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

ANA PAULA DE LIMA MONTALDI

INFLUÊNCIA DO GENE *APE1/REF-1* NAS RESPOSTAS CELULARES DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA AO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA

Ribeirão Preto
2013

ANA PAULA DE LIMA MONTALDI

INFLUÊNCIA DO GENE *APE1/REF-1* NAS RESPOSTAS CELULARES DAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA AO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA

Tese 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
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Montaldi, Ana Paula de Lima

Influência do gene *APE1/REF-1* nas respostas celulares das linhagens de glioblastoma ao quimioterápico temozolomida/ Ribeirão Preto, 2013.

166f.:il; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de Concentração: Genética; Orientadora: Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi

1. *APE1/REF-1*. 2. Glioblastoma. 3. Temozolomida. 4. siRNA. 5. Reparo por excisão de base. 6. Respostas a danos no DNA.

Nome: MONTALDI, Ana Paula de Lima

Título: Influência do gene *APE1/REF-1* nas respostas celulares das linhagens de glioblastoma ao quimioterápico temozolomida

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

Aprovado em:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Proc. N° 2009/10106-5 e 2009/10925-6).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. (Proc. N° 473684/2009-8)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof. Dr Aguinaldo Luiz Simões** (ex-chefe) pela atenção e apoio prestados.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, coordenador do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da FMRP-USP pelo apoio e dedicação à pós-graduação e principalmente pela sua simpatia.

Aos **Prof. Dr. Geraldo Aleixo Silva Passos, Prof^{a}. Dr^{a}. Nilce Maria Martinez Rossi** e **Prof^{a}. Dr^{a}. Zilá Luz Paulino Simões**, por gentilmente disponibilizar o uso de alguns aparelhos de seus laboratórios.

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

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

Aos técnicos do laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da FMRP/USP, **Luiz Augusto da Costa Júnior** e **Sueli Aparecida Neves** pelo carinho, companheirismo e apoio, além da grande amizade**!**

Aos amigos de Laboratório de Citogenética e Mutagênese Ambiental: **Leo**, meu fiel companheiro de discussões e apoio das minhas invenções; **Fernanda C.**,

que sempre contribuiu muito com sua inteligência e experiência, principalmente na etapa final; **Paulo**, pela ajuda intelectual e sofrimento conjunto nos experimentos de nossas teses...; **Verônica** (minha flor), **Giovana**, **Paulinha** (as gracinhas do lab), **Danilo (Xitão)**, **Tiago**, **João P.** (minha babá), **Andrés** e **William**, muito obrigado pela ótima convivência no ambiente de trabalho. **Valeu pessoal!!!**

Aos ex-alunos deste laboratório, Pati, Gustavo, Fernanda P., Filipe, Flávia e Raquel, que de alguma forma ajudaram neste trabalho, seja na convivência ou no conhecimento.

Em especial a **Aline**, **Maria Sol, Daniel** e **Luiza** pelos ensinamentos, papos, churras, muito incentivo e principalmente pela grande amizade.

Às companheiras do laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, em especial **Nalu** e **Gabi**, a quem dei muito trabalho**.**

À **Cleusa** por cuidar com carinho do laboratório.

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

Às minhas queridas irmãs **Fernanda** e **Sarah**, por todo apoio e por sempre elevar minha autoestima. Amo Vocês!

À minha querida mãe **Marlene**, por simplesmente fazer parte da minha vida; ao meu pai **Fernando**, que sempre estará presente no meu coração; minha sogra **Márcia**, pelo grande apoio amizade, carinho e incentivo. **Amos vocês para sempre!**

Ao meu marido **Daniel**, toda minha gratidão por tudo que você representa na minha vida. Obrigada pelo amor, amizade, compreensão, paciência, incentivo a mim dedicado. E à minha nova razão de ser e existir que é meu filho **Bernardo** (BER), um ser muito especial. **AMO MUITO VOCÊS!!!**

RESUMO

MONTALDI, A.P. **Influência do gene *APE1/REF-1* nas respostas celulares das linhagens de glioblastoma ao quimioterápico temozolomida.** 2013, 166f**,** Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A proteína APE1 (do inglês *Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1/ Redox Factor-1* - APE1/REF-1) é uma enzima multifuncional, cuja expressão encontra-se frequentemente aumentada em gliomas. Além de apresentar atividade no reparo por excisão de base (BER), o gene *APE1* também atua como fator de redução, mantendo fatores de transcrição (FTs) em um estado reduzido ativo. A via BER de reparo do DNA tem sido apontada como um possível fator de resistência a terapias baseadas no uso de agentes alquilantes, tais como temozolomida (TMZ). No presente trabalho, utilizou-se a estratégia de inibição da transcrição do gene *APE1* pelo método de RNA interferente (siRNA) e tratamento com a droga TMZ nas células de glioblastoma (GBM), T98G (resistente à TMZ) e U87MG (sensível à TMZ), a fim de verificar a influência do silenciamento do gene *APE1* sobre as respostas celulares à droga avaliadas por vários ensaios, bem como os efeitos sobre a expressão transcricional dos genes alvos dos FTs regulados por APE1. O silenciamento de *APE1* e o tratamento das células T98G com a TMZ foram eficazes no sentido de reduzir a proliferação e a capacidade clonogênica, além de intervir na progressão do ciclo celular com bloqueio na fase S. Tais efeitos foram acompanhados pelo aumento da indução de danos no DNA e da expressão de H2AX fosforilada (γH2AX), o que justifica a queda na sobrevivência celular. O mesmo efeito não foi observado nas células U87MG silenciadas para *APE1* e tratadas com a TMZ, havendo o predomínio dos efeitos causados pela TMZ, exceto por uma leve indução de danos no DNA e de γH2AX. Adicionalmente, nas células T98G silenciadas e tratadas, verificou-se uma moderada indução de apoptose, que foi observada ao longo dos tempos avaliados (1 a 10 dias), com uma leve indução de caspase-3 (5 dias); nessas células, observou-se também a indução (3,8 vezes) de morte celular autofágica (5 dias). Entretanto, nas células U87MG, a indução de apoptose foi baixa e não houve indução de morte por autofagia, sugerindo outros mecanismos de morte envolvidos na eliminação dessas células em resposta ao tratamento com a TMZ. O silenciamento de APE1 causou uma redução acentuada na invasão das células T98G, de forma similar à observada nas células somente tratadas com a TMZ, sendo que a combinação (silenciamento de *APE1* e tratamento com a droga) resultou em um efeito aditivo, enquanto que nas células U87MG a combinação foi eficaz no sentido de reduzir a proporção de células invasivas, fato não observado nas condições isoladas. Os genes *COX2* e *VEGF*, alvos dos FT NFκB e HIF-1α (regulados por APE1) foram reprimidos nas células T98G enquanto que o gene *VEGF* foi induzido nas células U87MG, entretanto, tais alterações no padrão de expressão transcricional foram observadas somente em resposta ao tratamento com

a TMZ, independentemente do silenciamento de *APE1*, indicando nenhuma mudança na atividade redox de APE1, possivelmente pela existência de proteínas APE1 remanescentes na célula. Além disso, a expressão proteica de NFκBp65$^{(ser563)}$ foi aumentada em ambas as linhagens silenciadas e tratadas com a TMZ, provavelmente devido à inibição da proliferação celular. Em geral, os resultados do presente trabalho demonstraram que a estratégia de inibição do gene *APE1* (participante da via BER) mostrou-se potencialmente viável, suportando a contribuição do BER na resistência à TMZ, visto que nas condições testadas, observou-se uma sensibilização das células de GBM, com efeito restrito às células de GBM resistentes (linhagem T98G), sendo pouco eficaz no sentido de sensibilizar as células sensíveis (linhagem U87MG) a esse agente. Assim, há que considerar as características genéticas de cada linhagem de GBM, visto que estas são cruciais para as respostas apresentadas pelas células aos tratamentos empregados.

Palavras-chave: gene *APE1/REF-1*, glioblastoma, temozolomida, siRNA, reparo por excisão de base, respostas a danos no DNA.

ABSTRACT

MONTALDI, A.P. **Influence of *APE1/REF-1* gene on cellular responses of glioblastoma cells to chemotherapeutic temozolomide**. 2013, 166f, Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

APE1 (*Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1/ Redox Factor-1* - APE1/REF-1) protein is a multifunctional enzyme whose expression is often increased in gliomas. Besides presenting activity in base excision repair (BER), APE1 also acts as a reduction factor, maintaining transcription factors (TFs) in an active reduced state. The BER pathway has been implicated as a possible factor of resistance to therapies based on the use of alkylating agents such as temozolomide (TMZ). In the present study, we have been using a strategy of small interference RNA (siRNA) to down-regulate the APE1 gene under conditions of treatment with TMZ in T98G (resistant to TMZ) and U87MG (sensitive to TMZ), glioblastoma (GBM), in order to determine the effects of *APE1* gene silencing on cellular responses to this drug, evaluated by several assays, as well as the effects on the transcriptional expression of target genes of TFs regulated by APE1. *APE1* silencing and TMZ treatment was effective to reduce the cell proliferation and clonogenic capacity of T98G cells, in addition to interfering in the cell cycle progression (S-phase arrest). These effects were accompanied by induction of DNA damage and phosphorylation of H2AX (γH2AX), which may explain the decrease in cell survival. The same effect was not observed in silenced U87MG and TMZ-treated cells, being observed a predominance of the effects caused by TMZ itself, except for a slight induction of DNA damage and γH2AX. Additionally, in silenced T98G and TMZ-treated cells, there was a moderate induction of apoptosis, as observed over time (1 to 10 days), with a slight induction of caspase-3 (on day 5); for those cells, we also observed autophagic induction (3.8 fold) at day 5. However, the induction of apoptosis and autophagy in U87MG cells was very low, suggesting that other mechanisms of cell death might be involved in the elimination of GBM cells under TMZ treatment. *APE1* silencing caused a marked reduction on the invasiveness of T98G cells, similarly to that observed in TMZ treated cells, while the combination (*APE1* silencing and drug treatment) led to an additive effect. For U87MG, the treatment combination was effective in reducing the proportion of invasive cells, in spite of an absence of any effect produced by each isolated condition tested. Regarding to the expression profile of target genes of TFs regulated by the APE1 redox activity, it was observed that *COX2* and *VEGF* genes, targets of FTs NFκB and HIF-1α, were down-regulated in T98G while *VEGF* gene showed induced in U87MG cells; however, such alterations in the transcriptional expression pattern were observed only in response to TMZ treatment, independently of *APE1* gene silencing, indicating no change in the APE1 redox activity, possibly due to the presence of APE1 remaining proteins inside cells. In addition, NFκBp65$^{(ser563)}$ protein expression was increased in both cell lines (silenced and treated with TMZ), probably

due to the reduced cell proliferation rates. In general, the present results show that the strategy of *APE1* gene knockdown was potentially viable, supporting the BER contribution of the mechanism of TMZ resistance, since under the conditions tested, there was a sensitization of GBM cells. However, this effect was restricted to the resistant cell line (T98G cells). Thus, it should be considered the genetic characteristics of each GBM cell line, since these are crucial to the cellular responses to the conditions tested in the present work.

Keywords: *APE1/REF-1* gene, glioblastoma, temozolomide, siRNA, base excision repair, DNA damage responses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da proteína APE1 em humanos e suas principais funções: participação na via de reparo BER; atividade de repressão transcricional através da sua ligação a elementos negativos de resposta ao cálcio (n-CARE); regulação de fatores de transcrição redox-dependente e independente; participação no metabolismo de RNA (Adaptado de Tell et al., 2010)..... **30**

Figura 2: O papel de APE1/REF-1 no reparo via BER. Danos oxidativos e de alquilação no DNA podem ser reparados pela via curta (esquerda) ou via londa (direita) do BER (Adaptado de Parsons e Dianov, 2013)..... **31**

Figura 3: Figura mostrando como APE1 converte fatores de transcrição (FT), de um estado oxidado inativo para um reduzido ativo, podendo assim se ligar a regiões regulatórias de genes alvos (Adaptado Fishel e Kelley, 2007)..... **35**

Figura 4: (A) Expressão gênica transcricional avaliada por qPCR em tempo real em células T98G transfectadas com 40 e 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), no tempo de 48 h. Os resultados de expressão gênica relativa foram representados em *Fold-Change* (Log_2); **(B)** Porcentagem de *knockdown* para o gene *APE1* em células T98G transfectadas com 40 e 80 nM do siRNA e coletadas em 48 h. As porcentagens foram calculadas a partir dos valores de *Fold-Change* (Log_2) obtidos na análise por qPCR em tempo real..... **56**

Figura 5: Expressão das proteínas APE1 (~38 kDa) e β-Tubulina (~55 kDa) analisada por *Western blotting* em células T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após a transfecção..... **57**

Figura 6: Níveis de expressão da proteína APE1 após 24, 48, 72 e 96 h do silenciamento com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR). Os valores foram normalizados com a proteína β-Tubulina para as linhagens T98G **(A)** e U87MG **(B)** utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4* (*Media Cybernetic*)..... **58**

Figura 7: Porcentagens de colônias (escala Log) obtidas para as células T98G (**A**) e U87MG (**B**) no ensaio de sobrevivência clonogênica, 10 dias após o tratamento com diversas concentrações de TMZ por 24 h. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$..... **59**

Figura 8: Localização e distribuição da proteína APE1 nas células T98G analisadas por imunofluorescência. As células foram transfectadas com 80 nM do siRNA do gene APE1 e sequência *scrambled* (SCR), sendo coletadas duas horas após o tratamento com 600 µM de TMZ. A proteína foi detectada por meio

de um anticorpo secundário conjugado com *Alexa Fluor® 594* (vermelho), sendo a contra-coloração do núcleo efetuada com o corante fluorescente DAPI (azul)..... **61**

Figura 9: Proliferação celular (*Cell Proliferation Kit II (XTT)* em células transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), avaliada 24, 48 e 72 h após tratamento com 600 µM de TMZ por 24 h para a linhagem T98G **(A)** e 10 µM de TMZ para a linhagem U87MG **(B)**. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados..... **63**

Figura 10: Sobrevivência clonogênica das linhagens de GBM transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR) avaliada 10 dias após tratamento com 600 µM de TMZ para a linhagem T98G **(A)** e 10 µM de TMZ para a linhagem U87MG **(B)** por 24 h. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados..... **65**

Figura 11: Indução de danos no DNA avaliada em termos de porcentagem de DNA na cauda (TI) por meio do Ensaio Cometa nas linhagens T98G **(A)** e U87MG **(B)** transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e analisadas em diferentes tempos de recuperação (0, 6 e 24 h após tratamento com 600 µM-T98G e 10 µM de TMZ-U87MG por 24 h). Os valores foram obtidos usando o sistema *Comet Assay IV* (*Perceptive Instrument*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **67**

Figura 12: Distribuição das células T98G (**A**) e U87MG (**B**) em diferentes fases do ciclo celular em células transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento durante 24 h com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente, avaliadas por 24, 48 e 72 h. Os dados foram obtidos utilizando o sistema *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados..... **70**

Figura 13: Células apoptóticas analisadas por conteúdo sub-G1 e anexina V, observadas na linhagem T98G (**A** e **B**, respectivamente) e U87MG (**C** e **D**, respectivamente) transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ respectivamente. A apoptose avaliada pela fração sub-G1 foi monitorada por 24,

48 e 72 h, enquanto a análise pelo reagente anexina V foi observada nos tempos de três, cinco e 10 dias. Para a detecção do conteúdo sub-G1 foi utilizado o corante iodeto de propídio e para identificar células positivas para anexina-V foi utilizado o *Guava Nexin® Reagent* (*Guava Technologies*), sendo ambos dados analisados por meio do sistema *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.... **74**

Figura 14: Avaliação de morte autofágica após cinco dias do tratamento das células T98G (**A**) e U87MG (**B**). As células foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. Na análise foi utilizada a coloração com alaranjado de acridina e os dados foram obtidos por meio do *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados..... **77**

Figura 15: Análise da capacidade de invasão celular em células T98G (**A**) e U87MG (**B**) transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (*SCR),* tratadas com 600 e 10 µM da droga TMZ por 24 h, respectivamente. Foi analisada a capacidade de invasão em Matrigel após 22 h do tratamento com a droga. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados..... **79**

Figura 16: Expressão gênica transcricional dos genes *COX2* (**A**) *e VEGF* (**B**) em células T98G e U87MG transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), analisadas após o tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. Os resultados obtidos de expressão gênica relativa foram representados em *Fold-Change* (Log_2). Os valores são provenientes de dois experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão (± EP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados..... **82**

Figura 17: Expressão protéica avaliada por *Western blotting* em células das linhagens T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência s*crambled* (SCR), tratadas por 24 h com a droga TMZ (600 µM e 10 µM, respectivamente). A análise foi realizada após três e cinco dias do tratamento, usando-se anticorpos para as seguintes proteínas: HIF-1α (112 kDa), pró-caspase-3 (38 kDa), *p*NFkBp65$^{(ser536)}$ (65 kDa) e *p*H2AX$^{(ser139)}$ (15 kDa). O anticorpo para β-Tubulina (55 kDa) foi utilizado como controle endógeno..... **84**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagens de redução da expressão proteica de APE1 após silenciamento com 80 nM de siRNA nas linhagens T98G e U87MG. Os valores foram normalizados com a proteína β-Tubulina utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4* (*Media Cybernetic*)..... **58**

Tabela 2: Porcentagens de colônias formadas para as linhagens T98G e U87MG avaliadas 10 dias após o tratamento das células (durante 24 h) com diversas concentrações de TMZ. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP) **59**

Tabela 3: Porcentagens de proliferação celular obtidas para as linhagens T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), avaliadas nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com 600 e 10 µM de TMZ por 24 h, respectivamente. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **64**

Tabela 4: Porcentagens de formação de colônias em linhagens de GBM transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR) avaliada 10 dias após tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ para a linhagem T98G e U87MG, respectivamente. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **66**

Tabela 5: Porcentagens de DNA na cauda (*Tail Intensity*) apresentadas pelas linhagens T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1,* analisadas em zero, seis e 24 h após tratamento com 600 e 10 µM de TMZ durante 24 h, respectivamente. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). Os valores foram obtidos usando o sistema *Comet Assay IV* (*Perceptive Instrument*). (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$; (#) diferença entre silenciado + tratado e tratado; (†) diferença entre silenciado + tratado e silenciado..... **68**

Tabela 6: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo celular nas linhagens T98G e U87MG, transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e submetidas a tratamento (24h) com 600 µM e 10 µM de TMZ, respectivamente. Os dados foram obtidos utilizando o sistema *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **71**

Tabela 7: Porcentagens de células apoptóticas pelo conteúdo sub-G1 coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 h após a remoção da droga. As células T98G e U87MG foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência

scrambled (SCR), submetidas ao tratamento (durante 24 h) com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. A análise foi realizada em células coradas com iodeto de propídio, usando-se o aparelho *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e o programa *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **75**

Tabela 8: Porcentagens de células apoptóticas observada na linhagem T98G e U87MG e avaliada após tratamento com a TMZ. As células foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetida ao tratamento com 600 e 10 µM de TMZ por 24h, respectivamente, e analisadas por três, cinco e 10 dias. Na análise foi utilizado o *Guava Nexin® Reagent* (*Guava Technologies*) e os dados foram obtidos por meio do *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **76**

Tabela 9: Porcentagens de células autofágicas obtidas após cinco dias do tratamento das células T98G e U87MG. As células foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento de 600 e 10 µM de TMZ por 24 h, respectivamente. Para a análise foi utilizado o corante alaranjado de acridina e os dados foram obtidos por meio do *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **78**

Tabela 10: Porcentagens de células T98G e U87MG invasivas após transfecção com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR) após tratamento com 600 e 10 µM da droga TMZ por 24 h, respectivamente. A capacidade de invasão em Matrigel foi analisada após 22 h do tratamento. Os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média ± desvio padrão (± DP)..... **80**

Tabela 11: Valores da análise de expressão gênica por q-PCR em tempo real analisados para os genes *COX2* e *VEGF*, em células T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1,* analisadas após o tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. Os valores dos níveis de expressão transcricional foram expressos em *Fold Change* (Log2), utilizado o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores são provenientes de dois experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão (± EP)..... **83**

LISTA DE ABREVIATURAS

3’P	3’ fosfato
3’PUA	aldeído fosfo-insaturado
5’dRP	5’ desoxirribose fosfato
5’P	5’-fosfato
AIC	*5-aminoimidazole-4-carboxamide*
AP	*Apurinic／Apyrimidinic*
AP-1	*activator protein 1*
APE1/REF-1	*Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1/Redox Factor-1*
ATCC	*American Type Culture Collection*
BCNU3	carmustine
BER	*Base excision repair*
BG	*O6-benzylguanine*
C	Citosina
CCNU	*Lomustine (1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea)*
CDK4	*Cyclin-dependent Kinase 4*
cDNA	DNA complementar
CHK2	*Checkpoint kinase 2*
CKII	*Casein Kinase II*
c-Myc	*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*
COX2	*Cyclooxygenase-2*
CREB	*cAMP response element-binding protein*
Cys	Cisteína
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA	Ácido desoxiribonucleíco
DSBs	*Double-Strand Breaks*
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FEN1	*Flap Endonuclease-1*
FT	Fator de transcição
GBM	Glioblastoma
GSH	*Glutathione*
H2AX	*H2A histone family, member X*
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HDAC-1	*Histone Deacetylases-1*
HDM2	*Human Double Minute 2*
HIF-1	*Hypoxia-induced factor 1*
HIF-1α	*Hypoxia-induced factor 1 alpha*

HLF	*Hepatic Leukemia Factor*
IKKα	*IkB kinase α*
IκB	i*nhibitor of kappa B*
LIG 1	*DNA Ligase I*
LIG 3	*DNA Ligase III*
LOH	*Loss of Heterozigosity*
LP-BER	*Long-Patch BER*
MAPK	*Mitogen activated protein kinase*
MGMT	*Methylguanine-DNA Methyltransferase*
miRNA	*micro*RNA
MMP	*Matrix metalloproteinases*
MMR	*Mismatch repair*
MMS	Metilmetanosulfonato
mRNA	RNA mensageiro
MSK1	*Mitogen- and Stress-activated protein Kinase 1*
MTIC	5-(3-metltriazeno-1-il)-imidazol-4-carboxamida
MX	*Methoxyamine*
N3-metil-A	*N3-methyladenine*
N7-metil-G	*N7-methylguanine*
nCaRE	*negative Calcium Responsive Elements*
NF-kB(p50)	*p50 subunit of NFkB*
NF-κB	*Nuclear factor kappa B*
NF-κB(p65)	*p65 subunit of NFkB*
NLS	*Nuclear Localization Signal*
NSCLC	*Non-Smal lCell LungCancer*
O6-metil-G	*O6-methylguanine*
OMS	Organização Mundial da Saúde
p16INK4a	*Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A*
PARP	*Poly (ADP-ribose) polymerase*
PCNA	*Proliferation Cell Nuclear Antigen*
PDGF	*Platelet-derived Growth Factor*
PDT	*Photodynamic Therapy* (terapia fotodinâmica)
PKA	*Protein Kinase A*
POL β	*DNA polymerase β*
PTEN	*Tumor-suppressor Phosphatase and Tensin homolog*
PTH	*Parathyroide Hormone*
qRT-PCR	*Quantitative real time polymorphism chain reaction*
RFC	*Replication Factor C*
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA interferente

RSK-1	*Ribosomal protein S6 Kinase alpha-1*
SCE	*Sister Chromatid Exchanges*
she	*soluble epoxide hydrolase*
Ser	Serina
siRNAs	*small interfering RNA*
SNC	Sistema Nervoso Central
SP-BER	*Short-Patch BER:*
SSBs	*Single-Strand Breaks*
T	Timina
t-AUCB	inibidor de sEH - *soluble epoxide hydrolase*
TGF-β	*Transforming Growth Factor beta*
TIMP	*Tissue-localized tissue Inhibitors of Metalloproteinases*
TMZ	Temozolomida
TP53	*Tumor Protein p53*
Trx	*Thioredoxin*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
XRCC1	*X-Ray Repair Cross Complementing*
γH2AX	*phosphorilated gamma H2A histone family, member X*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 22

1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)..... 22

1.2. Gliblastoma, caracteríticas e tratamentos..... 23

1.3. Mecanismos de reparo envolvido na resistência à TMZ..... 25

1.4. APE1/REF-1 como alvo no tratamento do câncer..... 28

2. OBJETIVOS..... 38

2.1 Objetivos específicos..... 38

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 41

3.1. Linhagens Celulares..... 41

3.2. Cultivo Celular..... 41

3.3. Ensaio de inibição da expressão gênica por RNA de interferência (siRNA)..... 41

3.4. Tratamento com Temozolomida..... 42

3.5. Experimentos para avaliação da expressão gênica transcricional..... 43

3.5.1. Extração de RNA total e síntese dos cDNAs..... 43

3.5.2. Avaliação da expressão gênica por qPCR em Tempo Real..... 44

3.6. Experimentos para avaliação da expressão protéica por Western blotting..... 45

3.6.1. Extração de proteínas com Solução de Lise..... 46

3.6.2. Eletroforese de proteínas..... 46

3.6.3. Transferência eletroforética..... 46

3.6.4. Imunodetecção e visualização das proteínas..... 46

3.7. Ensaio de Imunofluorescência..... 47

3.8. Proliferação celular avaliada pelo Kit XTT..... 48

3.9. Teste de Sobrevivência Clonogênica..... 48

3.10. Avaliação da capacidade de recuperação dos danos no DNA pelo Ensaio Cometa..... 49

3.11. Análise da Cinética do Ciclo Celular por citometria de fluxo..... 50

3.12. Detecção de morte celular..... 51

3.12.1. Apoptose..... 51

3.12.2. Morte celular autofágica..... 51

3.13. Ensaio de invasão celular em Matrigel..... **52**
3.14. Análise estatística..... **52**
4. RESULTADOS..... **55**
4.1. Transfecção por siRNA para o gene APE1..... **55**
4.2. Determinação do IC_{50} para a droga temozolomida em linhagens de glioblastoma T98G e U87MG..... **58**
4.3. Detecção da proteína APE1 por imunofluorescência..... **60**
4.4. Proliferação Celular após silenciamento e tratamento com a droga TMZ..... **62**
4.5. Sobrevivência Clonogênica após silenciamento e tratamento com a TMZ..... **64**
4.6. Cinética de recuperação de danos no DNA após silenciamento e tratamento com a droga TMZ..... **66**
4.7. Cinética do Ciclo Celular após transfecção do gene APE1 e tratamento com a droga TMZ..... **68**
4.8. Indução de morte celular (apoptose e autofagia)..... **72**
4.8.1. Apoptose (sub-G1) **72**
4.8.2 Apoptose (anexina V) **73**
4.8.3 Morte celular autofágica..... **76**
4.9. Avaliação da capacidade de invasão das células após silenciamento e tratamento com a droga TMZ..... **78**
4.10. Expressão transcricional dos genes COX2 e VEGF..... **80**
4.11. Avaliação da expressão proteica de $H2AX^{(ser139)}$, caspase 3 e $p65^{(ser536)}$ **83**
5. DISCUSSÃO..... **86**
6. CONCLUSÕES..... **105**
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **109**
ANEXO 1: Publicações..... **132**
ANEXO 2: Artigo..... **136**

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizada em 2007 (Dresemann, 2010), os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) estão entre as neoplasias mais difíceis de serem tratadas, sendo responsáveis por aproximadamente 2% dos casos de morte por câncer em homens e 1,4% em mulheres, representando a terceira causa mais comum de óbito devido ao câncer na faixa etária de 15 a 34 anos (Osborne et al., 2001). Nos Estados Unidos, a estimativa para 2013 é de 23.130 casos novos, entre os quais serão esperados aproximadamente 14.080 casos de óbitos (National Cancer Institute).

Os tumores cerebrais podem ser classificados em gliomas, tumores neurais, neoplasias mal-diferenciadas e meningiomas (Reifenberger e Collins, 2004; Santarius et al., 1997). A OMS classifica os gliomas em grau I (astrocitomas pilocíticos), grau II (oligodendroglioma e oligoastrocitoma), grau III (astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico) e grau IV (glioblastoma - GBM). Ambos os gliomas de graus III e IV são designados como gliomas de alto grau ou malignos; entre os gliomas, o GBM é considerado o subtipo mais frequente e maligno (Ohgaki e Kheihues, 2005a; Louis et al., 2007).

Tumores de grau I são caracterizados por apresentarem baixos índices de proliferação celular, com a possibilidade de cura após ressecção cirúrgica. As neoplasias de grau II mostram atividade mitótica baixa, entretanto, existe a probabilidade de recorrência. Os tumores de grau III apresentam histologia anaplásica, comumente com elevação da atividade mitótica, aumento de celularidade e pleomorfismo nuclear. Finalmente, a classificação grau IV é atribuída a neoplasias malignas com alta atividade mitótica, propensas à necrose e associadas a uma rápida evolução clínica (Reifenberger et al., 2006; Kleihues et al., 2007).

1.2. Gliblastoma, caracteríticas e tratamentos

O GBM responde por 69% de todos os tumores malignos primários do SNC e apresenta uma incidência de 4-5 a cada 100.000 habitantes por ano nos países industrializados da Europa, bem como nos EUA (Dresemann, 2010). A maioria dos pacientes diagnosticados com esse tumor apresenta uma média de sobrevivência de 14,6 meses a partir do diagnóstico (Ohka et al., 2012); porém, apena 5% sobrevivem por mais de 5 anos, apesar das terapias agressivas (Mrugala, 2013), sendo a idade avançada o indicador mais significativo de mau prognóstico (Ohgaki e Kheihues, 2005b).

Tumores do tipo GBM apresentam grande capacidade de infiltrar e invadir o tecido cerebral normal circunjacente, além de uma propensão para a disseminação cranioespinhal, compreendendo tumores bastante agressivos com crescimento rápido e curso clínico bastante curto (Louis *et al*., 2007; Ohgaki e Kheihues, 2005b). A falta de delimitação anatômica bem como a heterogenidade celular e genética característica do GBM torna os pacientes difíceis de serem tratados (Kleihues e Ohgaki, 2000; Louis et al., 2007; Ohgaki e Kleihues, 2007; Kesari et al., 2011).

A maioria dos GBMs são diagnosticados sem a evidência de um tumor de precursor de menor grau, sendo denominados como GBM primário (GBM *de novo*), acometendo em sua grande maioria pacientes mais idosos. Entretanto, o GBM secundário surge pela progressão de um astrocitoma de baixo grau ou astrocitoma anaplásico, ocorrendo em pacientes mais jovens. Ambos os subtipos podem se originar a partir do acúmulo de diferentes alterações genéticas (Kleihues e Ohgaki, 2000; Ohgaki, 2005; Tso et al., 2006; Ohgaki e Kleihues, 2007; Kesari, 2011). Sabe-se que os GBMs apresentam uma alta heterogeneidade em termos patológicos e genéticos que pode, muitas vezes, comprometer o seu diagnóstico (Welsh, 2010; Bai et al., 2011).

Os GBM primários compartilham algumas anormalidades genéticas similares ao GBM secundário, tais como a perda de *PTEN* (*tumor-suppressor Phosphatase and Tensin homolog*), deleção ou mutação de *p16INK4a* (*Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A*), e amplificação de *HDM2* (*Human Double Minute 2*) ou *CDK4* (*Cyclin-dependent Kinase 4*) (Sathornsumetee et al., 2007). No entanto, as frequências de algumas alterações genéticas distinguem o tipo primário ou

secundário. Por exemplo, análises moleculares em GBM primário indicaram alterações que incluem LOH (*Loss of Heterozigosity* - perda de heterozigosidade) do cromossomo 10q (70%), mutações no gene *TP53* (28%), deleção de *P16INK4* (31%), mutações no gene *PTEN* (25%), assim como a predominância da amplificação do gene *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*; 36%), geralmente não detectada nos GBM secundários. Já a mutação no gene *TP53* (em torno de 65%) é uma alteração genética precoce e frequente nos GBM secundários, bem como a LOH do cromossomo 10q (63%), entre outras (Ohgaki e Kleihues, 2007; Noda et al., 2009).

Durante a última década foi explorada uma enorme variedade de tratamentos para o GBM, mas com sucesso limitado. Os principais desafios na terapia do GBM estão associados com a localização do tumor e sua biologia complexa e heterogênea (Kesari, 2011). Os quimioterápicos mais comumente empregados incluíam o agente cloroetilante BCNU3 (carmustine) e CCNU1 (lomustine), assim como os agentes metilantes procarbazina e temozolomida (TMZ), utilizados sozinhos ou em regimes de combinação (Prados e Russo, 1998; Prados, 2001). No entanto, a completa ressecção cirúrgica associada a tratamentos adjuvantes (quimio- e radioterapia) tem mostrado melhora de apenas alguns meses na sobrevida dos pacientes (Ahmadloo et al., 2013). Recentemente o tratamento padrão para os pacientes recém-diagnosticados inclui ressecção cirúrgica do tumor seguido por seis semanas de radioterapia, com terapia sistêmica concomitante ao agente alquilante (TMZ), o qual é mantido como terapia adjuvante pelo período mínimo de seis meses (Mrugala, 2013).

Entre 1990 e 2000, a TMZ, um agente alquilante de moderada toxicidade administrado oralmente e capaz de passar integralmente pela barreira hematoencefálica, foi considerada a droga mais promissora para os pacientes com GBM (Dresemann, 2010). A TMZ atua como um pró-fármaco, estável em pH ácido, uma propriedade que permite a sua administração oral (Newlands et al., 1992) com uma meia vida no plasma de 1,8 horas em pH 7,4 (Tsang et al., 1990). Em pH fisiológico, a TMZ é rapidamente absorvida e sofre hidrólise espontânea para formar monometil triazeno 5-(3-metiltriazeno-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC), o qual em seguida, reage com água para liberar o 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e o cátion metildiazonium altamente reativo. Este adiciona um grupo metil no DNA nas posições N^7 e O^6 da guanina e N^3 da adenina, em uma frequência de 80%, 5% e

15%, respectivamente (Newlands et al., 1997; Mutter e Stupp, 2006; Zhang et al., 2012).

A metilação do DNA parece ser o principal mecanismo responsável pela citotoxicidade da TMZ em células malignas. Dentre as N-metilpurinas, a N^7-metilguanina (N7-metil-G) não altera a estrutura dupla do DNA, não interfere na duplicação e não contribui substancialmente para a citotoxicidade da droga. Em contrapartida, N^3-metiladenina (N3-metil-A) é uma lesão geralmente considerada altamente citotóxica, devido à sua capacidade de bloquear a duplicação do DNA após sua interação com as DNA polimerases. Essas lesões induzem trocas entre cromátides irmãs (SCE – *Sister Chromatid Exchanges*), quebras e *gaps* cromossômicos, bloqueio na fase S do ciclo celular, além de apoptose (Engelward et al., 1998; Fronza e Gold, 2004). Embora a maioria das lesões formadas seja na posição N7-metil-G, a 0^6-metilguanina (O6-metil-G) é a principal responsável pelos efeitos mutagênicos e tóxicos provocados por agentes alquilantes (Beranek, 1990).

A alquilação O6-metil-G é uma importante etapa no aparecimento de mutações, principalmente devido à sua tendência em parear com a timina durante a replicação, resultando na conversão de guanina–citosina (G:C) em adenina–timina (A:T) pareadas no DNA (Jacinto e Esteller, 2007)

1.3. Mecanismos de reparo envolvido na resistência à TMZ

Várias vias de reparo do DNA promovem a resistência de GBM às lesões de base induzidas pela TMZ (Yoshimoto et al., 2012). A melhor caracterizada destas é aquela mediada pela enzima MGMT, uma proteína monomérica de 22 kDa, que atua apenas restaurando a O6-metil-G em guanina, pela transferência do grupo metil para um resíduo interno de cisteína (Silber et al., 2012), sendo aparentemente a única enzima humana com atividade de reparo do DNA que é capaz de remover essas lesões (Mitra, 2007; Kaina et al., 2007; Tubbs et al., 2007).

Dentre as enzimas com atividade de reparo do DNA, a MGMT é a única enzima cujo sítio ativo não pode ser reativado, sendo ubiquitinada e subsequentemente degradada após remoção de um grupo alquil. Esse mecanismo “suicida” acarreta restrição quanto à remoção das lesões O6-metil-G no DNA *in vivo,*

limitando-se ao número de moléculas de MGMT presentes na célula e à taxa de síntese *de novo* da proteína (Tubbs et al., 2007).

Um aumento da atividade de MGMT foi encontrado em tumores de cólon, pulmão, mama e ovário (Kaina e Christmann, 2002); em GBM, a porcentagem de tumores com deficiência de MGMT é particularmente elevada (Silber et al., 1998; Kaina e Christmann, 2002; Silber et al., 2012). Estudos que abordam resistência a terapias correlacionam a expressão aumentada de MGMT com a ausência de resposta dos gliomas ao tratamento com a TMZ, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Kokkinakis et al., 2001; Ma et al., 2002; Hermisson et al., 2006; Fruehauf et al., 2006; van Nifterik et al., 2010).

As lesões O6-metil-G também podem ser reparadas por outro mecanismo de reparo, sendo que determinantes adicionais importantes relacionados com a resistência à TMZ decorrem do reparo *mismatch* (MMR - *DNA mismatch repair*) (Yoshimoto et al., 2012). A função do MMR na resistência a agentes alquilantes ocorre quando O6-metil-G não é reparado por MGMT, anteriormente à duplicação do DNA. Por esse mecanismo, as bases mal pareadas são reconhecidas pelos heterodímeros MSH2 (*MutS homolog 2*) e MSH6 (*MutS homolog 6*), os quais recrutam outro complexo heterodimérico, MLH1 (*MutL protein homolog 1*) e PMS2 (*Postmeiotic Segregation Increased 2*), desse modo regulando o processo de reparo (Stojic et al., 2004). Lesões O6-Metil-G não reparadas podem parear erroneamente no momento da duplicação do DNA com citosina (C) ou timidina (T). Assim, as O6-Metil/C ou O6-Metil/T são reconhecidas pelo sistema MMR, gerando uma incisão na fita recém-sintetizada, o que mantém a lesão O6-Metil-G intacta. Contudo, uma vez que outra fita é gerada em oposição a O6-metil-G ainda presente, o sítio é novamente reconhecido pelo sistema MMR e uma nova tentativa de reparo é realizada. Essas tentativas fazem com que haja quebras na fita de DNA na próxima fase de duplicação (fase S do ciclo celular), gerando quebras de fita dupla no DNA (DSB – *Double-Strand Breaks*) e ainda acionando outras vias de reparo e/ou vias apoptóticas (Bignami *et al*., 2000; Kaina e Christmann, 2002). Assim, uma função normal da via de reparo MMR é pré-requisito para a citotoxicidade induzida pela lesão O6-Meti-G, de forma que a sua inativação foi associada com a tolerância aos efeitos citotóxicos induzidos por agentes alquilantes (D'Atri et al., 1998; Kinsella, 2009).

No entanto, O6-Metil-G não é a única lesão induzida pela TMZ capaz de promover citotoxicidade se não reparada. As lesões do tipo N7-metil-G, N3-metil-A, e sítios abásicos compreendem mais de 80% das lesões induzidas pela TMZ no DNA (Sobol e Wilson, 2001; Tentori e Graziani, 2002; Tentori e Graziani, 2009), as quais são eficientemente removidas do DNA pela via curta do reparo por excisão de bases (BER - *Base Excision Repair*), um processo multi-passos e cuidadosamente coordenado, que substitui nucleotídeos contendo a base danificada (Parsons and Dianov, 2013; Dianov and Hübscher, 2013). No caso da TMZ, a porcentagem de N3-metil-A gerada é baixa e estas são eficientemente reparadas pela via BER antes de exercer efeitos letais. Entretanto, na ausência desse mecanismo de reparo, essas lesões podem aumentar a citotoxicidade da droga, mesmo em quantidades mínimas (Sobol et al., 1996; Zhang et al., 2012).

Contudo, a resistência a TMZ também pode ser causada, em parte, por um eficiente processo de reparo via BER. Por outro lado, na ausência desse mecanismo de reparo, essas lesões podem aumentar a citotoxicidade da droga, mesmo em quantidades mínimas (Sobol et al., 1996; Zhang et al., 2012). Ainda, existem poucos estudos na literatura focando essa abordagem em gliomas (Liu e Gerson, 2004; Montaldi e Sakamoto-Hojo, 2012).

Apesar da citotoxicidade da TMZ, os mecanismos que promovem a sobrevivência das células tratadas apresentam um impacto negativo na eficácia do tratamento (Madhusudan e Hickson 2005). Mesmo considerando que a quimioterapia adjuvante seja à base de agentes alquilantes (Prados, 2001), cerca de 50% dos pacientes com GBM não respondem ao tratamento; quando respondem, o efeito ocorre em curto prazo (Shapiro e Shapiro, 1998; Prados e Russo, 1998; Avgeropoulos e Batchelor, 1999). Nos últimos 10 anos, foram publicados mais de 200.000 artigos descrevendo os biomarcadores de resposta ao tratamento com TMZ. No entanto, poucos deles são utilizados rotineiramente na prática clínica (McDonald et al., 2013), tornando necessária a investigação dos possíveis mecanismos de resistência a agentes alquilantes clinicamente eficazes que possam viabilizar estratégias capazes de contornar a quimiorresistência.

1.4. APE1/REF-1 como alvo no tratamento do câncer

Uma nova estratégia emergente para aumentar a sensibilização das células tumorais a agentes antineoplásicos é a inibição de proteínas de reparo do DNA (Belzile et al., 2006; Madhusudan e Midlleton, 2005).

A tecnologia de RNA interferente (RNAi) tem sido utilizada também para genes de reparo do DNA, visando aumentar a sensibilidade das células cancerosas a agentes quimioterápicos e radiações (Pai et al., 2006; Phalon et al., 2010). Sua regulação envolve mecanismos pós-transcricionais de silenciamento de genes, os quais podem ocorrer por meio de remodelagem da cromatina, inibição da tradução de proteínas ou degradação direta do mRNA (Dorsett e Tuschl, 2004; Shankar et al., 2005). Dessa forma, a compreensão adquirida a partir desses estudos facilita a busca sistemática de novos alvos terapêuticos e também a eficácia dos agentes quimioterápicos existentes, tendo como objetivo específico silenciar genes associados à resistência a drogas (Pai et al., 2006).

Nesse contexto, existem vários trabalhos na literatura os quais utilizaram a via de reparo BER como alvo potencial para radio e quimio-sensibilização em vários tipos de tumores (Fishel et al., 2007; Fishel e Kelley 2007; O'Connor et al., 2007; Adhikari et al., 2008; Johannessen et al., 2008; Li et al., 2012; Chen et al, 2013).

A proteína codificada pelo gene *APE1/REF-1* (*Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1/ Redox factor-1*) exerce duas funções importantes, a atividade redox e a de reparo por excisão de base (BER), as quais são determinadas em regiões completamente independentes. A região N-terminal, a qual contém sinais de localização celular bipartido (NLS - *nuclear localization signal*), desempenha principalmente a atividade de co-ativação transcricional mediada pela ação de redução. Já a região C-terminal exerce a atividade enzimática em sítios abásicos de DNA, principalmente através dos resíduos H309 em seu sítio catalítico (Xanthoudakis et al., 1994). Ainda é motivo de controvérsia na literatura, a questão sobre a característica necessária para acionar a atividade redox de APE1 humano (hAPE1) (Luo *et al*., 2010; Kelley et al., 2012). Dos sete resíduos de cisteínas (*cis*) presentes na hAPE1, c*is*65 foi identificado como sendo o resíduo crítico necessário para a atividade redox, por meio de análise de substituições únicas de *cis* para alanina (Ala) na proteína APE1 (Walker et al., 1993).

Uma terceira função secundária, porém pobremente caracterizada, é representada pela sua atividade de repressão transcricional de regiões promotoras do hormônio paratireoideano (PTH - *Parathyroide Hormone*) e do gene *APE1*, através da sua ligação a elementos negativos de resposta ao cálcio (*negative calcium responsive elements* - nCaRE) (Chung et al., 1996; Kuninger et al., 2002).

Recentemente, foi descoberta uma nova e inesperada função para a proteína APE1 no metabolismo de RNA, a qual é mediada pelos primeiros 33 aminoácidos terminais (33N-terminal) dessa proteína. Por essa via demonstrou-se que APE1 é capaz de se ligar ao RNA, atuando como um fator de purificação de RNA abásico (Vascotto et al., 2009b; Tell et al., 2010). Outros autores demonstraram que APE1 pode controlar a expressão do gene *c-Myc* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) pela clivagem de seu RNA mensageiro (Tell et al., 2010). Essas evidências apontam uma nova função dessa proteína na regulação da expressão gênica por meio de mecanismos pós-transcricionais, abrindo novas perspectivas na compreensão do papel multifuncional de APE1 nas células tumorais (Tell et al., 2010) (**Figura 1**).

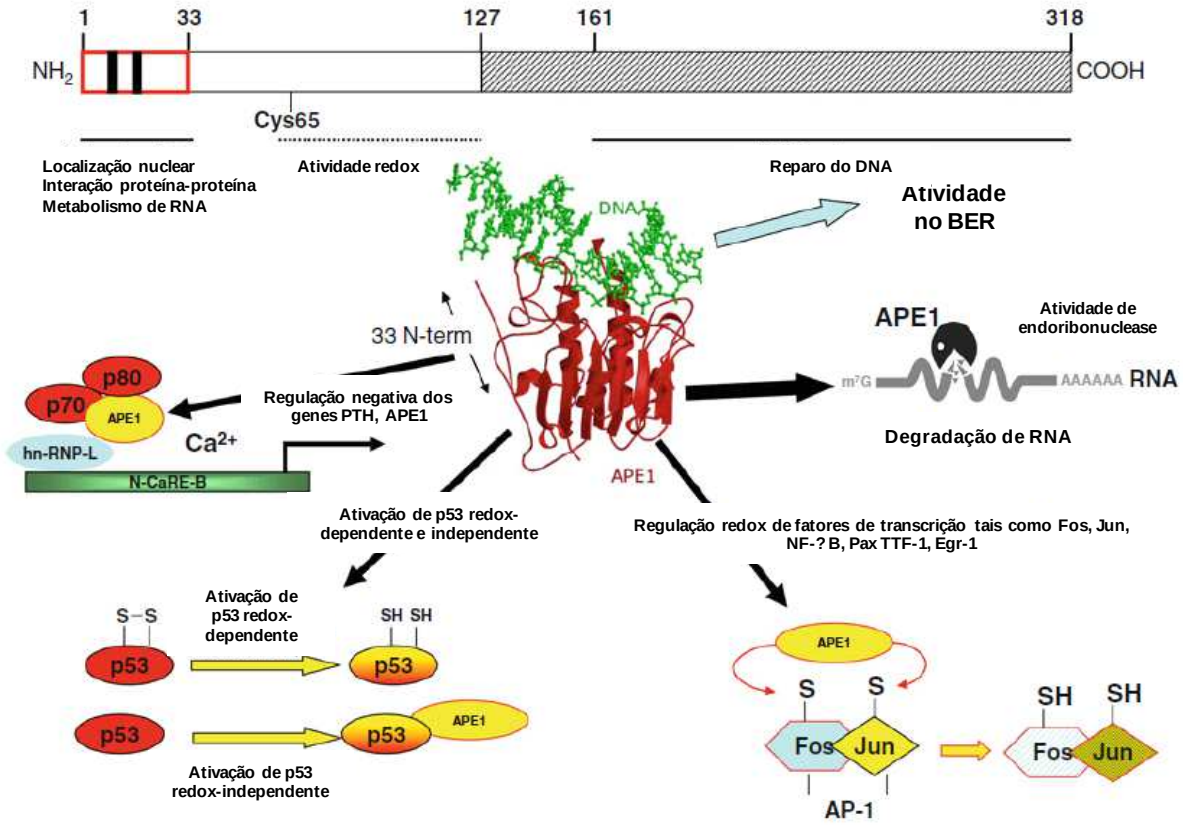

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da proteína APE1 em humanos e suas principais funções: participação na via de reparo BER; atividade de repressão transcricional através da sua ligação a elementos negativos de resposta ao cálcio (n-CARE); regulação de fatores de transcrição redox-dependente e independente; participação no metabolismo de RNA (Adaptado de Tell et al., 2010).

Na via BER, a proteína APE1 é responsável pelo reparo de danos oxidativos e de alquilação, protegendo as células contra os efeitos tóxicos de agentes endógenos e exógenos, incluindo os agentes quimioterápicos (Fleck e Nielsen, 2004; Demple e Harrison, 1994; Evans et al., 2000). Essa via foi primeiramente descrita em *E. coli* (Friedberg et al., 2006) e estudos subsequentes mostraram que esse mecanismo é bem conservado em eucariotos, incluindo os mamíferos (Hegde et al., 2008), capaz de processar cerca de 10^4 eventos de lesões de bases que podem ocorrer por célula, por dia (Lindahl, 1993; Nakamura et al., 1998; Lindahl e Barnes, 2000) (**Figura 2**).

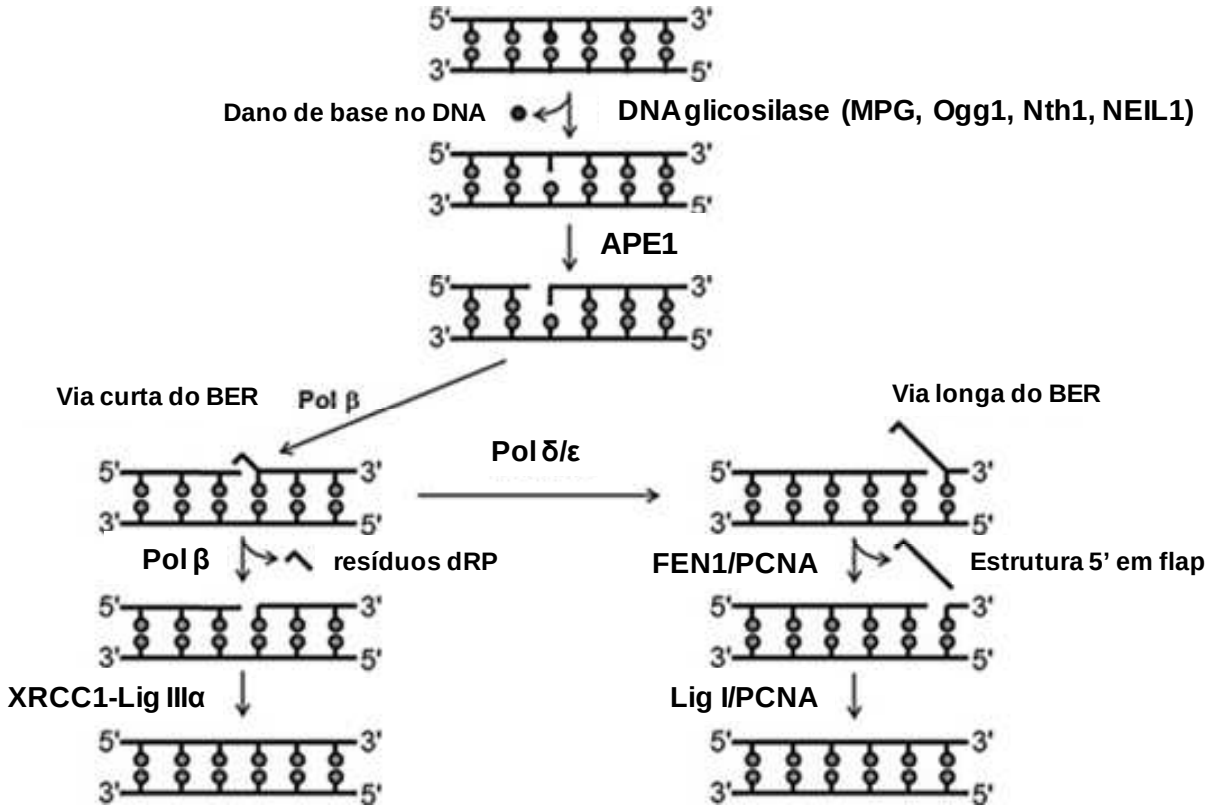

Figura 2: O papel de APE1/REF-1 no reparo via BER. Danos oxidativos e de alquilação no DNA podem ser reparados pela via curta (esquerda) ou via londa (direita) do BER (Adaptado de Parsons e Dianov, 2013).

Como já mencionado, as lesões N7-metil-G e N3-metil-A geradas após a exposição a agentes alquilantes (como a TMZ) são processados via BER. Por esta via, as bases danificadas são removidas através da hidrólise da ligação N-glicosídica por uma DNA glicosilase específica que pode ser bi-funcional, ou seja, além de remover a base pela sua atividade de liase 3´AP, também remove o açúcar-fosfato. Alternativamente, a base pode ser removida por uma DNA glicosilase monofuncional e o açúcar-fosfato pode sofrer remoção por uma enzima endonuclease AP (endonuclease apurínica/apirimidínica), como a APE1. Essa ação gera um sítio AP no DNA, o qual pode bloquear as DNA polimerases replicativas (Yu et al., 2003), acarretando efeito citotóxico e mutagênico.

A clivagem do sítio AP por APE1 ocorre pela hidrólise da ligação fosfodiéster na posição 5’ adjacente ao sítio AP, formando uma quebra na fita de DNA com uma extremidade 3’OH e outra extremidade 5’dRP (5’ desoxirribose fosfato) (Doetsch e Cunningham, 1990). Se o reparo começar pela ação de uma DNA glicosilase

bifuncional, serão produzidos dois tipos de extremidades: uma extremidade 5'P (5'-fosfato), a qual é substrato para a DNA polimerase β (POL β), e uma extremidade 3'PUA (aldeído fosfo-insaturado) ou 3'P (3' fosfato), as quais não são substratos para a POL β (Hegde et al., 2008).

A remoção da base danificada levando à substituição de um nucleotídeo faz parte da via curta de BER (*short-patch BER:* SP-BER) (Kubota et al., 1996). No entanto, um reparo de cerca de 2 a 10 nucleotídeos tem sido designado como via longa de reparo (*Long-patch BER:* LP-BER). A decisão por uma ou outra sub-via depende de vários fatores, tais como a natureza da lesão, tipo da DNA glicosilase que remove a base danificada, cinética de competição entre as enzimas, bem como o nível de expressão de diferentes proteínas de BER (Sung e Mosbaugh, 2001; 2003; Ranalli et al., 2002; Greenberg et al., 2004; Sukhanova et al., 2005; Bennett et al., 2001).

Os nucleotídeos substituídos por ambas as vias são polimerizados pela ação da POL β no reparo pela SP-BER ou pela POL β, δ ou ε no reparo pela LP-BER (Dogliotti et al., 2001). Participantes adicionais no reparo pela LP-BER são RFC (*Replication Factor C*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), FEN1 (*Flap Endonuclease-1*) e PARP (*Poly (ADP-Ribose) Polymerase*). Foi relatado que a PARP-1 se liga às quebras de fita simples (*Single-strand breaks* - SSBs), havendo evidência de que essa ligação protege contra a conversão de SSBs a DSBs, assim preservando o substrato para BER (Woodhouse et al., 2008). PARP é ainda necessária para estimular a síntese e liberação da fita, facilitando o reparo de longos trechos de DNA (Prasad et al., 2001). O caminho final de ligação é operado pelo complexo XRCC1 (*X-Ray Repair Cross Complementing 1*)/DNA Ligase III (LIG 3) ou DNA Ligase I (LIG 1), nas vias curta e longa, respectivamente (Dogliotti et al., 2001; Almeida e Sobol, 2007; Baute e Depicker, 2008; Dianov e Hübscher, 2013; Parsons e Dianov, 2013).

Em células de mamíferos, a proteína APE1 possui uma forte atividade endonucleásica AP, apresentando uma eficiência de incisão de sítios abásicos de aproximadamente 95% (Tell et al., 2009; Abbotts e Madhusudan, 2010), podendo contribuir para a resistência a agentes alquilantes utilizados no tratamento de alguns cânceres, tais como os gliomas (Silber et al., 2002; Bobola et al., 2001; 2004; 2012). Além disso, foi observada a inviabilidade de camundongos *knockout* e de células deficientes para APE1, reforçando a importância dessa proteína para a

sobrevivência celular (Xanthoudakis et al., 1996). Da mesma forma, bactérias e leveduras mutantes, que são geneticamente deficientes para a atividade de APE1, são hipersensíveis à morte induzida por agentes alquilantes (Demple e Harrison, 1994; Memisoglu e Samson, 2000).

Assim, como a atividade de APE1 é essencial para a sobrevivência celular, é razoável a suposição de que uma estratégia de inibição da atividade de APE1 seja bastante promissora no sentido de sensibilizar células tumorais a quimio- e/ou radioterapias. Como estratégia de inibição indireta de APE1 pelo bloqueio de sítios AP e, consequentemente, da via de reparo BER, alguns trabalhos têm usado uma pequena molécula derivada do alkoxiamino, a metoxiamina (MX) (Talpaert-Borle e Liuzzi, 1983; Liuzzi e Talpaert-Borle, 1985) que tem mostrado resultados interessantes promovendo o aumento da citotoxicidade de agentes metilantes, tais como a TMZ, e assim anulando a resistência às drogas (Liu et al., 1999; Taverna et al., 2001; Liu et al., 2002; Rinne et al., 2004; Fishel et al., 2007; Montaldi e Sakamoto-Hojo, 2012). Recentemente, estudos *in vitro* e *in vivo* em células de GBM e melanoma também mostraram outras moléculas capazes de inibir a atividade da endonuclease de APE1 (Bapar et al., 2010; Mohammed et al., 2011).

Além da abordagem de inibição da via BER em gliomas, o enfoque relacionado à função redox de APE1 ainda requer um estudo mais aprofundado. Em conjunto, essas abordagens poderão convergir em direção à elucidação das vias genéticas relacionadas à resistência das células de GBM ao tratamento com quimioterápicos.

Além da estratégia de inibição da atividade endonucleásica de APE1, também foi observado que a inibição da sua atividade redox está relacionada com a diminuição da capacidade de ligação de fatores de transcrição (FTs) ao DNA. Sabe-se que APE1 estimula a atividade de ligação ao DNA de uma variedade de FTs que estão envolvidos na promoção e progressão do câncer, tais como AP-1 (FOS/JUN), NFκB, HIF-1α, CREB, HLF, TP53, e outros. APE1 atua na redução desses FTs, mantendo-os em um estado reduzido ativo (Evans et al., 2000; Tell et al., 2005) (**Figura 3**). Por exemplo, foi mostrado que a inibição da atividade redox de APE1 afetou a ligação de NFkB (*Factor Nuclear kappa B*) ao DNA, aumentando a resposta das células tumorais a agentes quimioterápicos, como a gemcitabina (Evans et al., 2000; Raffoul et al., 2007; Arlt et al., 2003), reduzindo drasticamente o crescimento celular *in vitro* e *in vivo* (Duffey *et al*., 1999). Dessa forma, através da inibição da

atividade redox de APE1, estes FTs seriam incapazes de se ligar ao DNA impedindo a sinalização de angiogênese do tumor e o crescimento descontrolado (Fishel e Kelley, 2007).

O ativo FT NFκB, envolvido na progressão do tumor forma um complexo heterodimérico composto pelas subunidades p65 e p50 e a proteína APE1 atua justamente impedindo a ligação de p50 ao DNA (Nakamura et al., 1997; Shimizu et al., 2000). Em células não estimuladas, o complexo heterodímérico NFκB é sequestrado no citoplasma por uma variedade de proteínas inibitórias da família IκB (*Inhibitor of kappaB*), incluindo IκBα (Beg e Baldwin, 1993; Barnes et al., 1997). Esses inibidores mascaram o domínio de localização nuclear de NFκB e inibem a sua atividade de ligação ao DNA. Em resposta a uma grande variedade de estímulos, o inibidor de IκB é rapidamente fosforilado, ubiquitinado e degradado, o que permite a translocação nuclear de NFκB, sua ligação a sítios promotores de múltiplos genes alvos (Karin, 1999; Pahl, 1999), os quais estão envolvidos em uma variedade de processos, incluindo a proliferação e sobrevivência celular (Baldwin, 2001).

Outro passo da ativação de NFκB independente da fosforilação de IκBs, entretanto, depende de uma atividade induzível de fosforilação e de transativação da subunidade p65, os quais ocorrem no citoplasma ou no núcleo. Existem pelo menos três resíduos (ser276, ser529 e ser536) em p65 que sofrem fosforilação por quinases, como por exemplo, a proteína quinase A (PKA – *Protein Kinase A*) (Zhong et al., 1997) e MSK1 (*Mitogen- and Stress-activated protein Kinase 1*), que fosforilam a ser276, CKII (*Casein Kinase II)* (Kato et al., 2003) que promove a fosforilação na ser529 e IKK (*IkB kinase*) (Ghosh e Karin, 2002) e RSK-1 (*Ribosomal protein S6 kinase 1*) (Bohuslav et al., 2004) que fosforilam a serina 536; todas aumentam o potencial de transativação de p65.

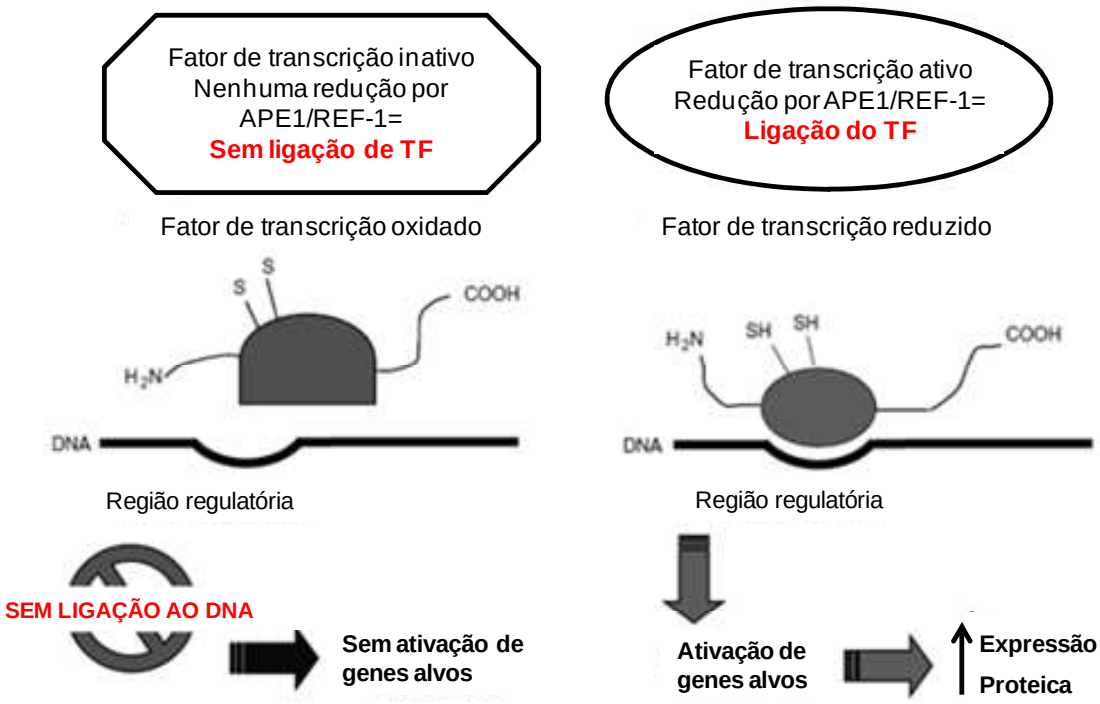

Figura 3: Figura mostrando como APE1 converte fatores de transcrição (FT), de um estado oxidado inativo para um reduzido ativo, podendo assim se ligar a regiões regulatórias de genes alvos (Adaptado Fishel e Kelley, 2007).

Em GBM, a expressão constitutiva de NFκB se associa com o aumento do crescimento, progressão do ciclo celular e quimiorresistência (Wang et al., 1999; Ansari et al., 2001, Nagai et al., 2002; Bian et al., 2002; Raychaudhuri et al., 2007), desempenhando um papel importante na regulação de genes envolvidos na adesão celular, migração e invasão (Higgins et al., 1993; Huang et al., 2000). A migração de células tumorais desempenha um papel principal na malignidade do tumor, particularmente de tumores cerebrais. O fato de as células de glioma migrarem rapidamente contribui grandemente para letalidade do GBM, tornando frustrantes as estratégias terapêuticas baseadas na ressecção (Giese et al., 2003). Há relatos na literatura mostrando que NFκB também desempenha um papel fundamental na proteção das células contra indutores de apoptose, incluindo drogas quimioterápicas, possivelmente através da ativação de genes antiapoptóticos (Barkett e Gilmore, 1999). Assim, devido ao seu papel na oncogênese, a regulação de NFκB torna-se um alvo importante na terapia do câncer.

Além de afetar a via NFkB, outro alvo *downstream* de APE1 é o HIF-1α (*Hypoxia-inducible factor-1α*), um FT expresso durante a angiogênese. Este é um heterodímero formado pela associação das subunidades α e β (HIF-1α e HIF-1β) (Wang e Semenza, 1995; Duffy et al., 2003). Estudos anteriores demonstraram que a superexpressão de HIF-1 em espécimes cirúrgicas está positivamente relacionada com a agressividade do tumor e com prognóstico ruim em neoplasias humanas (Vaupel et al., 2001; Unruh et al., 2003). A análise imunohistoquímica mostrou que a proteína HIF-1α é superexpressa em vários tumores humanos (cólon, mama, estômago, pulmão, pele, ovário, próstata, renal e carcinomas pancreáticos) quando comparado com tecidos normais, sendo também mais pronunciada em lesões pré-malignas do que em lesões benignas (Zhong et al., 1999). Esses resultados enfatizam que HIF-1α desempenha um papel importante no crescimento do tumor e na progressão à metástase. Sua atuação como um potente ativador da angiogênese ocorre pela estimulação da produção de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e de muitos outros fatores que iniciam a proliferação das células endoteliais, invasão e migração (Kaur et al., 2005). Assim, HIF-1α é uma subunidade induzível do fator de transcrição heterodimérico HIF-1 que inicia um papel chave na adaptação patofisiológica das células do tumor (Semenza, 2000).

Em gliomas, a expressão de HIF-1α foi significativamente induzida nas células invasivas dos GBM, estando correlacionada com o grau do glioma e densidade dos vasos, enfatizando o papel deste na progressão do tumor e na angiogênese, além de ser associado à falha do tratamento e aumento da mortalidade (Zagzag et al., 2000; Søndergaard et al., 2002; Reszec et al., 2013). Desta forma, a superexpressão de HIF-1α pode representar um evento precoce na carcinogênese, sugerindo seu potencial como biomarcador de lesões pré-cancerosas (Duffy et al., 2003), o que o torna um alvo promissor para a terapia anticâncer (Post, 2004; Tan et al., 2005). A regulação de genes envolvidos na progressão do tumor, angiogênese e vasodilatação por HIF-1α sugerem que a inibição da ligação destes ao DNA pode ter um potencial clínico (Powis e Kirkpatrick, 2004).

Assim, a hipótese do presente trabalho se baseia nas informações mencionadas sobre a importância da via de reparo BER como um fator que contribui substancialmente para a resistência das células de GBM à quimioterapia baseada em agentes alquilantes, tal qual a TMZ, de forma que a proteína APE1, envolvida nessa via de reparo, bem como em processos de ativação redox de fatores de transcrição, pode contribuir para a resistência à TMZ, representando um alvo molecular promissor para intervenção terapêutica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Avaliar as respostas de duas diferentes linhagens de GBM às condições de inibição da transcrição do gene *APE1* (por meio do método de siRNA para esse gene) combinada ou não ao tratamento com a droga TMZ, visando a sensibilização das células de GBM. Para tanto, foi proposto analisar uma série de parâmetros, tais como: capacidade proliferativa e sobrevivência clonogênica, danos no DNA, alterações na cinética do ciclo celular, invasão celular, avaliação de morte por apoptose e autofagia. Adicionalmente, avaliar a expressão transcricional de genes alvos dos fatores de transcrição regulados por APE1, bem como proteica de vias diversas.

2.1 Objetivos específicos

1) Estudar os efeitos da inibição da transcrição do gene *APE1* sobre a proliferação celular e a sobrevivência clonogênica de células GBM (linhagens U87MG e T98G) submetidas ao tratamento com a droga TMZ;

2) Avaliar a ocorrência de indução de danos no DNA (ensaio cometa) e alterações na cinética do ciclo celular, nas linhagens de GBM (U87MG e T98G) transfectadas com siRNA do gene *APE1* e submetidas ao tratamento com a droga TMZ;

3) Analisar a indução de morte apoptótica e autofágica em resposta ao silenciamento do gene *APE1* nas células GBM (linhagens U87MG e T98G) submetidas ao tratamento com a droga TMZ;

4) Avaliar a influência da inibição da transcrição do gene *APE1* na capacidade de invasão das células de GBM (U87MG e T98G) quando submetidas ao tratamento com a droga TMZ;

5) Avaliar a expressão dos genes *COX2* e *VEGF,* regulados pelos FTs NFκB e HIF-1α*,* respectivamente, em células de GBM (U87MG e T98G) transfectadas com siRNA do gene *APE1* e tratadas com TMZ;

6) Analisar a expressão de proteínas envolvidas na sinalização de danos no DNA (γH2AX), via de morte celular (caspase-3), bem como proteínas da via de sinalização de NFκB ($p65^{ser536}$) e HIF-1α nas células de GBM (U87MG e T98G) transfectadas com siRNA do gene *APE1* e tratadas com TMZ.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares T98G e U87MG adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). A linhagem T98G apresenta mutações nos genes *CDKN2A*, *PTEN e* difere da U87MG quanto à proficiência do gene *TP53* (T98G deficiente e U87MG proficiente) (Ishii et al., 1999). No entanto, ao contrário da linhagem U87MG, a linhagem T98G apresenta elevada atividade da enzima de reparo MGMT (Hermisson et al., 2006).

3.2. Cultivo Celular

As células previamente congeladas em nitrogênio líquido foram cultivadas em monocamada, em meio HAM-F10 + DEMEM (*Sigma Aldrich*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Cultilab), mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 até atingirem o estado de semiconfluência, sendo posteriormente subcultivadas e preparadas para os experimentos.

3.3. Ensaio de inibição da expressão gênica por RNA de interferência (siRNA).

As células foram semeadas em frasco de cultivo de 25 cm^2 (1 x 10^5 células em 3 mL de meio de cultura), suplementado com 10% de SBF. Em seguida, as células foram incubadas até atingirem 60-80% de confluência (período de 24 h).

Para proceder ao silenciamento do gene *APE1* foi utilizado o oligômero APE1 siRNA (sc-29470 - *Santa Cruz Biotechnology*) que apresenta três sequências de 20-25 nucleotídios para o mesmo gene. O oligômero foi transfectado nas linhagens utilizando a *Lipofectamina 2000* (*Invitrogen*). Inicialmente, o oligômero foi

centrifugado e ressuspendido em água livre de nuclease a uma concentração de 50 µM. Para a transfecção, 15 µL de Lipofectamina foram diluídos em 200 µL do meio *Opti-MEM* (*Invitrogen*), pré-aquecido a 37 °C e incubado por cinco minutos à temperatura ambiente. A seguir, o oligômero (concentração final de 40 e 80 µM quando adicionado às células) foi diluído em 200 µL do meio *Opti-MEM*. Após a incubação da Lipofectamina diluída, essa foi combinada com o oligômero diluído, sendo incubados por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o complexo oligômero-Lipofectamina foi adicionado a 2,6 mL de meio de cultura sem antibióticos, produzindo um volume final de 3 mL. A transfecção ocorreu por um período de seis horas, quando as células foram lavadas e um novo meio foi adicionado. Após esse período, as células transfectadas foram incubadas por 24 a 96 horas a 37 °C. A eficiência da transfecção foi monitorada por *Western blot*.

3.4. Tratamento com Temozolomida

O princípio foi extraído do medicamento Temodal® (*Schering Plough*). O conteúdo da cápsula foi diluído em água deionizada, agitada a 37 °C por 30 minutos e em seguida, filtrada em filtro com poro de 0,45 µ (*Merck Millipore*) e estocado a -80°C. As células das linhagens T98G e U87MG foram tratadas com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente, após 48 h da transfecção com o siRNA, no qual ocorreu uma redução semelhante na expressão do gene *APE1* para as duas linhagens. A concentração utilizada foi baseada nos IC_{50} (concentração inibitória de 50%) da TMZ observado para cada linhagem. As linhagens foram mantidas em cultura com a droga por um período de 24 h, sendo posteriormente lavadas em PBS e subsequente incubação por tempos diferentes, dependendo do tipo de experimento ou análise. Como a TMZ foi adicionada após 48 h da transfecção, e essa se manteve por 24 h, os tempos de análise de 24, 48 e 72 h após tratamento, se referem aos tempos de 96, 120 e 144 h após a transfecção.

3.5. Experimentos para avaliação da expressão gênica transcricional

3.5.1. Extração de RNA total e síntese dos cDNAs

Nos experimentos de análise de expressão gênica, o RNA foi extraído com o Kit *illustra™ RNAspin Mini Isolation* (*GE Healthcare*), conforme instrução do fabricante. Em seguida, a integridade dos RNAs foi verificada através de uma eletroforese em gel de agarose com formaldeído.

Após a confirmação da integridade do RNA total extraído foi realizada a etapa de transcrição reversa para a síntese do cDNA. Para tanto, cada amostra foi submetida a uma reação com DNase segundo a seguinte proporção para uma reação com o volume final de 10 µL: 1 µL de *DNase Reaction Buffer* 10X (*Invitrogen*) (concentração final de 1x), 1 µL de *DNase I Ampgrade* 1U/µL (*Invitrogen*), 1µg de RNA total e água DEPC para completar. Os tubos foram deixados por 15 minutos à temperatura ambiente com posterior adição de 1 µL de EDTA (25 mM) por 10 minutos a 65 °C. Após esse período, foi adicionado 1 µL de oligoDT primer (250 ng/µL) (*Invitrogen*) ao RNA submetido à reação com DNase e as amostras foram incubadas a 70 °C por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados imediatamente no gelo para a distribuição da mistura para a transcrição reversa utilizando 4 µL de *First strand buffer* (*Invitrogen*), 2 µL de *DTT* 0,1M (*Invitrogen*), 1 µL da mistura de dNTPs 10 mM e 1 uL de *Superscript III* (*Invitrogen*). Posteriormente, os tubos foram mantidos a 50 °C por 50 minutos e incubados a 70 °C por 15 minutos. O produto da reação foi estocado a -20 °C até o momento de ser utilizado para os ensaios de PCR em tempo real.

Para a confirmação da reação de transcrição reversa, realizou-se uma PCR convencional utilizando iniciadores para o gene endógeno *B2M* em um volume final de reação de 25 µL contendo: *10X PCR Buffer* (concentração final 1X), 1,0 µL de $MgCl_2$ a 50 mM, 0,5 µL de solução de dNTP a 10 mM (concentração final de 0,5 mM), 0,5 µL de cada iniciador *forward* e *reverse* a 10 µM (concentração final de 0,5 uM), 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) e 0,75 µL de cDNA. O programa para amplificação do gene *B2M* compreendeu uma etapa de desnaturação inicial de cinco minutos a 94 °C, uma etapa de dois minutos a 60 ºC e 35 ciclos de desnaturação a

94 °C por um minuto anelamento a 60 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com *Gel Red* 20X (*Invitrogen*).

3.5.2. Avaliação da expressão gênica por qPCR em Tempo Real

Para determinar a quantidade inicial do número de cópias do gene *APE1* foi utilizado o aparelho *7500 Real-Time PCR Systems* (*Applied Biosystems*), com as reações preparadas utilizando-se o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). As reações foram realizadas para um volume final de 15 µL. Para este volume, o mix foi preparado de acordo com as seguintes proporções: 7,5 µL de *PCR Master Mix* (*SYBR Green – Applied Biosystems*), 0,75 µL do inidiador *Forward* (solução estoque de 10 µM), 0,75 µL do iniciador *Reverse* (solução estoque de 10 µM), 5,4 µL de água livre de RNAse e 0,6 µL do cDNA. As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (*Applied Biosystems*), onde foram adicionadas a mistura da reação e posteriormente as amostras de cDNA. Após a montagem das reações de PCR, as placas foram seladas. Foram feitas a incubação e a ciclagem, utilizando-se o seguinte programa: incubação (2 minutos a 50 °C), ativação da Taq (15 minutos a 95 °C) e 40 ciclos de denaturação (15 segundos a 95 °C), anelamento (30 segundos a 56 °C) e extensão (30 segundos a 72 °C). Após esse programa, foi realizada a curva de dissociação/fusão. Para essa reação foram utilizados iniciadores para o gene *APE1* (*Foward* 5-ATATTGCTTCGGTGGGTGAC-3’ e *Reverse* 5’-GCTCTGTCCTGAGCTCATCC-3’). As amostras de RNA provenientes de dois experimentos foram utilizadas para determinar a quantidade inicial do número de cópias do gene de interesse, utilizando-se o método de curva-padrão relativa para cada gene. Para determinar os níveis de expressão relativa, utilizou-se o método de CT comparativo, ou $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Para a quantificação da expressão gênica dos genes *VEGF* e *COX2* foi utilizado o aparelho *StepOnePlus Real Time System* (*Applied Biosystems*), com as reações preparadas utilizando-se *TaqMan® Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*). Duas amostras de RNA provenientes de experimentos independentes foram utilizadas para cada um dos pontos e as reações realizadas em triplicata. O

preparo e armazenamento das soluções foram feitas de acordo com o fabricante, exceto o volume final da reação otimizado para 10 µL. Para tal foram também utilizados primers/sondas TaqMan® (*Applied Biosystems*) inventoriados para os genes *VEGF* (*Hs00900055_m1*) e *COX2* (*Hs00153133_m1*), além dos endógenos *HPRT1* (*Hs02800695_m1*) e *TBP* (*Hs00427620_m1*). O mix foi preparado de acordo com as seguintes proporções: 2 µL de água livre de RNAse, 5 µL de *2X TaqMan Universal Master Mix* (*Applied Biosystems*), 0,5 µL de *20X TaqMan Gene Expression Assay* (sonda/primers - *Applied Biosystems*) e 2,5 µL do cDNA (diluído 1:4). As condições da PCR foram 95 °C por 10 minutos para ativar a Taq polimerase, seguido por 40 ciclos de anelamento e extensão a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos. O método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para calcular a expressão de cada gene, através do programa *StepOne Software v2.2* (*Applied Biosystems*).

3.6. Experimentos para avaliação da expressão protéica por Western blotting

3.6.1. Extração de proteínas com Solução de Lise

Para a extração de proteínas foi utilizado o reagente *ProteoJT™ Mammalian Cell Lysis Reagent* (*Fermentas Life Sciences*). Brevemente, as células foram tripsinizadas e lavadas uma vez com PBS gelado. Posteriormente, foi adicionada a solução de lise gelada (100-200 µL/10^6 células) com 1% de inibidores de proteases *Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit* (*Thermo Scientific*). As células foram ressuspendidas por agitação rápida e permaneceram por 10 minutos no agitador rotatório (1200 rpm). Logo após, as células foram centrifugadas a 18.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e estocado a -80 °C. As proteínas foram quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão obtida para uma proteína conhecida (por exemplo: soro albumina bovina) utilizando-se o *kit BSA* (*Pierce*).

3.6.2. Eletroforese de proteínas

O perfil das proteínas foi analisado utilizando-se géis de Bis-Tris com dimensões 8 x 8 x 0,1 cm (*Invitrogen*). As amostras foram preparadas com 30 µg de proteína. Estas foram desnaturadas a 90 °C por cinco minutos e posteriormente aplicadas no gel. Os marcadores de peso molecular empregados foram: *Magic Mark™ XP Western Protein Standard e SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard*, ambos da *Invitrogen*. A eletroforese foi realizada 200V por 35 minutos em cuba (*XCell SureLock™ Mini-Cell - Invitrogen*) contendo tampão SDS (*Invitrogen*).

3.6.3. Transferência eletroforética

Após a eletroforose, as proteínas foram transferidas do gel para membranas *Invitrolon PVDF* (*Invitrogen*) utilizando-se o sistema *XCell II™ 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 30V por cerca de cinco horas, sendo que esse tempo poderia variar dependendo do peso molecular da proteína a ser estudada. Para a confirmação da transferência das proteínas, as membranas foram coradas por cinco minutos com o corante *Simply Blue™ Safe Stain* (*Invitrogen*). Posteriormente, as mesmas foram lavadas e submetidas à imunodetecção.

3.6.4. Imunodetecção e visualização das proteínas

A imunodetecção e a visualização das proteínas foram realizadas com o auxílio do kit *Western Breeze 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 enxaguada com 20 mL de água ultrapura durante cinco minutos e incubada com 10 mL da solução de anticorpo primário por cinco

horas. Após esse passo, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos. Então, a membrana foi incubada em 10 mL da solução de anticorpo secundário por 30 minutos, sendo em seguida, novamente lavadas três vezes por cinco minutos com solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados dois enxágues com 20 mL de água por dois 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 em água ultrapura, sendo posteriormente secas em papel de filtro. Os anticorpos empregados neste trabalho foram os seguintes: anti-mouse APE1 (proporção 1:1000 - *Santa Cruz Biotechnology*), anti-rabbit NFkB p65$^{(ser536)}$ (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*), anti-mouse procaspase-3 (proporção 1:500 -Santa Cruz Biotechnology), anti-rabbit H2AX$^{(ser139)}$ (proporção 1:500 - *Santa Cruz Biotechnology*), anti-mouse HIF1-α (proporção 1:500 - *Santa Cruz Biotechnology*), além dos endógenos anti-rabbit β-Actina (proporção 1:2000 - *Cell Signaling Technology*) ou anti-mouse β-Tubulina (proporção 1:1000 - *Santa Cruz Biotechnology*), usados como controle para normalização.

As membranas foram escaneadas e as bandas foram quantificadas utilizando o programa *Gel Pro Analizer 4* (*Media Cybernetic*), sendo os valores relativos à quantificação das bandas normalizados em relação às proteínas endógenas para a proteína APE1. As outras proteínas estudadas foram somente escaneadas.

3.7. Ensaio de Imunofluorescência

Foram semeadas 2 x 10^4 células transfectadas com o siRNA do gene *APE1* sobre lamínula e, após o tratamento de duas h com a TMZ, as células foram fixadas (PBS-paraformaldeido 3%) por 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes (3 minutos) com PBS e permeabilizadas (PBS-Triton X-100 0,2%) por três minutos. Após as lavagens, as células foram incubadas em PBS-BSA 2% contendo anticorpo primário ani-mouse APE1 (*Santa Cruz Biotechnology*) na proporção de 1:50 por 45 minutos a 37 °C e posteriormente lavadas. Em seguida, as células foram incubadas (PBS-BSA 1%) com anticorpo secundário anti-mouse *Alexa Fluor® 594 chicken* (*Invitrogen*) diluído 1:200. A incubação ocorreu por 30 minutos a 37 °C,

seguida de três lavagens com PBS. As células também foram coradas com DAPI (0,15 µg/mL) preparado em *Vectashield* (*Vector Labs*) e as lamínulas foram montadas em lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência. As imagens foram fotografadas em microscópio de fluorescência *Zeiss*.

3.8. Proliferação celular avaliada pelo Kit XTT

O ensaio com o kit-XTT (*Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular Biochemicals*) possibilita detectar células viáveis com base no princípio de que a clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas forma um corante formazam alaranjado. Dessa forma, essa conversão ocorre somente nas células viáveis. Portanto, esse experimento tem a finalidade de determinar a quantidade de células sobreviventes após a transfecção e o tratamento com a TMZ. Após tratamento das células transfectadas, foram semeadas 1 x 10^4 células para a linhagem T98G e 3 x 10^4 células para a linhagem U87MG, em placas de cultivo com 12 poços (*Corning*), sendo monitorada por três dias (24, 48 e 72 h). Nos determinados tempos, foi feita a lavagem dos poços com PBS e adicionados 500 µL de meio DEMEM sem fenol vermelho (*Invitrogen*), juntamente com 60 µL da solução XTT/electron (preparada de acordo com as instruções do fabricante). O reagente permaneceu em cultura por cerca de uma a duas horas a 37 °C, até o momento da leitura colorimétrica em um espectrofotômetro, de acordo com as instruções do fabricante. O resultado da absorbância, medida em 492 e 690 nm, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra.

3.9. Teste de Sobrevivência Clonogênica

Após o silenciamento do gene *APE1* e tratamento com a TMZ foram semeadas 500 células/frasco (T98G) ou 1000 células/frasco (U87MG) por tratamento em triplicata, sendo incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 10 dias. Foram contadas as colônias com mais de 50 células, coradas com Giemsa

(1:20) e analisadas com o auxílio de uma lupa. Nesse ensaio, foram calculadas e comparadas as médias das triplicatas de cada um dos três experimentos independentes.

3.10. Avaliação da capacidade de recuperação dos danos no DNA pelo Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa foi realizado segundo o protocolo proposto por Singh et al. (1988) e adaptado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Após o silenciamento do gene *APE1*, as culturas foram tratadas com TMZ (24 h) e colhidas após zero, seis e 24 h para avaliar a recuperação dos danos no DNA. Após a colheita, uma alíquota de 400 µL de células foi centrifugada a 1000 rpm por cinco minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de células ressuspendido com auxílio de micropipeta. Foi adicionado ao precipitado de células um volume de 160 µL de agarose (*Invitrogen*) de baixo ponto de fusão a 0,5% (37 °C).

Transferiu-se a mistura para duas lâminas de microscopia (80 µL em cada) pré-preparadas com uma camada fina de agarose de ponto de fusão normal a 1,5% (*Invitrogen*). Estas lâminas foram cobertas com lamínulas e deixadas a 4ºC por cinco minutos. As lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise recém-preparada (NaCl 2,5 M, Na_2EDTA 100 µM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0) a 4°, por 24 horas.

Transcorrido o tempo necessário na solução de lise, as lâminas de cada amostra foram colocadas em uma cuba para eletroforese contendo tampão de pH alcalino (NaOH 0,3 M e Na_2EDTA 1 mM, pH > 13) durante 20 minutos, após os quais procedeu-se a eletroforese a 25V (1V/cm, 300 mA) a 4 °C durante 20 minutos. Terminada a eletroforese, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) e posteriormente fixadas em etanol absoluto por cinco minutos.

A coloração das lâminas foi feita sempre no momento da análise, por meio da adição de 50 µL de solução 0,2 µg/mL de *SYBR GREEN I* (*Invitrogen*), sendo a lâmina coberta com uma lamínula e imediatamente analisada.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (*Zeiss*, filtro 516 – 560 nm e barreira de filtro de 590 nm) em aumento de 40X. A análise foi feita a partir das imagens obtidas por meio de microscopia de fluorescência que são capturadas por uma câmera acoplada a um computador. Foram analisadas 50 células/tratamento utilizando o programa *Comet Assay IV* (*Perceptive Instruments Ltd*), o qual fornece uma série de dados a partir da imagem escolhida, dos quais apenas o parâmetro *Tail intensity,* considerado como o mais adequado para o tipo de análise a ser feita, foi utilizado neste trabalho. Este determina a porcentagem de DNA na cauda do "cometa", a qual tem relação direta com a quantidade de danos presentes no DNA da célula em questão.

3.11. Análise da Cinética do Ciclo Celular por citometria de fluxo

Para a análise da cinética do ciclo celular, as células foram semeadas em placas de seis poços (*Corning*). Após o silenciamento do gene *APE1*, as culturas foram tratadas e colhidas após 24, 48 e 72 h. No momento da colheita, o meio foi removido e armazenado, enquanto as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e coletadas com o meio previamente guardado. As células foram centrifugadas a 1000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante (meio de cultura) foi removido, sendo o precipitado de células lavado em seguida com PBS. As células foram novamente centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos) e, após a centrifugação, o PBS foi removido e o precipitado foi ressuspendido em 2 mL de etanol 70% gelado, mantido posteriormente a -20 °C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Antes de proceder a leitura das amostras, o material armazenado a -20 °C foi centrifugado (1000 rpm por 5 minutos) e o etanol 70% foi removido. O precipitado foi ressuspendido em 1 mL de PBS gelado e novamente centrifugado. Após a centrifugação, o PBS foi removido e o precipitado ressuspendido em 200 µL da solução de iodeto de propídio. Após 30 minutos de incubação, o material foi analisado no citômetro de fluxo *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*), em que pelo menos 5.000 eventos foram analisados para cada amostra.

3.12. Detecção de morte celular

3.12.1. Apoptose

A análise de detecção de morte celular por apoptose foi realizada em células semeadas em placas de seis poços (*Corning*). Após a transfecção com siRNA e tratamento com a TMZ por 24 h, as células foram colhidas em determinados tempos dependendo da metodologia empregada.

Os experimentos para análise de apoptose (determinação do conteúdo sub-G1) foram também utilizados para análise da cinética do ciclo celular, utilizando o citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e analisada por meio do *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). A detecção de apoptose foi também alcançada pelo método da anexina-V, utilizando o *Guava Nexin® Reagent* (*Guava Technologies*), segundo o protocolo do fabricante. Brevemente, 4 x 10^4 células foram centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos a 4 °C) e ressuspendidas em 100 µL de meio de cultura e incubadas por 20 minutos com 100 µL do reagente para posterior leitura no citômetro de fluxo, em que pelo menos 5.000 células/amostra foram analisadas.

3.12.2. Morte celular autofágica

A autofagia é caracterizada pela formação e promoção de AVOs (*Acid Vesicular Organelles*). Em células coradas com alaranjado de acridina, o citoplasma e núcleo emitem fluorescência verde brilhante, enquanto compartimentos acídicos emitem fluorescência vermelho brilhante. O volume do compartimento celular ácido, que reflete o número de vacúolos autofágicos pode ser quantificado. As células foram semeadas em placas de seis poços e transfectadas com o siRNA-*APE1*. Posteriormente à transfecção, as culturas foram tratadas com TMZ por 24 h e, após cinco dias do tratamento foi adicionado às células o corante alaranjado de acridina (*Sigma Aldrich*) a uma concentração final de 1 µg/mL e incubado por 15 minutos a

37 °C. As células foram removidas da placa e coletadas em microtubos de centrifuga, sendo ressuspendidas em meio de cultura DEMEM sem fenol (*Invitrogen*).

A leitura foi realizada no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*), em que 5.000 células/amostra foram avaliadas mediante iluminação com luz de excitação azul (488 nm), sendo quantificadas as fluorescências de emissão verde (510-530 nm) e vermelha (> 650 nm).

3.13. Ensaio de invasão celular em Matrigel

As células foram transfectadas com o siRNA do gene *APE1* e tratadas com TMZ durante 24 h. Ao final do tratamento, as células foram tripsinizadas e 2 x 10^5 células foram ressuspendidas em 200 µL meio de cultura sem SBF, sendo posteriormente semeadas em placas de 24 poços contendo insertos com membranas de poros de 8 µm (*Corning*) pré-revestidas com Matrigel (descongelada a 4 °C *overnight* e diluída na proporção de 1:30 - *BD Biosciences*), preparada com meio sem soro, 30 minutos antes e mantidas a 37 °C. Na parte inferior do inserto foram adicionados 750 µL de meio de cultura com 10% de SBF com quimiotactante. Após a incubação a 37 °C por 22 h, as células que não invadiram foram removidas da parte superior do inserto com o uso de um cotonete. As células que invadiram foram fixadas com metanol 100% por cinco minutos e coradas com uma solução de Giemsa (1:10) por 15 minutos. Foram realizados três experimentos, sendo os resultados expressos como média de células invasivas por campo ± desvio padrão. A análise foi efetuada por microscopia de luz (magnitude de 20x), sendo contados dez campos aleatórios por ponto experimental.

3.14. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste-t de *Student,* sendo $p < 0,05$ o valor considerado como significativo. Na maioria dos ensaios foi utilizado o programa

Sigma Stat v. 3.5 (*Jandel Scientific Software*), no entanto, os gráficos foram construídos com o auxílio do software Microsoft Excel, pertencente ao pacote de programas do *Microsoft Office Professional Plus 2010* (*Microsoft Corporation*). Foram realizados três experimentos independentes, exceto para a realização da imuno-marcação e *Western blotting*, para os quais dois experimentos foram conduzidos. Os resultados mostrados nos gráficos foram realizados a partir das médias dos experimentos e as barras correspondem ao desvio padrão. No ensaio de expressão gênica foram realizados dois experimentos independentes, sendo a análise estatística e a construção dos gráficos feitas pelo programa *GraphPad Prism v.5* (*GraphPad Software*). Nesses experimentos, os resultados ilustrados nas figuras correspondem às médias dos experimentos e as barras correspondem ao erro padrão.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Transfecção por siRNA para o gene APE1

Foram inicialmente realizados testes para a padronização da concentração de siRNA do gene *APE1* bem como da sequência *scrambed* (SCR – sequência aleatória) para a linhagem T98G, sendo testadas as concentrações de 40 e 80 nM, com base na literatura. A análise de expressão transcricional após 48 h da transfecção com siRNA mostrou que os valores de expressão em termos de *Fold Change* (*FC*) foram -2,6 para a concentração de 40nM e -3,6 para 80 nM (**Figura 4-A**). Os valores de *FC* foram utilizados para o cálculo das porcentagens de *knockdown* (redução temporária da expressão) para o mesmo gene a fim de verificar a concentração capaz de induzir uma maior inibição transcricional. Assim, foi obtido 83,9% de inibição para a concentração de 40 nM e 91,5% para 80 nM (**Figura 4-B**); esta última foi escolhida para ser utilizada nos demais experimentos.

A confirmação da redução de expressão proteica de APE1 foi realizada por *Western blotting* em comparação com o nível de expressão da proteína constitutiva β-tubulina (programa *Gel Pro Analyzer 4, Media Cybernetics*). Nas células T98G, a redução da expressão da proteína APE1 foi observada em todos os tempos avaliados após a transfecção: 25% (24 h); 46,2% (48 h), 46,7% (72 h) e 46,2% (96 h), não sendo observadas diferenças entre os tempos de 48 a 96 h (**Figura 5**, **6-A** e **Tabela 1**). No entanto, para a linhagem U87MG observamos maior porcentagem de redução da expressão proteica: 27,4% (24 h); 54,4% (48 h), 58,5% (72 h) e 76,7% (96 h) (**Figura 5, 6-B** e **Tabela 1**). Considerando que os resultados de expressão transcricional e proteica foram discordantes nas células T98G, a eficiência do silenciamento gênico nas células U87MG foi confirmada apenas pela quantificação da expressão proteica.

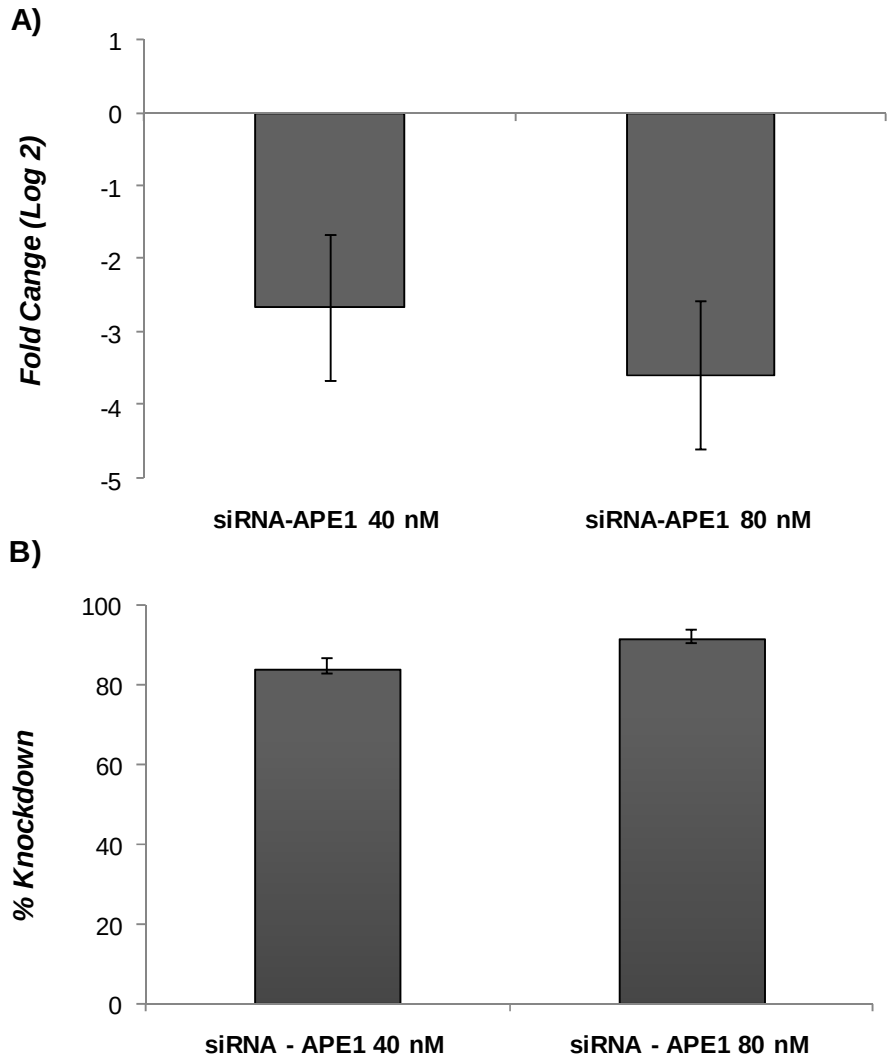

Figura 4: (A) Expressão gênica transcricional avaliada por qPCR em tempo real em células T98G transfectadas com 40 e 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), no tempo de 48 h. Os resultados de expressão gênica relativa foram representados em *Fold-Change* (Log_2); **(B)** Porcentagem de *knockdown* para o gene *APE1* em células T98G transfectadas com 40 e 80 nM do siRNA e coletadas em 48 h. As porcentagens foram calculadas a partir dos valores de *Fold-Change* (Log_2) obtidos na análise por qPCR em tempo real.

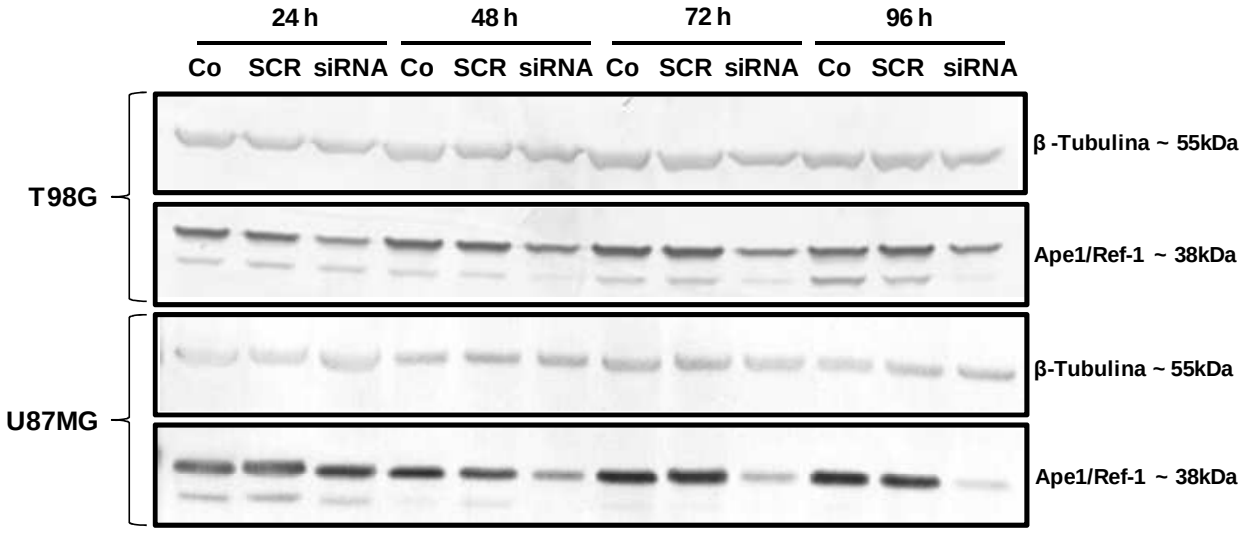

Figura 5: Expressão das proteínas APE1 (~38 kDa) e β-Tubulina (~55 kDa) analisada por *Western blotting* em células T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após a transfecção.

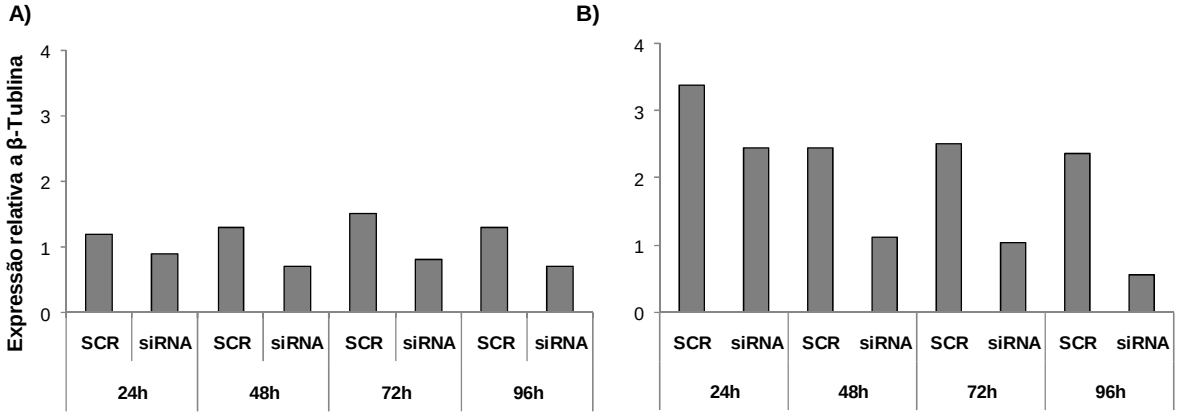

Figura 6: Níveis de expressão da proteína APE1 após 24, 48, 72 e 96 h do silenciamento com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR). Os valores foram normalizados com a proteína β-Tubulina para as linhagens T98G **(A)** e U87MG **(B)** utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4* (*Media Cybernetic*).

Tabela 1: Porcentagens de redução da expressão proteica de APE1 após silenciamento com 80 nM de siRNA nas linhagens T98G e U87MG. Os valores foram normalizados com a proteína β-Tubulina utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4* (*Media Cybernetic*).

Linhagens	Redução na expressão protéica (%)			
	Tempos (h)			
	24	**48**	**72**	**96**
T98G	25,0	46,2	46,7	46,2
U87MG	27,4	54,4	58,5	76,7

4.2. Determinação do IC_{50} para a droga temozolomida em linhagens de glioblastoma T98G e U87MG

As células foram tratadas com diversas concentrações de TMZ (2,5 a 40 µM para U87MG e 100 a 800 µM para T98G) a fim de determinar os valores de IC_{50} para a TMZ por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica. As colônias com mais de 50 células foram contadas 10 dias após o tratamento. Na linhagem T98G observou-se uma redução significativa na formação de colônias após o tratamento com concentrações acima de 400 µM de TMZ. Para a linhagem U87MG, foram observados valores significativos de redução para concentrações acima de 10 µM. Para a realização dos experimentos foi selecionada a concentração capaz de reduzir em torno de 50% a formação de colônias; esta correspondeu a 600 µM de TMZ para a linhagem T98G (43% de redução) e 10 µM de TMZ para a linhagem U87MG (51,6% de redução). As curvas dose-resposta para as diferentes concentrações da droga apresentaram valores de R^2 = 0,906 e R^2 = 0,950, para as linhagens T98G e U87MG, respectivamente (**Figura 7**; **Tabela 2**).

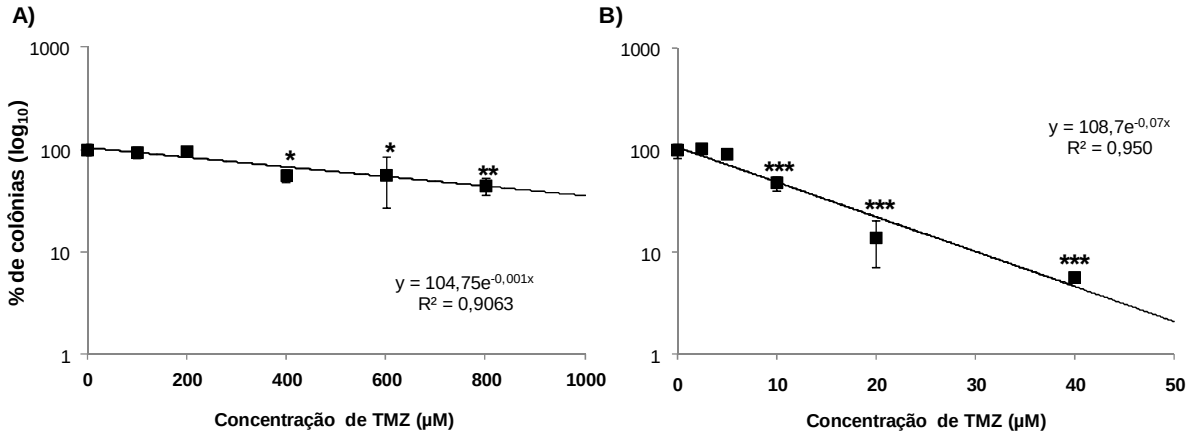

Figura 7: Porcentagens de colônias (escala Log) obtidas para as células T98G (**A**) e U87MG (**B**) no ensaio de sobrevivência clonogênica, 10 dias após o tratamento com diversas concentrações de TMZ por 24 h. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.

Tabela 2: Porcentagens de colônias formadas para as linhagens T98G e U87MG avaliadas 10 dias após o tratamento das células (durante 24 h) com diversas concentrações de TMZ. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	**Sobrevivência Clonogênica (%) (± Desvio Padrão)**					
	TMZ (µM)					
	0	**100**	**200**	**400**	**600**	**800**
T98G	100,6 ± 12,8	95,1 ± 11,2	97,6 ± 7,5	56,7 ± 8,1	57,0 ± 29,8	44,9 ± 8,2
	TMZ (µM)					
	0	**2,5**	**5**	**10**	**20**	**40**
U87MG	100,0 ± 15,3	103,5 ± 9,7	92,7 ± 6,2	48,4 ± 7,5	13,8 ± 6,7	5,7 ± 0,6

4.3. Detecção da proteína APE1 por imunofluorescência

A expressão da proteína APE1 foi analisada por imunofluorescência nas células T98G, as quais foram transfectadas com o siRNA do mesmo gene (referidas no texto como células siRNA-APE1) e com a sequência *scrambled* (células SCR), bem como nas células transfectadas e tratadas com a TMZ (referida como células siRNA-APE1 tratadas) e nas células tratadas somente com a droga TMZ. Observou-se que a proteína APE1 apresentou expressão nuclear e distribuição difusa nas células SCR**.** Entretanto, nas células tratadas com a TMZ, a distribuição da proteína no núcleo foi intensa, conforme evidenciado pela forte marcação. Nas células siRNA-APE1 observou-se uma localização também nuclear, porém com menor intensidade em relação às células SCR e também de forma gradual entre as células. Quando a transfecção foi associada à TMZ (células siRNA-APE1 tratadas) observou-se uma menor intensidade de marcação em relação àquelas observadas nas células tratadas somente com a droga. Adicionalmente, nota-se também uma variação na intensidade de marcação entre as células, conforme observado nas células siRNA-APE1 **(Figura 8)**.

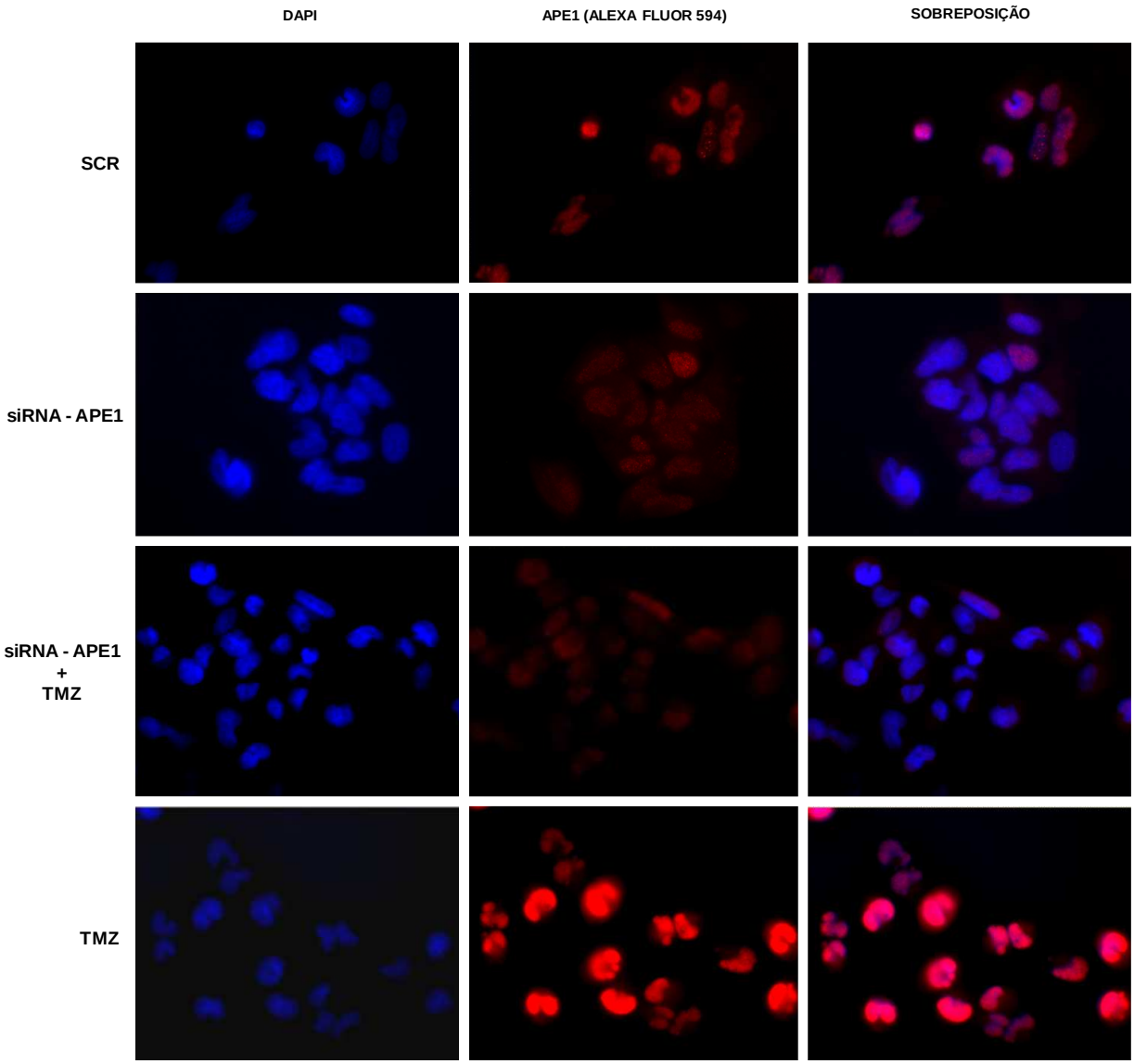

Figura 8: Localização e distribuição da proteína APE1 nas células T98G analisadas por imunofluorescência. As células foram transfectadas com 80 nM do siRNA do gene APE1 e sequência *scrambled* (SCR), sendo coletadas duas horas após o tratamento com 600 µM de TMZ. A proteína foi detectada por meio de um anticorpo secundário conjugado com *Alexa Fluor® 594* (vermelho), sendo a contra-coloração do núcleo efetuada com o corante fluorescente DAPI (azul).

4.4. Proliferação Celular após silenciamento e tratamento com a droga TMZ

A avaliação da proliferação celular das linhagens T98G e U87MG após transfecção do siRNA do gene *APE1* e tratamento com a TMZ foi monitorada por três dias. Nas células T98G, a transfecção do siRNA do gene *APE1* e tratamento com a TMZ foi eficaz em reduzir significativamente (p<0,001) as taxas de proliferação nos tempos de 48 e 72 h em relação às células SCR, bem como em relação às células tratadas com a TMZ (p<0,01). A redução máxima observada nas células siRNA-APE1 tratadas com a droga foi de 39,6% em 72 h. Entretanto, a transfecção com siRNA-APE1 também foi capaz de reduzir significativamente a proliferação celular nos tempos de 48 h (p<0,001) e 72 h (p<0,01), porém, em menor grau, indicando que a redução tenha resultado da combinação (silenciamento e TMZ), visto que o tratamento somente com a TMZ não afetou o índice de proliferação (**Figura 9-A**; **Tabela 3)**.

Diferentemente dos resultados anteriores, os ensaios de proliferação celular para as células U87MG não mostraram nenhum efeito do silenciamento do gene *APE1*, embora tenha havido uma tendência à redução dos valores de proliferação (79 a 88%) em 72 h (**Figura 9-B; Tabela 3**).

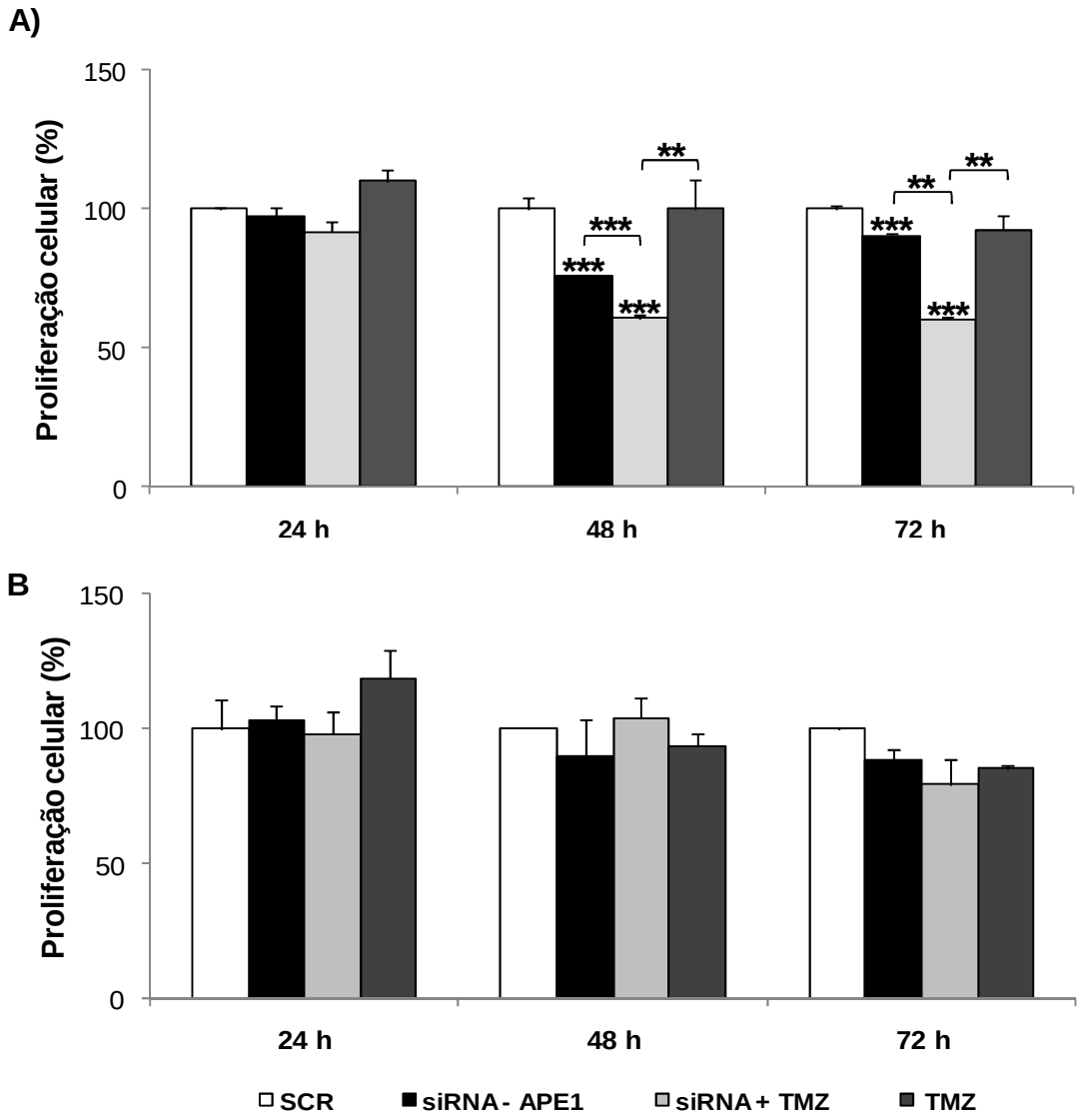

Figura 9: Proliferação celular (*Cell Proliferation Kit II (XTT)* em células transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), avaliada 24, 48 e 72 h após tratamento com 600 µM de TMZ por 24 h para a linhagem T98G **(A)** e 10 µM de TMZ para a linhagem U87MG **(B)**. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.

Tabela 3: Porcentagens de proliferação celular obtidas para as linhagens T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), avaliadas nos tempos de 24, 48 e 72 h após tratamento com 600 e 10 µM de TMZ por 24 h, respectivamente. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	Grupos de tratamentos	Proliferação celular (%) (± Desvio Padrão)		
		Tempo (h)		
		24	48	72
T98G	***scrambled***	100,0 ± 0,7	100,0 ± 3,8	100,0 ± 1,0
	siRNA-APE1	97,2 ± 3,4	75,0 ± 0,5	90,0 ± 1,3
	siRNA + TMZ	91,8 ± 3,4	60,5 ± 1,7	60,4 ± 0,9
	TMZ – 600 µM	109,8 ± 3,9	100,0 ± 10,1	92,5 ± 5,3
U87MG	***scrambled***	100,0 ± 10,4	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,1
	siRNA-APE1	102,8 ± 5,6	89,7 ± 13,7	88,3 ± 4,0
	siRNA + TMZ	97,9 ± 8,2	103,9 ± 7,7	79,2 ± 9,7
	TMZ – 10 µM	118,7 ± 10,2	93,7 ± 4,1	85,0 ± 1,6

4.5. Sobrevivência Clonogênica após silenciamento e tratamento com a TMZ

Com o intuito de verificar se o silenciamento do gene *APE1* (por meio da transfecção do siRNA-APE1) adicionalmente ao tratamento com a TMZ nas linhagens T98G e U87MG seriam capazes de alterar a capacidade reprodutiva dessas células, realizou-se o ensaio de sobrevivência clonogênica. Na linhagem T98G, o silenciamento associado ao tratamento com a TMZ apresentou uma redução significativa (p<0,001) de 63,1% na fração de sobrevivência, sendo estatisticamente diferente quando comparada às células transfectadas (p<0,01) e às células somente tratadas (p<0,05). Entretanto, nas células tratadas com a TMZ, observamos uma redução não significativa de 21%. Por outro lado, a transfecção sozinha também não foi capaz de reduzir significativamente a fração de sobrevivência das células. Em conjunto, esses resultados evidenciam um efeito de

redução na sobrevivência clonogênica promovido pelo silenciamento do gene *APE1* combinado ao tratamento com a droga (**Figura 10-A, Tabela 4**).

Nos experimentos com as células U87MG, a transfecção do siRNA-APE1 associada ao tratamento com a TMZ apresentou pouco efeito, visto que o tratamento com a droga sozinha reduziu significativamente (p<0,05) a fração de sobrevivência, havendo portanto, um efeito causado predominantemente pela droga. Além disso, a transfecção com o siRNA-APE1 exerceu apenas uma pequena redução não significativa na sobrevivência dessas células. (**Figura 10-B, Tabela 4**).

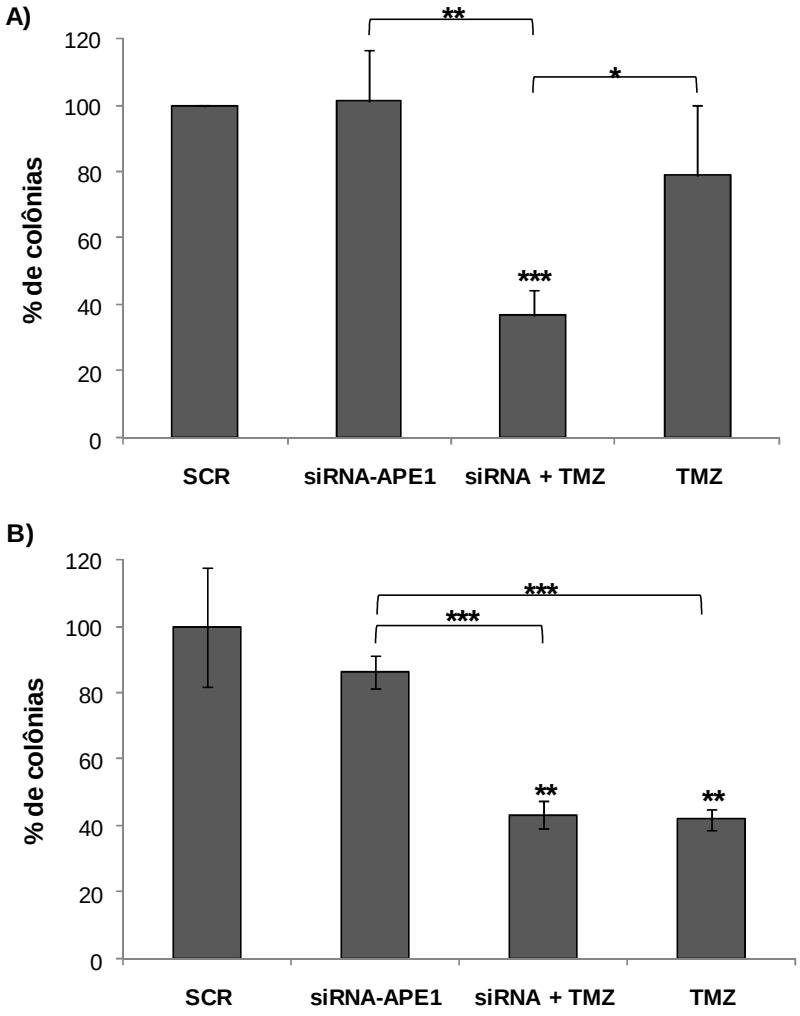

Figura 10: Sobrevivência clonogênica das linhagens de GBM transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR) avaliada 10 dias após tratamento com 600 µM de TMZ para a linhagem T98G **(A)** e 10 µM de TMZ para a linhagem U87MG **(B)** por 24 h. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.

Tabela 4: Porcentagens de formação de colônias em linhagens de GBM transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR) avaliada 10 dias após tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ para a linhagem T98G e U87MG, respectivamente. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	Sobrevivência Clonogênica (%) (± Desvio Padrão)			
	Grupos de tratamentos			
	Scrambled	**siRNA-APE1**	**siRNA + TMZ**	**TMZ**
T98G	100,0 ± 0,6	101,2 ± 15,4	36,9 ± 7,7	79,0 ± 21,0
U87MG	100,0 ± 17,9	86,3 ± 4,8	43,5 ± 4,1	42,0 ± 3,3

4.6. Cinética de recuperação de danos no DNA após silenciamento e tratamento com a droga TMZ

A transfecção associada ao tratamento com a TMZ foi capaz de gerar uma maior quantidade de danos no DNA (*Tail Intensity* - TI) nas células T98G logo após o final do tratamento, porém tais danos foram reparados até 24 h. Nessas células, houve um aumento significativo (p<0,01) dos danos após zero (16,5%) e seis horas (21,6%) de recuperação em relação às células SCR e células siRNA-APE1 não tratadas (p<0,05). Além disso, o aumento do TI em seis horas também foi significativamente (p<0,01) maior em relação ao obtido nas células tratadas apenas com a TMZ. A transfecção por si só, bem como o tratamento com a TMZ não induziram aumento dos danos no DNA em nenhum dos tempos analisados (**Figura 11-A; Tabela 5**).

Da mesma maneira, para a linhagem U87MG, observou-se uma maior indução de danos nos tempos de zero hora (10,7%) e principalmente em seis horas (13,3%) de recuperação nas células transfectadas e tratadas com a TMZ (p<0,01 e p<0,001, respectivamente). Nesse último tempo, um maior aumento foi observado em relação ao tratamento com a TMZ (8,4%; p<0,05) e à transfecção sozinha (8,5 %; p<0,001). As células somente transfectadas também foram capazes de induzir níveis de TI aumentados (p<0,05) nos tempos de zero e seis horas (7,1 e 8,5%,

respectivamente). No entanto, a TMZ causou elevação nos danos (p<0,01) apenas imediatamente após o término do tratamento (9,6% em 0 h). Da mesma forma como nas células T98G, as células U87MG também recuperaram os danos após 24 h do tratamento, de forma semelhante em todas as condições testadas (**Figura 11-B; Tabela 5**).

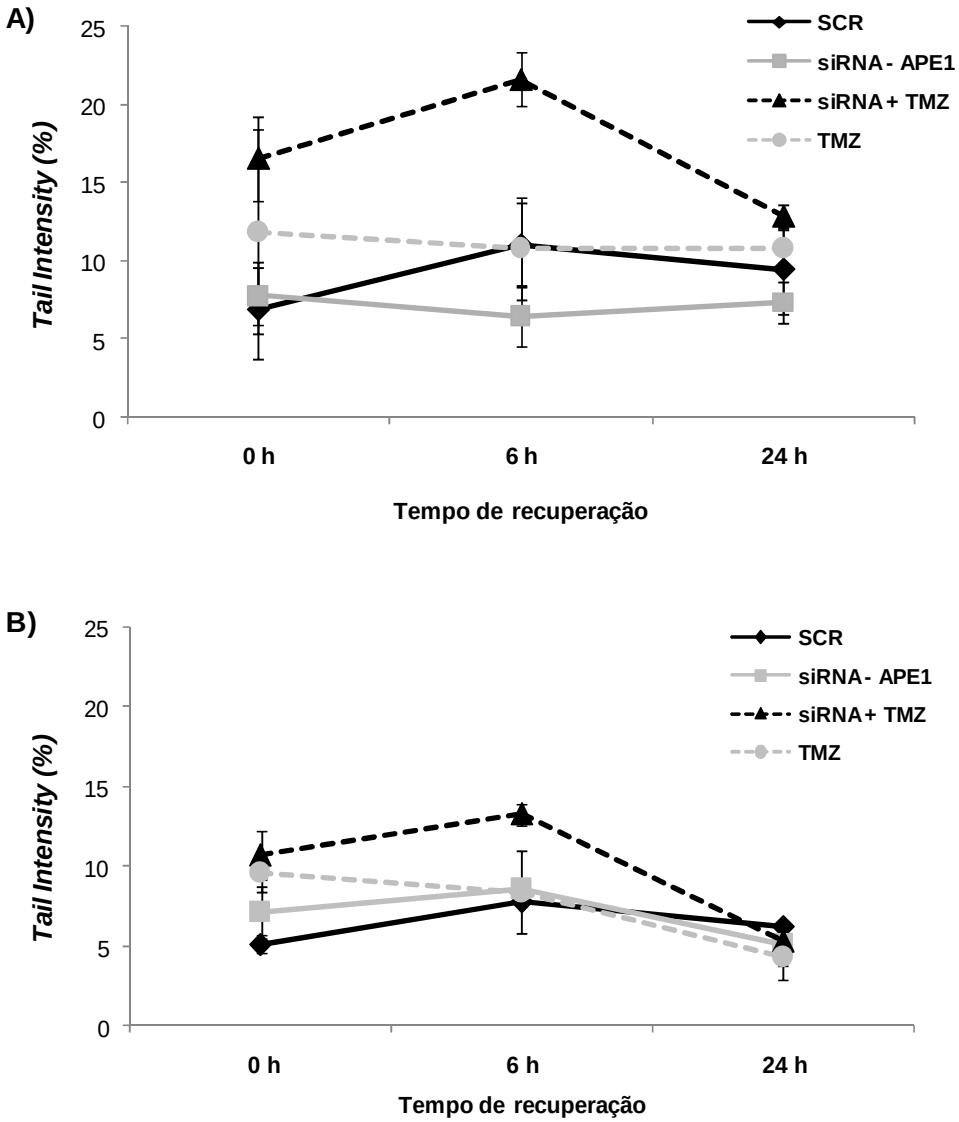

Figura 11: Indução de danos no DNA avaliada em termos de porcentagem de DNA na cauda (TI) por meio do Ensaio Cometa nas linhagens T98G **(A)** e U87MG **(B)** transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e analisadas em diferentes tempos de recuperação (0, 6 e 24 h após tratamento com 600 µM-T98G e 10 µM de TMZ-U87MG por 24 h). Os valores foram obtidos usando o sistema *Comet Assay IV* (*Perceptive Instrument*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Tabela 5: Porcentagens de DNA na cauda (*Tail Intensity*) apresentadas pelas linhagens T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1,* analisadas em zero, seis e 24 h após tratamento com 600 e 10 µM de TMZ durante 24 h, respectivamente. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). Os valores foram obtidos usando o sistema *Comet Assay IV* (*Perceptive Instrument*). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001; (#) diferença entre silenciado + tratado e tratado; (†) diferença entre silenciado + tratado e silenciado.

Linhagem	**Grupos de tratamentos**	***Tail Intensity* (%) (± Desvio Padrão)**		
		Tempos (recuperação)		
		0 h	**6 h**	**24 h**
T98G	***Scrambled***	6,8 ± 3,1	11,0 ± 2,7	9,4 ± 2,8
	siRNA – APE1	7,7 ± 1,8†**	6,4 ±1,9†**	7,3 ± 1,4†**
	siRNA + TMZ	16,5 ± 2,7**	21,6 ± 1,7**#**	12,8 ± 0,8
	TMZ – 600 µM	11,9 ± 7,1	10,8 ± 3,3	10,9 ± 1,2
U87MG	***Scrambled***	5,1 ± 0,5	7,8 ± 0,3	6,2 ± 0,4
	siRNA – APE1	7,1 ± 1,6*	8,5 ± 0,3*†**	5,1 ± 1,3
	siRNA + TMZ	10,7 ± 1,5**	13,3 ± 0,7***#*	5,3 ± 1,2
	TMZ – 10 µM	9,6 ± 1,1**	8,4 ± 2,6	4,3 ± 1,4

4.7. Cinética do Ciclo Celular após transfecção do gene APE1 e tratamento com a droga TMZ

Os efeitos do silenciamento do gene *APE1* sobre a cinética do ciclo celular foram analisados nas células T98G e U87MG transfectadas com o siRNA-APE1 e submetidas ao tratamento com a droga TMZ (24 h), após 24, 48 e 72 h do final do tratamento.

Na linhagem T98G, o tratamento com a TMZ causou um aumento significativo (p<0,05) na porcentagem de células na fase G2/M do ciclo nos tempos de 24 h (32,1%) e 72 h (34,8%), em relação às células SCR. O mesmo foi observado nas células silenciadas e tratadas, porém com um aumento significativo (p<0,05) apenas no tempo de 48 h (32,9%). Nas células somente transfectadas também foi observado um acúmulo significativo (p<0,05) na fase S (17,7% em 72 h), mesmo quando tratadas com a TMZ (20,8%). Tal acúmulo ocorreu independentemente do

tratamento com a TMZ, mostrando diferenças significativas (p<0,05) (**Figura 12-A, Tabela 6**).

Avaliando somente a TMZ nos tempos de 24, 48 e 72 h, foi observado um aumento significativo (p<0,001; p<0,001 e p<0,01, respectivamente) nas porcentagens de células U87MG na fase G2/M do ciclo celular (37,1; 55,0 e 48,2%, respectivamente) em relação às células SCR. Esse aumento foi acompanhado de uma grande redução da população de células na fase G1 (p<0,001). Entretanto, nos tempos de 24, 48 e 72 h foi observado um acúmulo significativo (p<0,01; p<0,01 e p<0,001, respectivamente) na fase G2/M (31,0; 43,3 e 43,3%, respectivamente) nas células silenciadas e tratadas com a TMZ, porém em menos nível (p<0,05; p<0,01 e p<0,001, respectivamente) em relação ao acúmulo observado no tratamento somente com a TMZ. Assim, o silenciamento associado ao tratamento com a TMZ reduziu o bloqueio em G2/M causado pela droga. Por outro lado, a transfecção por si só não causou alterações evidentes na distribuição das células no ciclo celular (**Figura 12-B; Tabela 6**).

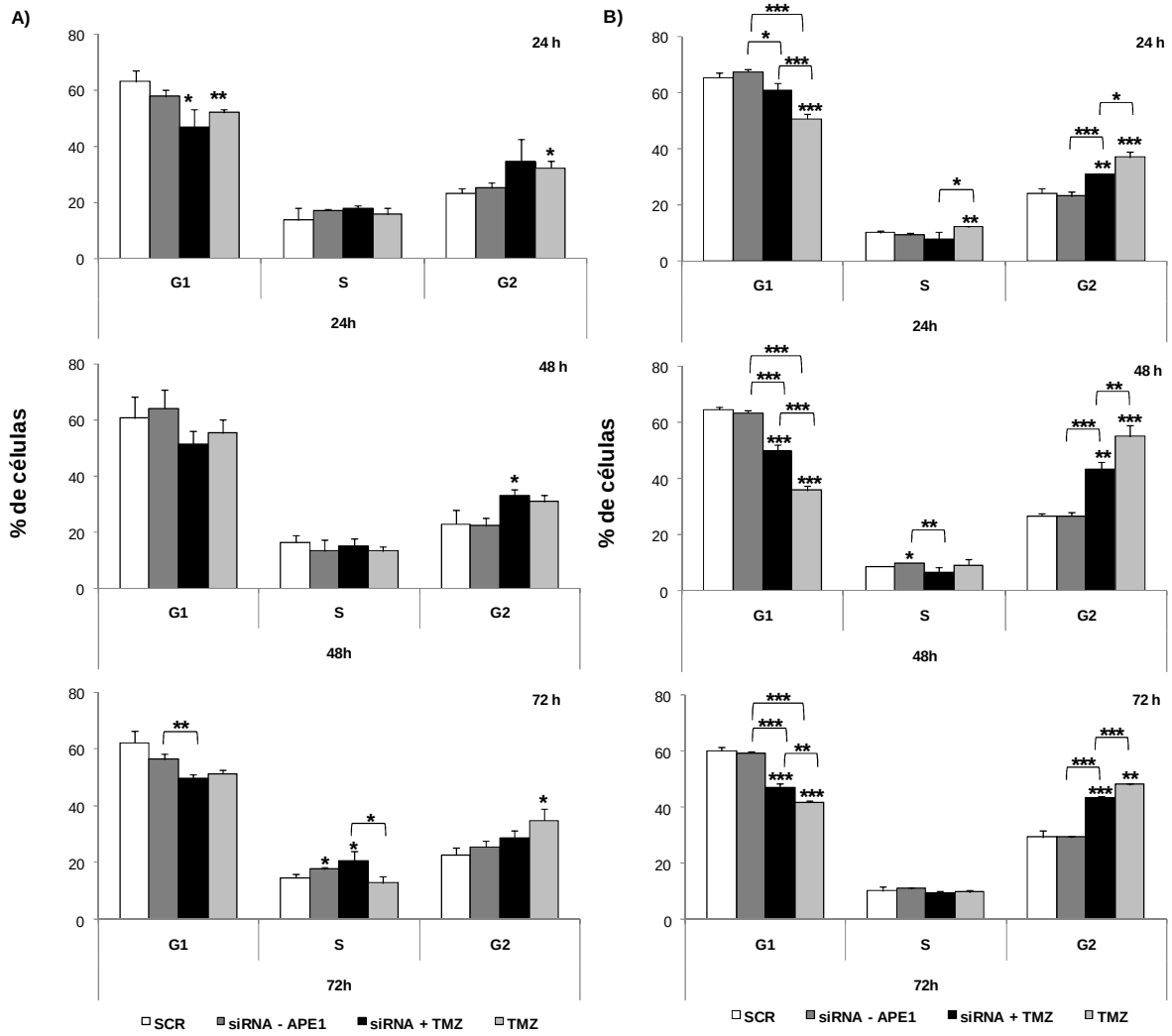

Figura 12: Distribuição das células T98G (**A**) e U87MG (**B**) em diferentes fases do ciclo celular em células transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento durante 24 h com 600 e 10 μM de TMZ, respectivamente, avaliadas por 24, 48 e 72 h. Os dados foram obtidos utilizando o sistema *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.

Tabela 6: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo celular nas linhagens T98G e U87MG, transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e submetidas a tratamento (24 h) com 600 µM e 10 µM de TMZ, respectivamente. Os dados foram obtidos utilizando o sistema *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	Grupos de tratamentos	Distrubuição de células nas fases do ciclo celular (%) (± Desvio Padrão)								
		Tempos de coleta (h)								
		24			48			72		
		Fases do ciclo celular								
		G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
T98G	***Scrambled***	63,0±3,9	13,6±4,3	23,2±1,9	60,5±7,7	16,4±2,8	22,9±4,9	62,3±4,2	14,7±1,5	22,8±2,6
	siRNA-APE1	57,7±2,4	17,1±0,6	25,0±2,2	64,3±6,6	13,4±3,8	22,4±2,6	56,5±1,9	17,7±0,8	25,7±2,0
	siRNA + TMZ	46,9±6,3	18,0±1,0	34,7±7,7	51,4±4,7	15,2±2,7	32,9±2,4	49,8±1,3	20,8±3,2	28,6±2,8
	TMZ - 600 µM	52,0±1,4	15,6±2,3	32,1±2,6	55,3±4,9	13,4±1,5	30,9±2,5	51,5±1,3	13,0±2,1	34,8±4,3
U87MG	***Scrambled***	65,5±1,7	10,2±0,5	24,3±1,8	64,7±0,8	8,7±0,3	26,6±1,0	60,2±1,3	10,3±1,4	29,5±2.5
	siRNA-APE1	67,6±1,0	9,3±0,6	23,1±1,5	63,4±1,0	9,9±0,4	26,7±1,3	59,5±0,5	11,0±0,3	29,4±0,4
	siRNA + TMZ	61,0±2,4	8,0±2,5	31,0±0,3	50,0±1,9	6,7±1,7	43,3±2,6	47,2±1,4	9,5±0,8	43,3±0,6
	TMZ - 10 µM	50,7±1,7	12,2±0,4	37,1±1,7	36,0±1,6	9,1±2,4	55,0±4,0	41,9±0,6	9,9±0,5	48,2±0,4

4.8. Indução de morte celular (apoptose e autofagia)

Os índices de morte celular por apoptose e autofagia foram determinados em resposta ao silenciamento do gene *APE1* e/ou tratamento com a TMZ.

A detecção de morte por apoptose foi avaliada pelo conteúdo sub-G1 (iodeto de propídio) e por meio do reagente anexina V (*Guava Nexin Reagent*, *Guava Technologies*). A autofagia foi detectada por meio da utilização do corante alaranjado de acridina.

4.8.1. Apoptose (sub-G1)

O conteúdo sub-G1 é um indicativo de apoptose por considerar a fragmentação do DNA, sendo que esta é possível de ser analisada nos mesmos experimentos de análise da cinética do ciclo celular. Nas células T98G, a indução de fragmentação do DNA foi observada nos primeiros ciclos de divisão celular (24 a 72 h), tendo ocorrido com maior intensidade nas células transfectadas com siRNA-APE1 e tratadas com a TMZ, sendo observado um aumento significativo de células na fase sub-G1 (16,7; 12,0 e 6,6%, respectivamente), em relação às células SCR, nos tempos de 24, 48 e 72 h (p<0,01; p<0,05 e p<0,05, respectivamente). No entanto, em 24 h, a TMZ induziu fragmentação significativa (p<0,01) praticamente equivalente à induzida (p<0,05) pelo silenciamento do gene *APE1* (**Figura 13-A; Tabela 7**).

Diferentemente, nas células U87MG, tanto o silenciamento do gene *APE1* quanto o tratamento com a TMZ (combinados ou não) não induziram o acúmulo de células em sub-G1 nos tempos de 24 e 48 h. Uma indução significativa do conteúdo sub-G1 (p<0,01) ocorreu apenas em 72 h nas células siRNA-APE1 tratadas com a TMZ (6,1%) em relação às células SCR (4,1%). Nesse mesmo tempo, comparando as células silenciadas e tratadas com a droga e as células apenas tratadas com a TMZ (4,3%), observou-se uma maior indução de fragmentação (p<0,05) comparativamente às células somente transfectadas (4,4%; p<0,001), embora em níveis baixos (**Figura 13-C; Tabela 7**).

4.8.2 Apoptose (anexina V):

Os resultados sobre a indução de apoptose nas células T98G avaliada em três, cinco e 10 dias mostraram que a combinação da transfecção e tratamento com a TMZ foi eficiente em induzir morte por apoptose após três e cinco dias, comparativamente aos grupos controles (células silenciadas ou apenas tratadas com a TMZ) e mesmo após um período mais longo de 10 dias. Para as células T98G silenciadas e tratadas com a TMZ, o pico de indução de apoptose (27,3%; p<0,001) ocorreu em três dias, mas as porcentagens de células positivas para anexina-V foram ainda elevadas após cinco (24,5%; *p*<0,001) e 10 dias (16,5%; *p*<0,001), com pequeno decréscimo em função do tempo. Entretanto, a transfecção por si própria também teve efeito na indução de apoptose nessas células, bem como o tratamento apenas com a TMZ. Esta induziu aumento significativo na frequência de apoptose somente em três e cinco dias (*p*<0,01), porém em menor nível ao observado nas células siRNA-APE1 tratadas. A transfecção do siRNA-APE1 também induziu aumento significativo na apoptose em cinco dias (7,7%; *p*<0,05) e em maior intensidade em 10 dias (19,6%; *p*<0,001) (**Figura 13-B; Tabela 8**).

Nos experimentos com a linhagem U87MG, a indução de apoptose foi significativa (*p*<0,001) em três dias para o grupo de células silenciadas e tratadas com a TMZ (16,4% de células positivas) e também para as células tratadas somente com a TMZ (14,0% de células positivas), havendo pouca diferença, embora significativa (*p*<0,05) entre esses grupos. Entretanto, em tempos posteriores (5 e 10 dias), a indução de apoptose ocorreu em níveis basais, com um pequeno aumento significativo (*p*<0,05) em 10 dias nas células transfectadas com o siRNA (**Figura 13-D; Tabela 8**).

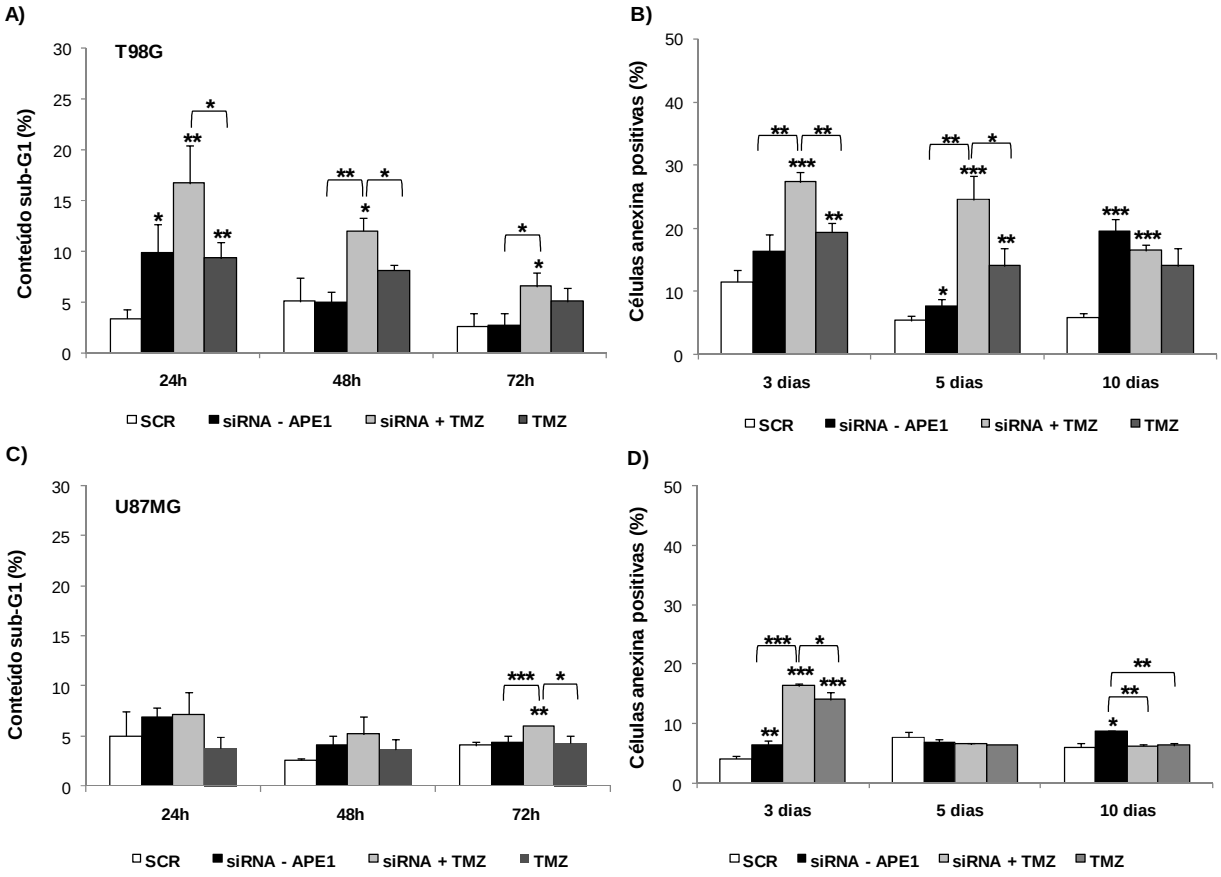

Figura 13: Células apoptóticas analisadas por conteúdo sub-G1 e anexina V, observadas na linhagem T98G (**A** e **B**, respectivamente) e U87MG (**C** e **D**, respectivamente) transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento de 24 h com 600 e 10 μM de TMZ respectivamente. A apoptose avaliada pela fração sub-G1 foi monitorada por 24, 48 e 72 h, enquanto a análise pelo reagente anexina V foi observada nos tempos de três, cinco e 10 dias. Para a detecção do conteúdo sub-G1 foi utilizado o corante iodeto de propídio e para identificar células positivas para anexina-V foi utilizado o *Guava Nexin® Reagent* (*Guava Technologies*), sendo ambos dados analisados por meio do sistema *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.

Tabela 7: Porcentagens de células apoptóticas pelo conteúdo sub-G1 coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 h após a remoção da droga. As células T98G e U87MG foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento (durante 24 h) com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. A análise foi realizada em células coradas com iodeto de propídio, usando-se o aparelho *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e o programa *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	**Grupos de tratamentos**	**Células Apoptóticas (%) sub-G1 (± Desvio Padrão)**		
		Tempos de coleta (h)		
		24	**48**	**72**
T98G	***Scrambled***	3,4 ± 0,9	5,1 ± 2,4	2,6 ± 1,3
	SiRNA - APE1	9,9 ± 2,7	5,0 ± 1,1	2,7 ± 1,2
	siRNA + TMZ	16,7 ± 3,8	12,0 ± 1,3	6,6± 1,3
	TMZ – 600 µM	9,4 ± 1,6	8,1 ± 0,6	5,1 ± 1,4
U87MG	***Scrambled***	5,1 ± 2,4	2,7 ± 0,2	4,1 ± 0,4
	SiRNA - APE1	6,9 ± 0,9	4,1 ± 0,9	4,4 ± 0,6
	siRNA + TMZ	7,2 ± 2,2	5,2 ± 1,8	6,1 ± 0,1
	TMZ – 10 µM	3,8 ± 1,1	3,7 ± 1,0	4,3 ± 0,8

Tabela 8: Porcentagens de células apoptóticas observada na linhagem T98G e U87MG e avaliada após tratamento com a TMZ. As células foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetida ao tratamento com 600 e 10 μM de TMZ por 24h, respectivamente, e analisadas por três, cinco e 10 dias. Na análise foi utilizado o *Guava Nexin® Reagent* (*Guava Technologies*) e os dados foram obtidos por meio do *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	**Grupos de tratamentos**	**Células Apoptóticas (%) Anexina V (± Desvio Padrão)**		
		Tempos de coleta (dias)		
		3	**5**	**10**
T98G	***Scrambled***	11,5 ± 1,8	5,4 ± 0,8	5,9 ± 0,6
	siRNA - APE1	16,3 ± 2,7	7,7 ± 1,1	19,6 ± 1,9
	siRNA + TMZ	27,3 ± 1,7	24,5 ± 3,9	16,5 ± 1,0
	TMZ – 600 μM	19,4 ± 1,4	14,1 ± 2,8	14,1 ± 2,7
U87MG	***Scrambled***	4,1 ± 0,5	7,7 ± 1,0	6,0 ± 0,8
	siRNA - APE1	6,4 ± 0,7	6,9 ± 0,5	8,7 ± 0,2
	siRNA + TMZ	16,4 ± 0,4	6,5 ± 0,1	6,2 ± 0,3
	TMZ – 10 μM	14,0 ± 1,2	6,4 ± 0,0	6,3 ± 0,4

4.8.3 Morte celular autofágica

A indução de morte por autofagia também foi avaliada nas células T98G e U87MG visando obter informações sobre outro tipo de morte que possa ter ocorrido sob as condições de transfecção com siRNA do gene *APE1* e tratamento com a TMZ. Após cinco dias do tratamento, foi observada uma porcentagem significativamente maior (p<0,01) de morte autofágica nas células T98G silenciadas e tratadas, sendo cerca de 3,8 vezes maior (12,9%) que a induzida pela droga TMZ (3,4%) ou pelo silenciamento de *APE1* por si próprio (2,8%), indicando que houve certa contribuição deste tipo de morte na eliminação dessas células (**Figura 14-A; Tabela 9**).

Para a linhagem U87MG não se observou aumento significativo nas porcentagens de células autofágicas em relação às células SCR (1,9%) a não ser por uma redução (p<0,01) nas células transfectadas (0,6%) e nas células tratadas somente com a TMZ (0,6%). A transfecção associada ao tratamento com a TMZ (2,0%) induziu um aumento significativo (p<0,05) somente quando comparadas com as células siRNA-APE1 tratadas e também com aquelas tratadas somente com a droga. Da mesma forma como observado para apoptose, essa linhagem mostrou baixos índices de morte por autofagia. Possivelmente, outros tipos de morte celular podem ter contribuído para a eliminação dessas células (**Figura 14-B; Tabela 9**).

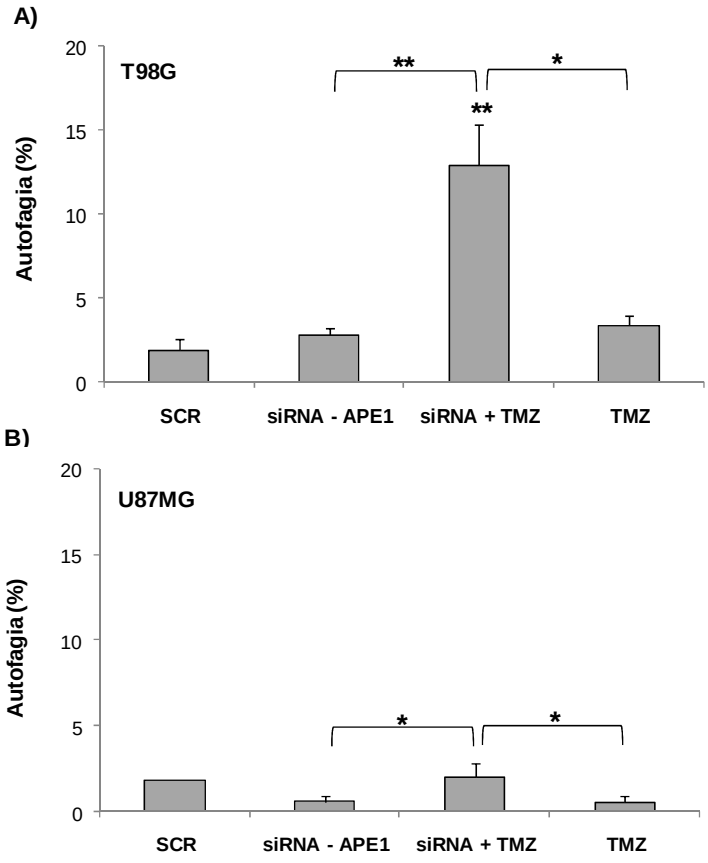

Figura 14: Avaliação de morte autofágica após cinco dias do tratamento das células T98G (**A**) e U87MG (**B**). As células foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. Na análise foi utilizada a coloração com alaranjado de acridina e os dados foram obtidos por meio do *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.

Tabela 9: Porcentagens de células autofágicas obtidas após cinco dias do tratamento das células T98G e U87MG. As células foram transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), submetidas ao tratamento de 600 e 10 μM de TMZ por 24 h, respectivamente. Para a análise foi utilizado o corante alaranjado de acridina e os dados foram obtidos por meio do *Guava EasyCyte Mini System* (*Guava Technologies*) e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*). Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	**Porcentagens de células autofágicas (± desvio padrão)**			
	Grupos de tratamentos			
	Scrambled	**siRNA - APE1**	**siRNA + TMZ**	**TMZ**
T98G	1,9 ± 0,7	2,8 ± 0,4	12,9 ± 2,5	3,4 ± 0,6
U87MG	1,9 ± 0,0	0,6 ± 0,3	2,0 ± 0,8	0,6 ± 0,3

4.9. Avaliação da capacidade de invasão das células após silenciamento e tratamento com a droga TMZ

Na linhagem T98G, a expressão reduzida do gene *APE1* foi capaz de diminuir significativamente (p<0,01) as porcentagens de células invasivas, tanto na ausência (25,7%) quanto na presença da droga TMZ (11,6%). A droga sozinha também causou um decréscimo equivalente na capacidade de invasão (25,6%) (**Figura 15-A; Tabela 10**).

Para a linhagem U87MG, a TMZ sozinha não foi capaz de reduzir a invasão celular. A transfecção mostrou apenas uma leve redução, não significativa, resultando em 81,7% de células invasivas. No entanto, nas células silenciadas e tratadas com a TMZ, notou-se um maior efeito da combinação no sentido de reduzir significativamente (p<0,001) a invasão, resultando em 36,9% de células invasivas. A redução da invasão nessas células mostrou-se estatisticamente significativa em relação às células somente transfectadas (p<0,01) ou relativamente às células tratadas com a TMZ (p<0,001) (**Figura 15-B; Tabela 10**).

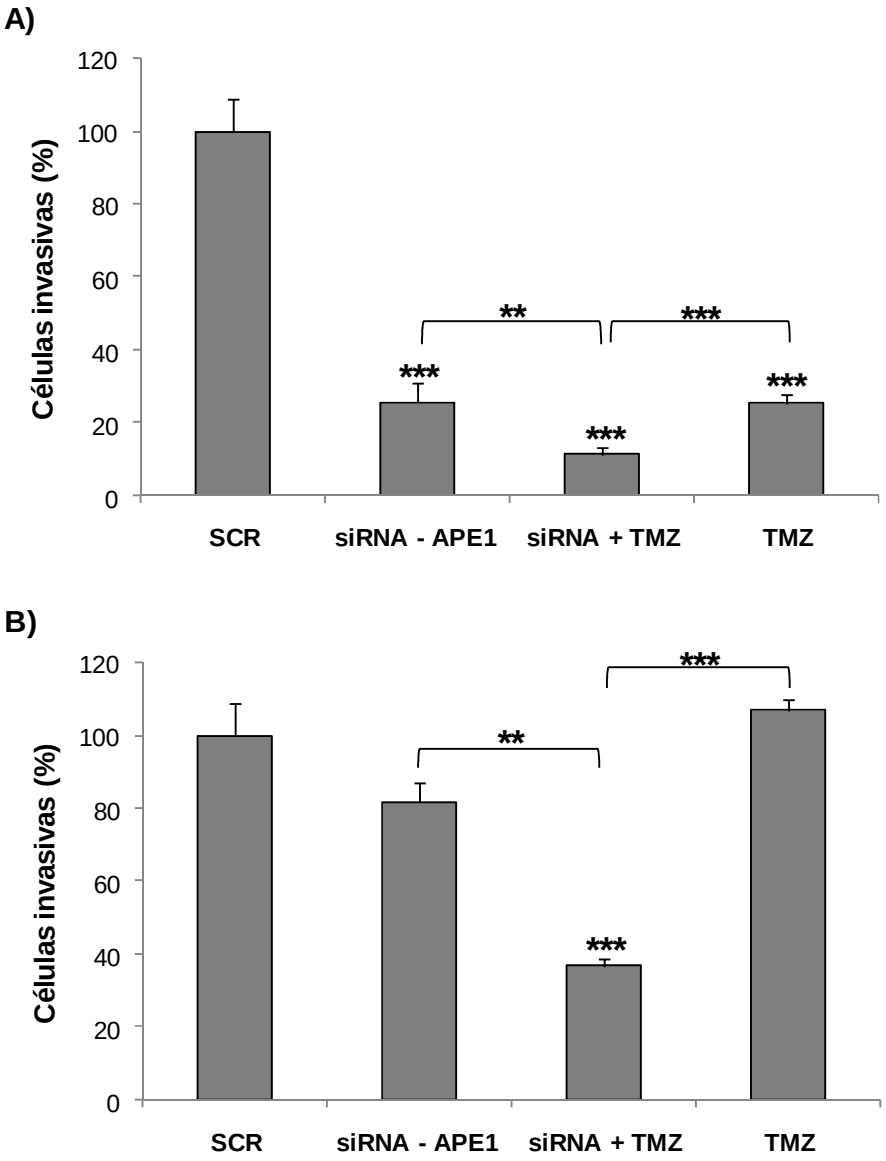

Figura 15: Análise da capacidade de invasão celular em células T98G (**A**) e U87MG (**B**) transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (*SCR),* tratadas com 600 e 10 µM da droga TMZ por 24 h, respectivamente. Foi analisada a capacidade de invasão em Matrigel após 22 h do tratamento com a droga. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média ± desvio padrão (± DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.

Tabela 10: Porcentagens de células T98G e U87MG invasivas após transfecção com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR) após tratamento com 600 e 10 µM da droga TMZ por 24 h, respectivamente. A capacidade de invasão em Matrigel foi analisada após 22 h do tratamento. Os valores são representativos de três experimentos independentes, expressos como média ± desvio padrão (± DP).

Linhagens	Invasão celular (%) (± Desvio Padrão)			
	Grupos de tratamentos			
	Scrambled	**siRNA - APE1**	**siRNA + TMZ**	**TMZ**
T98G	100,0 ± 8,9	25,7 ± 5,3	11,6 ± 1,9	25,6 ± 2,6
U87MG	100,0 ± 20,1	81,7 ± 14,7	36,9 ± 2,9	107,0 ± 8,5

4.10. Expressão transcricional dos genes COX2 e VEGF

No presente trabalho foi também analisada a expressão transcricional dos genes *VEGF* e *COX2* (alvos dos FTs HIF-1α e NFκB, respectivamente) nas células transfectadas com siRNA-APE1 e sequência SCR, e submetidas ao tratamento com a TMZ por 24 h. Os valores foram expressos como médias dos FC, normalizados para os genes de referência *HPRT1* e *TBP*, utilizando o programa *StepOne Software v2.2* (*Applied Biosystems*).

Os resultados de expressão gênica para os genes *COX2* e *VEGF* obtidos para a linhagem T98G mostraram que o silenciamento do gene *APE1* por si só não causou alterações significativas na expressão desses genes. Entretanto, após o tratamento com a droga, foi observada uma pequena repressão do gene *COX2* causada pela TMZ (*FC*= -0,77; $p<0,05$), independentemente do silenciamento do gene *APE1* (*FC*= -0,95; $p<0,01$) em relação às células somente silenciadas (*FC*= 1,19). Por outro lado, esse mesmo gene não sofreu alterações significativas na sua expressão na linhagem U87MG (**Figura 16, Tabela 11**). O gene *VEGF*, em ambas as linhagens, foi modulado pelo tratamento com a TMZ. Nas células T98G, como observado para o gene *COX2*, o tratamento com a TMZ (*FC*= -0,53; $p<0,05$) ocasionou uma leve repressão transcricional, mesmo nas células siRNA-APE1 tratadas (*FC*= -0,60; $p<0,01$) quando comparadas com as células somente

silenciadas (*FC*= -0,08) e com as células SCR (*FC*= -0,00; *p*<0,01 e *p*<0,001, respectivamente). Diferentemente, na linhagem U87MG, foi observada uma leve indução significativa do gene *VEGF*, nas células tratadas com a TMZ (*FC*= 0,53; p<0,01), bem como nas células silenciadas e tratadas (*FC*= 0,34; p<0,01), relativamente às células somente silenciadas (*FC*= -0,16). Foi também observada uma indução significativa de *VEGF* quando comparados ambos os tratamentos (siRNA-APE1 + TMZ e TMZ) em relação às células SCR (*FC*= -0,00; *p*<0,001 e *p*<0,001, respectivamente). Esse gene foi o único a mostrar diferenças significativas entre as células U87MG silenciadas e tratadas e as células somente tratadas com a TMZ, com uma maior indução nessa última (*p*<0,001) (**Figura 16, Tabela 11**).

De forma geral, o silenciamento de *APE1* em ambas as linhagens não exerceu um efeito significativo na expressão dos genes *COX2* e *VEGF,* indicando o que a função redox de APE1 provavelmente não foi afetada pelo silenciamento parcial do gene.

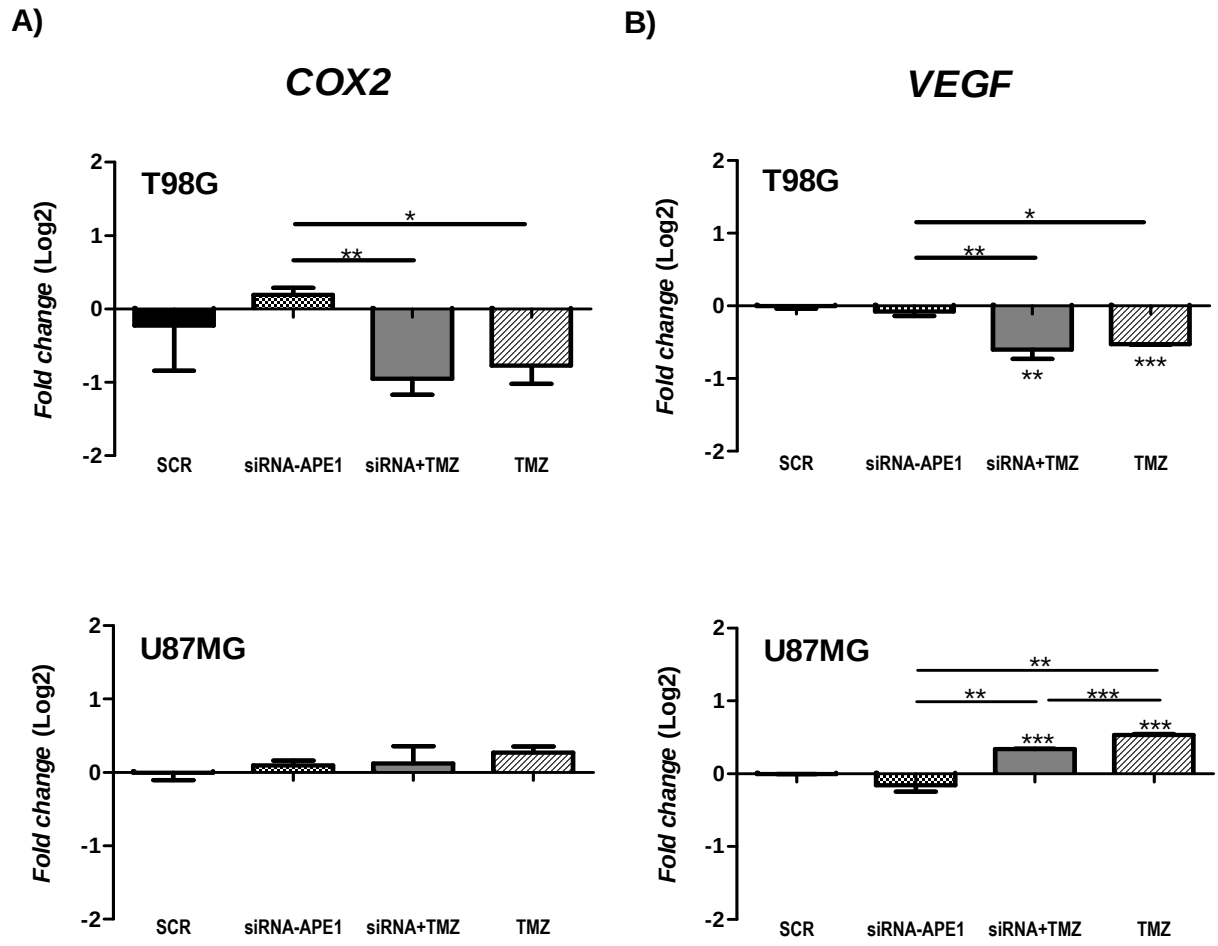

Figura 16: Expressão gênica transcricional dos genes *COX2* (**A**) *e VEGF* (**B**) em células T98G e U87MG transfectadas com 80 nM de siRNA do gene *APE1* e sequência *scrambled* (SCR), analisadas após o tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. Os resultados obtidos de expressão gênica relativa foram representados em *Fold-Change* (Log_2). Os valores são provenientes de dois experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão (± EP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Os símbolos isolados representam a comparação com a sequência SCR e os símbolos com chaves, a comparação entre os tratamentos indicados.

Tabela 11: Valores da análise de expressão gênica por q-PCR em tempo real analisados para os genes *COX2* e *VEGF*, em células T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1,* analisadas após o tratamento de 24 h com 600 e 10 µM de TMZ, respectivamente. Os valores dos níveis de expressão transcricional foram expressos em *Fold Change* (Log2)*,* utilizado o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores são provenientes de dois experimentos independentes e expressos como média ± erro padrão (± EP).

Linhagens	**Grupos de Tratamentos**	**Médias de *Fold Change* (Log2) (± Erro Padrão)**	
		Genes	
		COX2	***VEGF***
T98G	**Scrambled**	-0,23 ± 0,61	-0,00 ± 0,04
	siRNA - APE1	1,19 ± 0,10	-0,08 ± 0,06
	siRNA + TMZ	-0,95 ± 0,22	-0,60 ± 0,13
	TMZ – 600 µM	-0,77 ± 0,25	-0,53 ± 0,01
U87MG	**Scrambled**	-0,01 ± 0,10	-0,00 ± 0,00
	siRNA - APE1	0,09 ± 0,06	-0,16 ± 0,09
	siRNA + TMZ	0,12 ± 0,24	0,34 ± 0,00
	TMZ – 10 µM	0,27 ± 0,08	0,53 ± 0,02

4.11. Avaliação da expressão proteica de H2AX$^{(ser139)}$, caspase 3 e p65$^{(ser536)}$

Avaliou-se a expressão de proteínas envolvidas na resposta ao dano no DNA (H2AX$^{(ser139)}$), morte celular (caspase-3), bem como o FT HIF-1α e p65$^{(ser536)}$ por *Western blotting*. Nas células T98G e U87MG foi possível observar uma maior indução de γH2AX no grupo silenciado para *APE1* e tratado com a TMZ em relação ao somente tratado com a TMZ, avaliadas em três e cinco dias. Da mesma forma, uma maior indução da proteína p65 fosforilada foi observada em ambas as linhagens silenciadas e tratadas com a droga analisadas nesses mesmos dias. Entretanto, a clivagem de caspase-3 ocorreu apenas após cinco dias de tratamento nas células T98G de forma semelhante nos grupos siRNA-APE1 tratado com a TMZ e o somente tratado com a droga. Entretanto, a proteína HIF-1α não apresentou níveis de expressão detectáveis em ambas as linhagens avaliadas em três dias (**Figura 17**).

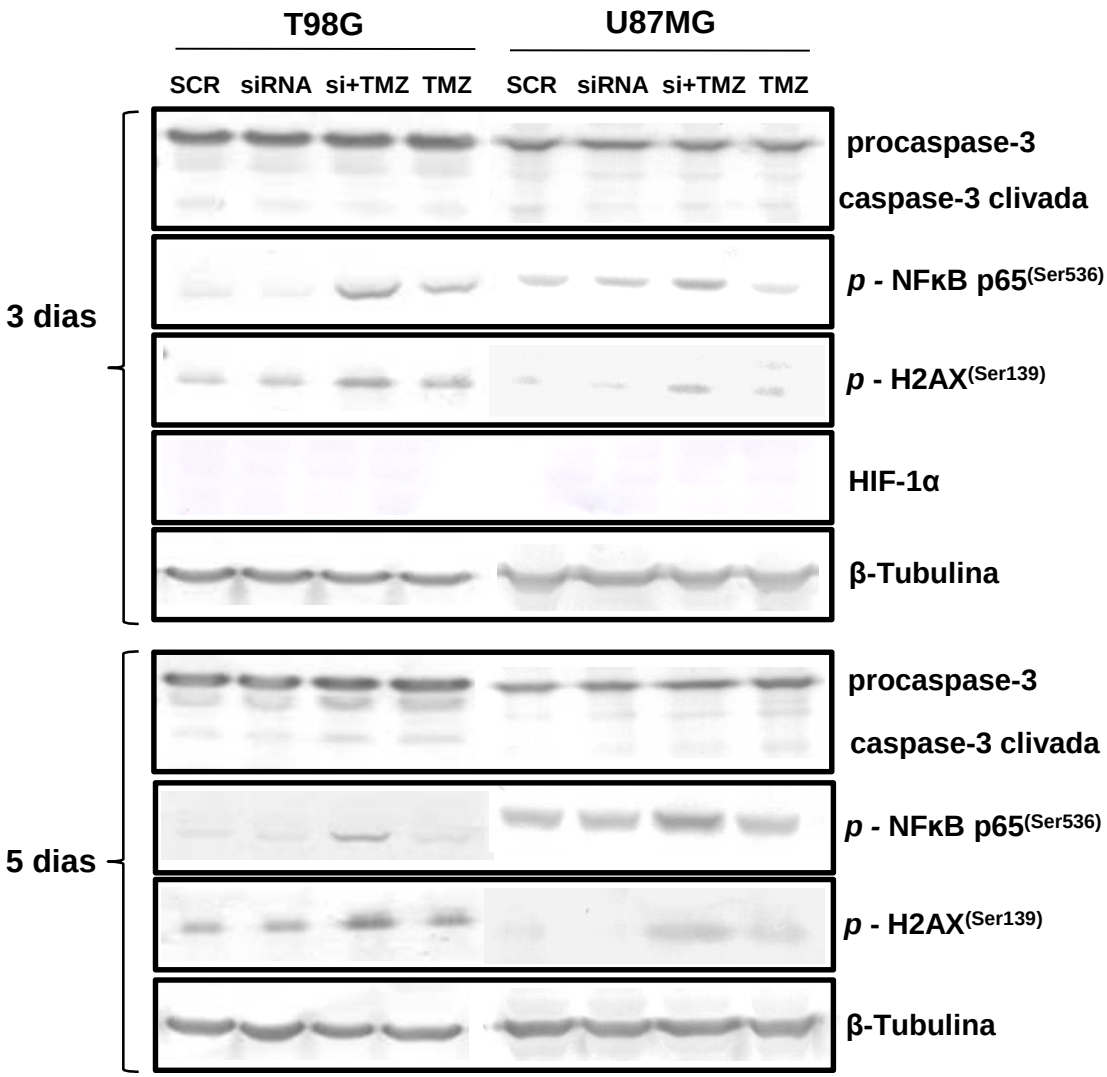

Figura 17: Expressão proteica avaliada por *Western blotting* em células das linhagens T98G e U87MG transfectadas com 80 nM do siRNA do gene *APE1* e sequência s*crambled* (SCR), tratadas por 24 h com a droga TMZ (600 µM e 10 µM, respectivamente). A análise foi realizada após três e cinco dias do tratamento, usando-se anticorpos para as seguintes proteínas: HIF-1α (112 kDa), pró-caspase-3 (38 kDa), *p*NFkBp65$^{(ser536)}$ (65 kDa) e *p*H2AX$^{(ser139)}$ (15 kDa). O anticorpo para β-Tubulina (55 kDa) foi utilizado como controle endógeno.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos de ação de drogas antitumorais envolvem vias complexas de respostas aos danos induzidos no DNA que ainda são pouco compreendidas. Além disso, a resistência adquirida ou intrínseca aos agentes citotóxicos associados às diferentes respostas dos tumores continua sendo o principal obstáculo no tratamento do câncer (Sarkaria et al., 2008). Apesar dos avanços alcançados para os pacientes com GBM, o prognóstico ainda permanece sem expectativa de melhora (Bai et al., 2011). Assim, novos alvos terapêuticos necessitam ser desenvolvidos com o propósito de aumentar a sobrevida desses pacientes (Khasraw e Lassman, 2010).

A terapia específica para alvos moleculares tais como, receptores de fatores de crescimento, proteínas do ciclo celular e de reparo, entre outros, tem se tornado abordagens de grande interesse no tratamento do câncer (Kelley e Fishel, 2008), mas ainda é pouco explorada. Mecanismos de reparo do DNA constituem a base molecular da defesa contra os danos no DNA e desempenham um papel importante na proteção da estabilidade e integridade genômica (Wang et al., 2009). Dessa forma, a capacidade de reparo do DNA em células tumorais é uma das responsáveis pela resistência destas às drogas antitumorais ou às radiações, limitando enormemente a eficácia desses agentes. Assim, o emprego de inibidores de reparo, por exemplo, da via BER (alvo do presente estudo), torna-se uma estratégia potencial e atrativa para a radio- ou quimio-sensibilização (Jiang et al, 2010; Li et al., 2012; Chen et al, 2013; Gu et al., 2013).

Em um trabalho anterior, verificou-se que o reparo via BER pode estar envolvido nas respostas à TMZ, pois a utilização da metoxiamina (MX), um bloqueador dessa via de reparo, resultou em um aumento de danos no DNA, morte celular clonogênica e redução dos níveis de expressão de duas proteínas (FEN1 e APE1) participantes da via BER; tais resultados mostraram que a MX potencializou os efeitos de morte causada pela TMZ em células resistentes a esse quimioterápico (Montaldi e Sakamoto-Hojo, 2012). Com base nesses resultados, foi proposto no presente trabalho uma intervenção direta, por meio da estratégia de silenciamento pela metodologia de siRNA, de um gene participante dessa via de reparo, o gene *APE1*, na tentativa de avaliar se realmente o reparo via BER pode contribuir para a

resistência de linhagens de GBM ao tratamento com a TMZ, bem como avaliar a influência do gene APE1 no processo de ativação redox de fatores de transcrição.

A inibição do gene *APE1* foi confirmada por *Western blot*, o qual mostrou uma redução máxima, de 46,7% em 72 h e de 76,7% em 96 h, na expressão da proteína APE1 em células T98G e U87MG, respectivamente.

Primeiramente, foi realizado um ensaio para a avaliação da proliferação celular até três dias, sendo observada uma pequena sensibilização das células T98G silenciadas, com redução máxima significativa da proliferação celular em 48 h (25%). Quando as células T98G silenciadas foram tratadas com a TMZ, observamos uma redução máxima de 39,6% (72 h) na proliferação celular, o que não foi observado nas células somente tratadas com a TMZ. Para verificar a influência dos tratamentos sobre a capacidade reprodutiva das células, realizou-se o ensaio de sobrevivência clonogênica, o qual requer análise após um período mais longo do tratamento (10 dias). O silenciamento de *APE1* por si só não exerceu efeito inibitório na capacidade de formar colônias. É possivel que após esse tempo, a expressão da proteína APE1 tenha sido restabelecida. Um efeito ainda mais acentuado foi observado nas células T98G silenciadas, com uma queda na formação de colônias de 63,1%, correspondendo a cerca de três vezes em relação ao obtido no tratamento com a TMZ (21%). Desta forma, as células transfectadas com o siRNA para APE1 e tratadas com a TMZ mostraram um maior efeito anti-proliferativo em relação ao tratamento com a droga isoladamente. Na linhagem U87MG o silenciamento não provocou redução da proliferação, da mesma forma que na sobrevivência clonogênica avaliada após 10 dias. Entretanto, nessas células silenciadas e tratadas, a queda na sobrevivência clonogênica foi praticamente devida ao tratamento com a TMZ, não sendo influenciada pelo silenciamento de *APE1*. Vale ressaltar que as células U87MG se mostraram mais sensíveis à TMZ em comparação às células T98G, que se mostraram resistentes, conforme demonstrado no ensaio de sobrevivência clonogênica, no qual várias concentrações da droga foram testadas. Interessantemente, as células T98G foram sensibilizadas ao tratamento com a TMZ pela redução na expressão de APE1.

Em gliomas, o aumento na atividade de APE1 foi relatado como sendo um marcador da tumorigênese glial, provavelmente devido, em parte, em resposta ao aumento do metabolismo oxidativo (Bobola et. al., 2001), o qual pode contribuir para a resistência intrínseca aos agentes alquilantes (Silber et al., 2002). Segundo Fung e

Demple (2005), mesmo na ausência de danos exógenos no DNA, o siRNA dirigido contra o gene *APE1* em células humanas (células linfoblastóides, câncer de cólon e mama) resultou em uma diminuição na proliferação acompanhada da elevação de sítios AP e aumento dos níveis de apoptose. Esse fato está de acordo com nossas observações quanto à redução da proliferação obtida na linhagem T98G silenciada avaliada até três dias. É possível que o silenciamento desse gene (o qual participa no reparo via BER) possa ter ocasionado falha nas respostas de defesa das células T98G, causando uma redução da proliferação ou morte celular devido aos níveis elevados de danos basais não reparados na ausência de APE1, o que não ocorreu na linhagem U87MG. De forma semelhante, os danos causados pela TMZ, os quais não foram corrigidos pelo reparo via BER (supostamente devido ao silenciamento de *APE1*), possam ter levado ao bloqueio da duplicação ou à morte dessas células, visto que a TMZ pode ter causado a indução de sítios AP não reparados. Sabe-se que sítios AP não adequadamente processados, podem gerar SSBs e DSBs no DNA, aumentando a citotoxicidade para as células em divisão (Taverna et al., 2001; Drablos et al., 2004), o que pode ter ocorrido nessas células. Mesmo considerando a possibilidade de que a expressão de APE1 tenha sido restaurada em 10 dias, os danos causados pela TMZ podem ter sido irreversíveis nas células T98G silenciadas, ocasionando redução da capacidade reprodutiva das mesmas.

A divergência observada nas respostas entre as linhagens pode ser explicada pelo fato de as mesmas apresentarem alterações genéticas diferentes; por exemplo, o gene *TP53* encontra-se mutado na linhagem T98G, sendo selvagem na linhagem U87MG (Ishii et al., 1999). Foi demonstrado que o gene *TP53* selvagem (mas não a forma mutada) regula negativamente a expressão de *APE1* em células de carcinoma de cólon HCT116 (Zaky et al., 2008). Esses mesmos pesquisadores, usando ensaio de imunoprecipitação de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation* - ChIP assay), demonstraram que a proteína TP53 se liga ao promotor de *APE1*, indicando que sua repressão não é mediada via ligação direta a elementos *cis* regulatórios, mas envolve o direto recrutamento dessa proteína por outros FTs (possivelmente Sp1).

Esses achados são interessantes, pois TP53 atua como um fator pró-apoptótico na resposta celular ao estresse; por outro lado APE1 é uma proteína pró-sobrevivência, cuja função de reparo do DNA é essencial para proteger as células contra danos oxidativos. Provavelmente, as células utilizam a TP53 para controlar negativamente a expressão de *APE1* em resposta a danos no DNA (Bhakat et al.,

2009). Também é conhecido que a linhagem U87MG não apresenta a atividade da enzima MGMT, principal mecanismo de resistência à TMZ, ao contrário da linhagem T98G (Hermisson et al., 2006). Interessantemente, a linhagem T98G, que é altamente resistente ao tratamento com a TMZ, mostrou-se sensibilizada perante o silenciamento do gene *APE1* e tratamento com a droga, com consequente interrupção da via BER de reparo. Esse fato ocorreu independentemente do principal mecanismo de reparo associado à resistência ao tratamento com a TMZ, o reparo MGMT, outro mecanismo regulado negativamente por TP53 (Harris et al., 1996; Grombache et al., 1998; Srivenugopal et al., 2001). Dessa forma, existe a possibilidade de que em resposta aos danos causados pela TMZ nas células U87MG, a TP53 provavelmente regula a expressão de *APE1*, o que tornou indiferente a redução da expressão dessa proteína, mesmo que parcial, resultando em uma ausência de resposta como observado no ensaio de proliferação e sobrevivência clonogênica.

O efeito anti-proliferativo observado nas células T98G silenciadas e tratadas pode ter sido consequência de uma maior indução de danos no DNA. Nos experimentos de ensaio cometa, foi observada uma maior porcentagem de danos nos tempos de zero e seis horas (mais acentuado) após o tratamento com a TMZ nas células T98G silenciadas, o que não foi notado no outros grupos de tratamento. Esses dados são compatíveis com os relatados por Danson e Middleton (2001), os quais observaram que em cinco horas após o tratamento, a TMZ causou o máximo de quebras no DNA. Entretanto, no presente trabalho, em 24 h houve uma tendência à recuperação desses danos. O mesmo ocorreu na linhagem U87MG, com uma maior indução de danos nas células silenciadas e tratadas, nos mesmos tempos avaliados, embora em menor nível relativo ao observado para a linhagem T98G. Para os grupos de tratamentos, a recuperação dos danos ocorreu de forma semelhante, mesmo considerando as células silenciadas para *APE1* e tratadas com a TMZ, as quais apresentaram níveis maiores de danos. Porém, o ensaio cometa não indica até que ponto essa recuperação direciona as células à sobrevivência, ou se uma parte dessas pode ser conduzida à morte.

Segundo McNeill et al. (2009) a monofuncionalidade (único grupo reativo, reagindo covalentemente com um único centro nucleofílico do DNA), uma propensão para formar adutos de N7-guanina e N3-adenina e uma baixa capacidade de gerar modificações O6-guanina ou *crosslinks* inter/intracadeia no DNA são, coletivamente,

indicadores para o potencial envolvimento de APE1 e BER em resposta a agentes alquilantes, como é o caso da TMZ. Esse fato sugere que o aumento dos danos provocados pela TMZ nas células silenciadas seja devido às lesões induzidas por essa droga, as quais não foram reparadas devido ao silenciamento, ainda que parcial, do gene *APE1*. Esse fato corrobora a observação de que a droga TMZ causou um intenso recrutamento de APE1 no núcleo duas horas após o tratamento, como observado nos resultados de imunofluorescência para a linhagem T98G. Por outro lado, devido ao silenciamento de *APE1*, uma menor ou ausente marcação nuclear foi observada em resposta ao tratamento, evidenciando que essas lesões provavelmente não foram reparadas.

Um recente trabalho ressaltou que lesões 3-metil-A são tóxicas devido à sua capacidade de bloquear diretamente a polimerização do DNA, inibindo assim a sua duplicação (Iyer et at., 2012) e conduzindo a efeitos de morte em GBM, sendo que MPG (*Methylpurine DNA glycosylase*), a única glicosilase que remove esse tipo de lesão, e APE1, a principal endonuclease AP humana, são mediadoras da resistência à TMZ em GBM, representando assim, potenciais alvos anti-resistência (Bobola et al., 2012). Considerando que agentes metilantes e cloroetilantes produzem uma diversidade de purinas N-alquil e pirimidinas no DNA, a atividade endonucleásica da enzima APE1 torna-se a principal entre as enzimas de reparo para esse tipo de dano (Beranek, 1990; Ludlum, 1997), uma vez que essas bases alquiladas constituem 50 a 80% das lesões induzidas por esses agentes. A N-alquilação promove a formação de sítios abásicos por desestabilizar o vínculo glicosídico entre a base e a desoxirribose (Loeb e Preston, 2000) e por criar substratos para a DNA glicosilase que clivam as ligações glicosídicas em nucleotídeos danificados (Krokan et al., 2000). Essas observações indicam que lesões de base predominantemente produzidas por agentes alquilantes são precursoras de sítios abásicos que impedem a síntese de DNA pela DNA polimerase replicativa levando ao bloqueio da duplicação do DNA, uma fonte aparente de citotoxicidade (Loeb e Preston, 2000; Yuan et al., 2000; Sutton e Walker, 2001). Esse fato também foi demonstrado por estudos *in vivo,* em que intermediários tóxicos de BER, inicialmente tolerados pela via de reparo homólogo (HR - *Homologous Recombination*) induzem aumento de SCE, as quais levam ao bloqueio da síntese de DNA e citotoxicidade caso não sejam reparados (Sobol et al., 2003).

No presente trabalho, avaliamos se esses intermediários tóxicos do BER induzidos pela TMZ e não reparados devido ao silenciamento do gene *APE1* foram capazes de provocar alterações na cinética do ciclo celular, ou um bloqueio da síntese de DNA. A análise da progressão das células no ciclo celular mostrou que a TMZ administrada às culturas de células T98G causou um acúmulo significativo de células em G2/M, independentemente da inibição do gene *APE1*, mostrando o efeito predominantemente causado pela droga. Entretanto, o silenciamento por si próprio causou um bloqueio na fase S, embora apenas no tempo de 72 h, sendo que efeito semelhante ocorreu quando as células foram silenciadas e tratadas com a TMZ. A presença de sítios abásicos não reparados pode ter impedido a síntese de DNA pela DNA polimerase, levando ao bloqueio da duplicação do DNA e aumento de células na fase S. Diferentemente, na linhagem U87MG a TMZ induziu forte bloqueio em G2/M, tanto nas células silenciadas como naquelas apenas tratadas com a droga, embora o silenciamento de *APE1* não tenha influenciado o bloqueio em G2/M, havendo o predomínio do efeito da TMZ.

A expressão de APE1 em células de camundongo NIH3T3 é dependente do ciclo celular, sendo observado um maior nível dessa proteína no início ou no meio da fase S, apontando uma função particular de APE1 nessa fase do ciclo celular (Fung et al., 2001). De forma semelhante, Fishel et al. (2008) utilizaram o siRNA para o gene *APE1* em células tumorais de ovário (SKOV3x) e, na ausência de danos exógenos, demonstraram uma inibição do crescimento celular, sugerindo que o *knockdown* desse gene retarda a progressão das células aumentando a extensão da fase S, também avaliada em três dias, da mesma forma que em nosso estudo. Interessantemente, as células T98G, resistentes à TMZ, não foram capazes de sofrer bloqueio em G2/M da mesma forma que as células U87MG (sensíveis à droga).

Com relação aos efeitos da TMZ em células de glioma, foi relatado que essa droga induz bloqueio em G2/M do ciclo celular dependente de *TP53* seguido por senescência (Tentori et al., 2002; Hirose et al., 2001), ou ainda uma via independente de *TP53*, conduzindo à catástrofe mitótica (Hirose et al., 2001). Como mencionado *TP53* não é necessário para induzir bloqueio em G2/M, porém esse determina a duração desse bloqueio, acompanhado de alterações mínimas na expressão de TP53 ou $p21^{Waf1}$ (Hirose et al., 2001). Logo, é possível que as alterações genéticas intrínsecas a cada linhagem revelem respostas diferentes para

os mesmos tratamentos, principalmente quanto à proficiência do gene *TP53* na linhagem U87MG, já que este atua bloqueando o ciclo em G2/M via $p21^{waf1}$ (Bunz et al., 1998; Winters et al., 1998) e que nessa linhagem, esse bloqueio foi extremamente elevado, sobrepondo-se aos efeitos da expressão reduzida de APE1. Foi relatado que a redução da expressão de APE1 resultou em taxas de proliferação diminuídas, havendo a recuperação quando a expressão desse gene foi restaurada, demonstrando que essa proteína é vital para a propagação de sinalização de crescimento e, em certos tipos de células, resulta em morte celular por apoptose (Yang et al., 2007; Zou et al., 2007; Fung e Demple, 2005). Nesse contexto, no presente trabalho, o silenciamento de *APE1* associado ao tratamento com a TMZ na linhagem T98G induziu um aumento nos níveis de apoptose (analisada pelo conteúdo sub-G1 e pela detecção de células positivas para anexina V). O monitoramento por três dias avaliado pelo conteúdo sub-G1, um indicativo de apoptose, revelou uma maior indução desta nas células T98G transfectadas e tratadas com a TMZ, verificada a partir de 24 h após o término do tratamento, sendo que a transfecção com o siRNA-APE1 e o tratamento com a droga, ambos isoladamente, exerceram um efeito em menor grau. Células apoptóticas (detectadas como anexina V-positivas) atingiram o máximo de 27,3% após três dias do tratamento, permanecendo até 10 dias, porém em menor intensidade. Diferentemente, nas células da linhagem U87MG silenciadas e tratadas com a TMZ, o aumento da fragmentação ocorreu em menor nível e apenas em 72 h, conforme avaliado por ambas as metodologias; no entanto, a TMZ também mostrou efeitos na indução de apoptose, embora em menor grau. As duas metodologias avaliadas mostraram a mesma tendência dos resultados, porém, o método de detecção pela anexina V apresenta uma maior especificidade no sentido de detectar apoptose (inicial e final), relativamente ao método de análise do conteúdo sub-G1 (que detecta apenas fragmentação do DNA); assim, foram demonstrados níveis mais elevados de indução de apoptose em três dias. Conjuntamente, os resultados obtidos mostraram que o silenciamento do gene *APE1* (alcançado pela transfecção do siRNA-APE1) associado ao tratamento com a TMZ nas células T98G induziu um aumento moderado nos índices de apoptose, sendo esta contínua ao longo dos dias que sucederam o tratamento. Entretanto, no caso dos ensaios realizados nas células U87MG, os dados mostraram que a apoptose não deve ser o principal mecanismo de morte celular, visto a baixa indução observada nessas células.

Yang et al. (2007) também demonstraram que a redução da expressão de APE1 induziu morte celular por apoptose na presença de danos exógenos, além de resultar em um lento crescimento, o que corrobora os nossos resultados. Assim, a indução de apoptose nas células T98G silenciadas e tratadas com a TMZ pode ter exercido uma influência no sentido de reduzir a proliferação e sobrevivência clonogênica, conforme observado nessas células. Outros trabalhos também demonstraram a indução de apoptose em condições de reduzida expressão de APE1 e tratamento com outros agentes, como a cisplatina (Wang et al. 2009), gemcitabina (Xiong et al. 2010), bleomicina (Fung e Demple, 2011) e radiação (Chen et al., 2013). Nesse último trabalho, foi relatada uma elevação dos índices apoptóticos, em torno de 16%, após *knockdown* de *APE1* em resposta às radiações em células de câncer pancreático, valores similares ao observado no presente estudo.

Com a finalidade de confirmar a presença de danos no DNA nos grupos de tratamentos e correlacioná-los com a indução de morte celular nos tempos estudados, determinamos os níveis de expressão de H2AX fosforilada (γH2AX). Estes foram maiores nas células T98G transfectadas e tratadas com a TMZ, em relação às células somente tratadas após três e cinco dias. Nesse último tempo, o aumento da expressão de γH2AX teve correlação com uma pequena elevação na expressão de caspase-3 clivada, sugerindo que os efeitos da combinação persistiram até esse tempo, levando à formação de DSBs no DNA, sendo acompanhados pela indução de apoptose. No entanto, nas células U87MG, a indução de γH2AX ocorreu em menor intensidade, mas não se observou um aumento nos níveis de caspase-3. Foi relatado que sítios AP incompletamente reparados quando MX foi associado à TMZ também induziram um aumento da expressão de γH2AX devido à elevação dos níveis de SSBs e DSBs, que por sua vez, levaram á morte celular por apoptose (Taverna et al., 2001; Rinne et al., 2004; Fishel et al., 2007).

A proteína H2AX atua como um sensor de quebras de fita dupla no DNA; na presença dessas lesões no DNA, H2AX é fosforilada e se liga às quebras, sinalizando essas lesões e facilitando o recrutamento da maquinaria de reparo do DNA e de remodeladores da cromatina, o que permite restaurar a integridade genômica (Kuo e Yang, 2008; Srivastava et al., 2009). Interessantemente, uma elevação dos níveis de H2AX fosforilada em três dias nas células T98G correlaciona

com o bloqueio na fase S. Ewald et al. (2007) também relataram em células submetidas a tratamento com gemcitabina uma correlação entre a fosforilação de H2AX, interrupção da síntese de DNA, bloqueio na fase S e a ativação de proteínas de *checkpoint* dessa fase. Essa indução também sugere que a persistência das lesões de base podem ter gerado DSBs, possivelmente devido à ausência de processamento dessas lesões por APE1, elevando assim os níveis de γH2AX. No presente trabalho, em especial no caso das células T98G, também foi possível correlacionar a indução de γH2AX com a indução de caspase-3, indicando a associação entre a indução de quebras e a indução de morte por apoptose. Entretanto, nas células U87MG a indução de γH2AX pode estar relacionada a outros eventos celulares, diferentes dos observados nas células T98G.

Estudos envolvendo o silenciamento do gene *APE1* em linhagem de osteosarcoma mostraram uma maior sensibilidade às radiações e ao tratamento com MMS, H_2O_2, agentes alquilantes e oxidantes, com base nos resultados de indução de apoptose provavelmente resultante da redução da atividade de endonuclease desse gene (Wang et al., 2004). Em células HeLa, o silenciamento do gene *APE1* induziu apoptose pela via intrínseca por comprometimento da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c e AIF (Vascotto et al., 2009a), porém, em ambos os trabalhos não foi utilizada a TMZ como tratamento.

Não existe um consenso na literatura sobre os mecanismos de indução de apoptose em GBMs, mas em geral, esses tumores apresentam resistência a esse tipo de morte (Krakstad e Chekenya, 2010). Roos colaboradores (2007) mostraram que células de glioma sofrem apoptose dependente da concentração e tempo de tratamento com agentes metilantes, e que esta é dependente do *status* do gene *TP53* (selvagem ou mutado). Segundo esses autores, células de glioma mutadas para *TP53* sofrem apoptose pela ativação da via mitocondrial, antecedida pelo declínio da expressão de BCL-2 e ativação de caspase-9 e -3. Contudo, segundo esses autores, células com *TP53* selvagem sofrem apoptose via receptor Fas/CD95/Apo-1, com ativação de caspase-8. Dessa forma, a falta de expressão de caspase-3 nas células U87MG pode provavelmente ser explicada pelo *status* selvagem de *TP53* nessas células.

Por outro lado, outros autores relataram que a TMZ induz autofagia, mas não apoptose (Kanzawa et al., 2004). Entretanto, foi relatado que células de gliomas, em resposta ao tratamento com a TMZ, sofrem autofagia seguida de senescência ou

apoptose de forma tempo-dependente, com uma complexa interação entres os mesmos, sendo a decisão de morte ou sobrevivência dependente do balanço entre esses mecanismos. Porém, esses efeitos são abolidos em células que expressam MGMT, sugerindo que lesões O6-metil-G são responsáveis por induzir autofagia nessas células (Knizhnik et al., 2013). Assim, a indução de morte autofágica também foi avaliada nas linhagens T98G e U87MG. Em nosso estudo, os resultados indicaram que a transfecção do siRNA de *APE1* e tratamento com a TMZ induziu um acréscimo de 3,8 vezes na porcentagem de células T98G autofágicas, não induzida pela TMZ, determinada em cinco dias. Nesta linhagem, a autofagia contribuiu para a eliminação dessas células, adicionalmente à apoptose, justificando a redução de 63,1% na sobrevivência clonogênica observada nas células T98G silenciadas e tratadas. Diferentemente, não houve indução de autofagia nas células U87MG, resultado compatível com os obtidos por Knizhnik et al. (2013), embora essa linhagem não apresente MGMT.

Knizhnik et al. (2013) consideram a autofagia como um mecanismo citoprotetor universal contra agentes causadores de danos no DNA, que também foi recentemente proposto em células de hepatoma (Chen et al., 2011). Assim, Knizhnik et al. (2013) demonstram que a autofagia precede a apoptose de maneira a promover sobrevivência induzindo senescência. Contudo, Palumbo et al. (2012) demonstraram em células T98G um aumento da sensibilização em resposta ao tratamento com TMZ e radiação através da indução de autofagia. Com base nesse trabalho, é possível que outras lesões, diferentes das O6-metil-G, também possam induzir esse tipo de morte, visto que a autofagia foi observada na linhagem T98G que apresenta expressão de MGMT. Assim, nesse presente estudo a indução da autofagia pode ter ocorrido no sentido de sensibilizar as células T98G por lesões de bases não reparadas devido ao silenciamento de *APE1*.

Existem estudos de silenciamento do gene *APE1* em células HeLa, glioma de ratos e carcinoma de pulmão relacionando a expressão desse gene com a resistência celular a uma variedade de agentes, como por exemplo, agentes alquilantes e oxidantes, bem como radiações ionizantes (Chen e Olkowski, 1994; Ono et al., 1994; Walker et al., 1994; Evans et al., 2000; Wang et al., 2004). No entanto, não é conhecido ainda se a maior sensibilidade das células a estes agentes é de fato resultante da perda da função de reparo do DNA por APE1, ou da sua

atividade de redução. Em gliomas, não foi descrito até o presente nenhum estudo de silenciamento de *APE1* associado ao tratamento com o agente TMZ.

Uma melhor compreensão sobre o papel de APE1 seja pela sua função redox ou de reparo DNA, na resistência dos GBMs ao tratamento é importante, na busca de terapias mais eficazes. Como já mencionado, além da função de reparo do DNA, APE1 também atua como fator de redução, afetando as atividades de ligação de FTs ao DNA, tais como AP-1 (FOS/JUN), NFκB, HIF-1α, CREB, HLF, TP53, entre outros, mantendo-os em um estado reduzido ativo, podendo atuar na promoção e progressão do câncer (Evans et al., 2000; Merluzzi et al., 2004; Tell et al., 2005). Tais informações justificaram o presente estudo sobre a influência da redução da expressão de APE1 nesses processos.

APE1 aciona de forma redox dependente a via NFκB, por ativar a capacidade de p50 de se ligar ao DNA (Nakamura et al., 1997), além de estabilizar HIF-1α de forma a ativar HIF-1 (Huang et al., 1996). O inibidor E3330, uma pequena molécula que inibe a atividade redox de APE1, mostrou um bloqueio na ativação da ligação de FTs, tais como NFκB e HIF-1α (Luo et al., 2008; Fishel et al., 2011), indicando que o decréscimo da ligação dessas proteínas ao DNA ocorre devido ao bloqueio da conversão de um estado oxidado para reduzido promovido por APE1 (Luo et al., 2008). O nível celular de HIF-1α e sua estabilização redox por APE1 são críticos para sua translocação nuclear, ligação ao DNA e atividade transcricional (Wang e Semenza, 1993; Huang, 1996). Assim, a inibição da sua ligação ao DNA pode apresentar potencial clínico, pelo fato de HIF-1α regular genes envolvidos na progressão tumoral, angiogênese e vasodilatação (Powis e Kirkpatrick, 2004). O RNA mensageiro (mRNA) de *HIF-1α* é constitutivamente expresso, porém, sua proteína é rapidamente degradada sob condições de normóxia (Wiener et al., 1996; Jiang et al., 1996), o que justifica a falta de expressão dessa proteína no presente estudo, conforme avaliada por W*estern blotting*.

Outro alvo de APE1, o FT NFkB, é ativado através de muitas vias diferentes, ocorrendo uma complexa resposta gênica, com a expressão de centenas de genes pertencentes às famílias gênicas específicas, incluindo um grande número de membros funcionalmente relacionados com a resposta imune e inflamatória, proliferação celular, invasão, diferenciação, entre outros (Montovani, 2010; Tafani et al., 2013). Devido ao seu papel crítico nesses processos, tem sido implicado no processo de carcinogênese (Baldwin, 2001; Bharti e Aggarwal, 2002; Pereira e

Oakley, 2007; Montovani, 2010). O gene *NFκB* é de grande interese no estudo do câncer, em especial nos gliomas, devido ao fato de sua expressão constitutiva estar associada com o potencial maligno de tumores astrocíticos (Tsunoda et al. 2005), permanecendo constitutivamente ativado em linhagens de GBM e em células de culturas primárias, desempenhando um papel crítico na capacidade de invasão em gliomas (Raychaudhuri et al., 2007).

No processo de invasão, o evento chave para degradar a barreira fisiológica do tecido e iniciar o processo é basicamente controlado pelos genes *HIF-1α* e *NFkB* (Tafani et al., 2013). É bem conhecido que em tumores malignos, ocorre a desregulação da relação das atividades de MMP (*Matrix metalloproteinases*) e TIMPs (*Tissue-localized inhibitors of metalloproteinases*), com um ganho de função de atividade proteolítica das MMP sobre a membrana basal e de proteínas de matriz extracelular, sendo tais alterações correlacionadas ao potencial invasivo das células tumorais (Tobar et al., 2010; Tafani et al., 2013).

Considerando o papel de *NFκB* e *HIF-1α* na regulação da invasão, estudamos os efeitos do silenciamento do gene *APE1* nesse processo. Nesse ensaio observamos uma redução de 74,3% na invasão das células T98G transfectadas com siRNA-APE1 em relação às células SCR, evidenciando um possível efeito de APE1 na regulação da invasão, Entretanto, o tratamento somente com a TMZ resultou em um efeito semelhante nessas células. Na linhagem T98G transfectadas e tratadas com a TMZ, a redução foi 14% maior em relação ao tratamento somente com a TMZ, mostrando possivelmente um efeito aditivo da droga. Curiosamente, na linhagem U87MG, a ação da combinação do silenciamento com o tratamento foi mais eficaz em reduzir a proporção de células invasivas (63,1% de redução), o que não ocorreu com as células somente transfectadas com o siRNA-APE1 ou apenas tratadas com a droga. Interessantemente, a linhagem U87MG apresentou maior eficácia quanto ao silenciamento de *APE1* (76,7% de redução na expressão proteica) em relação às células T98G (46,4%) no tempo em que foi avaliada a capacidade de invasão (96 h), sugerindo que a combinação do silenciamento de *APE1* e tratamento com a TMZ de alguma forma influenciou essa resposta, o que de forma geral não ocorreu para os demais parâmetros analisados para U87MG.

Um relato recente mostrou que MGMT é capaz de regular negativamente o processo de invasão (Chahal et al., 2012), de forma que células que apresentam a atividade da enzima MGMT são menos invasivas. Assim, as células U87MG

(deficientes para atividade da enzima MGMT) se mostraram altamente invasivas, sendo que esse processo foi revertido pela redução na expressão de APE1 e tratamento com a TMZ, o que requer um estudo mais detalhado sobre o papel de outros genes nesse processo.

Como APE1 atua de maneira a provocar mudanças pós-traducionais em seus FTs alvos (NFκB e HIF-1α), foi proposto averiguar os genes regulados pelos mesmos, os quais poderiam gerar informações sobre a atividade de ligação desses FTs ao DNA. Dessa forma, foram avaliados os genes *COX2* e *VEGF*, genes alvos de NFκB e HIF-1α, respectivamente, em resposta ao silenciamento de *APE1* e/ou tratamento com a TMZ. O silenciamento isoladamente não alterou os perfis de expressão dos genes *COX2* e *VEGF*. O tratamento com a TMZ causou uma repressão de ambos os genes, a qual foi independente do silenciamento de *APE1* na linhagem T98G. Diferentemente, nas células U87MG, o tratamento com a droga não afetou significativamente a expressão de *COX2*, porém, levou à indução de *VEGF*. Nessas células, o silenciamento e tratamento com a TMZ reduziu sutilmente a indução da expressão de *VEGF*, porém significativa. Em conjunto, esses resultados evidenciam somente um efeito da TMZ sobre a expressão desses genes, não sendo possível estabelecer uma correlação direta com o silenciamento de *APE1*.

Como um FT clássico relacionado ao estresse oxidativo, a ativação do HIF-1 requer a expressão de HIF-1α e sua heterodimerização com HIF-1β (Hofer et al., 2001) levando à expressão de genes-alvo como *VEGF*, HO-1 (*Heme Oxygenase 1*) e PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), que aumentam a sobrevivência celular após o estresse oxidativo. APE1 participa desse processo pela regulação da atividade transcricional de HIF-1α através de seu domínio redox. Estudos envolvendo o *knockdown* de *APE1* mostraram uma redução da atividade de ligação de HIF-1, seguida de repressão transcricional de *VEGF* sob terapia fotodinâmica (PDT) em carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC - *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*) (Yang et al, 2010). Não existem relatos na literatura de estudos envolvendo a resposta desse gene ao silenciamento de *APE1* e tratamento com a TMZ, mas somente trabalhos mostrando a influência dessa droga. Fisher et al (2007) menciona sua indução após tratamento com a TMZ em células de glioma U251 e U87MG. Contraditoriamente, outros autores demonstraram que a TMZ não induz a expressão, porém proteica, de VEGF em células de glioma U251 (Lu et al.,

2012). No presente trabalho mostramos que o silenciamento de *APE1* não influenciou a expressão de *VEGF* e que as linhagens responderam diferentemente à droga TMZ, com repressão e indução transcricional nas linhagens T98G e U87MG, respectivamente.

NFκB regula *COX2* através de dois sítios de ligação presentes nesse gene (Tazawa et al, 1994). *In vitro,* a inibição dessa proteína mostrou atenuar a expressão de *COX2* em células de câncer colorretal, indicando que NFκB pode ter um papel importante na indução desse gene (Plummer et al, 1999; Williams et al, 2003). Mais especificadamente, Charalambous et al. (2009) relataram que a expressão de *COX2* esta associada à indução de p65, porém não de IKKα ou p50, conforme observado em células estromais malignas e normais circundante do tecido colorretal.

Como mencionado, da mesma forma que o gene *VEGF*, *COX2* também não sofreu alterações induzidas pelo silenciamento, mas apenas pela ação da TMZ nas células T98G, não sendo alterado nas células U87MG. Em resposta ao tratamento com a TMZ, foi relatada a repressão de *COX2*, sendo que esse efeito não envolve a ação sobre resíduos redox sensíveis, conforme demonstrado com o uso concomitante de agentes redutores, ou de fosforilação de p65. No entanto, a TMZ atua no domínio de transativação COOH-terminal de p65, resultando em uma mudança molecular conformacional que bloqueia sua ligação ao DNA, dessa forma, impedindo a ligação de NFκB ao promotor de *COX2*, bem como de *BcL-XL* (Yamini et al., 2007). Por outro lado, Schmitt et al. (2011) mostraram que a TMZ bloqueia a atividade transcricional de NFκB em células de GBM, por fosforilar a subunidade p50 na serina 329, impedindo a ligação dos dímeros de NFκB ao DNA. Entretanto, em nosso trabalho, as células silenciadas e tratadas (T98G e U87MG) mostraram um aumento na expressão da proteína p65 fosforilada na serina 536 em relação às células somente tratadas com a TMZ em três e cinco dias do tratamento, o que não foi observado nas células somente silenciadas ou no controle SCR, indicando um efeito da combinação (silenciamento de *APE1* e tratamento com a droga) na indução dessa subunidade. Assim, a suposição de que p65 é responsável por induzir a expressão de *COX2* não foi mostrada nesse presente estudo nas células silenciadas e tratadas, contrariando o trabalho de Charalambous et al. (2009), embora não tenha sido indicado o sítio de fosforilação, mas somente a proteína ativa. No entanto, a TMZ causou apenas uma leve expressão de $p65^{(ser536)}$. Com base na literatura mencionada acima e os resultados obtidos no presente estudo, é possível que o

efeito da TMZ, como mencionado Schmitt et al. (2011), e de APE1, que atua sobre p50 (Nakamura et al., 1997) sejam predominantemente relacionados a essa subunidade, o que merece ainda ser investigado.

A fosforilação de p65 ocorre dentro do complexo citosólico NFκB/IκB, o qual facilita a importação nuclear de p65 fosforilado (Mattioli et al., 2004), sugerindo que essa fosforilação pode ser um evento citoplasmático, crítico para sua subsequente função nuclear de ativar NFkB *in vivo* (Wang et al., 2006). Drogas tais como doxorubicina ou etoposido são capazes de ativar NFκB via TP53, sendo a fosforilação da serina 536 de p65 mediada por RSK-1 (*Ribosomal protein S6 kinase alpha-1*) (Bohuslav et al., 2004). Em células de meduloblastoma e GBM que não apresentam *TP53* funcional, nenhuma fosforilação de p65 foi detectada sob tratamento com etoposido (Meley et al., 2010), diferentemente dos nossos resultados, mas deve ser considerado que as drogas são distintas, com mecanismos de ação diferentes. Por outro lado, Markiewicz-Żukowska et al. (2013) não observaram alterações na expressão de p65 na linhagem U87MG sob tratamento com a TMZ; porém, nesse estudo não foi verificada a proteína fosforilada, não sendo também realizado o silenciamento de *APE1*. Outra abordagem para a indução de p65 foi recentemente relatada. Li et al. (2012) demonstraram ativação de $p65^{(ser536)}$ induzida por t-AUCB (um inibidor de sEH - *soluble epoxide hydrolase*) associada à redução do crescimento de células de GBM U87MG e U251, o que oferece apoio ao observado em nosso trabalho quanto à expressão aumentada dessa proteína.

O efeito de NFκB em tumores são complexos e ambivalentes, sendo possível que tanto a sua inibição quanto a ativação possam promover a carcinogênese (Seitz et al., 1998; Li et al., 2012) que envolve várias etapas (Zhong et al., 2002). É conhecido que homodímeros p50 existem no núcleo de células não estimuladas (Kang et al., 1992 e Ten et al., 1992; Zhong et al., 2002) e esses foram demonstrados se associarem a histonas desacetilases (HDAC-1 - *Histone Deacetylases-1*), ligando-se ao DNA e reprimindo a expressão gênica dependente de NFκB. Quando ocorre estimulação, heterodímeros p50/p65 contendo p65 fosforilada entram no núcleo e liberam p50/HDAC-1 ligada ao DNA, podendo associar-se com o co-ativador transcricional CBP/p300 (Zhong et al., 2002). Contudo, ainda não é conhecido se a ativação de NFκB está associada a um tipo específico de tumor ou a algum estágio da carcinogênese.

Deve ser enfatizado que a p65 fosforilada na serina 536 nas células silenciadas para *APE1* e tratadas com a TMZ não é suficiente para indicar que a via NFκB esteja ativada, visto que o gene *APE1* regula a subunidade p50, que na forma homodimérica reprime a transcrição (Zhong et al., 2002). Da mesma forma, heterodímeros p65/p50 poderiam ainda estar presentes no citoplasma, de forma a não exercer seu papel na regulação da transcrição. Em apoio a essa hipótese, os resíduos *cis*62 de p50, os quais são seletivamente reduzidos por APE1 no núcleo, constituem um pré-requisito necessário para a ativação *in vivo* de NFκB (Nishi et al., 2002). Adicionalmente, APE1 é capaz de aumentar a capacidade de ligação ao DNA apenas quando p50 está presente no complexo NFκB (Shimizu et al., 2000), além de aumentar a atividade de ligação de membros da família Rel, p52 e c-Rel, porém, não de p65 (Ando et al., 2008). Curiosamente, E3330 (inibidor redox de APE1) também não afeta outros passos de ativação de NFκB, incluindo a degradação de IkB e fosforilação de p65 (Hiramoto et al., 1998). Assim, uma redução na expressão de p65 fosforilada pelo silenciamento de *APE1* combinado ao tratamento com a TMZ não é necessariamente esperada.

Conforme exposto, os mecanismos envolvidos na ativação ou bloqueio da via NFκB pela TMZ ou por APE1 são ainda pouco compreendidos, pela natureza complexa das vias de sinalização. Porém, pelo menos quanto à atividade redox de APE1, concluímos que essa não foi de fato alterada pelo silenciamento ou foi suprimida pelo efeito causado pela TMZ. Também deve ser considerada a possibilidade de que certo nível de APE1 ainda presente nas células pode continuar a exercer seus efeitos. Foi relatado que a atividade de chaperona redox de APE1, que envolve a direta interação dessa proteína com FTs, não requer altas concentrações de APE1 para exercer seus efeitos (Ando et al., 2008). Esses autores também concluíram que APE1 tem dois efeitos distintos sobre a ligação de p50 ao DNA. Em primeiro lugar, APE1 ativa p50 por ligar diretamente de forma cis-dependente, requerendo concentrações elevadas de APE1. Em segundo lugar, na presença de GSH (*Glutathione*) ou Trx (*Thioredoxin*), APE1 também ativa p50 indiretamente, de forma cis-independente e em baixas concentrações. Quando avaliamos a expressão dos genes *COX2* e *VEGF*, o silenciamento do gene *APE1* atingiu o máximo de redução proteica (46,7 e 58,5%) nas células T98G e U87MG, respectivamente, sendo possível a existência de atividade redox de APE1 remanescente nas células.

De forma geral, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a expressão reduzida do gene *APE1* aliada ao efeito do tratamento com a TMZ foi capaz de reduzir a proliferação celular e sobrevivência clonogênica na linhagem T98G, possivelmente devido a um bloqueio da via BER, seguida de uma maior exposição das lesões de base no DNA, induzidas pela TMZ, com consequente indução de apoptose e autofagia, além de redução na capacidade de invasão celular com efeito incrementado pela ação da droga. Esses resultados obtidos para a linhagem T98G indicam que o reparo via BER pode representar um fator de resistência ao tratamento com esse quimioterápico, sendo que a estratégia de inibição dessa via mostra-se promissora na sensibilização das células tumorais resistentes. Adicionalmente, a função de redução de APE1 não foi significativamente afetada pelo silenciamento, possivelmente pelo fato de o silenciamento ter sido parcial, o que constitui uma limitação da metodologia utilizada. Interessantemente, observou-se um maior recrutamento de APE1 no núcleo das células T98G promovido pelo tratamento com a TMZ, sendo que o silenciamento de *APE1* reduziu ou praticamente neutralizou esse efeito.

Entretanto, ensaios semelhantes realizados com as células da linhagem U87MG mostraram que estas não foram sensibilizadas pelo silenciamento de *APE1* e tratamento com a droga, exceto no caso da invasão, provavelmente pelo fato dessas células serem mais sensíveis ao tratamento com a TMZ, o que é compatível com a deficiência da enzima MGMT e proficiência da proteína TP53.

Devem ser também considerados outros mecanismos de regulação, não abordados neste trabalho, que envolvem a participação de APE1, os quais podem também ser afetados pelo silenciamento desse gene conjuntamente ao tratamento com a TMZ. Recentemente, foi demonstrado que APE1 altera os perfis de expressão de miRNAs em células de osteosarcoma, alterando a expressão gênica via fatores de transcrição, regulando uma série de genes envolvidos em vários processos celulares, de desenvolvimento e sinalização celular (tais como TGF-β, Wnt, MAPK e TP53) (Dai et al., 2013).

Em conjunto, os resultados do presente trabalho indicam que a estratégia de inibição de BER visando uma sensibilização das células de GBM mostrou-se potencialmente viável, mas restrito às células de GBM resistentes à TMZ (linhagem T98G). Os resultados dos ensaios realizados para a linhagem U87MG demonstraram que para essas células, as quais são sensíveis à TMZ, o

silenciamento de *APE1* praticamente não exerceu um efeito de sensibilização das células tumorais. Assim, as características genéticas de cada linhagem de GBM são cruciais para as respostas apresentadas pelas células aos tratamentos empregados.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- O silenciamento de *APE1* em células T98G tratadas com a TMZ causou uma queda acentuada na proliferação e na sobrevivência clonogênica (63,1% de redução), comparativamente às células tratadas somente com a TMZ. Diferentemente, nas células U87MG, a TMZ exerceu efeito predominante na redução da capacidade clonogênica (58%), não sendo observados efeitos devidos ao silenciamento de *APE1*.

- Um maior recrutamento de APE1 no núcleo das células T98G foi promovido pelo tratamento com a TMZ; entretanto, o silenciamento de *APE1* reduziu ou praticamente neutralizou esse efeito, indicando que falhas no reparo das lesões induzidas pela TMZ devam ser responsáveis pelo aumento da citotoxicidade causada pela droga.

- O tratamento com a TMZ nas células T98G e U87MG silenciadas para *APE1* induziu um aumento significativo de danos no DNA logo após o final do tratamento (zero hora) e após seis horas, sendo esses danos recuperados até 24 h. Embora o ensaio cometa não indique até que ponto essa recuperação direcione as células à sobrevivência, ou se uma parte destas pode ser conduzida à morte, os dados indicaram uma maior sensibilização das células silenciadas para *APE1* e tratadas com a TMZ.

- A droga TMZ causou um bloqueio em G2/M em ambas as linhagens celulares (T98G e U87MG), independentemente do silenciamento de *APE1*; entretanto, a combinação do silenciamento e tratamento com a droga nas células T98G induziu um aumento significativo na proporção de células na fase S, sugerindo que a persistência de danos não reparados devido à ausência do reparo via BER causou um bloqueio moderado na síntese de DNA. O mesmo não ocorreu nas células U87MG.

- A presença de H2AX fosforilada observada em ambas as linhagens (T98G e U78MG), após três e cinco dias no grupo de células silenciadas para *APE1* e tratadas com a droga evidenciou a presença de DSBs como consequência da reduzida expressão de APE1, comprovando assim a sensibilização das células de GBM nas condições testadas.

- O silenciamento de *APE1* e tratamento com a TMZ elevaram os níveis de apoptose em ambas as linhagens (T98G e U87MG), sendo esse efeito mais pronunciado nas células T98G, ainda observado após 10 dias, com uma leve indução de caspase-3 em cinco dias; além disso, nas células T98G, observou-se um aumento de 3,8 vezes na indução de autofagia nesse mesmo tempo.

- O silenciamento de *APE1* por si só foi capaz de reduzir a invasão nas células T98G com resultados incrementados em combinação com a TMZ. Nas células U87MG, a expressão reduzida de APE1 aliada ao tratamento com a TMZ exerceu um forte efeito no sentido de reduzir a capacidade de invasão, o que não foi observado nos respectivos grupos controles isoladamente (tratamento com a TMZ ou silenciamento do gene *APE1*).

- Os genes *COX2* e *VEGF*, alvos dos FT NFκB e HIF-1α (regulados por APE1), mostraram alterações no padrão de expressão transcricional somente em resposta ao tratamento com a TMZ, mas de forma independente do silenciamento de *APE1*, com repressão de ambos os genes nas células T98G e na U87MG; a TMZ induziu *VEGF,* enquanto que a expressão de *COX2* não foi alterada, demonstrando a falta de efeito do silenciamento de *APE1* no sentido de modular os FTs, ou alternativamente, o efeito pode ter sido mascarado pela ação da TMZ, já que ambos possivelmente atuam de forma semelhante na modulação desses genes.

- Houve maior indução de p65 fosforilada na serina 536 em ambas as linhagens mediante o silenciamento de *APE1* e tratamento com a TMZ em três e cinco dias; embora esses dados não indiquem que a via NFκB esteja

ativada, podem possivelmente ser consequência da redução nas taxas de proliferação celular.

- Em conjunto, os resultados do presente trabalho demonstraram a contribuição da via de reparo BER na resistência à TMZ, visto a sensibilização alcançada para células de GBM que são resistentes a essa droga (linhagem T98G), porém sendo pouco eficaz no sentido de sensibilizar as células sensíveis (linhagem U87MG). Adicionalmente, os resultados demonstram que as características genéticas de cada linhagem de GBM devem ser consideradas, visto que estas são cruciais para as respostas apresentadas pelas células aos tratamentos empregados.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbotts R, Madhusudan S. (2010). Human AP endonuclease 1 (APE1): from mechanistic insights to druggable target in cancer. Cancer Treat. Rev. 36: 425–435.

Adhikari S, Choudhury S, Mitra PS, Dubash JJ, Sajankila SP, Roy R. (2008) Targeting base excision repair for chemosensitization. Anticancer Agents Med Chem. 8(4):351-7.

Ahmadloo N, Kani AA, Mohammadianpanah M, Nasrolahi H, Omidvari S, Mosalaei A, Ansari M. (2013) Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. J Egypt Natl Canc Inst. 25(1):21-30.

Almeida KH, Sobol RW. (2007) A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. DNA Repair (Amst). 6(6):695-711.

Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. (2004) Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. Cancer Res. 64(14):4912-8.

Ando K, Hirao S, Kabe Y, Ogura Y, Sato I, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H. (2008) A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF-kappaB and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. Nucleic Acids Res. 36(13):4327-36.

Ansari S. A., Safak M., Del Valle L., Enam S., Amini S. and Khalili K. (2001) Cell cycle regulation of NF-kappa b-binding activity in cells from human glioblastomas. Exp. Cell Res. 265, 221–233.

Avgeropoulos NG, Batchelor TT. (1999) New treatment strategies for malignant gliomas. Oncologist 4: 209–224.

Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. (2011) Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. Trends Mol Med. 17(6):301-12.

Baldwin AS. (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. J Clin Invest. 107(3):241-6.

Bapat A, Glass LS, Luo M, Fishel ML, Long EC, Georgiadis MM, Kelley MR. (2010) Novel small-molecule inhibitor of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 blocks

proliferation and reduces viability of glioblastoma cells. J Pharmacol Exp Ther. 334(3):988-98.

Barkett M, Gilmore TD. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18: 6910–6924.

Barnes, P. J., and Karin, M. (1997) Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases (review). N. Engl. J. Med. 336: 1066–1071.

Baute J, Depicker A (2008) Base excision repair and its role in maintaining genome stability. Crit Rev Biochem Mol Biol. 43(4):239-76.

Beg AA, Baldwin AS Jr. (1993) The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. Genes Dev. 7(11):2064-70.

Belzile JP, Choudhury SA, Cournoyer D, Chow TY. (2006) Targeting DNA repair proteins: a promising avenue for cancer gene therapy. Curr Gene Ther. 6(1):111-23.

Bennett SE, Sung JS, Mosbaugh DW. (2001) Fidelity of uracil-initiated base excision DNA repair in DNA polymerase β-proficient and -deficient mouse embryonic fibroblast cell extracts. Journal of Biologic Chemistry v. 276, p. 42588–42600.

Beranek DT. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. Mutat. Res. 231: 11–30.
Bhakat KK, Mantha AK, Mitra S. (2009) Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. Antioxid Redox Signal. 11(3):621-38.

Bharti AC, Aggarwal BB. (2002) Chemopreventive agents induce suppression of nuclear factor-kappaB leading to chemosensitization. Ann. N. Y. Acad. Sci. 973:392-5.

Bian X, Opipari AW Jr, Ratanaproeksa AB, Boitano AE, Lucas PC, Castle VP (2002) Constitutively active NFkappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma. J Biol Chem. 277:42144–42150

Bignami M, O´Driscoll M, Aquilina G, Karran P. (2000) Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. Mutat. Res.;462(2-3):71-82.

Bobola MS, Blank A, Berger MS, Stevens BA, Silber JR. (2001) Apurinic/apyrimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas. Clin Cancer Res. 7(11):3510-8.

Bobola MS, Emond MJ, Blank A, Meade EH, Kolstoe DD, Berger MS, Rostomily RC, Silbergeld DL, Spence AM, Silber JR. (2004) Apurinic endonuclease activity in adult gliomas and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy and after radiotherapy. Clin. Cancer Res. 10(23): 7875-7883.

Bobola MS, Kolstoe DD, Blank A, Chamberlain MC, Silber JR. (2012) Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. Front Oncol. 2:176.

Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y & Greene WC (2004). p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB Kinase independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. J. Biol. Chem. 279, 26115–26125.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G(2) arrest after DNA damage. Science 282: 1497–1501.

Caporali S, Levati L, Graziani G, Muzi A, Atzori MG, Bonmassar E, Palmieri G, Ascierto PA, D'Atri S. (2012) NF-κB is activated in response to temozolomide in an AKT- dependent manner and confers protection against the growth suppressive effect of the drug. J Transl Med. 21;10:252.

Chahal M, Abdulkarim B, Xu Y, Guiot MC, Easaw JC, Stifani N, Sabri S. (2012) O6-Methylguanine-DNA methyltransferase is a novel negative effector of invasion in glioblastoma multiforme. Mol Cancer Ther. 11(11):2440-50.

Charalambous MP, Lightfoot T, Speirs V, Horgan K, Gooderham NJ. (2009) Expression of COX-2, NF-kappaB-p65, NF-kappaB-p50 and IKKalpha in malignant and adjacent normal human colorectal tissue. Br J Cancer. 101(1):106-15

Chen DS, Olkowski ZL. (1994) Biological responses of human apurinic endonuclease to radiation-induced DNA damage. Ann N Y Acad Sci. 726:306-8.

Chen LH, Loong CC, Su TL, Lee YJ, Chu PM, Tsai ML, Tsai PH, Tu PH, Chi CW, Lee HC, Chiou SH. (2011) Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway. Biochem Pharmacol. 81(5):594-605

Chen S, Xiong G, Wu S, Mo J. (2013) Downregulation of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to radiotherapy in vitro. Cancer Biother Radiopharm. 28(2):169-76.

Chung U, Igarashi T, Nishishita T, Iwanari H, Iwamatsu A, Suwa A, Mimori T, Hata K, Ebisu S, Ogata E, Fujita T, Okazaki T (1996) The interaction between Ku antigen and

REF1 protein mediates negative gene regulation by extracellular calcium. J Biol Chem. 271:8593–8598

Dai N, Zhong ZY, Cun YP, Qing Y, Chen Ch, Jiang P, Li MX, Wang D. (2013) Alteration of the microRNA expression profile in human osteosarcoma cells transfected with APE1 siRNA. Neoplasma. 60(4):384-94.

Danson SJ, Middleton MR. (2001) Temozolomide: a novel oral alkylating agent. Expert Rev Anticancer Ther. 1(1):13-9.

D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J. (1998) Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. Mol Pharmacol. 54(2):334-41.

Demple B, Harrison L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. Annu Rev Biochem. 63:915-48.

Dianov GL, Hübscher U. (2013) Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. Nucleic Acids Res.41(6):3483-90

Doetsch PW, Cunningham RP. (1990) The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. Mutation Research 236, p. 173-201.

Dogliotti E, Fortini P, Pascucci B e Parlanti E. (2001) Multiple pathways for DNA base excision repair. The mechanism of switching among multiple BER pathways. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 68: 1–28.

Dorsett Y, Tuschl T. (2004) siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 3: 318–329.

Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug GE, Krokan HE. (2004) Alkylation damage in DNA end RNA – repair mechanisms and medical significance. DNA Repair. 3: 1389-1407.

Dresemann G. (2010) Temozolomide in malignant glioma. Onco Targets Ther. 3:139-46.

Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, Siebenlist U, Van Waes C. (1999) Expression of a dominant negative mutant inhibitor-kappaBalpha of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. Cancer Res. 59: 3468–3474.

Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ. (2003) Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. Mol Cancer. 2:12.

Engelward BP, Allan JM, Dreslin AJ, Kelly JD, Wu MM, Gold B, Samson LD. (1998) A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. J. Biol. Chem. *273*, 5412.

Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR (2000) Going APE over ref-1. Mutat Res. 461(2):83-108.

Ewald B, Sampath D, Plunkett W. (2007) H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. Mol Cancer Ther. 6(4):1239-48.

Fishel ML e Kelley MR (2007) The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. Mol. Aspects Med. 28(3-4):375-95.

Fishel ML, He Y, Reed AM, Chin-Sinex H, Hutchins GD, Mendonca MS, Kelley MR. (2008) Knockdown of the DNA repair and redox signaling protein Ape1/Ref-1 blocks ovarian cancer cell and tumor growth.DNA Repair (Amst). 7(2):177-86.

Fishel ML, HE Y, Smith ML, Kelley MR. (2007) Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. Clin. Cancer Res. 13(1): 260-267.

Fishel ML, Jiang Y, Rajeshkumar NV, Scandura G, Sinn AL, He Y, Shen C, Jones DR, Pollok KE, Ivan M, Maitra A, Kelley MR (2011) Impact of APE1/Ref-1 redox inhibition on pancreatic tumor growth. Mol Cancer Ther. 10(9):1698-708.

Fisher T, Galanti G, Lavie G, Jacob-Hirsch J, Kventsel I, Zeligson S, Winkler R, Simon AJ, Amariglio N, Rechavi G, Toren A. (2007) Mechanisms operative in the antitumor activity of temozolomide in glioblastoma multiforme. Cancer J. 13(5):335-44.

Fleck O, Nielsen O. (2004) DNA repair. J Cell Sci. 117(Pt 4):515-7.

Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD. (2006) DNA repair: from molecular mechanism to human disease. DNA Repair (Amst). 5(8):986-96

Fronza G e Gold B. (2004) The biological effects of N3-methyladenine. J. Cell Biochem. *91*, 250.

Fruehauf JP, Brem H, Brem S, Sloan A, Barger G, Huang W, Parker R. (2006) In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. Clin Cancer Res. 12(15):4523-32.

Fu D, Calvo JA, Samson LD. (2012) Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nat Rev Cancer. 12(2):104-20.

Fung H, Bennett RA, Demple B. (2001) Key role of a downstream specificity protein 1 site in cell cycle-regulated transcription of the AP endonuclease gene APE1/APEX in NIH3T3 cells. J Biol Chem. 276(45):42011-7.

Fung H, Demple B. (2005) A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. Mol Cell. 17(3):463-70.

Fung H, Demple B. (2011) Distinct roles of Ape1 protein in the repair of DNA damage induced by ionizing radiation or bleomycin. J Biol Chem. 286(7):4968-77.

Ghosh S, Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell. 109 Suppl:S81-96.
Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 16:225–260

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, and Westphal M (2003). Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. J Clin Oncol. 21, 1624–1636.

Greenberg MM, Weledji YN, Kroeger KM, Kim J. (2004) In vitro replication and repair of DNA containing a C2'-oxidized abasic site. Biochemistry 7;43(48):15217-22.

GrombacherT, EichhornU e Kaina B (1998) p53 is involved inregulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNAmethyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. Oncogene 17, 845–851.

Gu X, Cun Y, Li M, Qing Y, Jin F, Zhong Z, Dai N, Qian C, Sui J, Wang D. (2013) Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease siRNA Inhibits the Angiogenesis Induced by X-Ray Irradiation in Lung Cancer Cells. Int J Med Sci. 10(7):870-82.

Harris LC, Remack JS, Houghton PJ e Brent TP (1996) Wild-type p53 suppresses transcription of the humanO6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. Cancer Res. 56, 2029–2032.

Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. Cell Research 18, p. 27-47, 2008.

Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M. (2006) O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. J. Neurochem 96(3):766-76.

Higgins KA, Perez JR, Coleman TA, Dorshkind K, McComas WA, Sarmiento UM, Rosen CA, Narayanan R (1993) Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. Proc Natl Acad Sci USA. 90:9901–9915.

Hiramoto M, Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Kawakami Y, Ito M, Aizawa S, Tanaka H, Makino I, Handa H. (1998) Nuclear targeted suppression of NF-kappa B activity by the novel quinone derivative E3330. J Immunol. 160(2):810-9.

Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. Cancer Res. 61(5):1957-63.

Hofer T, Desbaillets I, Höpfl G, Gassmann M, Wenger RH. (2001) Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy. FASEB J. 15(14):2715-7.

Huang L, Arany Z, Livingston D, Bunn H. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its a-subunit. J Biol Chem. 271:32253–59

Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ (2000) Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. Clin Cancer Res. 6:2573–2581

Huse JT, Holland EC. (2010)Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nat Rev Cancer. 10(5):319-31.
Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. (1999)

Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. Brain Pathol. 9(3):469-79.

Iyer P, Srinivasan A, Singh SK, Mascara GP, Zayitova S, Sidone B, Fouquerel E, Svilar D, Sobol RW, Bobola MS, Silber JR, Gold B. (2012) Synthesis and Characterization of DNA Minor Groove Binding Alkylating Agents. Chem Res Toxicol. [Epub ahead of print]

Jacinto FV, Esteller M. (2007) MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. DNA Repair (Amst) 6(8):1155-60.

Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. (1996)Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension. Am J Physiol. 271:C1172–C1180.

Johannessen TC, Bjerkvig R, Tysnes BB (2008) DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? Cancer Treat Rev. 34(6):558-67

Kabrun N, Enrietto PJ. (1994) The Rel family of proteins in oncogenesis and differentiation. Semin Cancer Biol. 5(2):103-12.

Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. (2007) MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair (Amst). 6(8):1079-99

Kaina B, Christmann M. (2002) DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 40(8):354-67.

Kang SM, Tran AC, Grilli M, Lenardo MJ. (1992) NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. Science 256(5062):1452-6

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. Cell Death Differ.11(4):448-57.

Karin M, Greten FR. (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol. 5: 749–759.

Karin M. (1999) How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. Oncogene 22; 18(49):6867-74.

Kato T Jr, Delhase M, Hoffmann A & Karin M. (2003). CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. Mol. Cell 12, 829–839.

Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. Neuro Oncol. 7(2):134-53.

Kelley MR, Georgiadis MM, Fishel ML. (2012) APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1. Curr Mol Pharmacol. 5(1):36-53.

Kelley MR. and Fishel ML (2008) DNA Repair Proteins as Molecular Targets for Cancer Therapeutics. Anticancer Agents Med Chem. 8(4): 417–425.

Khasraw M, Lassman AB. (2010) Advances in the treatment of malignant gliomas. Curr Oncol Rep. 12(1):26-33.

Kinsella TJ. (2009) Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. Clin Cancer Res.15(6):1853-9.

Kleihues P e Ohgaki H. (2000). Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. Toxicol Pathol. 28(1): 164-70.

Kleihues P, Louis DN, Wiestler OD, Burger PC and Scheithauer BW (2007) WHO grading of tumours of the central nervous system. In:WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System,4th Edition. Louis DN, Ohgaki H and Wiestler OD (eds.). Lyon,International Agency for Research on Cancer. pp. 10-11.

Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M, Kaina B. (2013) Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. PLoS One. 8(1):e55665.

Kokkinakis DM, von Wronski MA, Vuong TH, Brent TP, Schold SC Jr. (1997) Regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by methionine in human tumour cells. Br J Cancer. 75(6):779-88.

Krakstad C, Chekenya M (2010) Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. Mol Cancer 1;9:135.

Krokan, H. E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M., and Slupphaug G. (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. FEBS Lett. 476: 73–77.

Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schär P, Barnes DE, Lindahl T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. EMBO J 15(23):6662-70.

Kuninger DT, Izumi T, Papaconstantinou J, Mitra S (2002) Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter. Nucleic Acids Res. 30:823–829.

Kuo LJ, Yang LX. (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo. 22(3):305-9.

Li J, Liu H, Xing B, Yu Y, Wang H, Chen G, Gu B, Zhang G, Wei D, Gu P, Li M, Hu W.(2012) t-AUCB, an improved sEH inhibitor, suppresses human glioblastoma cell growth by activating NF-κB-p65. J Neurooncol. 108(3):385-93.

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362: 709–715.

Lindahl T e Barnes DE. (2000) Repair of endogenous DNA damage. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 65:127–134.

Liu L , Gerson SL. (2004) Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. Curr. Opin. Investig. Drugs. 5:623–627

Liu L, Nakatsuru Y,Gerson SL. (2002) Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. Clin. Cancer Res. 8(9): 2985-2991.

Liu L, Taverna P, Whitacre CM, Chatterjee S, Gerson SL. (1999) Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and –proficient colon cancer cells to methylating agents. Clin. Cancer Res. 5: 2908

Liuzzi M, Talpaert-Borle M. (1985) A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine. J. Biol. Chem. 260: 5252–5258.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Method. Methods 25(4):402-8.

Loeb LA, Preston BD. (1986) Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. Annu. Rev. Genet**.** 20: 201–230.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW and Kleihues P. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol .114, 97-109.

Lu XY, Cao K, Li QY, Yuan ZC, Lu PS. (2012) The synergistic therapeutic effect of temozolomide and hyperbaric oxygen on glioma U251 cell lines is accompanied by alterations in vascular endothelial growth factor and multidrug resistance-associated protein-1 levels. J Int Med Res. 40(3):995-1004.

Ludlum DB. (1997) The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. Cancer Investig. 15: 588–598.

Luo M, Delaplane S, Jiang A, Reed A, He Y, Fishel M, Nyland RL 2nd, Borch RF, Qiao X, Georgiadis MM, Kelley MR. (2008) Role of the multifunctional DNA repair and redox signaling protein Ape1/Ref-1 in cancer and endothelial cells: small-molecule inhibition of the redox function of Ape1. Antioxid Redox Signal. 10(11):1853-67.

Luo M, He H, Kelley MR, Georgiadis MM. (2010) Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development. Antioxid Redox Signal. 12(11):1247-69.

Luo M, Kelley MR. (2004) Inhibition of the human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) repair activity and sensitization of breast cancer cells to DNA alkylating agents with lucanthone. Anticancer Res. 24(4):2127-34.

Ma S, Egyházi S, Martenhed G, Ringborg U, Hansson J. (2002) Analysis of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma tumours in patients treated with dacarbazine-based chemotherapy. Melanoma Res. 12(4):335-42.

Madhusudan S, Hickson ID (2005) DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. Trends Mol. Med. 11(11): 503-511.

Madhusudan S, Middleton MR. (2005) The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. Cancer Treat Rev. 31(8):603-17

Mantovani A. (2010) Molecular pathways linking inflammation and cancer. Curr Mol Med. 10(4):369-73

Markiewicz-Żukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. (2013) Propolis changes he anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. BMC Complement /Altern Med. 27;13:50.

Mattioli I, Sebald A, Bucher C, Charles RP, Nakano H, Doi T, Kracht M, Schmitz ML. (2004) Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. J Immunol. 172(10):6336-44.

McDonald KL, Aw G, Kleihues P. (2012) Role of Biomarkers in the Clinical Management of Glioblastomas: What are the Barriers and How Can We Overcome Them? Front Neurol. 3:188.

McNeill DR, Lam W, DeWeese TL, Cheng YC, Wilson DM 3rd. (2009) Impairment of APE1 function enhances cellular sensitivity to clinically relevant alkylators and antimetabolites. Mol Cancer Res. 7(6):897-906.

Meley D, Spiller DG, White MR, McDowell H, Pizer B, Sée V. (2010) p53-mediated delayed NF-κB activity enhances etoposide-induced cell death in medulloblastoma. Cell Death Dis. 13;1:e41.

Memisoglu A e Samson L. (2000) Base excision repair in yeast and mammals. Mutat. Res. 451: 39–51.

Merluzzi S, Moretti M, Altamura S, Zwollo P, SigvardssonM, Vitale G, Pucillo C. (2004) CD40 stimulation induces Pax5/BSAP and EBF activation through a APE/Ref-1- dependent redox mechanism. J Biol Chem. 279(3), 1777–1786.

Mitra S. (2007) MGMT: a personal perspective. DNA Repair (Amst). 6(8):1064-70.
Mohammed MZ, Vyjayanti VN, Laughton CA, Dekker LV, Fischer PM, Wilson DM 3rd, Abbotts R, Shah S, Patel PM, Hickson ID, Madhusudan S. (2011) Development and evaluation of human AP endonuclease inhibitors in melanoma and glioma cell lines. Br J Cancer 104(4):653-63.

Montaldi AP, Sakamoto-Hojo ET. (2012) Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide. Clin Exp Med. In Press.

Mrugala MM. (2013) Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. Discov Med. 15(83):221-30.

Mutter N e Stupp R (2006) Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? Expert Rev. Anticancer Ther. 6(8):1187-1204.

Nagai S, Washiyama K, Kurimoto M, Takaku A, Endo S and Kumanishi T. (2002) Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma. J. Neurosurg. 96, 909–917.

Nakamura H, Nakamura K & Yodoi J. (1997) Redox regulation of cellular activation. Annu. Rev. Immunol. 15, 351–369.

Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YW, Swenberg JA. (1998) Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induceddepurination under physiological conditions. Cancer. Res. 58, 222–225.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol. 18(5):1135-49.

Newlands ES, Blackledge GR, Slack JA, Rustin GJ, Smith DB, Stuart NS, Quarterman CP, Hoffman R, Stevens MF, Brampton MH. (1992) Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045:M&B 39831: NSC 362856). Br. J. Cancer 65(2), 287-291.

Nishi T, Shimizu N, Hiramoto M, Sato I, Yamaguchi Y, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka H, Kataoka K, Watanabe H, Handa H. (2002) Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. J. Biol. Chem. 277, 44548–44556.

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):171-8.

O'Connor MJ, Martin NM, Smith GC. (2007) Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. Oncogene 26(56):7816-24.

Ohgaki H, Kleihues P. (2005a) Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol. 109(1):93-108.

Ohgaki H, Kleihues P. (2005b) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 64(6):479-89.

Ohgaki H, Kleihues P. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am. J. Pathol.;170 (5):1445-53.

Ohgaki, H. (2005). "Genetic pathways to glioblastomas." Neuropathology. 25(1): 1-7.
Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T. (2012) Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. Neurol Res Int. 2012:878425.

Ono Y, Furuta T, Ohmoto T, Akiyama K, Seki S. (1994) Stable expression in rat glioma cells of sense and antisense nucleic acids to a human multifunctional DNA repair enzyme, APEX nuclease. Mutat Res. 315(1):55-63.

Osborne RH, Houben MP, Tijssen CC, Coebergh JW, van Duijn CM. (2001) The genetic epidemiology of glioma. Neurology. 57(10):1751-5.

Pahl HL. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene 18(49):6853-66.

Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. (2006) Prospects of RNA interference therapy for cancer. Gene Ther. 13(6):464-77.

Palumbo S, Pirtoli L, Tini P, Cevenini G, Calderaro F, Toscano M, Miracco C, Comincini S. (2012) Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. J Cell Biochem. 113(7):2308-18.

Parsons JL, Dianov GL. (2013) Co-ordination of base excision repair and genome stability. DNA Repair (Amst). 12(5):326-33.

Pereira SG, Oakley F. (2008) Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. Int J Biochem Cell Biol. 40(8):1425-30.

Phalon C, Rao DD, Nemunaitis J. (2010) Potential use of RNA interference in cancer therapy. Expert Rev Mol Med. 12:e26.

Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L. (1999) Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. Oncogene. 18:6013–6020.

Post, D.E., Devi, N.S., Li, Z., Brat, D.J., Kaur, B., Nicholson, A., Olson, J.J., Zhang, Z., and Van Meir, E.G. (2004) Cancer therapy with a replicating oncolytic adenovirus targeting the hypoxic microenvironment of tumors. Clin Cancer Res. 10, 8603–8612.

Powis G, Kirkpatrick L. (2004). Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. Mol. Cancer Ther. 3 (5), 647–654.

Prados M. (2001) Temozolomide in combination with other cytotoxic agents. Semin. Oncol. 28: 24–33.

Prados MD, Russo C. (1998) Chemotherapy of brain tumors. Semin. Surg. Oncol. 14: 88–95.

Prasad R, Lavrik OI, Kim SJ, Kedar P, Yang XP, Vande Berg BJ, Wilson SH (2001) DNA polymerase *β*-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. J. Biol. Chem. 276:32411– 32414.

Raffoul JJ, Banerjee S, Singh-Gupta V, Knoll ZE, Fite A, Zhang H, Abrams J, Sarkar FH, Hillman GG. (2007) Down-regulation of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 expression by soy isoflavones enhances prostate cancer radiotherapy in vitro and in vivo. Cancer Res. 67(5):2141-2149.

Ranalli TA, Tom S, Bambara RA. (2002) AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair. Journal of Biologic Chemistry 277, p. 41715–41724.

Raychaudhuri B, Han Y, Lu T, Vogelbaum MA. (2007) Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. J Neurooncol 85(1):39-47.

Rayet B, Gelinas C. (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. Oncogene 18: 6938–6947.

Reifenberger G, Collins VP. (2004) Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. J. Mol. Med. 82(10): 656-670.

Reszec J, Rutkowski R, Chyczewski L. (2013) The expression of hypoxia-inducible factor-1 in primary brain tumors. Int J Neurosci. May 9.

Rinne M, Caldwell D, Kelley MR. (2004) Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells. Mol Cancer Ther. 3:955–67.

Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, Kaina B.(2007) Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. Oncogene. 26(2):186-97.

Santarius T, Kirsch M, Rossi ML., Black PM. (1997) Molecular aspects of neuro-oncology. Clinical Neurology and Neurosurgery. 99:184-195.

Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M, Wick W. (2008) Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. Clin Cancer Res. 14(10):2900-8.

Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. (2007) Molecularly targeted therapy for malignant glioma. Cancer. 2007 Jul 1;110(1):13-24.

Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. (2007) Molecularly targeted therapy for malignant glioma. Cancer. 110(1):13-24.

Schmitt AM, Crawley CD, Kang S, Raleigh DR, Yu X, Wahlstrom JS, Voce DJ, Darga TE, Weichselbaum RR, Yamini B (2011) p50 (NF-κB1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. Mol Cell. 44(5):785-96.

Schmitz ML, Bacher S, Kracht M. (2001) I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. Trends Biochem Sci. 26(3):186-90.

Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA. (1998) Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. Proc Natl Acad Sci U S A 3;95(5):2307-12.

Semenza G. (2000) HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch. Cancer Metastasis Rev. 19:59–65.

Shankar P, Manjunath N, Lieberman J. (2005) The prospect of silencing disease using RNA interference. Jama 293: 1367–1373.

Shapiro WR, Shapiro JR. (1998) Biology and treatment of malignant glioma. Oncology. 12: 233–240.

Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Nishi T, Sato I, Hiramoto M, Aizawa S, Hatakeyama M, Ohba R, Hatori H, Yoshikawa T, Suzuki F, Oomori A, Tanaka H, Kawaguchi H, Watanabe H, Handa H. (2000) High-performance affinity beads for identifying drug receptors. Nat Biotechnol. 18(8):877-81.

Silber JR, Bobola MS, Blank A, Chamberlain MC. (2012) O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. Biochim Biophys Acta. 1826(1):71-82.

Silber JR, Bobola MS, Blank A, Schoeler KD, Haroldson PD, Huynh MB, Kolstoe DD. (2002) The apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. Clin. Cancer Res. 8(9):3008-18.

Silber JR, Bobola MS, Ghatan S, Blank A, Kolstoe DD, Berger MS. (1998) O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. Cancer Res. 58(5):1068-73.

Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, Wilson SH. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-h in base-excision repair. Nature. 379:183–186.

Sobol RW, Kartalou M, Almeida KHh, Joyce DF, Engelward BP, Horton JK, Prasad R, Samson LD, Wilson SH. (2003) Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. J Biol Chem. 278(41): 39951-9.

Sobol RW, Wilson SH. (2001) Mammalian DNA h-polymerase in base excision repair of alkylation damage. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.; 68:57–74.

Søndergaard KL, Hilton DA, Penney M, Ollerenshaw M, Demaine AG. (2002) Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in tumours of patients with glioblastoma. Neuropathol Appl Neurobiol. 28(3):210-7.

Srivastava N, Gochhait S, de Boer P, Bamezai RN. (2009) Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. Mutat Res. 681(2-3):180-8

Srivenugopal KS, ShouJ, Mullapudi SR, Lang FF Jr, Rao JS e Ali-Osman F (2001) Enforced expression of wild-type p53curtails the transcription of the O(6)-

methylguanine-DNAmethyltransferase gene in human tumor cells and enhances theirsensitivity to alkylating agents. Clin. Cancer Res. 7, 1398–1409.

Stojic L, Brun R, Jiricny J. (2004) Mismatch repair and DNA damage signalling. DNA Repair (Amst).3(8-9):1091-101.

Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME. (2005) Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. Curr Neurol Neurosci Rep. 5(3):198-206.

Sukhanova MV, Khodyreva SN, Lebedeva NA, Prasad R, Wilson SH, Lavrik OI. (2005) Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. Nucleic Acids Res. 24;33(4):1222-9.

Sung JS, Mosbaugh DW. (2003) Escherichia coli uracil and ethenocytosine-initiated base excision DNA repair: Rate-limiting step and patch size distribution. Biochemistry. 42, p. 4613–4625.

Sutton MD, and Walker GC. (2001) Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 8342–8349.

Tafani M, Pucci B, Russo A, Schito L, Pellegrini L, Perrone GA, Villanova L, Salvatori L, Ravenna L, Petrangeli E, Russo MA. (2013) Modulators of HIF1α and NFkB in Cancer Treatment: Is it a Rational Approach for Controlling Malignant Progression? Front Pharmacol. 4:13

Talpaert-Borlé M, Liuzzi M. (1983) Reaction of apurinic/apyrimidinic sites with [14C]methoxyamine. A method for the quantitative assay of AP sites in DNA. Biochim. Biophys Acta**.** 740(4):410-6.

Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, Zhang H, Teng Q, Nicholson AC, Giannakakou P, Zhou W, Olson JJ, Pereira MM, Nicolaou KC, and Van Meir EG. (2005) Identifi cation of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. Cancer Res. 65, 605–612.

Tan C, de Noronha RG, Roecker AJ, Pyrzynska B, Khwaja F, Zhang Z, Zhang H, Teng Q, Nicholson AC, Giannakakou P, Zhou W, Olson JJ, Pereira MM, Nicolaou KC, and Van Meir EG. (2005) Identifi cation of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. Cancer Res. 65, 605–612.

Taverna P, Hwang HS, Schupp JE, Radivoyevitch T, Session NN, Reddy G, Zarling DA, Kinsella TJ (2003) Inhibition of base excision repair potentiates

iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. Cancer Res. 63(4):838-46.

Taverna P, Liu L, Hwang HS, Hanson AJ, Kinsella TJ, Gerson SL. (2001) Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. Mutat Res. 485:269–281.

Tazawa R, Xu XM, Wu KK, Wang LH. (1994) Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. Biochem Biophys Res Commun. 203:190–199

Tell G, Damante G, Caldwell D, Kelley MR. (2005) The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? Antioxid Redox Signal. 7(3-4):367-84.

Tell G, Fantini D, Quadrifoglio F (2010) Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. Cell Mol Life Sci. 67(21):3589-608.

Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Kelley MR (2009). The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. Antioxid. Redox Signal. 11: 601–620.

Ten RM, Paya CV, Israël N, Le Bail O, Mattei MG, Virelizier JL, Kourilsky P, Israël A. (1992) The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation. EMBO J. 11(1):195-203.

Tentori L, Graziani G (2009) Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. Curr Med Chem.16(2):245-57

Tentori L, Graziani G. (2002) Pharmacological strategies to increase the antitumor activity of methylating agents. Curr. Med. Chem. 9:1285–1301.

Tentori L, Portarena I, Torino F, Scerrati M, Navarra P, Graziani G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor increases growth inhibition and reduces G(2)/M cell accumulation induced by temozolomide in malignant glioma cells. Glia. 40(1):44-54.

Tobar N, Villar V, Santibanez JF. (2010) ROS-NFkappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. Mol Cell Biochem. 340(1-2):195-202.

Trivedi RN, Almeida KH, Fornsaglio JL, Schamus S, Sobol RW. (2005) The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. Cancer Res. 65(14): 6394-6400.

Tsang LL, Farmer PB, Gescher A, Slack JA (1990) Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humansand mice and evaluation of their cytotoxicity. Cancer Chemother.Pharmacol. *26*(6), 429-436.

Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liau LM, Cloughesy TF, Nelson SF. (2006) Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. Cancer Res. 66(1):159-67.

Tsunoda K, Kitange G, Anda T, Shabani HK, Kaminogo M, Shibata S, Nagata I. (2005) Expression of the constitutively activated RelA/NF-kappaB in human astrocytic tumors and the in vitro implication in the regulation of urokinase-type plasminogen activator, migration, and invasion. Brain Tumor Pathol. 22(2):79-87.

Tubbs JL, Pegg AE, Tainer JA. (2007) DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. DNA Repair (Amst). 6(8):1100-15.

Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM and Wenger RH. (2003) The hypoxiainducible factor-1 alpha is negative factor for tumor therapy. Oncogene 22: 3213-3220.

Van Nifterik KA, van den Berg J, van der Meide WF, Ameziane N, Wedekind LE, Steenbergen RD, Leenstra S, Lafleur MV, Slotman BJ, Stalpers LJ, Sminia P. (2010) Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. Br J Cancer. 103(1):29-35.

Vascotto C, Cesaratto L, Zeef LA, Deganuto M, D'Ambrosio C, Scaloni A, Romanello M, Damante G, Taglialatela G, Delneri D, Kelley MR, Mitra S, Quadrifoglio F, Tell G (2009) Genome-wide analysis and proteomic studies reveal APE1/Ref-1 multifunctional role in mammalian cells. Proteomics 9(4):1058-74.

Vascotto C, Fantini D, Romanello M, Cesaratto L, Deganuto M,Leonardi A, Radicella JP, Kelley MR, D'Ambrosio C, Scaloni A, Quadrifoglio F, Tell G (2009) APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process. Mol Cell Biol. 29:1834–1854

Vaupel P, Thews O and Hoeckel M. (2001) Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. Med Oncol. 18: 243-259.

Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID. (1994) A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. Nucleic Acids Res. 22(23):4884-9.

Walker LJ. Robson CN. Black E. Gillespie D. Hickson ID. (1993) Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. Mol Cell Biol. 13:5370–5376.

Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. (1999) Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. Nat. Med. 5, 412–417.

Wang D, Luo M, Kelley MR (2004) Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. Mol Cancer Ther. 3(6):679-86.

Wang D, Xiang DB, Yang XQ, Chen LS, Li MX, Zhong ZY, Zhang YS. (2009) APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. Lung Cancer. 66(3):298-304.

Wang GL, Semenza GL. (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA. 90:4304–8.

Wang GL, Semenza GL. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem. 270(3):1230-7.

Wang Y, Xiang GS, Kourouma F, Umar S. (2006) Citrobacter rodentium-induced NF-kappaB activation in hyperproliferating colonic epithelia: role of p65 (Ser536) phosphorylation. Br J Pharmacol. 148(6):814-24.

Welsh C. (2010) Molecular Mechanisms of Pathogenesis in Glioblastoma and Current Therapeutic Strategies in Glioblastoma. Editora Springer New York XII; pp 85-93.

Wiener C, Booth G, Semenza G. (1996) In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. Biochem Biophys Res Commun. 225:485–488.

Williams JL, Nath N, Chen J, Hundley TR, Gao J, Kopelovich L, Kashfi K, Rigas B. (2003) Growth inhibition of human colon cancer cells by nitric oxide (NO)-donating aspirin is associated with cyclooxygenase-2 induction and beta-catenin/T-cell factor signaling, nuclear factor-kappaB, and NO synthase 2 inhibition: implications for chemoprevention. Cancer Res. 63:7613–7618.

Winters ZE, Ongkeko WM, Harris AL, Norbury CJ. (1998) p53 regulatesCdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiationinducedG2 arrest in human cells. Oncogene 17: 673–684.

Woodhouse BC, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL (2008) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. DNA Repair 7:932–940.

Xanthoudakis S, Miao GG, Curran T (1994) The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. Proc Natl Acad Sci USA 91:23–27

Xanthoudakis S, Smeyne RJ, Wallace JD, Curran T. (1996) The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 20;93(17):8919-23.

Xiong GS, Sun HL, Wu SM, Mo JZ. (2010) Small interfering RNA against the apurinic or apyrimidinic endonuclease enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gemcitabine in vitro. J Dig Dis. 11(4):224-30.

Yamini B, Yu X, Dolan ME, Wu MH, Darga TE, Kufe DW, Weichselbaum RR. (2007) Inhibition of nuclear factor-kappaB activity by temozolomide involves O6-methylguanine induced inhibition of p65 DNA binding. Cancer Res. 67(14):6889-98.

Yang S, Misner BJ, Chiu RJ, Meyskens FL Jr. (2007) Redox effector factor-1, combined with reactive oxygen species, plays an important role in the transformation of JB6 cells. Carcinogenesis 28(11):2382-90.

Yang ZZ, Li MX, Zhang YS, Xiang DB, Dai N, Zeng LL, Li ZP, Wang G, Wang D. (2010) Knock down of the dual functional protein apurinic /apyrimidinic endonuclease 1 enhances the killing effect of hematoporphrphyrin derivative-mediated photodynamic therapy on non-small cell lung cancer cells in vitro and in a xenograft model. Cancer Sci. 101(1):180-7.

Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T. (2012) Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. Front Oncol. 2:186.

Yu SL, Lee SK, Johnson RE, Prakash L, Prakash S. (2003) The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. Mol Cell Biol. 23(1):382-8.
Yuan F, Zhang Y, Rajpal DK, Wu X, Guo D, Wang M, Taylor JS, and Wang Z. (2000) Specificity of DNA lesion bypass by the yeast DNA polymerase. J. Biol. Chem. 275: 8233–8239.

Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, and Semenza GL. (2000) Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: Association with angiogenesis, invasion, and progression. Cancer 88; 2606–2618.

Zaky A. Busso C. Izumi T. Chattopadhyay R. Bassiouny A. Mitra S. Bhakat KK. (2008) Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. Nucleic Acids Res. 36:1555–1566.

Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. (2012) Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Curr Mol Pharmacol. 5(1):102-14.

Zhong H, DeMarzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL and Simons JW (1999) Overexpression of Hipoxia-inducible Factor 1 in common human cancers and their metastases. Cancer Res. 59:5830-5835

Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. Mol Cell 9(3):625-36.

Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. Cell 89(3):413-24.

Zou GM, Luo MH, Reed A, Kelley MR, Yoder MC (2007) Ape1 regulates hematopoietic differentiation of embryonic stem cells through its redox functional domain. Blood 109(5):1917-22.

Anexo 1

ANEXO 1: Publicações

Artigos completos publicados em periódicos:

MONTALDI AP, SAKAMOTO-HOJO ET.Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide. Clin Exp Med. 2012 Jul 25 [Epub ahead of print]

DE OLIVEIRA JC, BRASSESCO MS, PEZUK JA, MORALES AG, VALERA ET, MONTALDI AP, SAKAMOTO-HOJO ET, SCRIDELI CA, TONE LG. In vitro PLK1 inhibition by BI 2536 decreases proliferation and induces cell-cycle arrest in melanoma cells. J Drugs Dermatol. 2012 May;11(5):587-92.

PEZUK JA, BRASSESCO MS, OLIVEIRA JC, MORALES AG, MONTALDI AP, SAKAMOTO-HOJO ET, SCRIDELI CA, TONE LG. Antiproliferative in vitro effects of BI 2536-mediated PLK1 inhibition on cervical adenocarcinoma cells. Clin Exp Med. 2013 Feb;13(1):75-80.

MORALES AG, BRASSESCO MS, PEZUK JA, OLIVEIRA JC, MONTALDI AP, SAKAMOTO-HOJO ET, SCRIDELI CA, TONE LG. BI 2536-mediated PLK1 inhibition suppresses HOS and MG-63 osteosarcoma cell line growth and clonogenicity. Anticancer Drugs. 2011 Nov;22(10):995-1001.

BRASSESCO MS, XAVIER DJ, CAMPAROTO ML, MONTALDI AP, DE GODOY PR, SCRIDELI CA, TONE LG, SAKAMOTO-HOJO ET. Cytogenetic Instability in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors. Journal of Biomedicine and Biotechnology (Print). 2011;2011. pii: 230481.

BRASSESCO MS, MONTALDI AP, GRAS DE, DE PAULA QUEIROZ RG, MARTINEZ-ROSSI NM, TONE LG, SAKAMOTO-HOJO ET. MLL leukemia-associated rearrangements in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals. Genet Mol Biol. 2009 Apr;32(2):234-41.

BRASSESCO MS, MONTALDI AP, SAKAMOTO-HOJO ET. Preferential induction of MLL(Mixed Lineage Leukemia) rearrangements in human lymphocyte cultures treated with etoposide. Genet Mol Biol. 2009 Jan;32(1):144-50.

BRASSESCO MS, MONTALDI AP, GRAS DE, CAMPAROTO ML, MARTINEZ-ROSSI NM, SCRIDELI CA, TONE LG, SAKAMOTO-HOJO ET. Cytogenetic and molecular analysis of MLL rearrangements in acute lymphoblastic leukaemia survivors. Mutagenesis. 2009 Mar;24(2):153-60.

Capítulos de livros publicados:

CARMINATI PA, GODOY PRDV, DONAIRES FS, MONTALDI AP, MEADOR JA, BALAJEE AS AND SAKAMOTO-HOJO ET. DNA-PK is a potential molecular therapeutic target for glioblastoma, Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications, Book edited by Terry Lichtor, InTech Open Access Pub., ISBN 980-953-307-523-0, p. 459-480, 2013.

GODOY PRDV, MELLO SS, MAGALHAES D, DONAIRES FS, MONTALDI AP, NICOLUCCI P, DONADI EA, PASSOS GAS AND SAKAMOTO-HOJO ET Portrait Of Transcriptional Expression Profiles Displayed By Different Glioblastoma Cell Lines. Brain Tumor /Book 2, ed. by Miklos Garami. In Tech Open Acess Publisher, ISBN 978-953-307-736-9, p.265-288, 2011.

Artigos submetidos ou em preparação:

MONTALDI AP, PEZUK JA, SAKAMOTO-HOJO ET, TONE LG, BRASSESCO MS. Base excision repair inhibition by Methoxyamine impairs growth and sensitizes osteosarcoma cells to conventionally used drugs. Neoplasma.

MONTALDI AP AND SAKAMOTO-HOJO ET. *APE1/REF-1* down regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line. (**ANEXO 1**).

Anexo 2

APE1/REF-1 DOWN REGULATION ENHANCES THE CYTOTOXIC EFFECTS OF TEMOZOLOMIDE IN A RESISTANT GLIOBLASTOMA CELL LINE

Montaldi, AP[1] and Sakamoto-Hojo, ET[1,2]

1-Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - USP;
2-Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto-USP, Campus USP de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, S.P., Brazil.

Keywords: *APE1/REF-1* gene, Glioblastoma, Base Excision Repair, Temozolomide, Redox function

***Corresponding author:** ElzaTiemi Sakamoto-Hojo, Department of Biology – Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of RibeirãoPreto, University of São Paulo – USP, RibeirãoPreto, SP.; Av. Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre 14040-901 – RibeirãoPreto, S.P., Brazil

Tel: +55 16 3602 3827 / Fax: +55 16 3602 0222. E-mail address: etshojo@usp.br

Financial Support

Supported by: *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* – FAPESP, Brazil (Grant numbers 2009/10106-5 and 2009/10925-6); *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* - CNPq, Brazil.

Abstract

Over the last decade, a variety of treatments for Glioblastoma (GBM) has been explored, but with very limited success. Various DNA repair pathways promote resistance to temozolomide (TMZ), a drug that is widely used in the GBM treatment. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE1/REF-1) is an essential enzyme of the base excision repair (BER) pathway, which is responsible for the repair of abasic sites caused by oxidative stress and alkylation. APE1/REF-1 also functions as a reduction factor, maintaining transcription factors (TF) in an active reduced state. In this study, we investigated the role that the BER pathway plays on the resistance of GBM cells to TMZ treatment by employing the *APE1* siRNA methodology. Our results demonstrated that *APE1* knockdown, although partial, associated with TMZ treatment of resistant GBM cells (T98G) was efficient in reducing cell proliferation and clonogenic survival, which appears to be due in part to an enhanced DNA damage, as observed by the induction of γH2AX and S-phase arrest. These events resulted in apoptosis and autophagy induction, which did not occur in a TMZ-sensitive cell line (U87MG). However, the APE1 redox function probably was not affected by its protein reduction, supported by the lack of modulation of *COX-2* and *VEGF* transcriptional expression, showing only effects caused by TMZ treatment. The absence of an effect of *APE1* knockdown might be due to a certain level of remaining proteins inside the cell. In U87MG cell line, in which the *APE1* down regulation was more efficient in reducing the APE1 protein expression, the *APE1* silencing associated to TMZ treatment were capable to reduce the invasiveness cell. In general, the present results show that the strategy of *APE1* gene inhibition was potentially viable, supporting the BER contribution to the TMZ resistance, since under the conditions tested, a sensitization of GBM cells was observed, with a greater effect on TMZ-resistant cells (T98G) and a limited effect on the TMZ-sensitive cells (U87MG). Thus, the genetic characteristics of each GBM cell line should be considered, since these are crucial to the responses presented by those cells to the treatment applied.

Keywords: *APE1/REF-1* gene, glioblastoma, temozolomide, siRNA, base excision repair, DNA damage responses.

Introduction

Over the last decade, a variety of different treatments were explored with very limited success (Mrugala, 2013) for patients with Glioblastoma (GBM). The current standard of care for newly diagnosed GBM patients includes surgery, radiotherapy and adjuvant temozolomide (TMZ) treatment, conferring a median survival time of 14.6 months (Ohka et al., 2012). These treatments rarely result in complete remission and are often accompanied by adverse toxic effects in longer surviving patients (Stupp et al., 2007). TMZ, a small lipophilic molecule, is an orally available monofunctional DNA alkylating agent belonging to the imidazotetrazine class (Zhang et al., 2012). The commonest site of methylation is at the N7 position of guanine (N7-Methyl-G; 60–80%) followed by the N3 position of adenine (N3-Methyl-A; 10–20%) and the O6 position of guanine (O6-Methyl-G; 5–10%) (Zhang et al., 2012; Fu et al., 2012).

Various DNA repair pathways in GBM promote resistance to induced-TMZ base lesions (Yoshimoto et al., 2012). The major of these is the monomeric MGMT enzyme, which operate only restoring O6-Methyl-G (Silber et al. 2012). However, N7-methyl-G and N3-methyl-A lesions and abasic sites comprise more than 80% of TMZ-induced lesions in DNA (Sobol and Wilson, 2001; Tentori and Graziani 2009), which are efficiently repaired by the BER (Base Excision Repair) pathway (Tentori and Graziani, 2009; Zhang et al., 2012; Yoshimoto et al., 2012).

Human apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 (APE1/REF-1) is an essential enzyme of BER pathway, which is responsible for the repair of abasic sites caused by oxidative and alkylation damage. In addition to its role in DNA repair, APE1 also functions as a reduction/oxidation (redox) factor in mammals cells, maintaining transcription factors in an active reduced state, thus stimulating the DNA binding capacity of several transcription factors (TFs) such as AP-1 (activator protein-1 - fos/Jun), NFκB (nuclear factor-κB), HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1-α), CREB, TP53 and others (Tell et al., 2009; Luo et al., 2010; Abbotts and Madhusudan, 2010; Kelley et al., 2012).

In cancer cells, including GBM, high expression levels of APE1 have been reported, and an altered subcellular localization of APE1 correlates with cellular resistance to chemotherapeutic agents in several cancer cell lines (Bobola et al., 2001; Kelley et al., 2001; Robertson et al., 2001; Silber et al., 2002). Targeted reduction of APE1 protein by small interfering RNA or expression of dominant-negative APE1 increases cellular sensitivity to ionizing radiation and alkylating and oxidizing agents, suggesting APE1 as a potential therapeutic target in cancer cells (Wang et al., 2009; Xiong et al., 2010; Chen et al., 2013; Gu et al., 2013). Similarly, inhibition of the repair activity of APE1 by methoxyamine (MX), which can block the DNA repair function of APE1, but not its redox function, increases tumor cell sensitivity in combination with alkylating agents such

as TMZ (Fishel et al., 2007; Montaldi and Sakamoto-Hojo, 2012). Possibly, both functions of APE1 may contribute to the resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents. Although the repair function of APE1 probably plays a direct role in cell resistance, the redox function may play an indirect role by controlling the expression of genes participating in cell survival, tumor promotion, and tumor progression (Fishel and Kelley, 2007; Luo et al., 2010).

On the basis of the above considerations we investigated the effect of *APE1* knockdown, using siRNA methodology, in the resistance of GBM cells to TMZ treatment. Under the experimental conditions tested, our results demonstrated that *APE1* gene knockdown, although partial, associated with TMZ treatment of resistant GBM cells (T98G) was effective in reducing the cell proliferation and clonogenic survival, leading a cell death, which not occurred in sensitive cell line (U87MG). However, the redox function of APE1 probably was not affected by its protein reduction, probably by a partial *APE1* knockdown, resulting in a certain level of proteins still remaining in the cell, performing this function. These data confirm that APE1 is important for the growth and proliferation of resistant GBM cells treated with TMZ (T98G), supporting the contribution of BER in resistance to this drug, however, being somewhat effective in sensitizing sensitive cells (U87MG) to this agent. Thus, inhibitors of APE1 have therapeutic implications in the treatment associated with TMZ treatment.

Materials and Methods

Cell lines and culture

U87MG and T98G were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). After thawing, cells were cultured in HAM F10/DMEM (1:1) medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP), penicillin (100U/ml), and streptomycin (100mg/ml) at 37° C in a humidified 5% CO_2 incubator.

siRNA inhibition and TMZ treatment

Cells were transfected with APE1siRNA (sc-29470; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and non-specific siRNA control (sc-37007; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at a final concentration of 80 nM with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's protocol. The efficiency of siRNA transfection was confirmed by Western blot, monitored along 4 days (24 to 96 h). The treatment with TMZ (TEMODAL® - Orion Corporation, Turku, Finland) was performed after 48 h following transfection; T98G and U87MG cell lines were treated with TMZ 600 µM and 10 µM, respectively, and the drug remained in culture for 24 h.

Western blot Analysis

Cells were lysed in 200 µL of the ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON) supplemented with HaltTM Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). Protein concentration was determined by BCA Protein Assay Reagents (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL), according to the manufacturer's instruction. Proteins (30 µg) were separated by electrophoresis in NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) and blotted onto a PVDF membrane (Invitrogen, Carlsbad, CA). Samples were incubated in blocking buffer before the addition of the primary antibody for APE1 and γ-H2AX (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), caspase-3 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), *p-NFkB*-p65 $^{(ser536)}$ (1:1,000 Cell Signaling Technology, Beverly, MA), and then incubated with the secondary antibody (Western Breeze Chromogenic Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). Anti- β-actin and β-Tubulin antibody (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used as endogenous controls (normalization). The immuno-detection was accomplished using a Western Breeze Chromogenic Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The band intensity was determined by using the Gel-Pro Analyzer 4.0 software (Media Cybernetics, Inc).

Cell Growth Assay

After transfection of APE1siRNA in GBM cells (T98G and U87MG) and treatment with TMZ, cells were seeded (5,000 cells/well) in 12-well plates, and were incubated at 37°C, being allowed to recover for 1, 2, and 3 days. Afterwards, culture medium was removed and replaced with a medium containing 60 µL in each well of XTT (sodium 3´-[1-(phenylaminocarbonyl) - 3,4-tetrazolium]-bis (4-ethoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) assay - Cell Proliferation Kit II – XTT, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). The plates were incubated for 30 minutes at 37 °C and the formazan product was measured by using a spectrophotometer (Ultrospec^{TM} 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Each experiment was performed on replicate wells and independent experiments were repeated three times.

Clonogenic Assays

Clonogenic assays were performed according to Franken et al. (2006). In brief, after T98G and U87MG cells were transfected with APE1siRNA, 500 and 1,000 cells/flask, respectively, were seeded in triplicate for each treatment. Approximately 10 days after treatment, cells were washed in PBS, fixed and stained with Giemsa. The colonies with more than 50 cells were counted. Three independent experiments were performed.

Comet Assay

After transfection with APE1siRNA T98G and U87MG cells were assayed for viability using trypan blue dye exclusion and only cultures showing cell viability above 70 % were considered suitable for the comet assay. This assay was performed as described previously by Singh et al. (1988). Briefly, 1 x 10^4 cells in suspension, following 2, 6, and 24 h of recovery, were kept on ice and protected from the light. The cell suspension was centrifuged at 500 rpm for 5 minutes at 4 °C. The pellet was re-suspended in 100 µL of 0.5 % low-melting point agarose (Gibco, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C, and the mixture was spread onto two microscope slides pre-coated with 1.5 % normal-melting point agarose (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Coverslips were placed on the gel. Next, the coverslips were removed and the slides were immersed in cold (4 °C) lysis solution (1 % Triton X-100, 10 % DMSO, 2.5 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Na_2EDTA, 100 mmol/L Tris, pH 10) for 4 h. Immediately, slides were placed in a horizontal electrophoresis unit containing buffer (1 mmol/L Na_2EDTA, 300 mmol/L NaOH, pH >13). The DNA was allowed to unwind for 20 min, and subsequently, electrophoresis was performed at 25 V, 300 mA for 20 min. The slides were then immersed in a neutralization buffer (0.4 mol/L Tris–HCl, pH 7.5) for 15 min and fixed with ethanol. The cells were stained with propidium iodide (40 µL/slides) and analyzed with fluorescent microscopy. Percentages of DNA in tails of more than 100 cells per slide were calculated with the Comet Score software (v1. 5; TriTek Corporation, Sumerduck, VA). Experiments were performed in triplicate.

Cell Cycle Analysis

After performing APE1siRNA transfection and TMZ treatment, cells were washed with PBS and fixed in 70% ethanol, stained with propidium iodide, and analyzed in a Guava EasyCyte Mini System (Merck Millipore, Billerica, MA), according to the standard protocol provided by the manufacturer. Percentages of cells undergoing G0/G1, S, or G2/M phase were collected on Day 1, 2, and 3 after treatment and processed by using the Guava CytoSoft 4.2.1 version software (Merck Millipore, Billerica, MA).

Apoptosis Assays via Annexin-V Staining

Apoptosis detection was evaluated on Day 1, 5 and 10 following APE1siRNA transfection and TMZ treatment. Aliquots of 2 x 10^4 cells were centrifuged at 500 rpm for 5 minutes and apoptosis induction was measured through the Guava Nexin Reagent (Merck Millipore, Billerica, MA), according to manufacturer's instructions. The samples were analyzed by flow cytometry Guava Personal Cell Analysis system (Merck Millipore, Billerica, MA).

Quantification of Acidic Vesicular Organelles (AVOs) with Acridine Orange Staining

To detect and quantify AVOs in response to APE1siRNA and TMZ treatment, we performed the cell staining with acridine orange. In acridine orange-stained cells, the cytoplasm and nucleolus appear fluorescent bright green and faint red, whereas acidic compartments show red brightness. The intensity of the red fluorescence is proportional to the degree of acidity. Therefore, the volume of the cellular acidic compartment can be quantified (Traganos and Darzynkiewicz, 1994; Kanzawa et al., 2003). Cells were stained with acridine orange (final concentration of 1 µg/ml) for 15 min, removed from the plate with trypsin-EDTA, and collected in phenol red-free growth medium. Green (510–530 nm) and red (650 nm) fluorescence emission from 1 x 10^4 cells under blue (488 NM) excitation light was measured with a Guava Personal Cell Analysis system (Merck Millipore, Billerica, MA).

Cell Invasion Assay

Cell invasion was determined by the use of modified chambers containing transwell polycarbonate membranes (Costar, Massachusetts, Cambridge). Briefly, after silencing and TMZ treatment the cell culture chambers were pre-coated with 24 µg/µL of Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA). GBM cells were seeded into the upper chamber ($1x10^4$ cells per well using a DMEM serum-free medium). In the lower chamber, 750 µL of DMEM with 10% fetal bovine serum was added as a chemo-attractant. After cell incubation for 22 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere, cells in the insert were washed with PBS, while cells on the top surface of the insert were removed with a cotton swab. Cells adhering to the lower surface were fixed with methanol (100%) and stained with Giemsa. For the analysis, ten fields were randomly selected for each chamber to count the number of cells with the microscope (200X magnification).

Quantitative Real-Time RT-PCR

Changes in transcript profiles of *COX-2*and *VEGF* target genes caused by APE1siRNA and TMZ treatment were analyzed by quantitative real time PCR. After treatment, cells were collected, and total RNA was isolated using illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Germany) and first-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1µg of each RNA sample using the Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The following genes were analyzed: *COX-2* (RefSeqs: *Hs00153133_m1*) and *VEGF* (RefSeqs: *Hs00900055_m1*). Gene expression assays for endogenous controls were: *HPRT1* (RefSeqs: *Hs02800695_m1*) and *TBP* (*Hs00427620_m1*). All assay plates were run on StepOnePlus Real Time System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and Cycle Threshold (CT) values were extracted from each assay with the StepOne plus software v2. 1

(Applied Biosystems, Foster City, CA). To determine the relative expression levels, we used the method of Comparative CT, or $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical Analysis

All data are expressed as mean ± SD (standard derivation) except those values of gene expression that were expressed as fold-change values. The statistical analysis was performed using the SigmaStat software (Jandel Scientific Company, San Rafael, CA). Student's t-test was used to establish whether significant differences existed between the groups. All *P*-values were two sided, and $P < 0.05$ was considered as statistical significant difference.

RESULTS

Transient suppression of APE1 expression by ribonucleic acid interference (RNAi)

In the experiments of gene silencing, the reduction in APE1 protein expression by siRNA transfection was confirmed by Western blot. The results showed that the expression levels of APE1 protein in the APE1siRNA silenced cells declined in both cell lines (T98G and U87MG), compared with the scrambled control siRNA (SCR). We observed a maximum reduction (46.7%) of protein expression at 72 h in T98G cells, while for U87MG cells, the greatest decrease (76.7%) occurred at 96 h (**Fig. 1A**). **Figure 2B** demonstrates the quantitation of the levels of APE1 expression over time.

Knockdown of APE1 gene reduced cell proliferation and clonogenic survival in TMZ-resistant but not in TMZ-sensitive GBM cells

TMZ treatment was administered when the reduction of protein expression was 46.2% in T98G cells and 54.4% of U87MG cells, observed at 48 h. The drug concentration was chosen from the IC_{50} observed in the clonogenic survival assay (Data not shown). The IC_{50} for TMZ treatment in T98G and U87MG cells were 600 µM and 10 µM (TMZ), respectively, which remaining in the culture along additional 24 h. Following TMZ treatment, the cell proliferation of GBM cell line T98G and U87MG transfected with APE1siRNA was monitored along three days. In APE1siRNA T98G cells, TMZ treatment significantly (p<0,001) reduced cell proliferation rates, and a maximum effect of 39.6% occurred at day 3; on the other hand, the APE1siRNA transfection itself inhibited only 10% the cell growth in the same time-point (p<0,001). TMZ treatment alone did not show significant reduction, indicating the high resistance of these cells (**Fig. 2A**, left panel). An effect more pronounced of APE1siRNA and TMZ treatment was observed in clonogenic survival, since we observed a significant reduction (63.1%; p<0,001) in the survival rates. APE1siRNA by itself failed in decreasing the colony formation capacity, similarly to TMZ treatment (**Fig. 2B**, left

panel). Similar experiments performed in U87MG cells showed that both the APE1siRNA transfection and TMZ treatment were unable to reduce cell proliferation (**Fig. 2A**, right panel). On the other hand, the colony formation capacity was reduced in both conditions (APE1siRNA-TMZ treated and TMZ-treated cells) equally, but not in APE1siRNA cells (**Fig. 2B**, right panel). Therefore, in our experimental conditions, *APE1* knockdown was more effective in sensitizing T98G cells, which are more resistant to TMZ compared with U87MG.

Knockdown of APE1 gene enhanced TMZ induced-DNA damage in resistant T98G cells

The comet assay was used aiming to analyze the repair kinetics of DNA damage (DNA breaks) after *APE1* silencing, by collecting cells at different recovery times. A significant increase ($p < 0.01$) in the percentage of DNA in the tail, assessed in terms of tail intensity (TI), was observed at 0 h (16.5%) and 6 h (21.6%) in T98G APE1siRNA-treated cells relative to SCR and APE1siRNA cells. This enhanced DNA damage was significant ($p < 0.01$) after 6 h of recovery in comparison to TMZ-treated cells. The transfection *per se*, and TMZ treatment did not induce DNA damage at any time (**Fig. 2C**, left panel). Likewise, for U87MG, there was a TI induction at the initial time-point (10.7%) with an enhanced at 6 h (13.3%) of recovery, observed in APE1siRNA-treated cells ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) relative to SCR cells. A greater increase was observed at 6 h relative to TMZ-treatment (8.4%, $p < 0.05$) and APE1siRNA cells (8.5%, $p < 0.001$). The APE1siRNA was also able to increase the levels of TI ($p < 0.05$), but to a lesser intensity at zero and 6 h. However, TMZ caused an elevation of DNA damage ($p < 0.01$) only at 0 h (9.6%) (**Fig. 2C**, right panel). As seen in T98G cells, U87MG also recovered the DNA damage after 24 h of treatment, at all conditions tested. However, this assay does not indicate to what extent such recovery may lead cells to survival, or which part of these cells may undergo cell death

Knockdown of APE1 gene induced S-blockage in the resistant GBM cell

We then studied whether the down-regulation of *APE1* in TMZ-treated cells may induce changes in cell cycle progression. In T98G cells, TMZ caused a significant blockage at the G2/M phase of the cell cycle (32.1, 30.9, and 34.8%), following 1, 2 and 3 days, respectively, and the same occurred when the APE1 gene was knocked-down (34.7, 32.9, and 28.6%, respectively) in TMZ-treated cells. Thus, the G2/M arrest occurred regardless of APE1siRNA. Similarly, APE1siRNA cells showed an S-phase arrest after 3 days, irrespective of TMZ treatment, indicating a blockage in DNA replication (**Fig. 4A**). In the experiments with U87MG cells, a high increase of cells blocked at G2/M phase was observed in TMZ-treated cells (37.1, 55.0, and 48.2%) as observed at day 1, 2 and 3, respectively. However, the knockdown of *APE1* gene did not cause significant changes in the cell cycle kinetics in these cells prevailing the effects of the drug itself.

Curiously, the association of TMZ treatment and APE1siRNA transfection caused a significant reduction in the percentage of cells undergoing the G2/M phase (31.0, 43.3, and 43.3%) compared with cells treated with TMZ alone (**Fig. 4B**; **Table 1**).

APE1 knockdown enhanced apoptosis and autophagy in TMZ-treated T98G cells

Induction of apoptosis by down-regulation of *APE1* was evaluated by Annexin-V staining. A peak of apoptosis induction in APE1siRNA-treated T98G cells occurred at day 3 (27.3%, $p < 0.001$), but the percentage of induction was still high after day 5 (24.5%, $p < 0.001$) and fell down following 10 days (16.5%, $p < 0.001$), with a small time-dependent decrease (**Figure 5A** left panel). The TMZ treatment itself induced a significant increase in the apoptosis frequency, at days 3 and 5 ($p < 0.01$), but to a lesser level than that observed for APE1siRNA-treated cells. Differently, in U87MG cells, as shown in the **Figure 5A** (right panel), a significant apoptosis induction ($p < 0.001$) analyzed as Annexin-V positive cells was observed at the Day 3 for the group of APE1siRNA-treated cells (16.4%) and also for TMZ-treated cells (14.0 %), with a small but statistically significant ($p < 0.05$) difference between these groups. APE1siRNA cells showed a low level of apoptosis induction following 3 and 10 days. Since apoptosis is not the sole kind of death, we examined the occurrence of autophagy. In APE1siRNA T98G cells following TMZ treatment (**Figure 5B)**, the percentage of autophagic cells was 3,8 times higher (12,9%) than that induced by TMZ alone (3,4%), or relative to *APE1*siRNA cells (2,8%), indicating a certain contribution of autophagy in the mechanism of cell death. However, we did not find similar results for U87MG. In these cells, another type of death should be involved in the responses to drug treatment under conditions of *APE1* silencing. In accordance with these results, phosphorylated H2AX (ser139) was more expressed in APE1siRNA-treated cells compared with TMZ-treated cells in both cell lines, as observed at two collection times, 3 and 5 days (**Fig. 5D**), thus confirming the generation of DNA double strand breaks, important lesions that lead to cell death.

APE1 down-regulation reduced the cell invasion, but did not affect the gene expression of COX-2 and VEGF

To examine the effect of *APE1* knockdown in cell invasion after treatment, GBM cells were cultured on a cell culture chamber coated with matrigel. After 22 h of incubation, the percentages of invading cells were counted in *APE1* knockdown T98G and U87MG cells. While cell invasion was reduced at 74.3% ($p < 0.001$) in APE1siRNA T98G cells, TMZ treatment alone caused 74.4% of reduction ($p < 0.001$). Moreover, *APE1* knockdown in T98G treated cells was efficient in decreasing 88.4% the cell invasion relative to SCR ($p < 0.001$), APE1siRNA ($p < 0.01$), and TMZ-treated cells ($p < 0.001$). Interestingly, for U87MG cells, *APE1* knockdown in TMZ-treated cells was very effective to reduce the invasion (63.1%), compared with the controls,

APE1siRNA cells ($p < 0.01$) or TMZ-treated cells ($p < 0.001$), in spite of the fact that each one of these conditions could not reduce the invasion capacity of U87 cells (**Fig. 6A**). In order to further test whether *APE1* knockdown reduce the redox activity of APE1 protein directed to their targets, such as the NFkB and HIF1 TFs, we examined the expression levels of *COX-2* and *VEGF*, which are targets for these TFs, respectively. In T98G cells, *COX-2* and *VEGF* genes were down-regulated by TMZ treatment, and a similar result was observed in *APE1* silenced TMZ-treated cells. Regarding to U87MG cells, *VEGF* was up-regulated, but *COX-2* was not significantly modulated (**Fig. 6B**). These results show a predominant effect caused by TMZ treatment itself, suggesting that the APE1 redox function was not affected by the partial reduction in protein expression. Interestingly, the reduction of APE1 protein expression by APE1siRNA, when associated with the TMZ treatment, increased the expression of p65 phosphorylated at serine 536, which was more evident in T98G cells, as analyzed at days 3 and 5 (**Figure 6C**).

Discussion

APE1 is responsible for 95% of the endonuclease activity in the cell and is a critical part of both the short-patch and the long-patch BER pathways (Evans *et al*., 2000). Evidences have demonstrated that the heterogeneity of APE1 expression pattern is linked to different pathological conditions ranging from metabolic to differentiate disorders and, in particular, to cancer, and that elevated levels of APE1 have been linked to resistance to chemotherapy, dismal prognosis and poor survival (Tell et al., 2010). The use of BER repair inhibitors is an attractive approach to chemotherapy or radio-sensitization (Parkinson et al., 2008; Adhikari et al., 2008; Johannessen et al., 2008; McNeill et al., 2009; Illuzzi and Wilson, 2012). In the same way, siRNA-mediated down-regulation of *APE1* induced apoptosis of many tumor cell types and enhanced cell sensitization to ionizing radiation and chemotherapeutic agents (Wang et al., 2004; Fung and Demple, 2011; Cun et al., 2013).

Here we investigate whether APE1, an important protein in DNA repair and in redox signaling, can contribute to resistance to TMZ treatment. In this report, we used the RNAi strategy, which has become a powerful research tool in gene function studies. siRNA treatment knocked out maximum of ~ 46 and 76% of the APE1 protein in T98G and U87MG cells, respectively. Meanwhile, TMZ treatment was performed as we had a reduction of 46.2 and 58.8%, respectively. The reduced APE1 expression by itself was able to reduce cell proliferation, but not the clonogenic capacity in T98G cells, however, in U87MG no effect was observed. As reported by Fung and Demple (2005), even in the absence of exogenous DNA damage in human cells (lymphoblastoid cells, colon and breast cancer), siRNA directed against the APE1 gene also results in a decrease in cell proliferation, followed by augmentation of AP sites and increased levels of apoptosis. In

gliomas, the elevation of APE1 activity was reported as a marker of glial tumorigenesis, which may be due in part in response to increasing oxidative metabolism (Bobola et al., 2001). Thus, the absence of this gene in the BER repair pathway may have caused a mechanical failure in a way to reduce the proliferation of T98G cells by high levels of basal damage not repaired, which was not occurring in U87MG cells. However, when the APE1 expression restored (10 days), the clonogenic capacity returned in T98G silenced cells.

Evaluating the reduction in the expression of APE1 in response to TMZ, It was observed in T98G APE1siRNA-treated cells reduced cellular proliferation by ~ 40% (3 days) and the clonogenic survival rate at ~ 63% (10 days), which was not observed in TMZ-treated cells. This demonstrates the high resistance to treatment with this drug and the strong effect of *APE1* silencing in this cell line. Additionally in these cells, the silencing and treatment caused a greater increase in DNA damage in 6 h. TMZ also induced effects with blockage in G2/M, but the silencing caused an accumulation of cells in S-phase on day 3, regardless of TMZ treatment. It is possible that the presence of unrepaired base lesions and AP sites may have blocked DNA synthesis by DNA polymerase, leading to blockage of DNA replication and accumulation of cells in S phase. In contrast, U87MG cells that none of the conditions tested reduced the proliferation, as assessed in 3 days. However, the TMZ-treatment by itself and APE1siRNA TMZ-treatment decreased colony formation after 10 days, with effect caused by TMZ. In these cells, the APE1 silencing and treatment induced an only slight increase in DNA damage, relative to TMZ-treated cells only 6 h after treatment. The TMZ prominent effect on U87MG cells was noted by the accumulation of cells in cell cycle G2/M phase in both treatment groups (APE1siRNA plus TMZ and TMZ-treatment).

The *TP53* gene is mutated in T98G cells, and the wild-type in U87MG (Ishii et al. 1999), one possible explanation for the difference in response between the cells. It has been demonstrated that the *TP53* wild-type negatively regulates the expression of APE1 by binding to its promoter in HCT116 colon carcinoma cells (Zaky et al. 2008). Thus, presumably, the cells utilize TP53 expression as a negative control for APE1 in response to DNA damage (Bhakat et al. 2009). It is also known that the U87MG cells lack the MGMT activity, main TMZ resistance mechanism, unlike the T98G cells (Hermisson et al. 2006). Interestingly, the T98G cells, which are highly resistant to TMZ treatment, showed sensitized by APE1 gene silencing and TMZ-treatment, with the consequent interruption of the BER pathway. This occurred regardless of the major repair mechanism associated with resistance to TMZ treatment, which is MGMT repair, another mechanism negatively regulated by TP53 (Harris et al. 1,996; Grombache et al. 1998; Srivenugopal et al. 2001)

In glioma cells, it was reported that TMZ induces G2/M cell cycle blockade (Tentori et al., 2002; Hirose et al., 2001) *TP53*-dependent followed by senescence, or a *TP53*-independent pathway leading the mitotic catastrophe (Hirose et al., 2001). Therefore, it is possible that intrinsic

genetic alterations to each cell line show different responses to the same treatments, especially regarding the proficiency of the *TP53* gene in U87MG cell, as this act by blocking the cycle in G2/M via $p21^{WAF1}$ (Bunz et al., 1998; Winters et al., 1998), which in this cell was extremely high, overlapping the effects of the absence of APE1, that can also be inhibited by TP53. There is the possibility that in response to damage caused by TMZ in U87MG cells, TP53 negatively regulates the expression of APE1, becoming unresponsive to the reduction in the expression of this protein, even partial, as seen in the proliferation assay, clonogenic survival and cell cycle. As mentioned, *TP53* is not necessary to induce G2/M arrest, but this determines the duration of the blockade, together with minimal changes in the expression of *TP53* or $p21^{WAF1}$ (Hirose et al. 2001). In *TP53* deficient cells the reentry in cell cycle may result in the acquisition of new genetic alterations generating cells more resistant to TMZ treatment (Hirose et al., 2001), which may have occurred in T98G cells treated with this drug, since these are resistant to reduce the clonogenic capacity, however, that was reversed by silencing of *APE1*.

A recent work emphasizes the evidence that 3-methyl-A lesions, that are toxic due to their ability to directly block the DNA polymerization, blocking the DNA replication (Iyer et at. 2012). Whereas N-methylated bases constitute about 80% of TMZ-induced injury (Zhang et al. 2012), promoting the formation of AP sites by destabilizing the glycosidic bond between the base and deoxyribose (Loeb and Preston, 1986). These sites prevent DNA synthesis by replicative DNA polymerase leading to blockage of DNA replication, an apparent source of cytotoxicity (Loeb and Preston, 1986; Yuan et al., 2000; Sutton and Walker, 2001), explaining the S-phase arrest in T98G cells. Interestingly, an increase of the phosphorylated H2AX level in T98G cells was observed on day 3, correlating to the blockage in S-phase, as well as on day 5, a fact that also occurred in U87MG cells. Ewald et al (2007) also reported in gemcitabine treated cells the relation of H2AX phosphorylation with DNA synthesis and S-phase arrest with the activation of checkpoint proteins on this phase. Additionally, the correlation of APE1 increased expression in the beginning or middle of the S-phase, indicating a role of this protein in this particular cell cycle phase (Fung et al., 2001), leads us to suggest that possibly the APE1 knockdown, even with the restoration of its expression in 10 days as well as damage recovery after 24 h (evaluated by comet assay), the lesions caused by TMZ treatment in T98G cells were permanent, which caused a reduction of clonogenic growth.

According to McNeill et al. (2009) the monofunctionality (single reactive group, reacting covalently with a single nucleophilic center of the DNA), a propensity to form N7-guanine and N3-adenine adducts and a low capacity to generate modifications in O6-guanine and inter- and intrastrand crosslinks in DNA are collectively an indicator for the potential involvement of APE1 and BER in response to alkylating agents, such as TMZ. This suggests that the increase in damage in silenced and TMZ-treated cells are due to lesions induced by this drug, which have not been

repaired due to reduced expression of APE1, albeit partial. This fact confirms the observation since that TMZ treatment caused intense nuclear APE1 recruitment two hours after treatment, as seen in the results of immunofluorescence for the T98G cells. Moreover, due to the *APE1* silencing, lower or absent nuclear staining was seen in response to treatment, suggesting that these injuries have probably not been repaired.

The results presented here demonstrate an important role of lesions generated by TMZ via BER pathway when the process is not active. The APE1 reduction caused apoptosis induction as assessed by annexin-V staining in T98G transfected and treated cells on day 3 reaching a maximum of 27.3% of annexin V-positive cells. Apoptosis induction was reduced over the 10 days that was evaluated, but maintaining higher in APE1siRNA treated cells, explaining the reduced growth rate at this time. In U87MG cells, apoptosis doesn't seem to be the main mechanism of death induced by the APE1 expression reduction and TMZ treatment, although the induction observed on day 3 was slightly higher in these cells relative to TMZ treatment. Other studies have also demonstrated the apoptosis induction in conditions of reduced expression of APE1 and cisplatin treatment (Wang et al., 2009), gemcitabine (Xiong et al., 2010) and radiation (Chen et al., 2013). In this last paper, the rise around 16% of apoptotic indices after APE1 knockdown in response to radiotherapy was similar to those observed in the present study. However, these rates of apoptosis encouraged us to assess another type of death, such as autophagy, since TMZ is known to induce this type of death (Kanzawa, et al. 2004). Again, the T98G APE1siRNA-treated cells, but not U87MG, showed a 3.8-fold induction of autophagic death, thus also contributing to the elimination of these cells. Although there is no report in the literature correlating this type of death with APE1 reduced expression. However, a recent paper suggests that glioma cells, in response to treatment with TMZ, undergo autophagy followed by senescence or apoptosis in a time-dependent manner, with a complex interaction among them. The decision of death or survival dependent on the balance among these mechanisms, but these effects are abolished in MGMT expressing cells, suggesting that O6-methyl-G lesions are responsible for autophagy induction in these cells (Knizhnik et al. 2013).

Knizhnik et al. (2013) mentions autophagy as a universal cytoprotective mechanism against DNA damage agents, which was also recently been proposed in hepatoma cells (Chen et al. 2011). Thus, Knizhnik et al. (2013) demonstrate that autophagy precedes apoptosis and thus promote survival by inducing senescence. However, Palumbo et al (2012) also in T98G cells showed an increased sensitization by autophagy induction in response to TMZ treatment and radiation. Based on this work, it is possible that other lesions, different from O6-methyl-G, may also induce this type of death, since that autophagyc death was observed in T98G cells, which has MGMT expression. Thus, in the present study the autophagy induction may have occurred in order to sensitize T98G cells by not repaired base lesions due to *APE1* silencing.

A better understanding of APE1 involvement, either by function redox or repair DNA, in the resistance of GBM to TMZ treatment is important in the search for a more effective way of treating these tumors. In order to assess the importance of redox function, we investigated the role of APE1 in the cellular invasion process. The key event to degrade physiological barrier tissue and start this process is basically controlled by HIF-1α and NFkB genes (Tafani et al., 2013), which as mentioned previously are regulated by APE1.The results showed a great effect in reducing the invasion by the decreasing of APE1 expression in T98G cells (74.3%), but also occurred in TMZ-treated cells (74.4%), resulting in an additive effect in combination (88.4%). In U87MG cells, the combination was effective in reducing the invasion (63.1%), which did not occur in isolated conditions. It is noteworthy that in U87MG cells, which we obtained maximum knockdown of 76.7% (96 h) resulted in a marked reduction in cell invasion, suggesting that the combination of APE1 silencing and TMZ treatment someway influenced this response, which did not occur for the other parameters in U87MG cells. Interestingly, it was recently discovered a new role of MGMT in negatively regulate cell invasion (Chahal et al., 2012). It is known that in U87MG cells has no MGMT enzyme activity (Hermisson et al., 2006) and this was highly invasive, process by which was reversed by the reduction in the APE1 expression associated with TMZ treatment, suggesting that the combination, anyway affected this process, but requires a more detailed study to understand this effect.

Interestingly, the expression of *COX-2* and *VEGF*, target genes of TFs (NFkB and HIF-1α) regulated by APE1 were not changed in the condition of the *APE1* knockdown, being regulated only by the TMZ action. There are no reports in the literature of studies involving *VEGF* expression in response to the *APE1* silencing and TMZ treatment, but only studies showing the influence of both isolated. There are results indicating that APE1 may play a crucial role in angiogenesis in response to the irradiation by induction of *VEGF* expression (Gu et al., 2013), showing that APE1 may regulate this gene. On the other hand, the effects of TMZ treatment demonstrate *VEGF* induction in U251 and U87MG glioma cell (Fisher et al., 2007), which confirms our studies in U87MG cells. Contradictorily, some authors showed that TMZ does not induce *VEGF* expression in U251 (Lu et al. 2012), as was also observed in T98G cells. Together, this work show that *APE1* silencing did not affect the expression of *VEGF*, and both cell lines responded differently to the TMZ treatment.

COX-2 is regulated by NFκB through two binding sites present in this gene (Tazawa et al, 1994). In vitro, the inhibition of this protein showed attenuate *COX-2* expression in colorectal cancer cells (Plummer et al, 1999, Williams et al, 2003). Additionally, the *COX-2* expression has been shown to induce p65, however, not by p50 or IKKα (Charalambous et al. 2009). Interestingly, in both silenced and TMZ-treated cells showed an increase in phosphorylated p65 $^{(ser536)}$ protein expression compared to TMZ-treated cell. As mentioned, in the same way as the *VEGF* gene, the

COX-2 expression also did not change by *APE1* silencing but only by the action of TMZ in T98G cells, but was not changed in U87MG. In response to TMZ treatment, studies show suppression of *COX-2* expression, and this effect does not involve the action of redox-sensitive residues or phosphorylation of the p65. However, TMZ acts on the transactivation COOH-terminus domain of p65, resulting in a molecular conformational change that blocks their binding to DNA, thus preventing the binding of NFκB to *COX-2* and *Bcl-XL* promoter (Yamini et al. 2007). Furthermore, Schmitt et al. (2011) showed that TMZ blocks the transcriptional activity of NFκB in GBM cells by phosphorylation of p50 subunit of serine 329, preventing the NFκB dimers binding to DNA.

In our study, silenced and treated cells (U87MG and T98G) showed an increase in p65 $^{(ser536)}$ protein expression in relation to TMZ-treated cells, which was not observed in silenced or SCR cells by themselves, indicating an effect of the combination (*APE1* silencing and drug treatment) in the induction of this subunit. Thus, the supposition that p65 is responsible for inducing *COX-2* expression was not shown in this study in *APE1* silenced and treated cells, contrary Charalambous et al. (2009) reports, although they not indicating the site of phosphorylation, but only the active protein. However, the TMZ treatment caused only a subtle p65 $^{(ser536)}$ expression and this condition repressed *COX-2* expression. Based on the literature cited above and the results obtained in this study, it is possible that the repressor effect of TMZ on p50, as mentioned by Schmitt et al. (2011), and of the APE1, which acts by reducing p50 (Nakamura et al., 1997,) were superimposed on this subunit, but needs to be further elucidated. Recently was demonstrated the p65 $^{(ser536)}$ activation induced by t-AUCB (an inhibitor SEH - soluble epoxide hydrolase) followed by growth reduction of U251 and U87MG GBM cells (Li et al. 2012), that supports what was observed in our study, related to the increased expression of this protein.

Another possible explanation for the lack effect of APE1 reduced expression in its redox function can be justified by the APE1 concentration, still present in the cells, may be somewhat exerting their effects. For example, the redox chaperone activity of APE1, which involves direct interaction of this protein with TFs, does not require high APE1 concentrations to exert their effects (Ando et al. 2008). When we assessed the expression of APE1, the reduction in the protein reached 46.7 and 58.5% in T98G and U87MG cells, respectively, at 72 h (by which time it was evaluated the *VEGF* and *COX-2* gene expression); it is possible that there is still remaining APE1 redox activity in the cells.

Taken together, the present results indicate that the BER inhibition strategy targeting a sensitizing GBM cells showed potentially viable but restricted to resistant GBM cells to TMZ treatment (T98G cells). The results in the U87MG cells showed that for these cells, which are sensitive to TMZ, the *APE1* silencing exercised virtually no effect of sensitization. Thus, the genetic characteristics of each strain GBM are crucial to the responses presented by the cells to the treatment applied.

Acknowledgements

The authors are grateful to Luiz A. Costa Junior and Sueli A. Neves for technical assistance. The research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Brazil (Grant n° 2009/10106-5; 2009/10925-6), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Brazil.

References

Abbotts R, Madhusudan S. (2010). Human AP endonuclease 1 (APE1): from mechanistic insights to druggable target in cancer. Cancer Treat. Rev. 36: 425–435.

Adhikari S, Choudhury S, Mitra PS, Dubash JJ, Sajankila SP, Roy R. (2008) Targeting base excision repair for chemosensitization. Anticancer Agents Med Chem.; 8(4):351-7.

Ando K, Hirao S, Kabe Y, Ogura Y, Sato I, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H. (2008) A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF-kappaB and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. Nucleic Acids Res. 36(13):4327-36.

Bhakat KK, Mantha AK, Mitra S. (2009) Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. Antioxid Redox Signal. 11(3):621-38.

Bobola MS, Blank A, Berger MS, Stevens BA, Silber JR. (2001) Apurinic/apyrimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas. Clin Cancer Res.; 7(11):3510-8.

Chahal M, Abdulkarim B, Xu Y, Guiot MC, Easaw JC, Stifani N, Sabri S. (2012) O6-Methylguanine-DNA methyltransferase is a novel negative effector of invasion in glioblastoma multiforme. Mol Cancer Ther. 11(11):2440-50.

Charalambous MP, Lightfoot T, Speirs V, Horgan K, Gooderham NJ. (2009) Expression of COX-2, NF-kappaB-p65, NF-kappaB-p50 and IKKalpha in malignant and adjacent normal human colorectal tissue. Br J Cancer. 101(1):106-15

Chen LH, Loong CC, Su TL, Lee YJ, Chu PM, Tsai ML, Tsai PH, Tu PH, Chi CW, Lee HC, Chiou SH. (2011) Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway. Biochem Pharmacol. 81(5):594-605

Chen S, Xiong G, Wu S, Mo J. (2013) Downregulation of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to radiotherapy in vitro. Cancer Biother Radiopharm. 28(2):169-76.

Cun Y, Dai N, Xiong C, Li M, Sui J, Qian C, Li Z, Wang D. (2013) Silencing of APE1 enhances sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to radiotherapy in vitro and in a xenograft model. PLoS One. 8(2):e55313.

Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR (2000) Going APE over ref-1. Mutat Res ;461(2):83-108.

Ewald B, Sampath D, Plunkett W. (2007) H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. Mol Cancer Ther. 6(4):1239-48.

Fishel ML and Kelley MR (2007) The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. Mol. Aspects Med.;28(3-4):375-95.

Fishel ML, HE Y, Smith ML, Kelley MR. (2007) Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. Clin. Cancer Res.; 13(1): 260-267.

Fisher T, Galanti G, Lavie G, Jacob-Hirsch J, Kventsel I, Zeligson S, Winkler R, Simon AJ, Amariglio N, Rechavi G, Toren A. (2007) Mechanisms operative in the antitumor activity of temozolomide in glioblastoma multiforme. Cancer J. 13(5):335-44.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc. 1(5):2315-9.

Fu D, Calvo JA, Samson LD. (2012) Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nat Rev Cancer. 12(2):104-20.

Fung H, Bennett RA, Demple B. (2001) Key role of a downstream specificity protein 1 site in cell cycle-regulated transcription of the AP endonuclease gene APE1/APEX in NIH3T3 cells. J Biol Chem. 276(45):42011-7.

Fung H, Demple B. (2005) A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. Mol Cell.; 17(3):463-70.

Fung H, Demple B. (2011) Distinct roles of Ape1 protein in the repair of DNA damage induced by ionizing radiation or bleomycin. J Biol Chem. 286(7):4968-77.

Grombacher T, EichhornU e Kaina B (1998) p53 is involved inregulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNAmethyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. Oncogene 17, 845–851.

Gu X, Cun Y, Li M, Qing Y, Jin F, Zhong Z, Dai N, Qian C, Sui J, Wang D. (2013) Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease siRNA Inhibits the Angiogenesis Induced by X-Ray Irradiation in Lung Cancer Cells. Int J Med Sci. 10(7):870-82.

Harris LC, Remack JS, Houghton PJ e Brent TP (1996) Wild-type p53 suppresses transcription of the humanO6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. Cancer Res. 56, 2029–2032.

Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M. (2006) O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. J Neurochem.; 96(3):766-76.

Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. Cancer Res.;61(5):1957-63.

Illuzzi JL, Wilson DM 3rd. (2012) Base excision repair: contribution to tumorigenesis and target in anticancer treatment paradigms. Curr Med Chem. 19(23):3922-36

Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. (1999) Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. Brain Pathol. 9(3):469-79.

Johannessen TC, Bjerkvig R, Tysnes BB (2008) DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? Cancer Treat Rev. 34(6):558-67

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. Cell Death Differ.11(4):448-57.

Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. (2003) Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. Cancer Res. 1;63(9):2103-8.

Kelley MR, Cheng L, Foster R, Tritt R, Jiang J, Broshears J, Koch M. (2001) Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. Clin Cancer Res. 7(4):824-30.

Kelley MR, Georgiadis MM, Fishel ML. (2012) APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1. Curr Mol Pharmacol. 5(1):36-53.

Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M, Kaina B. (2013) Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. PLoS One. 8(1):e55665.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 25(4):402-8.

Loeb LA, Preston BD. (1986) Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. Annu Rev Genet. 20:201-30.

Lu XY, Cao K, Li QY, Yuan ZC, Lu PS. (2012) The synergistic therapeutic effect of temozolomide and hyperbaric oxygen on glioma U251 cell lines is accompanied by alterations in vascular endothelial growth factor and multidrug resistance-associated protein-1 levels. J Int Med Res. 40(3):995-1004.

Luo M, He H, Kelley MR, Georgiadis MM. (2010) Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development. Antioxid Redox Signal. 12(11):1247-69.

McNeill DR, Lam W, DeWeese TL, Cheng YC, Wilson DM 3rd (2009) Impairment of APE1 function enhances cellular sensitivity to clinically relevant alkylators and antimetabolites Mol Cancer Res.7(6):897-906.

Montaldi AP, Sakamoto-Hojo ET. (2012) Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide. Clin Exp Med. In Press.

Mrugala MM. (2013) Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. Discov Med. 15(83):221-30.

Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YWw, Swenberg JA. (1998) Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. Cancer. Res. 58, p. 222–225.

Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T. (2012) Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. Neurol Res Int. 2012:878425.

Palumbo S, Pirtoli L, Tini P, Cevenini G, Calderaro F, Toscano M, Miracco C, Comincini S. (2012) Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. J Cell Biochem. 113(7):2308-18.

Parkinson JF, Wheeler HT, McDonald KL. (2008) Contribution of DNA repair mechanisms to determining chemotherapy response in high-grade glioma. J Clin Neurosci. 15(1):1-8.

Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L. (1999) Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. Oncogene. 18:6013–6020.

Robertson KA, Bullock HA, Xu Y, Tritt R, Zimmerman E, Ulbright TM, Foster RS, Einhorn LH and Kelley MR. (2001) Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. Cancer Res. 61, 2220–2225.

Schmitt AM, Crawley CD, Kang S, Raleigh DR, Yu X, Wahlstrom JS, Voce DJ, Darga TE, Weichselbaum RR, Yamini B (2011) p50 (NF-κB1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. Mol Cell. 44(5):785-96.

Silber JR, Bobola MS, Blank A, Chamberlain MC. (2012) O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. Biochim Biophys Acta. 1826(1):71-82.

Silber JR, Bobola MS, Blank A, Schoeler KD, Haroldson PD, Huynh MB, Kolstoe DD. (2002) The apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. Clin. Cancer Res. 8(9):3008-18.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184–191

Sobol RW, Wilson SH. (2001) Mammalian DNA h-polymerase in base excision repair of alkylation damage. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 68:57–74.

Srivenugopal KS, ShouJ, Mullapudi SR, Lang FF Jr, Rao JS e Ali-Osman F (2001) Enforced expression of wild-type p53curtails the transcription of the O(6)-methylguanine-DNAmethyltransferase gene in human tumor cells and enhances theirsensitivity to alkylating agents. Clin. Cancer Res. 7, 1398–1409.

Stupp R, Pica A, Mirimanoff RO, Michielin O. (2007) A practical guide for the management of gliomas. Bull Cancer. 94(9):817-22.

Sutton MD and Walker GC. (2001) Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 8342–8349.

Tafani M, Pucci B, Russo A, Schito L, Pellegrini L, Perrone GA, Villanova L, Salvatori L, Ravenna L, Petrangeli E, Russo MA. (2013) Modulators of HIF1α and NFkB in Cancer Treatment: Is it a Rational Approach for Controlling Malignant Progression? Front Pharmacol. 4:13

Tell G, Fantini D, Quadrifoglio F. (2010) Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. Cell Mol Life Sci. 67(21):3589-608.

Tell G, Wilson DM III, Lee CH (2009) Intrusion of a DNA repair protein in the RNome world: is this the beginning of a new era? Mol Cell Biol 30:366–371.

Tentori L, Graziani G. (2009) Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. Curr Med Chem. 16(2):245-57.

Tentori L, Portarena I, Torino F, Scerrati M, Navarra P, Graziani G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor increases growth inhibition and reduces G(2)/M cell accumulation induced by temozolomide in malignant glioma cells. Glia.40(1):44-54.

Traganos F, Darzynkiewicz Z. (1994) Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. Methods Cell Biol. ;41:185-94

Wang D, Luo M, Kelley MR (2004) Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. Mol Cancer Ther. 3(6):679-86.

Wang D, Xiang DB, Yang XQ, Chen LS, Li MX, Zhong ZY, Zhang YS. (2009) APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. Lung Cancer. 66(3):298-304.

Williams JL, Nath N, Chen J, Hundley TR, Gao J, Kopelovich L, Kashfi K, Rigas B. (2003) Growth inhibition of human colon cancer cells by nitric oxide (NO)-donating aspirin is associated with cyclooxygenase-2 induction and beta-catenin/T-cell factor signaling, nuclear factor-kappaB, and NO synthase 2 inhibition: implications for chemoprevention. Cancer Res. 63:7613–7618.

Xiong GS, Sun HL, Wu SM, Mo JZ. (2010) Small interfering RNA against the apurinic or apyrimidinic endonuclease enhances the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gemcitabine in vitro. J Dig Dis. 11(4):224-30.

Yamini B, Yu X, Dolan ME, Wu MH, Darga TE, Kufe DW, Weichselbaum RR. (2007) Inhibition of nuclear factor-kappaB activity by temozolomide involves O6-methylguanine induced inhibition of p65 DNA binding. Cancer Res. 67(14):6889-98.

Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T. (2012) Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. Front Oncol. 2:186.

Yuan, F., Zhang, Y., Rajpal, D. K., Wu, X., Guo, D., Wang, M., Taylor, J. S., and Wang, Z. (2000) Specificity of DNA lesion bypass by the yeast DNA polymerase . J. Biol. Chem. 275: 8233–8239.

Zaky A. Busso C. Izumi T. Chattopadhyay R. Bassiouny A. Mitra S. Bhakat KK. (2008) Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. Nucleic Acids Res. 36:1555–1566.

Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. (2012) Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Curr Mol Pharmacol. 5(1):102-14.

Conflict of interest: None.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Down-regulation of APE1 protein expression by siRNA detected by Western blot analysis in T98G and U87MG cells. (**A**) Representative Western blots of APE1 protein monitored along 4 days (24 to 96 h), following transfection with scramble (SCR) or APE1siRNA at 80 nM. β-tubulin was used as a loading control; (**B**) Levels of APE1 following APE1 and SCR siRNA transfection.

Fig. 2: Down-regulation of APE1 induced the cell growth inhibition and enhanced DNA damage after TMZ treatment. (**A**) Proliferation observed in T98G and U87MG APE1siRNA cells evaluated at 24, 48, and 72 h after TMZ treatment. (**B**) Clonogenic survival APE1siRNA cells analyzed at 10 days after treatment. (**D**) DNA damage induction observed at zero, 6 and 24 h after TMZ treatment in APE1siRNA cells. Mean ± SD values were calculated from the results of three independent experiments. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. Isolated symbols represent the comparison with SCR cells; symbols and keys represent the comparison between the indicated treatments.

Fig. 3: APE1 level in T98G cells transfected with scramble (SCR) or APE1siRNA (80 nM) and treated with TMZ (2 h) was processed for APE1 immunostaining. (line A) SCR cells show nuclear and diffuse staining; (line B) APE1siRNA cells showing a gradual APE1 nuclear distribution among the cells but at a lower intensity; (line C) APE1siRNA-treated cells have a significant decrease of nuclear APE1 staining compared to TMZ treatment (line D) that show intense nuclear staining. All magnifications X100 in panels.

Fig. 4: APE1siRNA induced S-phase arrest in T98G cells independly of TMZ treatment. After transfection and TMZ treatment, (**A**) T98G and (**B**) U87MG APE1siRNA cells were evaluated at 24, 48, and 72 h after treatment. The data were obtained using the Guava system EasyCyte Mini System (Guava Techn Merck Millipore, Billerica, MA) and Guava CytoSoft 4.2.1 Software (Merck Millipore, Billerica, MA). Mean ± SD values were calculated from results of three independent. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. Isolated symbols represent the comparison with SCR cells; symbols and keys represent the comparison between the indicated treatments. Statistically significant difference compared with controls and between transfected and treated with TMZ ($p \leq 0.05$).

Fig. 5: *APE1* knockdown induced apoptotic and autophagic cell death and expression of H2AX-γ in T98G cells. (**A**) The apoptosis by annexin-V staining in T98G and U87MG APE1siRNA cells were verified at 3, 5, and 10 days after treatment. The analysis was carried out by Guava Nexin reagent, analyzed by Mini Guava EasyCyte System (Merck Millipore, Billerica, MA Guava Technologies) and Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment (Merck Millipore, Billerica, MA).

(**B**) The autophagic death was evaluated by acridine orange staining and also analized by flow citometry. Were calculated the mean ± SD of three independent experiments. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. Isolated symbols represent the comparison with the SCR cells; symbols and keys represent the comparison between the indicated treatments. (**C**) A representative Western blot of whole cell protein extracts from GBM cells, collected on Day 3 and 5 following transfection and analyzed for the presence of H2AX-γ by Western blot.

Fig 6. Down-regulation of *APE1* gene inhibits cell invasion *in vitro* in GBM cells but not changes the target genes the transcriptional expression of *NFkB* and *HIF1α* TFs (*COX-2* and *VEGF*). (**A**) Effect of *APE1* knockdown on T98G and U87MG APE1siRNA cells in reduced the cellular invasion. Were calculated the mean ± SD of three independent experiments. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$. Isolated symbols represent the comparison with the SCR cells; symbols and keys represent the comparison between the indicated treatments. (**B**) The results of *COX-2* and *VEGF* relative gene expression evaluated after TMZ treatment are represented in fold-change (Log2). Data were presented as mean values ± SE obtained in two independent experiments in triplicate. (**C**) A representative Western blot of NFκB $(p65)^{(ser536)}$ in T98G e U87MG cells at 3 and 5 days after treatment.

Figure 1:

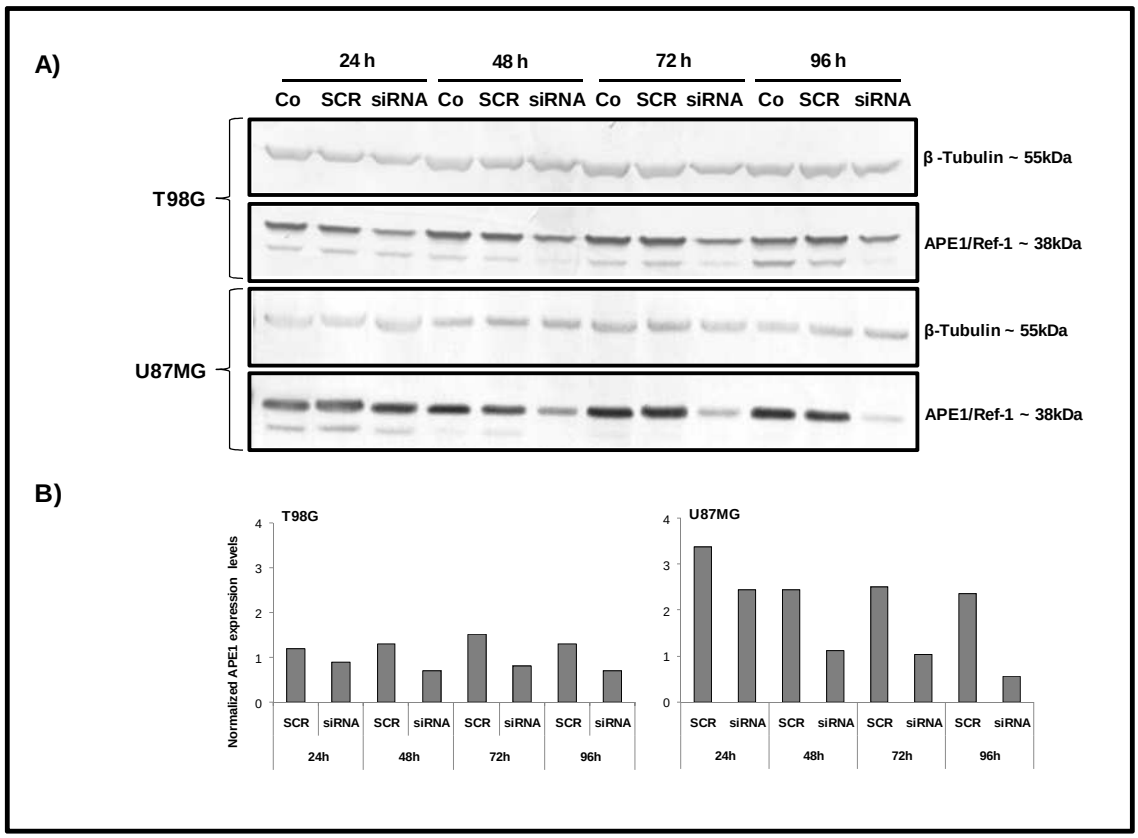
A)
24 h
48 h
72 h
96 h
Co SCR siRNA Co SCR siRNA Co SCR siRNA Co SCR siRNA
T98G
β -Tubulin ~ 55kDa
APE1/Ref-1 ~ 38kDa
U87MG
β-Tubulin ~ 55kDa
APE1/Ref-1 ~ 38kDa
B)
T98G
U87MG
Normalized APE1 expression levels
0
1
2
3
4
SCR siRNA SCR siRNA SCR siRNA SCR siRNA
24h 48h 72h 96h

Figure 2:

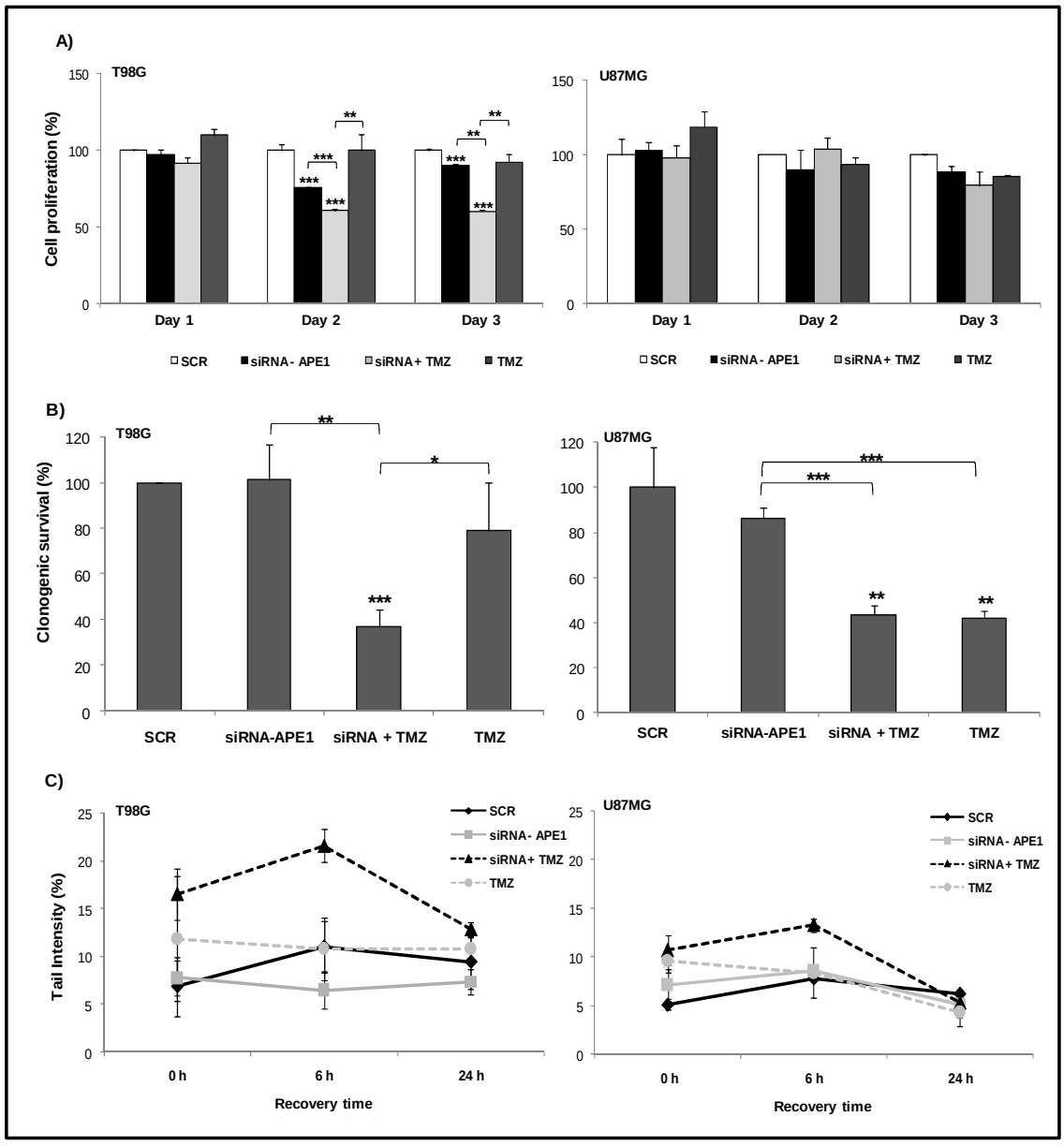
A)
T98G
U87MG
Cell proliferation (%)
Day 1
Day 2
Day 3
SCR
siRNA- APE1
siRNA+ TMZ
TMZ
B)
Clonogenic survival (%)
SCR
siRNA-APE1
siRNA + TMZ
TMZ
C)
Tail Intensity (%)
0 h
6 h
24 h
Recovery time

Figure 3:

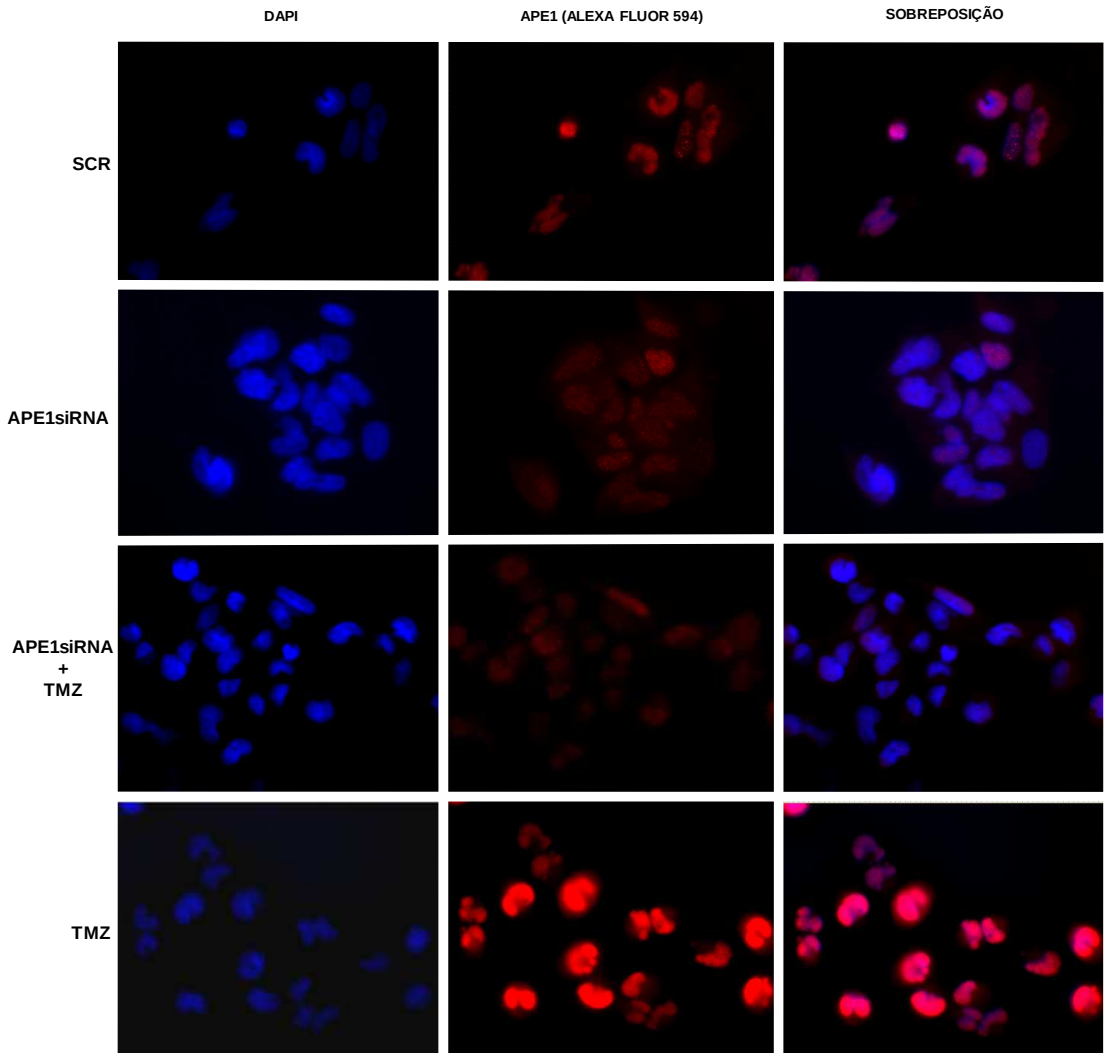
DAPI
APE1 (ALEXA FLUOR 594)
SOBREPOSIÇÃO
SCR
APE1siRNA
APE1siRNA
+
TMZ
TMZ

Figure 4:

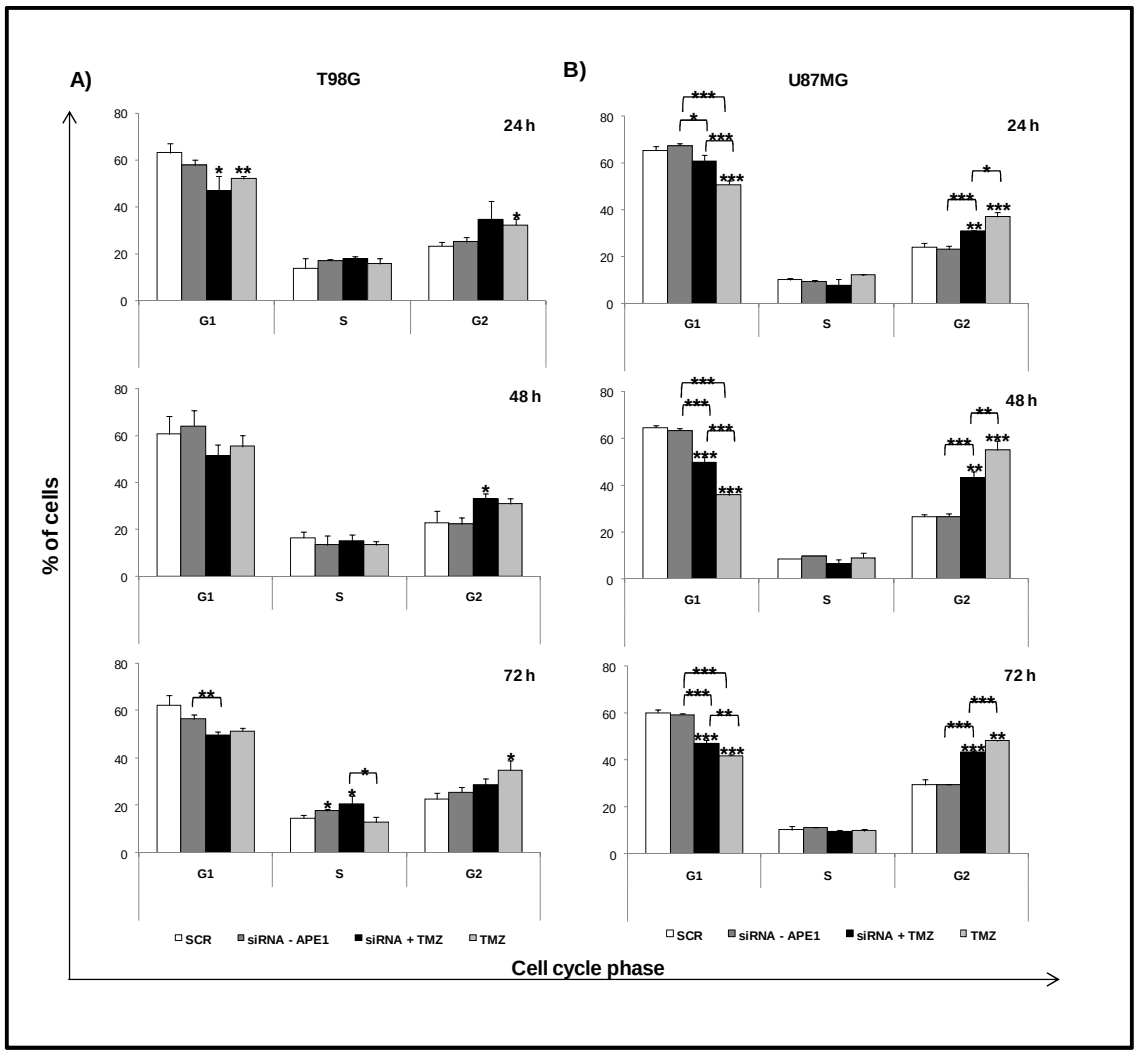
A)
T98G
B)
U87MG
24 h
48 h
72 h
% of cells
G1
S
G2
SCR
siRNA - APE1
siRNA + TMZ
TMZ
Cell cycle phase

Figure 5:

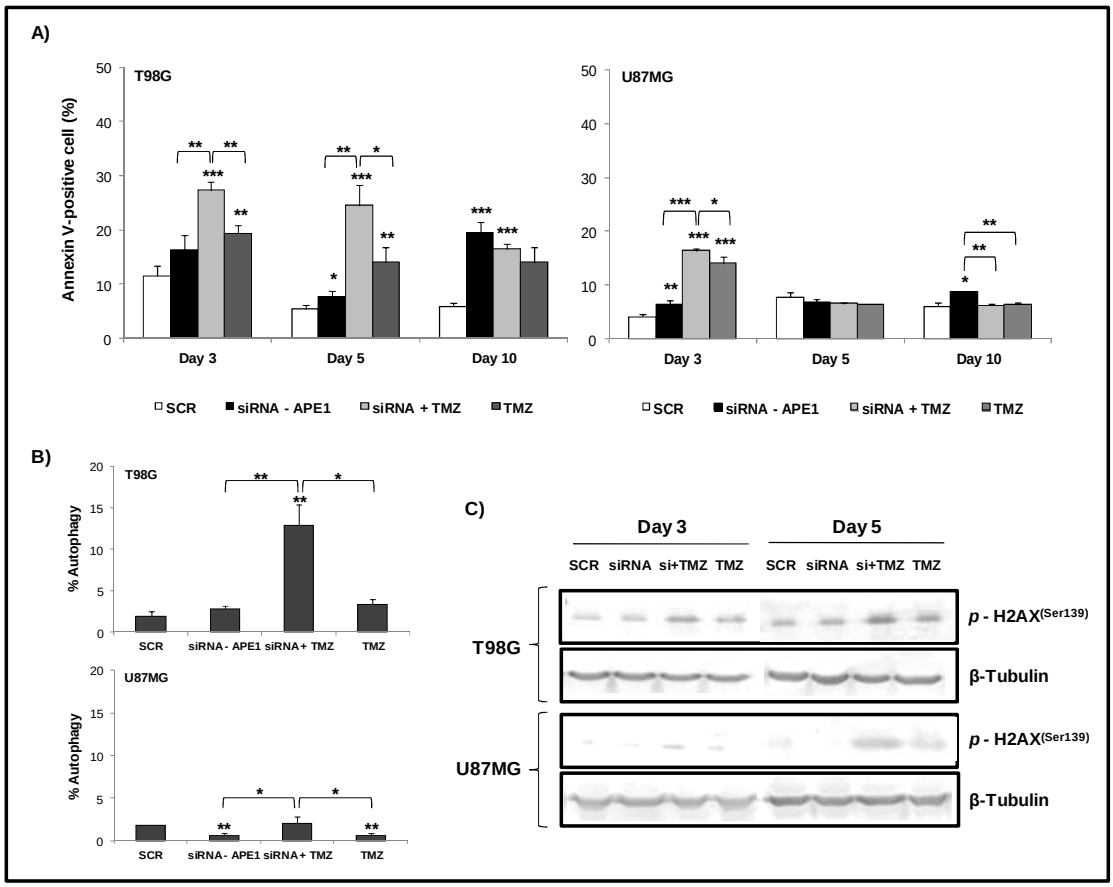
A)
T98G
U87MG
Annexin V-positive cell (%)
Day 3
Day 5
Day 10
SCR
siRNA - APE1
siRNA + TMZ
TMZ
B)
T98G
U87MG
% Autophagy
SCR
siRNA - APE1
siRNA + TMZ
TMZ
C)
Day 3
Day 5
SCR siRNA si+TMZ TMZ SCR siRNA si+TMZ TMZ
T98G
U87MG
p - H2AX(Ser139)
β-Tubulin

Figure 6:

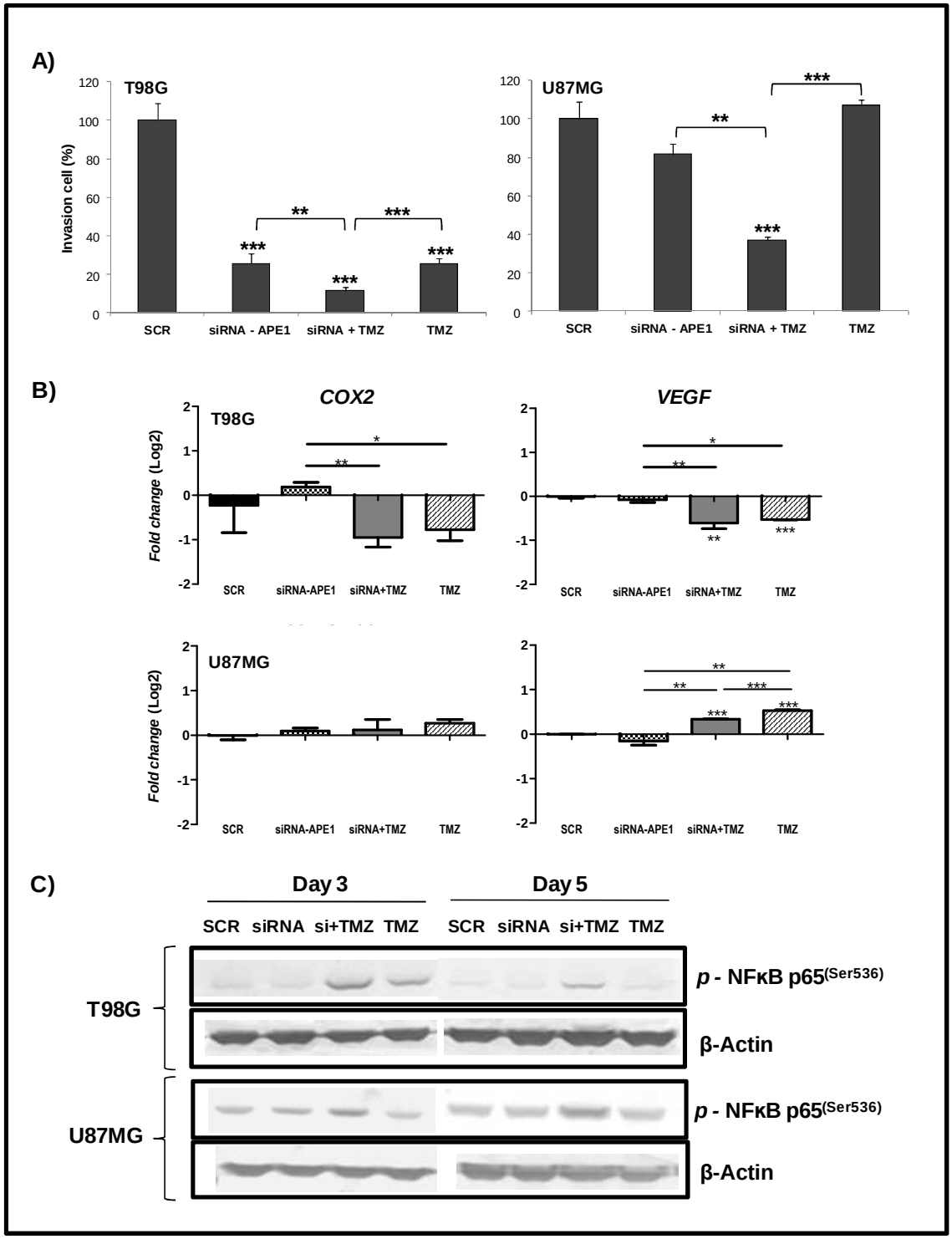
A)
T98G
U87MG
Invasion cell (%)
SCR
siRNA - APE1
siRNA + TMZ
TMZ
B)
COX2
VEGF
Fold change (Log2)
SCR
siRNA-APE1
siRNA+TMZ
TMZ
C)
Day 3
Day 5
SCR siRNA si+TMZ TMZ SCR siRNA si+TMZ TMZ
T98G
U87MG
p - NFκB p65(Ser536)
β-Actin

Table 1: Cell cycle analysis after TMZ treatment in T98G and U87MG cells transfected with 80 nM of APE1 and scrambled siRNA.

Cell lines	Treatments groups	Cell cycle distribution (%) (± SD)								
		Times (h)								
		24			48			72		
		Cell cycle phase								
		G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
T98G	Scrambled	63,0±3,9	13,6±4,3	23,2±1,9	60,5±7,7	16,4±2,8	22,9±4,9	62,3±4,2	14,7±1,5	22,8±2,6
	siRNA-APE1	57,7±2,4	17,1±0,6	25,0±2,2	64,3±6,6	13,4±3,8	22,4±2,6	56,5±1,9	17,7±0,8	25,7±2,0
	siRNA+TMZ	46,9±6,3	18,0±1,0	34,7±7,7	51,4±4,7	15,2±2,7	32,9±2,4	49,8±1,3	20,8±3,2	28,6±2,8
	TMZ-600 µM	52,0±1,4	15,6±2,3	32,1±2,6	55,3±4,9	13,4±1,5	30,9±2,5	51,5±1,3	13,0±2,1	34,8±4,3
U87MG	Scrambled	65,5±1,7	10,2±0,5	24,3±1,8	64,7±0,8	8,7±0,3	26,6±1,0	60,2±1,3	10,3±1,4	29,5±2.5
	siRNA-APE1	67,6±1,0	9,3±0,6	23,1±1,5	63,4±1,0	9,9±0,4	26,7±1,3	59,5±0,5	11,0±0,3	29,4±0,4
	siRNA+TMZ	61,0±2,4	8,0±2,5	31,0±0,3	50,0±1,9	6,7±1,7	43,3±2,6	47,2±1,4	9,5±0,8	43,3±0,6
	TMZ-10 µM	50,7±1,7	12,2±0,4	37,1±1,7	36,0±1,6	9,1±2,4	55,0±4,0	41,9±0,6	9,9±0,5	48,2±0,4