Zhang *et al.*, 2006). *SPP1* aumentou a resistência à cisplatina em linhagem de câncer de pulmão (SBC-3) (Gu *et al.*, 2009). As vias de sinalização induzidas pela ativação de moléculas de adesão diminuem a sensibilidade de

diferentes tipos celulares a vários agentes que causam estresse citotóxico como a cisplatina (Cimbora-Zovko *et al.*, 2007), dessa forma, aumentando a resistência à droga.

Esses resultados demonstram a capacidade de a cisplatina alterar a expressão de genes envolvidos nos processos de adesão celular, migração e, portanto, no avanço e crescimento tumoral. O mecanismo de diminuição da progressão tumoral pode ser considerado uma via adicional da cisplatina para contra-atacar o desenvolvimento e progressão do tumor, uma vez que a modulação de genes de adesão pode, também, aumentar a sensibilidade aos antitumorais por alterar a interação entre células e droga, ao nível do micro-ambiente tumoral. Na verdade, já foi verificado que a interação dos tumores com os seus micro-ambientes influencia o comportamento das células, levando a alterações drásticas na forma celular, afinidade de ligação, respostas celulares e também aumentando a resistência à apoptose (Westhoff *et al.*, 2008).

Consequentemente, um entendimento das relações moleculares entre as células de glioblastoma e os seus micro-ambientes constitui um aspecto relevante na busca por novos alvos moleculares, uma vez que o contexto celular anormal pode contribuir para a formação e progressão do tumor. Interessantemente, o tratamento com a cisplatina associada ao inibidor LY294002 modulou significativamente a expressão de 18 genes envolvidos nos processos de adesão e migração celular, em comparação ao tratamento somente com a cisplatina, que causou a alteração transcricional de apenas 5 genes envolvidos nos mesmos processos. Portanto, o LY294002 associado à cisplatina influenciou de forma mais pronunciada os perfis transcricionais das células U343, visto que o número total de genes modulados também foi maior nas células expostas à cisplatina e LY294002 (274 genes contra 108), principalmente em relação aos genes envolvidos na adesão e migração celular.

5.7. Perfis de expressão gênica em resposta ao inibidor LY294002

O agrupamento hierárquico dos genes modulados somente pelo tratamento com o inibidor LY294002 comparativamente ao controle (sem tratamento) revelou apenas alguns genes (33 no total) cuja expressão foi significativamente alterada, sendo que a maioria deles (27) se apresentou reprimidos pelo tratamento; em contrapartida, somente 6 genes foram induzidos pelo LY294002. As funções ou processos biológicos aos quais esses genes estão associados são principalmente os seguintes: adesão celular, reparo do DNA, apoptose e regulação da transcrição. Desse conjunto podemos destacar os genes *ITGB2* (induzido), *PRKDC*, *RAD52*, *DUSP22* e *MAPK6* (reprimidos).

ITGB2 está relacionado com apoptose e resistência à quimioterapia. Esse gene é expresso em uma variedade de células e parece ter um papel principal na invasão e migração celular (Daigeler *et al.*, 2008). O gene *PRKDC*, o qual codifica DNA-PK, mostrou-se reprimido após exposição ao LY294002, um inibidor de DNA-PK (Okayasu *et al.*, 2003; Stiff *et al.*, 2004). A expressão diminuída desse gene foi adicionalmente verificada por PCR em tempo real. O gene *RAD52* atua no reparo homólogo, enquanto que *DUSP22* está envolvido preferencialmente nas vias JNK (c-JUN n-terminal kinase) e p38MAPK, desempenhando um papel na apoptose e proliferação celular. Muitos membros da família DUSP foram relatados como responsivos à radiação ionizante em fibroblastos e em linfócitos *in vitro* (Fachin *et al.*, 2009). A repressão de *DUSP22* e *RAD52* foi observada também por PCR em tempo real. MAPK6 (ou ERK3), conforme discutido anteriormente, tem um papel na regulação negativa da progressão do ciclo celular (Hansen *et al.*, 2008). Portanto, podemos observar que o LY294002 exerceu um efeito bastante modesto em relação à quantidade de genes modulados, diferentemente do ocorrido quando o mesmo foi associado à cisplatina.

5.8. Perfis de expressão gênica em resposta à cisplatina comparada ao LY294002

A comparação entre os genes modulados após a exposição à cisplatina em relação aos modulados somente pelo tratamento com o inibidor LY294002 forneceu um agrupamento hierárquico contendo 163 genes significativamente modulados. Desses, 69 genes foram induzidos, enquanto 94 foram reprimidos. Neste agrupamento encontram-se genes relacionados principalmente com os processos de morte celular, reparo do DNA, ciclo celular, regulação da transcrição, metabolismo, adesão celular e proliferação.

DCLRE1C ou Artemis é um fator envolvido na recombinação V(D)J e reparo via NHEJ (*nonhomologous end joining*) de quebras-duplas. Além disso, Artemis também tem um papel na regulação do checkpoint G2/M do ciclo celular induzido por danos no DNA (Morio e Kim, 2008). Proteínas envolvidas no reparo NHEJ tais como Ku70, XRCC4 e Artemis são fosforiladas por DNA-PK (Abe *et al.*, 2008). Entretanto, o papel de Artemis no HR é independente de DNA-PK (Beucher *et al.*, 2009). Muitos trabalhos relacionam Artemis às respostas das células à radiação ionizante, entretanto, pouco ainda é conhecido sobre o seu envolvimento nas repostas à cisplatina. Esse gene foi reprimido pelo tratamento com a cisplatina comparada ao LY294002.

RAD51API, que codifica uma proteína de interação à RAD51, é especificamente requerido não somente para as respostas celulares aos agentes causadores de *crosslinks* intercadeia (como a cisplatina), mas também a outros agentes indutores de DSBs, incluindo

radiação ionizante e camptotecina. A diminuição de RAD51AP1 aumentou a sensibilidade de células HeLa ao tratamento com cisplatina e mitomicina C (causadores de *crosslinks*) e radiação ionizante (Modesti *et al.*, 2007). RAD51AP1 participa do HR por meio de interações com a proteína RAD51 (Modesti *et al.*, 2007; Wiese *et al.*, 2007). No presente estudo, RAD51AP1 apresentou-se reprimido pela cisplatina.

FEN1 está envolvida na duplicação do DNA, reparo e manutenção da estabilidade genômica (Liang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009). Essa enzima tem sido relacionada a vários mecanismos de reparo do DNA, incluindo BER, NER e NHEJ. Foi demonstrado que FEN1 participa do reparo dos danos causados pela cisplatina, e que o recrutamento de FEN1 é dependente de BRCA1. A indução desse gene pela cisplatina é condizente com as informações sobre o papel de FEN1 no reparo dos das lesões induzidas por essa droga (Spiro e McMurray, 2003). A indução desse gene também foi verificada por PCR em tempo real. DNA-PK, já discutida anteriormente, é requerida para o reparo de quebras-dupla do DNA por meio da via NHEJ e para a manutenção dos telômeros (Muller *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo estabeleceu um papel para DNA-PK na resposta celular aos danos induzidos pela cisplatina e na determinação da sensibilidade celular à essa droga (Djmek *et al.*, 2009). Os nossos resultados de expressão gênica diferencial mostraram que a expressão do gene *PRKDC*, o qual codifica DNA-PK, foi aumentada após a exposição à cisplatina, em comparação ao tratamento somente com o LY294002, denunciando, portanto, uma indução desse gene em resposta aos danos causados pela cisplatina. Por outro lado, a associação da cisplatina ao inibidor causou uma repressão de *PRKDC* e uma maior sensibilização celular.

5.9. Perfis de expressão gênica em resposta ao tratamento combinado comparado ao tratamento somente com cisplatina

Neste agrupamento analisamos os genes modulados pelo tratamento combinado (cisplatina e LY294002) em relação aos genes modulados apenas pela cisplatina. Nesta situação, todos os genes (18 no total) foram induzidos. Dentre eles, destacamos os genes com papel no processo de adesão celular (*MLLT4*) e reparo do DNA (*RAD51AP1*). *MLLT4* está envolvido na conexão entre as proteínas associadas à membrana e o citoesqueleto de actina (Zhang *et al.*, 2005). *RAD51AP1*, conforme discutido anteriormente, participa do reparo homólogo por codificar uma proteína de interação à *RAD51* (Modesti *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem novamente um efeito modesto do LY294002, já que nesta comparação podemos observar o efeito apenas do LY294002 na associação.

5.10. Perfis de expressão gênica em resposta ao tratamento combinado em relação ao LY294002

Neste agrupamento foram analisados aqueles genes modulados pelo tratamento combinado (cisplatina e LY294002) comparados aos genes modulados apenas pelo LY294002. Os genes de reparo do DNA modulados nesse agrupamento foram os seguintes: *XRCC6* (ou *KU70*) e *FANCF* (induzidos), e *DCLRE1C* (Artemis), *RAD51L3* (*RAD51D*), *BTG2*, *POLH* e *PRKDC* (*DNA-PK*) (reprimidos). Vários desses genes já foram discutidos anteriormente, pois estavam presentes em outros agrupamentos. Apenas o gene *XRCC6*, foi exclusivo desse agrupamento. *XRCC6* foi induzido pelo tratamento com a cisplatina associada ao LY294002. As proteínas Ku estão envolvidas na manutenção dos telômeros, apoptose e transcrição gênica, mas foram primariamente associadas com o reparo dos danos no DNA. O heterodímero Ku, formado pelas subunidades Ku70 e Ku86 se associa com a subunidade catalítica da DNA-PK (conhecida por DNA-PKcs) para formar a proteína quinase dependente de DNA, a DNA-PK. Já foi previamente mostrado que Ku é capaz de se ligar ao DNA modificado pela cisplatina (Turchi e Henkels, 1996; Djmek *et al.*, 2009).

A seguir, serão discutidos os genes relacionados ao processo de apoptose. Uma vez que a apoptose é considerada um mecanismo primário de indução de morte celular pela cisplatina, seria plausível a obtenção de um grande número de genes envolvidos direta ou indiretamente com o processo de apoptose nas células expostas a esse agente. Muitos genes implicados nesse processo foram modulados, entretanto, somente serão discutidos os genes exclusivos dessa comparação, como *PLSCR3* (ou *PLS3*), *BAT3* (induzidos) e *NACA*, *PAWR* e *BZRP* (reprimidos).

A fosfolipídio escramblase 3 (PLS3) está localizada na mitocôndria e parece atuar sinalização apoptótica. Foi verificado que PLS3 acentua a apoptose induzida por TRAIL por aumentar a liberação de fatores apoptogênicos e ativar a caspase 9, levando à ativação e amplificação da caspase 3 e da cascata de caspases *downstream* (Ndebele *et al.*, 2008). *BAT3* interage e regula a estabilidade e localização de AIF (fator indutor de apoptose) após estresse no retículo endoplasmático (Desmots *et al.*, 2007). Interessantemente, *BAT3* é considerado um novo substrato para caspase 3 (Wu *et al.*, 2004). Foi sugerido que *NACA* participa da regulação do complexo FADD (*Fas-associated death domain*) (Stilo *et al.*, 2003), possuindo papel importante na proliferação celular e apoptose, dependendo do contexto celular e do estímulo.

PAWR é uma proteína pró-apoptótica que induz apoptose nas células sensibilizando-as contra a ação de múltiplos estímulos pró-apoptóticos (Acharya *et al.*, 2009). Alguns

estudos mostraram a modulação desse gene por agentes antineoplásicos incluindo a cisplatina (Al-Romaih *et al.*, 2007; Duale *et al.*, 2007; Daigeler *et al.*, 2008). BZRP é uma proteína do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) fortemente expressa em gliomas e está envolvida na regulação da apoptose e proliferação celular. Os níveis de expressão dessa proteína já foram correlacionados com a malignidade do tumor (Rechichi *et al.*, 2008).

A indução de apoptose na linhagem U343 foi verificada em células tratadas com a cisplatina, sendo que o LY294002 associado à cisplatina acentuou esse efeito indutor de apoptose. A expressão alterada dos genes com papel no processo de morte celular mencionados acima é condizente com os dados citológicos apresentados, sob as mesmas condições de cultivo e tratamento. Também foram modulados genes relacionados com o ciclo celular (*MAP2K6*) e proliferação (*BIN1* e *CAMLG*). p38 MAPK, o qual está relacionado a uma variedade de funções celulares como inflamação, câncer, proliferação celular e resposta a agentes antitumorais, é controlado por duas MAPKKs, conhecidas como MKK3 e MKK6 (*MAP2K6*) (Galan-Moya *et al.*, 2008). Evidências sugerem que MKK6 é o principal ativador de p38 MAPK em resposta à cisplatina (Losa *et al.*, 2003; Galan-Moya *et al.*, 2008). Por outro lado, a expressão de *MAP2K6* já foi correlacionada à resistência ao tratamento com a cisplatina (Zhang *et al.*, 2006).

O aumento da expressão de *BIN1* aumentou os efeitos citotóxicos da doxorubicina, sugerindo que *BIN1* poderia atuar como um supressor de metástase e quimiossensibilizador (Zhong *et al.*, 2009). Cassimere *et al.* (2009) observaram um aumento dos níveis da proteína *BIN1* na presença de diversos agentes quimioterápicos, incluindo etoposide, adriamicina e cisplatina. Esses dados sugerem que a maquinaria celular sensível ao dano no DNA induziu a expressão do gene *BIN1*, que pode contribuir para a indução de apoptose, conforme também verificado no presente trabalho.

CAMLG (ou *CAML*) é requerida para o movimento adequado das cromátides-irmãs para os pólos opostos durante a anáfase. Portanto, *CAML* é considerado um novo gene de instabilidade cromossômica (Liu *et al.*, 2009). Dado o elo entre instabilidade cromossômica e câncer, será de grande importância examinar futuramente a possibilidade de um defeito em *CAML* estar diretamente relacionado à oncogênese.

Alguns trabalhos baseados em análise de expressão gênica em larga escala apresentaram um conjunto de genes alvos do gene *TP53* modulados em resposta ao tratamento com a cisplatina em diferentes linhagens celulares (Kerley-Hamilton., *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007). Dentre os genes diferencialmente expressos, alguns deles também foram modulados em resposta à cisplatina nas células U343, conforme os resultados aqui

apresentados. Os genes responsivos ao *TP53* observados foram: *POLH*, *CCNG1*, *BTG2*, *SESNI*, *TRIM22* e *CAVI*, todos relacionados com a resposta ao dano no DNA. Em conjunto, esses dados podem auxiliar a compreensão da influência de *TP53* nas respostas à cisplatina nas diferentes linhagens celulares.

A adesão celular foi um processo mais frequentemente associado aos genes significativamente modulados neste trabalho. Conforme discutido anteriormente, a adesão celular permite e promove processos biológicos tais como crescimento, sobrevivência, migração e metástase. Além disso, a adesão celular media a resistência a drogas em diversos tipos de tumor, diminuindo a eficiência da radioterapia, quimioterapia ou terapia combinada com inibidores. Conforme os alvos moleculares se tornem conhecidos e, além disso, os compostos específicos se tornem disponíveis, tem sido cogitada a estratégia de tratamento “anti-adesão”. No entanto, ainda poucas drogas com essa especificidade encontram-se disponíveis (Schmidmaier e Baumann, 2008).

As vias de reparo do DNA (incluindo HR, NHEJ, NER) também foram ativadas ou reprimidas em resposta aos tratamentos utilizados neste estudo, evidenciado pelo número de genes de reparo significativamente modulados. Interessantemente, a cisplatina associada ao LY294002 modulou de maneira negativa uma maior quantidade de genes de reparo, comparativamente aos outros tratamentos. Adicionalmente, muitos genes implicados na morte celular por apoptose também apresentaram uma expressão alterada de acordo com o tratamento empregado (cisplatina e/ou LY294002). Esses resultados mostraram a modulação da resposta ao dano no DNA ao agente antitumoral cisplatina e ao inibidor de PI3K (DNA-PK) LY294002.

Coletivamente, nossos dados com as linhagens MO59K e MO59J indicam que a DNA-PK é um determinante crítico da sobrevivência celular após exposição à cisplatina, sendo que a falta de um bloqueio em S nas células MO59J é provavelmente responsável pelo aumento da morte celular após o tratamento com a cisplatina.

A cisplatina é um agente quimioterápico clinicamente útil que causa danos no DNA e induz uma cascata de eventos de sinalização que pode acionar um bloqueio no ciclo celular, apoptose e reparo do DNA. De acordo com os resultados aqui apresentados, foi observado um leve bloqueio no ciclo celular (fase S), indução de apoptose, ativação de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (*CHK1* e *TP53*) e reparo das lesões induzidas pela cisplatina (*ATR*), além de marcadores de quebras duplas no DNA (*γH2AX*) e genes de reparo sendo ativados, mostrando a alta complexidade da organização das respostas celulares aos danos no DNA causados pela cisplatina. Na verdade, um estudo recente identificou mais de 700

proteínas que são fosforiladas em resposta a danos no DNA, mostrando uma rede de proteínas altamente ramificada que é orquestrada e regulada por modificações pós-traducionais (Matsuoka *et al.*, 2007).

Em conclusão, as vias de reparo do DNA provêm alvos interessantes para sensibilizar as células tumorais a tratamentos anticâncer, embora os agentes a serem empregados devam ser cuidadosamente selecionados de acordo com o *background* genético específico de cada linhagem celular (Ortiz *et al.*, 2008). Há forte evidência de que a DNA-PK possa desempenhar um papel vital na ativação de vias de sinalização intracelular em resposta aos danos induzidos no DNA pela radiação ionizante e drogas antitumorais. Visto que os componentes do complexo DNA-PK são em geral, superexpressos nas células cancerosas, a inibição farmacológica da DNA-PK constitui uma estratégia promissora no campo da terapia molecular, na tentativa de aumentar a eficiência da radio- e quimioterapia, minimizando o comprometimento das células normais. Além disso, a DNA-PK constitui um alvo molecular promissor para o tratamento dos gliomas, visto que essa proteína apresenta múltiplos papéis funcionais associados com a proteção da estabilidade genômica e reparo do DNA (Sakamoto-Hojo e Balajee, 2008), o que a torna um ótimo alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe T, Ishiai M, Hosono Y, Yoshimura A, Tada S, Adachi N, Koyama H, Takata M, Takeda S, Enomoto T, Seki M (2008) KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation, **Cell Signal.**, **20(11)**:1978-1985.
- Acharya M, Lingenfelter DJ, Huang L, Gage PJ, Walter MA (2009) Human PRKC apoptosis WT1 regulator is a novel PITX2-interacting protein that regulates PITX2 transcriptional activity in ocular cells, **J Biol Chem.**, *in press*.
- Albertella MR, Green CM, Lehmann AR, O'Connor MJ (2005) A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage, **Cancer Res.**, **65(21)**:9799-9806.
- Aloyz R, Xu ZY, Bello V, Bergeron J, Han FY, Yan Y, Malapetsa A, Alaoui-Jamali MA, Duncan AM, Panasci L. (2002) Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD, **Cancer Res.**, **62(19)**:5457-5462.
- Al-Romaih K, Somers GR, Bayani J, Hughes S, Prasad M, Cutz JC, Xue H, Zielenska M, Wang Y, Squire JÁ (2007) Modulation by decitabine of gene expression and growth of osteosarcoma U2OS cells in vitro and in xenografts: Identification of apoptotic genes as targets for demethylation, **Cancer Cell Int.**, **7**:14.
- Bacsi A, Kannan S, Lee MS, Hazra TK, Boldogh I. (2005) Modulation of DNA-dependent protein kinase activity in chlorambucil-treated cells, **Free Radic Biol Med.** **39(12)**:1650-9.
- Balajee AS, Gerd 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)**:1341-1351.
- Bar, J.; Lukaschuk, N.; Zalcenstein, A.; Wilder, S.; Seger, R. and Oren, M. (2005) The PI3K inhibitor LY294002 prevents p53 induction by DNA damage and attenuates chemotherapy-induced apoptosis, **Cell Death and Differentiation**: 1-10.
- Bartussek C, Naumann U, Weller M. (1999) Accumulation of mutant p53(V143A) modulates the growth, clonogenicity, and radiochemosensitivity of malignant glioma cells independent of endogenous p53 status, **Exp Cell Res.** **253(2)**:432-439.

- Bassi C, Mello SS, Cardoso RS, Godoy PD, Fachin AL, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Carlotti CG, Falcão RP, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET (2008) Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation, **Hum Exp Toxicol.**, **27(12)**:919-929.
- Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. (2001) Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress, **Mol Cell Biol.** **21(20)**:6913-6926.
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M (2009) ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2, **EMBO J.**, **28(21)**:3413-3427
- Boeckman HJ, Trego KS, Turchi JJ (2005) Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of nonhomologous end joining, **Mol Cancer Res.**, **3(5)**:277-285.
- Boehme KA, Kulikov R, Blattner C. (2008) p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK, **Proc Natl Acad Sci U S A** **105(22)**:7785-7790.
- Brabec, V. and J. Kasparkova (2005). Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs, **Drug Resist Updat** **8(3)**: 131-146.
- Brandes, A. A., L. M. Pasetto, F. Vastola and S. Monfardini (2000). Temozolomide in patients with high grade gliomas, **Oncology** **59(3)**: 181-186.
- Branzei D, Foiani M. (2007) Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks, **DNA Repair (Amst)**, **6(7)**:994-1003.
- Brozovic, A., G. Fritz, M. Christmann, J. Zisowsky, U. Jaehde, M. Osmak and B. Kaina (2004). Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance, **Int J Cancer** **112(6)**: 974-985.
- Brozovic A, Osmak M. (2007) Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance, **Cancer Lett.** **251(1)**:1-16.
- Brozovic A, Damrot J, Tsaryk R, Helbig L, Nikolova T, Hartig C, Osmak M, Roos WP, Kaina B, Fritz G (2009) Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response, **Mutat Res.**, **670(1-2)**:32-41.
- Carminati PO, Mello SS, Fachin AL, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Donadi EA, Passos GAS, Sakamoto-Hojo ET (2009) Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in glioma U343 cell line, **Genetics and Molecular Biology**, *in press*.
- Cassimere EK, Pyndiah S, Sakamuro D (2009) The c-MYC-interacting proapoptotic tumor suppressor BIN1 is a transcriptional target for E2F1 in response to DNA damage, **Cell Death Differ.**, **16(12)**:1641-1653
- Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. (2007) Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity, **Anticancer Agents Med Chem.** **7(1)**:3-18.
- Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS (2004) The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas, **J Clin Oncol.**, **22(10)**:1926-1933.
- Chaney, S. G., S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu and M. Faldu (2004). Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function, **J Inorg Biochem** **98(10)**: 1551-1559.
- Chang DJ, Lupardus PJ, Cimprich KA. (2006) Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and minichromosome maintenance helicase activities, **J Biol Chem.** **281(43)**:32081-32088.
- Chen CC, Kennedy RD, Sidi S, Look AT, D'Andrea A (2009) CHK1 inhibition as a strategy for targeting Fanconi Anemia (FA) DNA repair pathway deficient tumors, **Mol Cancer**, 8-24.

- Cohen, S. M. and S. J. Lippard (2001). Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** 67: 93-130.
- Coin F, Oksenyich V, Egly JM. (2007) Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair, **Mol Cell.** 26(2):245-256.
- Colton SL, Xu XS, Wang YA, Wang G (2006) The involvement of ataxia-telangiectasia mutated protein activation in nucleotide excision repair-facilitated cell survival with cisplatin treatment, **J Biol Chem.** 281(37):27117-27125.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, W. P. Roos and B. Kaina (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology** 193(1-2): 3-34.
- Cimbora-Zovko T, Ambriović-Ristov A, Loncarek J, Osmak M (2007) Altered cell-cell adhesion in cisplatin-resistant human carcinoma cells: a link between beta-catenin/plakoglobin ratio and cisplatin resistance, **Eur J Pharmacol.**, 558(1-3):27-36.
- Clingen PH, Wu JY, Miller J, Mistry N, Chin F, Wynne P, Prise KM, Hartley JA. (2008) Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy, **Biochem Pharmacol.** 76(1):19-27.
- Cruet-Hennequart S, Glynn MT, Murillo LS, Coyne S, Carty MP (2008) Enhanced DNA-PK-mediated RPA2 hyperphosphorylation in DNA polymerase eta-deficient human cells treated with cisplatin and oxaliplatin, **DNA Repair (Amst)** 7(4):582-596.
- Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol AM, Carty MP (2009) Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells, **Cell Cycle**, 8(18):3039-3050.
- Daigeler A, Klein-Hitpass L, Chromik MA, Müller O, Hauser J, Homann HH, Steinau HU, Lehnhardt M (2008) Heterogeneous in vitro effects of doxorubicin on gene expression in primary human liposarcoma cultures, **BMC Cancer**, 8:313.
- Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'incalci M, Broggin M. (2001) Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation, **Neoplasia**, 3(1):10-16.
- Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, **Genome Biol.**,4(5):P3.
- Desmots F, Russell HR, Michel D, McKinnon PJ (2008) Scythe regulates apoptosis-inducing factor stability during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, **J Biol Chem.**, 283(6):3264-3271.
- Diaz, R., M. V. Jorda, G. Reynes, J. Aparicio, A. Segura, R. Amador, V. Calderero and A. Beltran (2005). Neoadjuvant cisplatin and etoposide, with or without tamoxifen, prior to radiotherapy in high-grade gliomas: a single-center experience. **Anticancer Drugs** 16(3): 323-329.
- Dietrich A, Mueller T, Paschke R, Kalinowski B, Behlendorf T, Reipsch F, Fruehauf A, Schmoll HJ, Kloft C, Voigt W. (2008) 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-undecyl)-propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II): a novel platinum compound that overcomes cisplatin resistance and induces apoptosis by mechanisms different from that of cisplatin **J Med Chem.** 51(17):5413-5422.
- Dejmek J, Iglehart JD, Lazaro JB (2009) DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-dependent cisplatin-induced loss of nucleolar facilitator of chromatin transcription (FACT) and regulation of cisplatin sensitivity by DNA-PK and FACT, **Mol Cancer Res.**, 7(4):581-91.
- Drappatz J, Norden AD, Wen PY. (2009) Therapeutic strategies for inhibiting invasion in glioblastomas, **Expert Rev Neurother.**, 9(4):519-534.

- Duale N, Lindeman B, Komada M, Olsen AK, Andreassen A, Soderlund EJ, Brunborg G (2007) Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles, **Mol Cancer**, **6**:53.
- Durant S and Karran P (2003) Vanillins--a novel family of DNA-PK inhibitors, **Nucleic Acids Res.**, **31(19)**:5501-12.
- Enders GH (2008) Expanded roles for Chk1 in genome maintenance, **J Biol Chem.**, **283(26)**:17749-17752.
- Engelman JA (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nat Rev Cancer.**, **9(8)**:550-562.
- Evans JW, Chernikova SB, Kachnic LA, Banath JP, Sordet O, Delahoussaye YM, Treszezamsky A, Chon BH, Feng Z, Gu Y, Wilson WR, Pommier Y, Olive PL, Powell SN, Brown JM (2008) Homologous recombination is the principal pathway for the repair of DNA damage induced by tirapazamine in mammalian cells, **Cancer Res.**, **68(1)**:257-265.
- Fachin AL, Mello SS, Sandrin-Garcia P, Junta CM, Ghilardi-Netto T, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET (2009) Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation, **J Radiat Res (Tokyo)**, **50(1)**:61-71.
- Fernández de Mattos S, Villalonga P, Clardy J, Lam EW (2008) FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells, **Mol Cancer Ther.**, **7(10)**:3237-3246.
- Fragkos M, Jurvansuu J, Beard P. (2009) H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway, **Mol Cell Biol.**, **29(10)**:2828-40.
- Friesen C, Uhl M, Pannicke U, Schwarz K, Miltner E, Debatin KM. (2008) DNA-ligase IV and DNA-protein kinase play a critical role in deficient caspases activation in apoptosis-resistant cancer cells by using doxorubicin, **Mol Biol Cell.** **19(8)**:3283-3289.
- Fritz G, Kaina B. (2006) Late activation of stress kinases (SAPK/JNK) by genotoxins requires the DNA repair proteins DNA-PKcs and CSB, **Mol Biol Cell.****17(2)**:851-861.
- Fujiwara, Y., Kawada, K., Takano, D., Tanimura, S., Ozaki, K. and Kohno, M. (2006) Inhibition of the PI3 kinase/Akt pathway enhances doxorubicin-induced apoptotic cell death in tumor cells in a p53-dependent manner, **Biochem Biophys Res Communications**, **340**: 560-566.
- Fujiwara Y, Hosokawa Y, Watanabe K, Tanimura S, Ozaki K, Kohno M (2007) Blockade of the phosphatidylinositol-3-kinase-Akt signaling pathway enhances the induction of apoptosis by microtubule-destabilizing agents in tumor cells in which the pathway is constitutively activated, **Mol Cancer Ther.** **6(3)**:1133-1142.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, **Genes Dev**, **21(21)**:2683-2710.
- Fujiwara M, Izuishi K, Sano T, Hossain MA, Kimura S, Masaki T, Suzuki Y (2008) Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells, **J Exp Clin Cancer Res.**, **27**:76.
- Furuta, T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. **Cancer Res** **62(17)**: 4899-4902.
- Lu KV, Zhu S, Cvrljevic A, Huang TT, Sarkaria S, Ahkavan D, Dang J, Dinca EB, Plaisier SB, Oderberg I, Lee Y, Chen Z, Caldwell JS, Xie Y, Loo JA, Seligson D, Chakravari A, Lee FY, Weinmann R, Cloughesy TF, Nelson SF, Bergers G, Graeber T, Furnari FB, James CD, Cavenee WK, Johns TG, Mischel PS (2009) Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients, **Cancer Res.**, **69(17)**:6889-6898.
- Galan-Moya EM, Hernandez-Losa J, Aceves Luquero CI, de la Cruz-Morcillo MA, Ramírez-Castillejo C, Callejas-Valera JL, Arriaga A, Aramburo AF, Ramón y Cajal S, Silvio Gutkind

- J, Sánchez-Prieto R (2008) c-Abl activates p38 MAPK independently of its tyrosine kinase activity: Implications in cisplatin-based therapy, **Int J Cancer**, **122(2)**:289-97.
- Gao JH, He ZJ, Wang Q, Li X, Li YX, Liu M, Zheng JH, Tang H (2008) Low expression of S100P associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer cell line, **Chin Med J (Engl)**, **121(16)**:1563-1568.
- Gaya, A., J. Rees, A. Greenstein and J. Stebbing (2002). The use of temozolomide in recurrent malignant gliomas. **Cancer Treat Rev** **28(2)**: 115-120.
- Giese A, Kucinski T, Knopp U, Goldbrunner R, Hamel W, Mehdorn HM, Tonn JC, Hilt D, Westphal M (2004) Pattern of recurrence following local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) implants in patients with glioblastomas, **J Neurooncol.**, **66(3)**:351-360.
- Gu T, Ohashi R, Cui R, Tajima K, Yoshioka M, Iwakami S, Sasaki S, Shinohara A, Matsukawa T, Kobayashi J, Inaba Y, Takahashi K (2009) Osteopontin is involved in the development of acquired chemo-resistance of cisplatin in small cell lung cancer, **Lung Cancer**, **66(2)**:176-183.
- Hanasoge S, Ljungman M. (2007) H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase, **Carcinogenesis**, **28(11)**:2298-2304.
- Hansen CA, Bartek J, Jensen S (2008) A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3, **Cell Cycle**, **7(3)**:325-334.
- Hashiguchi K, Matsumoto Y, Yasui A. (2007) Recruitment of DNA repair synthesis machinery to sites of DNA damage/repair in living human cells, **Nucleic Acids Res.** **35(9)**:2913-2923.
- Hayashi T, Seki M, Inoue E, Yoshimura A, Kusa Y, Tada S, Enomoto T (2008) Vertebrate WRNIP1 and BLM are required for efficient maintenance of genome stability, **Genes Genet Syst.**, **83(1)**:95-100.
- Helt, C.E., Wang, W., Keng, P.C. and Bambara R.A. (2005) Evidence that DNA damage detection machinery participates in DNA repair, **Cell Cycle**, **4(4)**:529-532.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery, **Nat Rev Drug Discov.** **4(12)**:988-1004.
- Hsiao PW, Chang CC, Liu HF, Tsai CM, Chiu TH, Chao JI. (2007) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by celecoxib oppositely regulates survivin and gamma-H2AX in human colorectal cancer cells, **Toxicol Appl Pharmacol.** **222(1)**:97-104.
- Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z. (2004) Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin, **Cytometry A.** **58(2)**:99-110.
- Ijichi K, Adachi M, Hasegawa Y, Ogawa T, Nakamura H, Kudoh A, Yasui Y, Murakami S, Ishizaki K. (2008) Pretreatment with 5-FU enhances cisplatin cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma cells, **Cancer Chemother Pharmacol.** **62(5)**:745-752.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. and Wang, H. (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation, **Oncogene**, **22(37)**:5834-5847.
- Jacobsen J and Wewer UM (2009) Targeting ADAM12 in human disease: head, body or tail?, **Curr Pharm Des.**, **15(20)**:2300-2310.
- Jang SW, Liu X, Fu H, Rees H, Yepes M, Levey A, Ye K (2009) Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons, **J Biol Chem.**, **284(36)**:24512-24525.
- Jiang BH and Liu LZ (2007) PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis, **Biochim Biophys Acta.** **1784(1)**:150-158.
- Jiang M and Dong Z. (2008) Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity, **J Pharmacol Exp Ther.** **327(2)**:300-307.

- Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Shariat SF (2007) Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence, **Prostate**, **67(6)**:614-622.
- Karmakar S, Banik NL, Ray SK (2007) Molecular mechanism of inositol hexaphosphate-mediated apoptosis in human malignant glioblastoma T98G cells, **Neurochem Res.**, **32(12)**:2094-2102.
- Kartalou, M. and J. M. Essigmann (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res** **478(1-2)**: 23-43.
- Katakura Y, Udono M, Katsuki K, Nishide H, Tabira Y, Ikei T, Yamashita M, Fujiki T, Shirahata S (2009) Protein kinase C delta plays a key role in cellular senescence programs of human normal diploid cells, **J Biochem.**, **146(1)**:87-93.
- Kawadler H, Gantz MA, Riley JL, Yang X (2008) The paracaspase MALT1 controls caspase-8 activation during lymphocyte proliferation, **Mol Cell.**, **31(3)**:415-421.
- Kerley-Hamilton JS, Pike AM, Li N, DiRenzo J, Spinella MJ (2005) A p53-dominant transcriptional response to cisplatin in testicular germ cell tumor-derived human embryonal carcinoma, **Oncogene**, **24(40)**:6090-6100.
- Kim, Y., J. McBride, R. Zhang, X. Zhou and D. T. Wong (2005). p12(CDK2-AP1) mediates DNA damage responses induced by cisplatin. **Oncogene** **24(3)**: 407-418.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (1999) The WHO classification of tumors of the nervous system, **J Neuropathol Exp Neurol.**, **61(3)**:215-225.
- Kodama T, Ikeda E, Okada A, Ohtsuka T, Shimoda M, Shiomi T, Yoshida K, Nakada M, Ohuchi E, Okada Y (2004) ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor, **Am J Pathol.**, **165(5)**:1743-1753.
- Kong D, Yamori T. (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy, **Cancer Sci.** **99(9)**:1734-1740.
- Kong D, Yaguchi S, Yamori T (2009) Effect of ZSTK474, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, on DNA-dependent protein kinase, **Biol Pharm Bull.**, **32(2)**:297-300.
- Kopnin PB, Agapova LS, Kopnin BP, Chumakov PM (2007) Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability, **Cancer Res.**, **67(10)**:4671-4678.
- Laine, J.P., Mocquet, V. and Egly, J.M. (2006) TFIIH enzymatic activities in transcription and nucleotide excision repair, **Methods Enzymol**, 408: 246-263.
- Lee, S., Choi, E. J., Jin, C. and Kim, D.H. (2005) Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. **Gynecol Oncol**, **97(1)**:26-34.
- Lefranc F, Mijatovic T, Kondo Y, Sauvage S, Roland I, Debeir O, Krstic D, Vasic V, Gailly P, Kondo S, Blanco G, Kiss R, (2008) Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells, **Neurosurgery**, **62(1)**:211-221.
- Lei H and Quelle FW. (2009) FOXO transcription factors enforce cell cycle checkpoints and promote survival of hematopoietic cells after DNA damage, **Mol Cancer Res.** **7(8)**:1294-1303.
- Lewis KA, Lilly KK, Reynolds EA, Sullivan WP, Kaufmann SH, Cliby (2009) WA. Ataxia telangiectasia and rad3-related kinase contributes to cell cycle arrest and survival after cisplatin but not oxaliplatin, **Mol Cancer Ther.**, **8(4)**:855-863.
- Li J, Wood WH 3rd, Becker KG, Weeraratna AT, Morin PJ (2007) Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells, **Oncogene**, **26(20)**:2860-2872.
- Liang L, Deng L, Chen Y, Li GC, Shao C, Tischfield JA (2005) Modulation of DNA end joining by nuclear proteins, **J Biol Chem.**, **280(36)**:31442-31449.

- Liang, X., Reed, E. and Yu, J. J. (2006) Protein phosphatase 2A interacts with Chk2 and regulates phosphorylation at Thr-68 after cisplatin treatment of human ovarian cancer cells, **Int J Mol Med**, **17**(5):703-708.
- Liu Y, Malureanu L, Jeganathan KB, Tran DD, Lindquist LD, van Deursen JM, Bram RJ (2009) CAML loss causes anaphase failure and chromosome missegregation, **Cell Cycle**, **8**(6):940-949.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2003) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, **Methods**, **25**(4):402-408.
- Loew S, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME (2009) The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms., **Anticancer Agents Med Chem.**, **9**(6):703-715.
- Lu KV, Zhu S, Cvrljevic A, Huang TT, Sarkaria S, Ahkavan D, Dang J, Dinca EB, Plaisier SB, Oderberg I, Lee Y, Chen Z, Caldwell JS, Xie Y, Loo JA, Seligson D, Chakravari A, Lee FY, Weinmann R, Cloughesy TF, Nelson SF, Bergers G, Graeber T, Furnari FB, James CD, Cavenee WK, Johns TG, Mischel PS (2009) Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients, **Cancer Res.**, **69**(17):6889-6898.
- Mandic A, Viktorsson K, Molin M, Akusjärvi G, Eguchi H, Hayashi SI, Toi M, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. (2001) Cisplatin induces the proapoptotic conformation of Bak in a deltaMEKK1-dependent manner, **Mol Cell Biol.** **21**(11):3684-3691.
- Massimino M, Spreafico F, Cefalo G, Riccardi R, Tesoro-Tess JD, Gandola L, Riva D, Ruggiero A, Valentini L, Mazza E, Genitori L, Di Rocco C, Navarria P, Casanova M, Ferrari A, Luksch R, Terenziani M, Balestrini MR, Colosimo C, Fossati-Bellani F. (2002) High response rate to cisplatin/etoposide regimen in childhood low-grade gliomas, **J Clin Oncol.**, **20**(20):4209-4216.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage, **Science**, **316**(5828):1160-1166.
- McGowan CH and Russell P (2004) The DNA damage response: sensing and signaling, **Curr Opin Cell Biol**, **16**(6):629-633.
- Modesti M, Budzowska M, Baldeyron C, Demmers JA, Ghirlando R, Kanaar R (2007) RAD51AP1 is a structure-specific DNA binding protein that stimulates joint molecule formation during RAD51-mediated homologous recombination, **Mol Cell.**, **28**(3):468-481.
- Morio T and Kim H (2008) Ku, Artemis, and ataxia-telangiectasia-mutated: signalling networks in DNA damage, **Int J Biochem Cell Biol.**, **40**(4):598-603.
- Mujoo, K.; Watanabe, M.; Nakamura, J.; Khokhar, A. R. and Siddik, Z. H. (2003) Status of p53 phosphorylation and function is sensitive and resistant human cancer models exposed to platinum-based DNA damaging agents, **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 129: 709-718.
- Mukhopadhyay D, Jung J, Murmu N, Houchen CW, Dieckgraefe BK, Anant S. (2003) CUGBP2 plays a critical role in apoptosis of breast cancer cells in response to genotoxic injury, **Ann N Y Acad Sci.**, **1010**:504-509.
- Müller B, Blackburn J, Feijoo C, Zhao X, Smythe C (2007) DNA-activated protein kinase functions in a newly observed S phase checkpoint that links histone mRNA abundance with DNA replication, **J Cell Biol.**, **179**(7):1385-1398.
- Muscella A, Urso L, Calabriso N, Ciccarese A, Migoni D, Fanizzi FP, Di Jeso B, Storelli C, Marsigliante S (2005) Differential response of normal, dedifferentiated and transformed thyroid cell lines to cisplatin treatment, **Biochem Pharmacol.** **71**(1-2):50-60.
- Muscella A, Urso L, Calabriso N, Vetrugno C, Fanizzi FP, Storelli C, Marsigliante S (2009) Functions of epidermal growth factor receptor in cisplatin response of thyroid cells, **Biochem Pharmacol.**, **77**(6):979-992.

- Myers K, Gagou ME, Zuazua-Villar P, Rodriguez R, Meuth M. (2009) ATR and Chk1 suppress a caspase-3-dependent apoptotic response following DNA replication stress, **PLoS Genet.** **5(1)**:e1000324.
- Nakamura, J. L., Karlsson, A., Arvold, N. D., Gottschalk, A. R., Pieper, R. O., Stokoe, D. and Haas-Kogan, D. A. (2005) PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas, **J Neuro-Oncol**, **71**: 215-222.
- Nakatani K, Wada T, Nakamura M, Uzawa K, Tanzawa H, Fujita S (2005) Expression of caveolin-1 and its correlation with cisplatin sensitivity in oral squamous cell carcinoma, **J Cancer Res Clin Oncol.**, **131(7)**:445-452.
- Napolioni V and Curatolo P (2008) Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex, **Curr Genomics**, **9(7)**:475-487.
- Ndebele K, Gona P, Jin TG, Benhaga N, Chalah A, Degli-Esposti M, Khosravi-Far R (2008) Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced mitochondrial pathway to apoptosis and caspase activation is potentiated by phospholipid scramblase-3. **Apoptosis**, **13(7)**:845-856.
- Neveling K, Kalb R, Florl AR, Herterich S, Friedl R, Hoehn H, Hader C, Hartmann FH, Nanda I, Steinlein C, Schmid M, Tonnies H, Hurst CD, Knowles MA, Hanenberg H, Schulz WA, Schindler D (2007) Disruption of the FA/BRCA pathway in bladder cancer, **Cytogenet Genome Res.**, **118(2-4)**:166-176.
- Neuhof D, Zwicker F, Kuepper JH, Debus J, Weber KJ. (2007) Activation of telomerase by ionizing radiation: differential response to the inhibition of DNA double-strand break repair by abrogation of poly (ADP-ribosyl)ation, by LY294002, or by Wortmannin, **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** **69(3)**:887-894.
- Niemantsverdriet M, Wagner K, Visser M, Backendorf C (2008) Cellular functions of 14-3-3 zeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character, **Oncogene**, **27(9)**:1315-1319.
- Nigro CL, Arnolfo E, Taricco E, Fruttero A, Russi EG, Lucio F, Ribero S, Comino A, Merlano M, Ungari S. (2007) The cisplatin-irradiation combination suggests that apoptosis is not a major determinant of clonogenic death, **Anticancer Drugs**, **18(6)**:659-667.
- Noda SE, El-Jawahri A, Patel D, Lautenschlaeger T, Siedow M, Chakravarti A (2009) Molecular advances of brain tumors in radiation oncology, **Semin Radiat Oncol.**, **19(3)**:171-178.
- Norbury CJ, Zhitovovskiy B. (2004) DNA damage-induced apoptosis, **Oncogene** **23(16)**:2797-2808.
- Ohgaki H and Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas, **Acta Neuropathol.**, **109(1)**:93-108.
- Ohta T., Ohmichi, M., Hayasaka, T., Mabuchi, S., Saitoh, M., Kawagoe, J., Takahashi, K., Igarashi, H., Du, B., Doshida, M., Mirei, I. G., Motoyama, T., Tasaka, K. and Kurachi, H. (2006) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in vivo ovarian cancer models, **Endocrinology**, **147(4)**: 1761-1769.
- Okayasu R, Takakura K, Poole S, Bedford JS (2003) Radiosensitization of normal human cells by LY294002: cell killing and the rejoining of DNA and interphase chromosome breaks, **J Radiat Res (Tokyo)**, **44(4)**:329-333.
- Oksenysh V, de Jesus BB, Zhovmer A, Egly JM, Coin F (2009) Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage, **EMBO J.**, **28(19)**:2971-2980.
- Olive PL and Banáth JP (2009). Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin, **Cytometry B Clin Cytom.**, **76(2)**:79-90.
- Opel D, Westhoff MA, Bender A, Braun V, Debatin KM, Fulda S. (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis, **Cancer Res.** **68(15)**:6271-6280.

- Ortiz T, Burguillos MA, López-Lluch G, Navas P, Herrador M, González I, Piñero J. (2008) Enhanced induction of apoptosis in a radio-resistant bladder tumor cell line by combined treatments with X-rays and wortmannin, **Radiat Environ Biophys.** **47**(4):445-452.
- Osaki M, Oshimura M, Ito H (2004) PI3K-Akt pathway: its function and alterations in human cancer, **Apoptosis**, **9**: 667-676.
- Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R, Dong Z. (2008) ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis, **J Biol Chem.** **283**(10):6572-6583.
- Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Moon SI, Yoo DH, Lee HC, Park IC, Rhee CH, Hong SI. (2006) Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin, **Int J Oncol.** **28**(1):119-125.
- Pawelczak KS, Andrews BJ, Turchi JJ (2005) Differential activation of DNA-PK based on DNA strand orientation and sequence bias, **Nucleic Acids Res.**, **33**(1):152-161.
- Pawelczak KS and Turchi JJ (2008) A mechanism for DNA-PK activation requiring unique contributions from each strand of a DNA terminus and implications for microhomology-mediated nonhomologous DNA end joining, **Nucleic Acids Res**, **36**(12):4022-4031.
- Perez RP, Lewis LD, Beelen AP, Olszanski AJ, Johnston N, Rhodes CH, Beaulieu B, Ernstoff MS, Eastman A. (2006) Modulation of cell cycle progression in human tumors: a pharmacokinetic and tumor molecular pharmacodynamic study of cisplatin plus the Chk1 inhibitor UCN-01 (NSC 638850) **Clin Cancer Res.** **12**(23):7079-7085.
- Pichierri, P., Franchitto, A. Rosselli, F. (2004) BLM and the FANC proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks, **EMBO J** **23**(15):3154-3163.
- Pichierri P and Rosselli F (2004) Fanconi anemia proteins and the s phase checkpoint, **Cell Cycle**, **3**(6):698-700.
- Piperi C, Themistocleous MS, Papavassiliou GA, Farmaki E, Levidou G, Korkolopoulou P, Adamopoulos C, Papavassiliou AG (2009) High Incidence of MGMT and RARbeta Promoter Methylation in Primary Glioblastomas: Association with Histopathological Characteristics, Inflammatory Mediators and Clinical Outcome, **Mol Med.**, *in press*.
- Potapova O, Haghighi A, Bost F, Liu C, Birrer MJ, Gjerset R, Mercola D. (1997) The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin, **J Biol Chem.** **272**(22):14041-14044.
- Qian N, Frank D, O'Keefe D, Dao D, Zhao L, Yuan L, Wang Q, Keating M, Walsh C, Tycko B (1997) The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis, **Hum Mol Genet.**, **6**(12):2021-2029.
- Rabik CA and Dolan ME (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents, **Cancer Treat Rev.** **33**(1):9-23.
- Rebbaa A, Zheng X, Chu F, Mirkin BL. (2006) The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis, **Cell Death Differ.** **13**(11):1960-1967.
- Rechichi M, Salvetti A, Chelli B, Costa B, Da Pozzo E, Spinetti F, Lena A, Evangelista M, Rainaldi G, Martini C, Gremigni V, Rossi L (2008) TSPO over-expression increases motility, transmigration and proliferation properties of C6 rat glioma cells, **Biochim Biophys Acta**, **1782**(2):118-125.
- Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M. (2004) A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci, **Mol Cell.****16**(5):715-724.
- Rich JN, Bigner DD. (2004) Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma, **Nat Rev Drug Discov.** **3**(5):430-446.

- Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. and Mansour, V.H. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, **Nature**, **222(5191)**:385-386.
- Ross WP and Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis, **Trends Mol. Medicine**, **371**: 1-11.
- Rosselli F, Briot, D, Pichierri, P (2003) The Fanconi anemia pathway and the DNA interstrand cross-links repair, **Biochimie**, **85(11)**:1175-1184.
- Russell J and Ling CC (2003) Studies with cytotoxic agents suggest that apoptosis is not a major determinant of clonogenic death in neuroblastoma cells, **Eur J Cancer** **39(15)**:2234-2238.
- Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Pereira E, Fachin AL, Cardoso RS, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Donadi EA, Passos GA (2003) Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress, **Mutat Res.**, **544(2-3)**:403-413.
- Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Bassi CL, Merchi IG, Carminati PO, Fachin AL, Donadi EA, Passos GAS (2006) Genomic instability: signaling pathways orchestrating the responses to ionizing radiation and cisplatin, In: **Genome Integrity: Facets and Perspectives**, D.-H. Lankenau (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, p 423-452.
- Sakamoto-Hojo, E.T. and Balajee, A. S. (2008) Targeting poly (ADP) ribose polymerase I (PARP-1) and PARP-1 interacting proteins for cancer treatment, **Anticancer Agents Med Chem.** **8(4)**:402-416.
- Sathornsumetee S and Rich JN. (2006) New treatment strategies for malignant gliomas, **Expert Rev Anticancer Ther**, **6(7)**:1087-1104.
- Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. (2007) Molecularly targeted therapy for malignant glioma, **Cancer** **110(1)**:13-24
- Schmidmaier R and Baumann P (2008) ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology, **Curr Med Chem.**, **15(10)**:978-990.
- Sedletska, Y., M. J. Giraud-Panis and J. M. Malinge (2005). Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. **Curr Med Chem Anti-Canc Agents** **5(3)**: 251-265.
- Sengupta, S and Harris CC (2005) p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination, **Nat Rev Mol Cell Biol** **6**:44-55.
- Servidei T, Ferlini C, Riccardi A, Meco D, Scambia G, Segni G, Manzotti G, Riccardi R (2001) The novel trinuclear platinum complex BBR3464 induces a cellular response different from cisplatin, **Eur J Cancer**, **37(7)**:930-938.
- Shao CJ, Fu J, Shi HL, Mu YG, Chen ZP. (2008) Activities of DNA-PK and Ku86, but not Ku70, may predict sensitivity to cisplatin in human gliomas, **J Neurooncol.** **89(1)**:27-35.
- Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity, **Nat Rev Cancer** **3(3)**:155-168.
- Shiloh Y (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape, **Trends Biochem Sci**, **31(7)**:402-410.
- Shingu T, Yamada K, Hara N, Moritake K, Osago H, Terashima M, Uemura T, Yamasaki T, Tsuchiya M (2003) Synergistic augmentation of antimicrotubule agent-induced cytotoxicity by a phosphoinositide 3-kinase inhibitor in human malignant glioma cells, **Cancer Res**, **63**: 4044-4047.
- Shiotani B and Zou L. (2009) ATR signaling at a glance, **J Cell Sci.** **122(Pt 3)**:301-304.
- Siddik ZH (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene** **22(47)**: 7265-7279.
- Sidhu JS, Liu F, Boyle SM, Omiecinski CJ (2001) PI3K inhibitors reverse the suppressive actions of insulin on CYP2E1 expression by activating stress-response pathways in primary rat hepatocytes, **Mol Pharmacol.** **59(5)**:1138-1146.

- Silvani A, Gaviani P, Lamperti EA, Eoli M, Falcone C, Dimeco F, Milanese IM, Erbetta A, Boiardi A, Fariselli L, Salmaggi A (2009) Cisplatin and BCNU chemotherapy in primary glioblastoma patients, **J Neurooncol.**, **94(1)**:57-62.
- Skaar JR, Richard DJ, Saraf A, Toschi A, Bolderson E, Florens L, Washburn MP, Khanna KK, Pagano M (2009) INTS3 controls the hSSB1-mediated DNA damage response, **J Cell Biol.**, **187(1)**:25-32
- Skladanowski A, Bozko P, Sabisz M, Larsen AK. (2007) Dual inhibition of PI3K/Akt signaling and the DNA damage checkpoint in p53-deficient cells with strong survival signaling: implications for cancer therapy, **Cell Cycle**, **6(18)**:2268-2275.
- Smiraldi PG, Gruver AM, Osborn JC, Pittman DL (2005) Extensive chromosomal instability in Rad51d-deficient mouse cells, **Cancer Res.**, **65(6)**:2089-2096.
- Smyth GK, Yang YH, Speed T (2003) Statistical issues in cDNA microarray data analysis, **Methods Mol Biol.**, **224**:111-136.
- Spiro C and McMurray CT (2003) Nuclease-deficient FEN-1 blocks Rad51/BRCA1-mediated repair and causes trinucleotide repeat instability, **Mol Cell Biol.**, **23(17)**:6063-6074.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation, **Cancer Res.** **64(7)**:2390-2396.
- Stiff T, Walker SA, Cersaletti K, Goodarzi AA, Petermann E, Concannon P, O'Driscoll M, Jeggo PA. (2006) ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling, **EMBO J.**, **25(24)**:5775-5782.
- Stiff T, Cersaletti K, Concannon P, O'Driscoll M, Jeggo PA (2008) Replication independent ATR signalling leads to G2/M arrest requiring Nbs1, 53BP1 and MDC1, **Hum Mol Genet.**, **17(20)**:3247-3253.
- Stilo R, Liguoro D, di Jeso B, Leonardi A, Vito P (2003) The alpha-chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function, **Biochem Biophys Res Commun.**, **303(4)**:1034-1041.
- Stoimenov I and Helleday T (2009) PCNA on the crossroad of cancer, **Biochem Soc Trans.**, **37(Pt 3)**:605-613.
- Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. (2007) Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions, **J Clin Oncol.** **25(26)**:4127-4136.
- Subramaniam D, Natarajan G, Ramalingam S, Ramachandran I, May R, Queimado L, Houchen CW, Anant S. (2008) Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2, **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, **294(4)**:1025-1032.
- Tian X, Chen G, Xing H, Weng D, Guo Y, Ma D. (2007) The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa, **Oncol Rep.****18(4)**:927-932.
- Tokino, T and Nakamura Y (2000) The role of p53 target genes in human cancer, **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** **33**, 1–6.
- Tomita M, Suzuki N, Matsumoto Y, Enomoto A, Yin HL, Hosoi Y, Hirano K, Sakai K. (2003) Wortmannin-enhanced X-ray-induced apoptosis of human T-cell leukemia MOLT-4 cells possibly through the JNK/SAPK pathway, **Radiat Res.****160(4)**:467-477.
- Tomimatsu N, Mukherjee B, Burma S. (2009) Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells, **EMBO Rep.**, **10(6)**:629-635.
- Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, Yoshida Y, Tanabe M, Yoshida T, Igarashi T, Ichiro Niina I, Wakasugi T, Imaizumi T, Momii Y, Kuwano M, Kohno K (2005) Cisplatin Resistance and Transcription Factors, **Curr Med Chem - Anti-Canc Agents**, **5 (1)**: 15-27.
- Turchi JJ and Henkels K (1996) Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase, **J Biol Chem.**, **271(23)**:13861-13867.

- Vlahos, C. J. ; Matter, W. F.; Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4h-1-benzopyran-4-one (LY294002), **J. Biol. Chem.**, **269**: 5241-5248.
- Voland C, Bord A, Péleraux A, Pénarier G, Carrière D, Galiègue S, Cvitkovic E, Jbilo O, Casellas P. (2006) Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells, **Mol Cancer Ther.** **5(9)**:2149-2157.
- Wagner JM and Karnitz LM (2009) Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival, **Mol Pharmacol.**, **76(1)**:208-214.
- Wang D and Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs, **Nat Rev Drug Discov**, **4(4)**:307-320.
- Wang G, Dombkowski A, Chuang L, Xu XX (2004) The involvement of XPC protein in the cisplatin DNA damaging treatment-mediated cellular response, **Cell Res.**, **14(4)**:303-314.
- Wang Y, Shao C, Shi CH, Zhang L, Yue HH, Wang PF, Yang B, Zhang YT, Liu F, Qin WJ, Wang H, Shao GX (2005) Change of the cell cycle after flutamide treatment in prostate cancer cells and its molecular mechanism, **Asian J Androl.**, **7(4)**:375-380.
- Wang Q, He Z, Gao J, Hu S, Huang M, Liu M, Zheng J, Tang H (2008) S100P sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and paclitaxel in vitro, **Cancer Lett.**, **272(2)**:277-284.
- Wegrzyn P, Yarwood SJ, Fiegler N, Bzowska M, Koj A, Mizgalska D, Malicki S, Pajak M, Kasza A, Kachamakova-Trojanowska N, Bereta J, Jura J, Jura J (2009) Mimitin - a novel cytokine-regulated mitochondrial protein, **BMC Cell Biol.**, **10**:23.
- Westhoff MA, Zhou S, Bachem MG, Debatin KM, Fulda S (2008) Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells, **Oncogene**, **27(39)**:5169-5181.
- Westhoff MA, Kandenwein JA, Karl S, Vellanki SH, Braun V, Eramo A, Antoniadis G, Debatin KM, Fulda S (2009) The pyridinylfuranopyrimidine inhibitor, PI-103, chemosensitizes glioblastoma cells for apoptosis by inhibiting DNA repair, **Oncogene**, **28(40)**:3586-3596.
- Wiese C, Dray E, Groesser T, San Filippo J, Shi I, Collins DW, Tsai MS, Williams GJ, Rydberg B, Sung P, Schild D (2007) Promotion of homologous recombination and genomic stability by RAD51AP1 via RAD51 recombinase enhancement, **Mol Cell**, **28(3)**:482-490.
- Wong ML, Kaye AH, Hovens CM. (2007) Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes, **J Clin Neurosci.****14(4)**:301-308.
- Wood A, Garg P, Burgers PM. (2007) A ubiquitin-binding motif in the translesion DNA polymerase Rev1 mediates its essential functional interaction with ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen in response to DNA damage, **J Biol Chem.** **282(28)**:20256-20263.
- Wu YH, Shih SF, Lin JY (2004) Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3, **Biol Chem.**, **279(18)**:19264-19275.
- Xing CG, Zhu BS, Liu HH, Lin F, Yao HH, Liang ZQ, Qin ZH. (2008) LY294002 induces p53-dependent apoptosis of SGC7901 gastric cancer cells, **Acta Pharmacol Sin** **29(4)**:489-498.
- Yamaguchi, K., Lee, S.H., Kim, J. S., Wimalasena, J., Kitajima, S. and Baek, S. J. (2006) Activating transcription factor 3 and early growth response 1 are the novel targets of LY294002 in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. **Cancer Res**, **66 (4)**: 2376-2384.
- Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ (2003) ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses, **Carcinogenesis**, **24(10)**:1571-1580.
- Yang M, Guo H, Wu C, He Y, Yu D, Zhou L, Wang F, Xu J, Tan W, Wang G, Shen B, Yuan J, Wu T, Lin D (2009) Functional FEN1 polymorphisms are associated with DNA damage levels and lung cancer risk, **Hum Mutat.**, **30(9)**:1320-1328.

- Yazlovitskaya EM and Persons DL (2003) Inhibition of cisplatin-induced ATR activity and enhanced sensitivity to cisplatin, **Anticancer Res.**, **23(3B)**:2275-2279.
- Yonetani Y, Hochegger H, Sonoda E, Shinya S, Yoshikawa H, Takeda S, Yamazoe M. (2005) Differential and collaborative actions of Rad51 paralogs in cellular response to DNA damage. **Nucleic Acids Res.**, **33(14)**:4544-4552.
- Zhang Z, Rehmann H, Price LS, Riedl J, Bos JL (2005) AF6 negatively regulates Rap1-induced cell adhesion, **J Biol Chem.**, **280(39)**:33200-33205.
- Zhang L, Ding F, Cao W, Liu Z, Liu W, Yu Z, Wu Y, Li W, Li Y, Liu Z (2006) Stomatin-like protein 2 is overexpressed in cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma, **Clin Cancer Res.**, **12(5)**:1639-1646.
- Zhang P, Zhang Z, Zhou X, Qiu W, Chen F, Chen W (2006) Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line, **BMC Cancer**, **6**:224.
- Zhang L, Huang H, Wu K, Wang M, Wu B. (2009) Impact of BTG2 expression on proliferation and invasion of gastric cancer cells in vitro, **Mol Biol Rep.**, *in press*.
- Zhao H and Piwnicka-Worms H (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1, **Mol Cell Biol**, **21(13)**:4129-4139.
- Zhao X, Liu Y, Ma Q, Wang X, Jin H, Mehrpour M, Chen Q (2009) Caveolin-1 negatively regulates TRAIL-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells., *Biochem Biophys Res Commun.*, **378(1)**:21-26.
- Zhong X, Hoelz DJ, Kumar HR, Sandoval JA, Rescorla FJ, Hickey RJ, Malkas LH (2009) Bin1 is linked to metastatic potential and chemosensitivity in neuroblastoma, **Pediatr Blood Câncer**, **53(3)**:332-337.
- Ziv O, Geacintov N, Nakajima S, Yasui A, Livneh Z. (2009) DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106(28)**:11552-11557.
- Zohrabian VM, Nandu H, Gulati N, Khitrov G, Zhao C, Mohan A, Demattia J, Braun A, Das K, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Gene expression profiling of metastatic brain câncer, *Oncol Rep.*, **18(2)**:321-328.
- Zschenker O, Illies T, Ameis D (2006) Overexpression of lysosomal acid lipase and other proteins in atherosclerosis, *J Biochem.*, **140(1)**:23-38.
- Zustovich F, Lombardi G, Della Puppa A, Rotilio A, Scienza R, Pastorelli D (2009) A phase II study of cisplatin and temozolomide in heavily pre-treated patients with temozolomide-refractory high-grade malignant glioma, **Anticancer Res.**, **29(10)**:4275-9.

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](#)