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

ANA CLARA OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO GENE *PTEN* NA EXPRESSÃO DE RAD51 E SUAS
PARÁLOGAS, RAD51C E RAD51B, EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA
MULTIFORME TRATADAS COM ETOPOSÍDEO**

Ribeirão Preto - SP

2016

ANA CLARA OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO GENE *PTEN* NA EXPRESSÃO DE RAD51 E SUAS
PARÁLOGAS, RAD51C E RAD51B, EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA
MULTIFORME TRATADAS COM ETOPOSÍDEO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Genética

Orientadora: Prof^a Dr^a Elza Tiemi Sakamoto-Hojo

Ribeirão Preto

2016

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

Oliveira, Ana Clara

Influência do Gene *PTEN* na Expressão De RAD51 e suas Parálogas RAD51C e RAD51B, em Linhagens de Glioblastoma Tratadas com Etoposídeo/ Ribeirão Preto, 2016. 107f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Genética. Orientadora Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi

1.Glioblastoma; 2.*PTEN*; 3.RAD51; 4.Parálogas de RAD51; 5.Reparo por recombinação homóloga.

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.nº 2013/09352-7).

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo - FMRP-USP.

Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-
FFCLRP/USP.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Prof^ª. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, por ter me recebido em seu laboratório, com muito carinho, e por ter confiado em mim para ser sua aluna. Agradeço, em primeiro lugar, por ter me orientado e oferecido todo o suporte necessário para a realização deste trabalho, e em segundo lugar, pela amizade, apoio e por me auxiliar no meu amadurecimento profissional.

À professora, **Prof^ª. Dr^a. Catarina Satie Takahashi**, pela amizade e por sempre ser tão cuidadosa comigo. Sem contar as inúmeras festas, lanches e confraternizações do laboratório que só aconteciam graças a você, professora. Obrigada por tornar o laboratório, nossa segunda casa e nos mostrar que aqui, além de ciência, se faz amigos.

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

Ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP.

À **Prof^ª. Dr^a. Silvana Giuliatti**, coordenadora do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da FMRP-USP pelo apoio e dedicação à pós-graduação.

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

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

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

Aos colegas e amigos do Laboratório de Citogenética e Mutagenese: **Danilo J. Xavier, Paulo Roberto D'Auria Vieira de Godoy, William Castillo, Leonardo Franchi e Sarah Lima**. Agradeço por compartilharem comigo, conhecimento e amizade, por estarem sempre dispostos a ajudar quando precisei e, pela ótima convivência no nosso dia a dia. Agradeço de coração por terem me recebido de braços abertos no laboratório. **Giovana Da Silva Leandro e Verônica Santana**, obrigada pela amizade e por serem sempre tão queridas comigo. Vou sentir saudades! Agradeço de maneira bastante especial, a amiga que me ajudou imensuravelmente na parte metodológica da minha dissertação e principalmente, por ter sido sempre tão amável comigo durante esses dois anos: **Ana Paula de Lima Montaldi**. Ana, obrigada por dividir comigo conhecimento acadêmicos, receitas de bolo, almoço, doces e lanches; e obrigada por sempre me ajudar quando eu precisei! Vou levar sua amizade sempre comigo.

Ao meu **Papai** e minha **Mamãe**, por sempre acreditarem em mim, e não medirem esforços para realizar os meus sonhos. Que saíam de Goiânia para me visitar no final de semana, quando a saudade apertavam e ainda traziam comidas da minha terrinha. Graças a vocês, consegui concluir mais essa etapa da minha vida. Vocês que são meus maiores exemplos de vida, me falta palavras para agradecer.

Ao meu irmão, **João Gabriel**, que se não tivesse nascido, alguém ia ter que inventar. Obrigada por ser sempre tão alto astral, fazendo piada de tudo, e me mostrando o lado bom de toda e qualquer circunstância adversa. Obrigada por me mostrar que sair de casa é difícil mas necessário.

Ao meu noivo, **Mateus**, por sempre ser meu companheiro e por cuidar tanto de mim. Me incentivando, acolhendo e me apoiando em todos os momentos difíceis. Obrigada por ser a pessoa que posso contar todos os dias da minha vida.

Meu muito obrigada à todos que participaram e colaboraram com o desenvolvimento desse trabalho e consequentemente, com meu crescimento profissional.

RESUMO

Oliveira, AC¹.2016, 107f, Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é o tipo de tumor cerebral maligno com maior incidência na população. A perda do gene *PTEN* (fosfatase e tensina homóloga) é uma alteração comum associada ao GBM (até 60%) e esse gene codifica uma enzima que antagoniza a ação de PI3K, inibindo a fosforilação de AKT e, desse modo, regulando vias de sinalização relativas à sobrevivência celular e proliferação. Mutações em *PTEN* têm sido associadas à instabilidade genômica e ao aumento no número de quebras de fita dupla, além de serem relacionadas também à redução da expressão de RAD51, a qual é uma proteína-chave da via de reparo por recombinação homóloga (HR). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar se o *status* de *PTEN* interfere na expressão de RAD51 e proteínas parálogas (RAD51C e RAD51B) e, consequentemente, se *PTEN* é capaz de influenciar a eficiência de HR. Com o objetivo de induzir a formação de quebras de fita duplas (DSBs) no DNA, as células foram tratadas com a droga antitumoral etoposídeo, que produz quebras no DNA, principalmente duplas (DSBs). Duas linhagens de GBM com *status* diferentes de *PTEN* foram utilizadas: T98G (*PTEN* mutado) e LN18 (*PTEN* tipo selvagem). As células de GBM foram tratadas com etoposídeo em diferentes experimentos ou ensaios: proliferação celular, quantificação da necrose e apoptose, cinética do ciclo celular, imunofluorescência da proteína γ -H2AX, quantificação dos níveis de expressão de RAD51 e parálogas e o silenciamento de *PTEN* na linhagem LN18. Os resultados mostraram que a linhagem LN18 foi mais sensível à droga nos tempos iniciais (24 e 72 h) (até 61,2% de redução), em comparação com a T98G (até 12,3% de redução); no tempo mais tardio de análise (120 h), ambas as linhagens sofreram redução acentuada na proliferação. Adicionalmente, a LN18 exibiu maior porcentagem de células apoptóticas e necróticas, em comparação com a linhagem T98G, nos tempos de 24, 72 e 120 horas após o tratamento. O ensaio de imunofluorescência revelou maior indução de células positivas para γ -H2AX na linhagem LN18 em relação à T98G ($p \leq 0,001$), após tratamento com etoposídeo (50 e

75 μ M). Nessas concentrações, a análise da cinética do ciclo celular mostrou um bloqueio na fase G2 em ambas as linhagens ($p < 0,01$) nos tempos analisados (24, 48 e 72h), mas apenas a linhagem LN18 revelou bloqueio na fase S. A expressão de RAD51, RAD51B e C foi mais elevada em LN18 em comparação com a T98G e U87MG, nas células tratados (75 μ M) e controles. *PTEN* foi silenciado (siRNA-*PTEN*) na linhagem LN18 para verificar se a redução da expressão desse gene reduziria também a expressão de RAD51 e parálogas. Após 72 horas de silenciamento, com 69,9% de inibição de *PTEN*, a expressão de RAD51 e RAD51C também se mostrou reduzida em relação ao grupo controle. Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o *status* de *PTEN* é crucial para as vias de sobrevivência, controle do ciclo celular e indução de apoptose nas células de GBM, indicando a relação entre *PTEN* e RAD51 e parálogas nas células de GBM tratadas com um indutor de quebras no DNA. Adicionalmente, outras ferramentas de estudo são requeridas para investigar as vias moleculares e possíveis interações e complexos proteicos envolvendo a participação de *PTEN* e RAD51 e suas proteínas parálogas.

Palavras-chave: glioblastoma, *PTEN*, RAD51, parálogas de RAD51, reparo por recombinação homóloga, quebras de fita dupla.

ABSTRACT

Oliveira, AC.2016, 107f, Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common malignant brain tumor. Loss of *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) gene is the most frequent alteration associated with GBM and encodes a phosphatase enzyme that antagonizes the PI3K, by inhibiting AKT phosphorylation thereby regulating signaling pathways related to cell survival and proliferation. *PTEN* deficiency has been associated with genomic instability and increased endogenous DSBs, as well as reduced expression of RAD51, which is a key gene with crucial role in HR. In this study, we aimed to evaluate whether the *PTEN* status in GBM cell lines can affect RAD51 expression and HR efficiency under conditions of treatment with the antineoplastic drug etoposide, which targets the DNA topoisomerase II enzyme, thus leading to the production of DNA breaks. T98G (*PTEN* mutated) and LN18 (*PTEN* wild-type) cells were treated with etoposide, and several assays were carried out: cell proliferation, detection and quantification of necrosis and apoptosis, cell cycle kinetics, immunofluorescence staining, RAD51 (and paralogs) protein expression, and *PTEN* silencing in LN18 cell line, by using the siRNA method. LN18 cells showed a greater reduction in cell proliferation, compared to T98G after treatments (25, 50, 75 e 100 μ M) at 24, 72 and 120h. Both cell lines showed a significant increase ($p < 0.001$) in cell death induction, but LN18 presented a greater percentage of apoptotic and necrotic cells than T98G (24, 72 and 120h). The induction of DSB was analyzed by immunostaining (with γ -H2AX antibody), and for the concentrations (50 and 75 μ M) tested, LN18 showed higher levels of γ -H2AX positive cells than that observed for T98G ($p < 0.001$). The analysis of cell cycle kinetics performed for cells treated with etoposide (50 and 75 μ M) and collected at 24, 48 and 72h, LN18 presented a greater G2-blockage, as compared to T98G; only LN18 showed a blockage at the S-phase. The expression of RAD51, RAD51B and C was higher in LN18 compared to T98G and U87MG cells treated with etoposide (75 μ M) and controls. When we silenced *PTEN* in LN18 lineage, to check if *PTEN* silencing

may reduce the expression of RAD51 and its paralogs, we found a 69.9% reduction in PTEN protein expressions, and the expression of RAD51 and RAD51C was also found reduced, compared to the control group. Taken together, the results obtained in this study indicate that the status of PTEN is critical for survival pathways, cell cycle control and induction of apoptosis in GBM cells, confirming the relationship between PTEN and RAD51 and its paralogs in GBM cells treated with an inducer of DNA breaks. These results contribute with relevant information for further studies on molecular pathways underlying the interaction between PTEN and RAD51 and its paralogs.

Keywords: Glioblastoma, *PTEN*, RAD51, RAD51 paralogs, homologous recombination repair, DNA double strand breaks.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mecanismo de Recombinação Homóloga na presença de quebras de fita dupla no DNA. Adaptado de Srivastava e Raghavan, 2015.....25
- Figura 2:** Reparo por recombinação homóloga por duplicação induzida por quebra (BIR). Adaptado de: Lodish, Harvey et al., Biologia celular e molecular. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.....27
- Figura 3:** Modelo de recombinação homóloga para anelamento de fita dependente de síntese (SDSA). Adaptado de: Watson, James D et al., Biologia Molecular do Gene. 7^a ed. Porto Alegre: Artemed, 2015.....28
- Figura 4:** Duas principais vias de HR, com a formação de produtos sem *crossing-over* (a) e com *crossing-over* (b). Adaptado de: Huang e Mazin, 2014.....29
- Figura 5:** Via de sinalização PI3K/PTEN/mTORC1 em célula normal e célula com alteração. Adaptado de: Lin, Crowe e Yang, 2015.....32
- Figura 6:** Proliferação celular (*Cell Proliferation Xit II (XTT)*) em escala de log₁₀ avaliada 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (25, 50, 75 e 100 µM), nas linhagens LN18 e T98G. Os valores são provenientes de três experimentos independentes, realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.....54
- Figura 7:** Proliferação celular relativa (*Cell Proliferation Xit II (XTT)*) em células LN18 e T98G tratadas com etoposídeo 25, 50, 75 e 100 µM, avaliada 24, 72 e 120 horas após o tratamento. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.....57
- Figura 8:** Distribuição das células T98G e LN18, em diferentes fases do ciclo celular, quando submetidas ao tratamento com etoposídeo (50 e 75 µM). Os dados foram obtidos utilizando o sistema *Guava EasyCyte Mini System (Guava Techonologies)* e *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment (Guava Techonologies)*. Os valores são

provenientes de três experimentos independentes e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. O asterisco com a chave representa a comparação entre os grupos indicados.....59

Figura 9: Células positivas para a proteína γ -H2AX, relativas ao controle, em linhagens celulares LN18 e T98G tratadas com etoposídeo 50 e 75 μ M e avaliadas logo após o tratamento com etoposídeo, 0 horas, e 24 após o tratamento. Os valores dos grupos tratados foram normalizados com os valores dos grupos controles respectivos. 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$62

Figura 10: Porcentagem de células apoptóticas ($\pm$ Desvio Padrão) em células LN18 e T98G, avaliadas em 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M). Os dados foram obtidos utilizando o sistema *Guava Easy Cyte 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$65

Figura 11: Porcentagem de células necróticas ($\pm$ Desvio Padrão) nas linhagens LN18 e T98G, avaliadas em 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M). Os dados foram obtidos utilizando pelo 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$67

Figura 12: Expressão das proteínas PTEN (~54kDa), AKT (~57kDa), AKT fosforilado (~60kDa) e β -actina (~40kDa) em células HeLa, T98G, LN18 e U87MG, analisada por *Western Blot* e quantificadas pelo programa *Gel Pro Analyzer 4*.....70

Figura 13: Expressão das proteínas RAD51 (~37kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG, nos tempos de 0, 6 e 24 horas após o tratamento das

células com etoposídeo (75 μ M). Os sinais de expressão foram quantificados pelo programa *Gel Pro Analyzer 4*.....71

Figura 14: Níveis de expressão da proteína RAD51 (~37kDa) analisada por *Western Blot* em células (A) LN18, (B) T98G e (C) U87MG, quantificadas após 0, 6 e 24 horas do tratamento com etoposídeo (75 μ M). Os valores de expressão de RAD51 foram normalizados com a proteína β -tubulina utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4*. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).....72

Figura 15: Expressão das proteínas RAD51C (~42kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG, nos tempos 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μ M); as bandas foram quantificadas pelo programa *Gel Pro Analyzer 4*.....73

Figura 16: Níveis da expressão da proteína RAD51C (~37kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG. A análise das proteínas foi feita 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μ M). Os valores foram normalizados com a proteína β -tubulina para as linhagens (A) LN18, (B) T98G e (C) U87MG utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4*. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).....74

Figura 17: Expressão das proteínas RAD51B (~42kDa) e β -tubulina (~55kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG. A análise das proteínas foi feita 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μ M).....75

Figura 18: Níveis da expressão da proteína RAD51B (~42kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG. A análise das proteínas foi feita 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μ M). Os valores foram normalizados com a proteína β -tubulina para as linhagens (A) LN18, (B) T98G e (C) U87MG utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4*. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).....76

Figura 19: Expressão das proteínas PTEN (~54kDa) analisada por *Western Blot* em células LN18 transfectadas com 100 nM do siRNA para o gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção. A quantificação foi analisada usando *Gel Pro Analyser 4* e normalizada através da expressão de β -actina (~45kDa).....78

Figura 20: Níveis da expressão da proteína PTEN após 24, 48 e 72 horas do silenciamento com 100 nM de siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção. Os valores foram normalizados com a proteína β -actina para a linhagem LN18.....78

Figura 21: Porcentagens de redução da expressão proteica de PTEN após 24, 48 e 72 horas do silenciamento com 100 nM de siRNA-*PTEN* para a linhagem LN18. Os valores foram normalizados com base na expressão da β -actina. 79

Figura 22: Expressão das proteínas RAD51 (~37kDa) e β -actina (~45kDa) analisada por *Western Blot* em células LN18 transfectadas com 100 nM do siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção.....79

Figura 23: Níveis da expressão da proteína RAD51 após 24, 48 e 72 horas do silenciamento com 100 nM de siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção. Os valores foram normalizados com a proteína a β -actina para a linhagem LN18.....80

Figura 24: Expressão das proteínas RAD51C (~42kDa) e β -actina (~45kDa) analisada por *Western Blot* em células LN18 transfectadas com 100 nM do siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção.....80

Figura 25: Níveis da expressão da proteína RAD51C após 24, 48 e 72 horas do silenciamento das células LN18 com 100 nM de siRNA-*PTEN*. Os valores foram normalizados com a proteína β -actina.....81

Figura 26: Síntese dos processos analisados nas linhagens de GBM no presente trabalho. Na linhagem LN18 (*PTEN* proeficiente), PTEN desfosforila PIP3 a PIP2 e impede a fosforilação de AKT. Uma vez que AKT não é fosforilada, ela não irá induzir

a proliferação celular, não irá haver o bloqueio da apoptose e nem do ciclo celular. No núcleo celular, na presença de DSBs, PTEN, não se sabe o mecanismo, promove o aumento da expressão de RAD51 e parálogas. Por outro lado, a linhagem T98G (*PTEN* deficiente) não tem a desfosforilação efetiva de PIP3, e parte dessa proteína irá fosforilar AKT. AKT fosforilada irá ativar as vias de sobrevivência, irá bloquear processos de apoptose e bloqueio do ciclo. No núcleo, PTEN, com função reduzida, prejudica, não é sabido o mecanismo, os níveis de RAD51 e parálogas, diminuindo-o.....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagens de viabilidade celular obtidas no ensaio de proliferação para as linhagens T98G e LN18 tratadas com 25, 50, 75 e 100 μM de etoposídeo, e avaliadas 24, 72 e 120 horas após o tratamento. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).55

Tabela 2: Porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular em linhagens T98G e LN18 submetidas ao tratamento com 50 e 75 μM de etoposídeo. 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm\text{DP}$).....60

Tabela 3: Porcentagem de células positivas para a proteína $\gamma\text{-H2AX}$ em linhagens celulares LN18 e T98G tratadas com etoposídeo 50 e 75 μM e avaliadas logo após o tratamento com etoposídeo, 0 horas, e 24 após o tratamento. Os valores dos grupos tratados foram normalizados com os valores dos grupos controles respectivos. 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm\text{DP}$).....63

Tabela 4: Porcentagem de células apoptóticas ($\pm$ Desvio Padrão) em células LN18 e T98G, avaliadas em 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μM). 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm\text{DP}$).....66

Tabela 5: Porcentagem de células necróticas ($\pm$ Desvio Padrão) em células LN18 e T98G, avaliadas em 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μM). 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).....68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Glioblastoma multiforme	22
1.3 O gene <i>PTEN</i> e seu papel no reparo do DNA e no processo tumoral	30
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivos Gerais	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Linhagens celulares	42
3.2 Agente indutor de dano no DNA – Etoposídeo	43
3.3 Cultivo celular	43
3.4 Tratamento com etoposídeo	44
3.5 Análise da proliferação celular utilizando o <i>Cell Proliferation Kit II</i> (XTT) <i>Sigma-Aldrich</i> (USA)	44
3.6 Detecção de danos no DNA por imunofluorescência da proteína γ -H2AX	45
3.7 Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo	46
3.8 Detecção de morte celular por citometria de fluxo	47
3.9 Experimentos para avaliação da expressão proteica por <i>Western Blotting</i>	48
3.9.1 Extração de proteínas com solução de lise	48
3.9.2 Eletroforese de proteínas	48
3.9.3 Transferência eletroforética	49
3.9.4 Imunodetecção e visualização das proteínas	49
3.10 Ensaio de Inibição da Expressão Gênica por RNA de Interferência (siRNA)	50
4. RESULTADOS	53
4.1 Proliferação celular	53
4.2 Cinética do ciclo celular em células tratadas com etoposídeo	57
4.3 Indução de danos no DNA por imunofluorescência da proteína γ -H2AX	61
4.4 Indução de morte celular por apoptose e necrose	63
4.6 Expressão das proteínas PTEN, RAD51 e parálogas	69
4.7 Consequências do silenciamento de <i>PTEN</i> na linhagem LN18	77

5. DISCUSSÃO	83
5.1 Redução da função de PTEN promove a sobrevivência após tratamento com etoposídeo	84
5.2 PTEN promove bloqueio em S e G2 do ciclo celular em resposta ao etoposídeo.	86
5.3 O status de <i>PTEN</i> pode interferir na expressão de RAD51 e parálogas em células de GBM após tratamento com etoposídeo.....	89
6. CONCLUSÃO	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

Os tumores cerebrais são neoplasias que ocorrem no cérebro ou no canal medular e classificam-se em duas classes principais: tumores cerebrais primários, que começam no cérebro, e secundários, que são gerados por células que migraram a partir de tumores desenvolvidos em outras partes do corpo (Bhowmik, Khan e Gsosh, 2015; Ghosh et al., 2015). Divisões celulares anormais no cérebro ou medula, envolvendo neurônios, células gliais, nervos cranianos, meninges e glândula pituitária, são as principais causas da formação de tumores cerebrais primários (Kheirollahi et al., 2015). Os tumores do sistema nervoso central são responsáveis por 7% dos óbitos por câncer, antes dos 70 anos. A distribuição etária desses tipos de tumores é bimodal, com um primeiro pico em crianças e um segundo pico, maior, em adultos com idade entre 45 e 70 anos (Reifenberger e Collins, 2004).

Os principais tumores cerebrais são gliomas, meningiomas, meduloblastomas e gangliomas. Os gliomas são tumores que se originam a partir das células da glia, e correspondem a 30% dos tumores cerebrais; os meningiomas são formados nas meninges que circundam o cérebro e a medula espinhal, com maior incidência em adultos; os meduloblastomas se desenvolvem a partir das células neuroectodérmicas no cerebelo, têm crescimento rápido e ocorrem com maior frequência em crianças; os gangliomas são tumores formados por células da glia e neurônios e sua incidência é menos comum na população. Existem também outros tipos de tumores cerebrais, com menor ocorrência na população: neurilemomas, craniofaringiomas, cordomas e tumores pituitários (American Cancer Society, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO) classifica os tumores cerebrais, de acordo com a malignidade, em uma escala de I a IV, sendo o grau IV o mais grave: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso e oligodendrogliomas (grau II), astrocitoma anaplásico e oligoastrocitomas (grau III) e glioblastoma multiforme (GBM) (grau IV) (Zacharaki et al., 2009).

1.1 Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor mais maligno do sistema nervoso central, com uma incidência, nos Estados Unidos, de 10 casos em cada 100.000 pessoas/ano (Ohgaki Kleihues, 2007) e, apesar dos avanços na oncologia, o prognóstico desse câncer ainda é ruim, com taxa de óbito de, em média, um ano após o diagnóstico (Zeng et al., 2015). O GBM é constituído por uma população de células heterogêneas, geneticamente instáveis, com elevada capacidade de infiltração nos tecidos e resistentes à quimioterapia; tais células abrigam uma série de mutações que fornecem a elas vantagens no sentido de promover a proliferação celular, a sobrevivência e o crescimento em um ambiente hostil e de hipóxia (Ramirez et al., 2013). Mutações no gene *TP53* (28%), perda de heterozigosidade do cromossomo 10q (69%), amplificação do gene *EGFR* (36%), deleção do *p16^{INK4}* (31%) e mutações no gene *PTEN* (40-60%) são as alterações genéticas mais frequentes em GBM (Ohgaki et al., 2004).

O tratamento de pacientes com GBM inclui a ressecção cirúrgica do tumor; entretanto, como parte do tumor não é retirada, por estar infiltrado em outros tecidos, após a cirurgia, na maior parte dos casos, é feita a radioterapia, cinco vezes por semana, durante seis semanas, associada a um quimioterápico administrado por via oral diariamente (Alifieris e Trafalis, 2015). O quimioterápico mais utilizado atualmente no tratamento de GBM é um agente alquilante, a temozolomida (TMZ), que introduz vários sítios de metilação no DNA. Uma vez ativada, a TMZ metila o DNA nas posições N⁷ e O⁶ da guanina e na N³ da adenina, sendo o aduto formado na posição O⁶ da guanina, o O⁶-metilguanina (O⁶-metil-G) é o mais citotóxico (Annovazzi et al., 2015). A lesão O⁶-metil-G é reparada pela enzima O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), enquanto os adutos N⁷ na guanina e N³ na adenina são removidos pela via de reparo por excisão de base (*Base Excision Repair*, BER).

A radioterapia tem prolongado a sobrevivência dos pacientes por seis a oito meses e, assim como a quimioterapia, induz danos no DNA levando as células tumorais

à morte (Sesen et al., 2015). As radiações ionizantes (RI) produzem uma variedade de lesões no DNA, e o tipo de dano mais genotóxico para as células são as quebras de fita dupla (*double strand breaks*, DSBs). Se não forem reparadas, as DSBs podem levar a rearranjos cromossômicos como translocações e deleções, resultando em transformação oncogênica, que podem impedir os processos de duplicação do DNA e transcrição, resultando em morte celular (Hunt et al., 2012). As DSBs podem ser reparadas por duas vias: reparo por recombinação homóloga (*Homologous Recombination*, HR) e reparo por recombinação não-homóloga (*Non-Homologous End-Joining*, NHEJ). O reparo por HR requer homologia entre as cadeias de DNA, com uma fita servindo como molde, para o reparo de DSBs, o que não ocorre no reparo por NHEJ. Durante as fases S e G2 do ciclo celular, HR desempenha um papel importante no reparo de DSBs, devido à presença de cromátides irmãs homólogas próximas. Em contraste, o NHEJ pode operar em todas as fases do ciclo celular em eucariontes (Srivastava e Raghavan, 2015).

1.2 Reparo por recombinação homóloga

A manutenção da integridade genômica é crítica para a sobrevivência de um organismo, e as vias de reparo de DNA atuam de forma orquestrada para proteger o genoma das diversas lesões genotóxicas (Srivastava e Raghavan, 2015). Existem vários tipos de danos no DNA que perturbam a estrutura primária dessa molécula; por isso, a célula eucariótica conta com vários tipos de mecanismos de reparo do DNA, sendo que cinco tipos são bem estudados: reparo por recombinação homóloga (*Homologous Recombination*, HR), reparo por recombinação não-homóloga (*Non-Homologous End-Joining*, NHEJ), reparo por excisão de base (*Base Excision Repair*, BER), reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair*, NER) e reparo de pareamento errôneo (*Mismatch Repair*, MMR) (Christmann et al., 2003; Srivastava e Raghavan, 2015).

Na Recombinação Homóloga (HR), ocorre a permutação entre sequências de DNA homólogas, pois HR exige a presença de uma molécula de DNA de fita dupla não danificada homóloga, que servirá como molde (Mehta e Haber, 2014). A molécula não danificada guia o processo de reparo fornecendo um molde para a restauração da informação genética. O HR tem muitas funções na célula, mas três são de fundamental importância: I) reparo preciso de quebras na fita dupla; II) permutação de sequências nos cromossomos homólogos, durante a meiose na fase S; e III) atuação durante o desenvolvimento embrionário (Rodgers e McVey, 2016). Diferentes estudos realizados em roedores que tiveram nocauteados genes chaves de HR, como *BRCA1*, *BRCA2* e *Rad51*, demonstraram que estes exibiram alterações genéticas severas, que levaram à letalidade embrionária precoce (Huang e Mazin, 2014; Krajewska et al., 2015).

O HR compreende três fases: pré-sinapse, sinapse e pós-sinapse. Durante o processo pré-sináptico, as DSBs são reconhecidas e processadas para dar início ao reparo da sequência danificada (**Figura 1A**). O complexo de proteínas MRE11-RAD50-NBS1 (*M/R/N complex*) atua com atividade de exonuclease, clivando o DNA, onde há DSBs, e a clivagem gera extremidades livres de 3'-OH no DNA de cadeia simples (*single stranded DNA*, ssDNA), até que as regiões de homologia das duas fitas estejam expostas, de modo que as duas extremidades possam ser ligadas (Huang e Mazin, 2014; Srivastava e Raghavan, 2015).

Após as extremidades das fitas duplas terem sido processadas para gerar extremidades livre de fita simples com 3'-OH, a proteína mediadora RPA (proteína A) se liga à fita simples de DNA desestabilizando a sua estrutura secundária e protegendo-a da degradação por enzimas (Canitrot et al., 2004; Maloisel et al., 2008). Com o auxílio de proteínas mediadoras, a proteína RAD51 substitui a RPA, formando um núcleo filamento de DNA de fita simples-RAD51 (**Figura 1A**) (Huang e Mazin, 2014). Algumas proteínas mediadoras, como RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, que auxiliam a ação de RAD51 são proteínas parálogas a esta (Canitrot et al., 2004). Essas quatro proteínas atuam como mediadoras da atividade de recombinação e ajudam RAD51 no anelamento das fitas simples (*Single-Strand Annealing*, SSA). Outra proteína mediadora, não paróloga de RAD51, é a BRCA2, proteína humana supressora de câncer

de mama e ovário (Morokoff et al., 2015). Essa proteína apresenta domínios de ligação ao DNA de fitas simples e dupla e à proteína RAD51, o que indica que ela participa da nucleação do filamento de RAD51 ao DNA (Srivastava e Raghavan, 2015; Woo Cho e Greenberg, 2015).

Durante a etapa sináptica, o filamento de DNA com RAD51 procura a região de homologia em outra molécula de DNA, e, uma vez que essa região é encontrada, a fita com RAD51 promove a invasão na fita homóloga, gerando a alça-D, dentro da qual a extremidade 3'-OH da fita invasora é utilizada para iniciar a síntese do DNA danificado (**Figura 1B**) (Srivastava e Raghavan, 2015). Nessa etapa, RAD54, uma proteína motora ATPase dependente de quebras de fita dupla no DNA, auxilia a invasão da fita danificada à região de homologia na fita não danificada (**Figura 1**) (Morokoff et al., 2015). A proteína RAD54 também é importante para promover a transição da etapa de invasão de fita para a de síntese do DNA, uma vez que a mesma auxilia RAD51 a dissociar-se do DNA (Woo Cho e Greenberg, 2015).

Figura 1: Mecanismo de Recombinação Homóloga na presença de quebras de fita dupla no DNA. Adaptado de Srivastava e Raghavan, 2015.

No estágio pós-sináptico, há três sub-processos de recombinação homóloga diferentes, que podem operar após a formação da alça-D, cada processo com sua atividade enzimática específica (**Figura 1C**). A alça-D representa o ponto de ramificação para os três sub-processos da recombinação homóloga: duplicação induzida por quebra (*break-induce replication*, BIR), junções de Holliday dupla (*Double Holliday junction*, dHJ) e anelamento de fita dependente de síntese (*disengagement of the strand after synthesis*, SDSA) (Canitrot et al., 2004; Maloisel et al., 2008). Em casos de quebras cromossômicas causadas pelo colapso da forquilha de duplicação, o mecanismo de duplicação induzida por quebra (BIR) é ativado (Huang e Mazin, 2014). O BIR acontece quando há quebra em uma fita de DNA na forquilha e a helicase não encontra as ligações covalentes entre as fitas parentais, promovendo a parada da síntese das fitas filhas (**Figura 2**). Nesse processo, quando a forquilha de duplicação é colapsada (**Figura 2B**), a fita descontínua nascente, que estava pareada com a fita parental, liga-se à região da outra fita parental com quebra (**Figura 2C**), processo esse conhecido como migração de ramificação (**Figura 2D**) (Sarbjaj e West, 2014). As ligases unem a fita descontínua nascente à fita de DNA parental com quebra, restaurando essa fita. O fragmento da fita parental com quebra, que pareou com a região complementar da outra fita parental, é unido à fita nascente que estava sendo sintetizada (**Figura 2F**) (Morokoff et al., 2015). Proteínas de forquilha de duplicação se ligam novamente às fitas de DNA e recomeçam a síntese na fita-líder e na fita descontínua (**Figura 2G**) (Prakash et al., 2015). Embora esse processo restaure a integridade do cromossomo, ele pode levar à perda de heterozigossidade, pois há a inserção de um segmento complementar da fita parental na fita nascente e a inserção de um segmento da fita nascente na fita que estava com dano (Srivastava e Raghavan, 2015; Woo Cho e Greenberg, 2015).

Figura 2: Reparo por recombinação homóloga por duplicação induzida por quebra (BIR). Adaptado de: Lodish, Harvey et al., Biologia celular e molecular. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

No processo de SDSA, a extremidade 3'-OH invasora serve como iniciadora da síntese do novo segmento pela DNA-polimerase, na região homóloga entre as fitas (**Figura 3B**) (Canitrot et al., 2004; Prakash et al., 2015). Apenas uma cromátide do cromossomo danificado se liga à fita molde e o novo fragmento é sintetizado com base na homologia das duas fitas ligadas (**Figura 3C**). Em seguida, a fita recém-sintetizada é desligada do molde por ação de uma endonuclease, e se liga à sua extremidade 5', tornando-se uma fita contínua novamente (**Figura 3D**) (Maloisel et al., 2008; Sarbajna e West, 2014). A cromátide do cromossomo com quebra pode utilizar como molde a cromátide-irmã recém-sintetizada, provendo a síntese do fragmento ausente da segunda fita (**Figura 3D, 3E**) (Huang e Mazin, 2014; Morokoff et al., 2015). Esse caminho evita *crossing-over*, reduzindo as possibilidades de rearranjo cromossômico (Watson et al., 2015; Woo Cho e Greenberg, 2015).

Figura 3: Modelo de recombinação homóloga para anelamento de fita dependente de síntese (SDSA). Adaptado de: Watson, James D et al., *Biologia Molecular do Gene*. 7ª ed. Porto Alegre: Artemed, 2015.

Durante o processo de dHJ, a cromátide com quebra e com a extremidade 3'-OH procura uma região de complementaridade na cromátide-irmã e, então, invade a molécula de DNA homóloga. A partir desse processo, um intermediário especial de DNA contendo quatro fitas compartilhadas pelas duas hélices é formado (**Figura 4**) (Huang e Mazin, 2014; Sarbajna e West, 2014). Nesse intermediário-chave, conhecido como junção de Holliday ou permuta de fitas cruzadas, as quatro fitas de DNA se cruzam com as complementares nas duas duplas-hélices (**Figura 4A, 4B**) (Woo Cho e Greenberg, 2015).

A interação entre as duas cromátides-irmãs é necessária, pois, uma vez que as duas fitas da mesma hélice estão quebradas, não existe uma fita de DNA não danificada

disponível para ser utilizada como molde (Morokoff et al., 2015). Para restaurar as duas fitas de DNA separadas e finalizar o reparo, as fitas de DNA na junção de Holliday devem ser clivadas, processo esse denominado resolução, que ocorre quando a junção de Holliday é processada por resolvases. Estas são enzimas formadas pela junção de uma topoisomerase e uma helicase que separam as fitas anteriormente unidas (**Figura 4A.1, 4B.1**) (Canitrot et al., 2004; Maloisel et al., 2008). Em células mitóticas, o complexo de resolvases, que processa as junções de Holliday, não gera *crossing-over* no momento da união das extremidades (**Figura 4A.2**) (Prakash et al., 2015); já em células meióticas, o complexo de resolvases gera produtos com *crossing-over* (**Figura 4B.2**). Portanto, o mecanismo de dHJ pode gerar tanto produtos com *crossing-over* como produtos sem *crossing-over* (Srivastaa e Raghavan, 2015).

Figura 4: Duas principais vias de HR, com a formação de produtos sem *crossing-over* (a) e com *crossing-over* (b). Adaptado de: Huang e Mazin, 2014

1.3 O gene *PTEN* e seu papel no reparo do DNA e no processo tumoral

O gene Fosfatase e Tensina Homólogo (do inglês, *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*, *PTEN*) é um gene de 200kb localizado no cromossomo 10q23; contém nove éxons que codificam um RNAm que traduz 403 aminoácidos, sendo que a extremidade 3' do éxon 8 pode sofrer *splicing* (Ho et al., 2012; Minami et al., 2014; Misra, Mukherjee e Karmakar, 2014).

A expressão proteica de PTEN é observada na maioria dos tecidos em todos os estágios de vida, podendo presumir que se trata de uma proteína constitutiva das células. No entanto, a sua estabilidade é regulada pela sua interação com outras proteínas celulares (Bermudez, Goulielmaki e Papakonstanti, 2015). Os primeiros seis éxons codificam um domínio de 185 aminoácidos, na extremidade N-terminal, com a atividade de fosfatase, que catalisa a desfosforilação de fosfolípidos; e os outros três éxons codificam a extremidade C-terminal com 218 aminoácidos (Minami et al., 2014).

O *PTEN* está envolvido em vários processos celulares associados com a polaridade celular, migração, metabolismo, crescimento, progressão do ciclo celular e renovação das células (Wang, Huang e Young, 2015). Seu papel na ontologia de diferentes tipos de câncer tem sido estudado extensivamente, uma vez que o gene *PTEN* está localizado em um *hot-spot* de mutações no cromossomo 10 (Worby e Dixo, 2014). *PTEN* produz uma proteína fosfatase capaz de remover fosfato tanto em substrato proteico como lipídico. A função mais conhecida de *PTEN* é a sua ação como fosfatase lipídica que catalisa a conversão de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) para fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) a partir da retirada de um grupo fosfato de PIP₃, e, assim, antagoniza a ação da enzima fosfatidilinositol- 3-quinase (PI3K), que faz o processo inverso de PTEN, ou seja, converte PIP₂ a PIP₃ (**Figura 5**). É válido lembrar que PTEN atua na via PI3K/AKT no citoplasma da célula, próximo à membrana celular onde estão localizados os receptores para PI3K, mas PTEN também regula outros processos celulares dentro do núcleo da célula, isto é, a proteína PTEN pode ser

encontrada tanto no citoplasma, como dentro do núcleo da célula (Bononi e Pinton, 2015; Ho et al., 2015).

Na ausência de PTEN, PIP₃ não é convertido a PIP₂, e os níveis intracelulares de PIP₃ aumentam, fazendo com que a cascata de sinalização PI3K/AKT esteja constantemente ativada na célula, comprometendo vários processos (Hopkins et al., 2014). Isso ocorre porque, uma vez ativado, PI3K converte PIP₂ em PIP₃, a qual recruta várias proteínas, incluindo AKT (Li, Crowe e Yang, 2015). AKT é parcialmente ativada através da fosforilação inicial na treonina 308 (Thr308) e depois totalmente ativada pela fosforilação na serina 473 (Ser473). Em seguida, AKT ativada se desloca da membrana celular para o citoplasma e núcleo, sendo que neste último, pode ativar ou reprimir muitos alvos *downstream* e regular várias funções celulares, como crescimento celular, proliferação, sobrevivência, metabolismo e vias de motilidade (**Figura 5**). O efetor, *downstream* mais importante da sinalização de AKT é mTOR, uma serina treonina-quinase que, uma vez ativada por AKT, regula outras proteínas que contribuem para a proliferação e sobrevivência da célula (**Figura 5**) (Worby e Dixo, 2014; Lipkin et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Figura 5: Via de sinalização PI3K/PTEN/mTORC1 em célula normal e célula com alteração. Adaptado de: Lin, Crowe e Yang, 2015.

PTEN também pode ser encontrada no interior do núcleo da célula, onde desempenha papel importante na estabilidade do cromossomo, no reparo do DNA e na parada do ciclo celular (Worby e Dixo, 2014). Whiteman et al. (2002), utilizando amostras de pacientes com melanoma primário, mostraram que células quiescentes apresentaram maior quantidade de PTEN nuclear, e as células que estavam em processo de divisão mostraram níveis maiores de PTEN no citoplasma. Chang et al. (2008) encontraram relação entre PTEN e TP53 no núcleo. Neste, independentemente da atividade fosfatase de PTEN, esta regula a parada do ciclo celular em G1 pela ligação com TP53. Esse estudo mostrou que, na presença de estresse oxidativo, PTEN é acumulado no núcleo, e se liga à proteína TP53 interrompendo o ciclo celular e, assim, protege as células do dano oxidativo. Shen et al. (2007), demonstraram que os níveis de PTEN intranuclear influencia a estabilidade cromossômica, pois PTEN estava associado

fisicamente com a proteína C centrômero-específica, ligação esta que é importante para a estabilidade do cromossomo.

A atividade de PTEN é regulada em diversos níveis incluindo modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, ubiquitinação, oxidação, acetilação, sumoilação, interações proteína-proteína, regulação da transcrição, micro-RNAs e RNAs não codificantes (Worby e Dixo, 2014). A fosforilação de PTEN na cauda C-terminal, nos resíduos Ser380, Thr382, Thr383 ou Ser385, inibe a sua atividade de fosfatase, mas favorece a sua estabilização, pois essa fosforilação promove uma conformação mais estável da proteína PTEN. As enzimas responsáveis pela fosforilação de PTEN variam de acordo com o resíduo a ser fosforilado. Por exemplo, resíduos 380 e 385 são fosforilados pela caseína-quinase II (CK2), enquanto que resíduos Ser370 e Thr366 são fosforilados por CK2, GSK3 β e PLK3. Estudos vêm mostrando que alterações oxidativas no gene *PTEN* podem ocorrer quando há estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (Song, Salmena e Pandolfi, 2014). Evidências recentes demonstraram que as interações proteína-proteína influenciam a atividade supressora tumoral de *PTEN*, pois estas modificam a sua conformação, sua estabilidade, seu potencial de ligação à membrana lipídica e sua distribuição sub-celular (Minami et al., 2014).

A instabilidade genômica e cromossômica é uma característica de células tumorais. Nesse contexto, genes supressores tumorais desempenham um importante papel na manutenção da estabilidade do genoma; consequentemente, a perda de função desses genes leva à instabilidade genômica. *PTEN* se encontra, frequentemente, mutado nos diferentes tipos de tumores; entretanto, os mecanismos de *PTEN* para a manutenção da estabilidade genética, assim como o seu papel no processo tumoral ainda não foram completamente elucidados (Yin e Shen, 2008).

PTEN codifica uma importante fosfatase lipídica que participa da cascata de sinalização de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K); a perda de *PTEN* conduz à ativação da cascata de PI3K/AKT e estimula o crescimento e a proliferação celular (Opel et al., 2008). No entanto, alguns autores sugerem outras funções de *PTEN* que não estão

relacionadas com a sinalização de PI3K/AKT, por exemplo: algumas mutações em *PTEN* ocorrem em outros domínios, que não o da fosfatase, comprometendo a homeostase celular, além do fato de que *PTEN* não é encontrado apenas no citoplasma próximo à membrana celular, mas também se localiza no núcleo, indicando que *PTEN* deva exercer funções no núcleo da célula (Shen et al., 2007; Chang et al., 2008), conforme já mencionado anteriormente.

O primeiro relato sobre o papel de *PTEN* nuclear associado à instabilidade genética foi publicado por Puc e Parsons. (2005). Os autores constataram que, quando incidiam radiações ionizantes em células de roedores com *PTEN* inativo, estas não apresentaram atividade adequada da ciclina Chk1 no *checkpoint* em G2 do ciclo celular, o que resultou em maior acúmulo de quebras de fita dupla no DNA. A falta de *PTEN* eleva a atividade de AKT, que promove a fosforilação de Chk1 (no resíduo serina 280). A Chk1 fosforilada sofre ubiquitinação, o que impede a sua entrada no núcleo; assim, Chk1 não se liga às proteínas de detecção de dano no DNA e não promove a parada no ciclo celular em G2 para o reparo do DNA danificado. Puc e Parsons (2005), ao analisarem várias amostras de tumores mamários, detectaram aumento do nível de Chk1 citoplasmático, menor expressão de *PTEN* e elevada fosforilação de AKT.

Shen et al. (2007) demonstraram que *PTEN* é importante para a manutenção da estabilidade cromossômica, pois se liga fisicamente ao centrômero e à proteína centrômero-específica C (CENP-C), pois as células deficientes para *PTEN* apresentavam grande quantidade de quebras e aberrações cromossômicas, enquanto as células proficientes não apresentavam. Essa é uma das razões que explica a presença de *PTEN* no núcleo, distante do sítio onde exerce sua atividade de fosfatase. Shen et al. (2007) também verificaram que as células que não produziam a proteína *PTEN* apresentavam menores níveis da proteína RAD51, em comparação com as células proficientes para a proteína *PTEN* e, por esse motivo, as células deficientes para *PTEN* mostraram maior número de quebras de fita dupla. É provável que a função de *PTEN* na regulação da transcrição seja dependente da atividade de fosfatase dessa proteína, pois quando a proteína alterada na região da fosfatase, é inserida em células *PTEN*-mutado, essa proteína alterada é incapaz de induzir a expressão de RAD51 nessas

células, enquanto uma proteína alterada em uma região que não a de fosfatase, é capaz de induzir a expressão de RAD51 nas células *PTEN-null* (Shen et al., 2007). Esse mesmo grupo constatou, por imunoprecipitação, que PTEN se liga à região promotora de RAD51 e coopera com o fator de transcrição E2F1 na regulação transcricional de RAD51, sendo demonstrado que essa sinalização envolvendo tais proteínas fornece a base molecular relacionada ao papel essencial destas no reparo do DNA e estabilização dos cromossomos.

Woiwode et al. (2008), utilizando linhagens de diferentes tipos de tumores, observaram que PTEN auxilia a transcrição de RNA polimerase III e também, conseqüentemente, influencia na regulação da transcrição de vários genes, pois as células deficientes para PTEN mostraram níveis mais baixos da RNA-polimerase III. As descobertas da localização e de novas funções de *PTEN* no núcleo expandiram seu papel como supressor tumoral; atualmente, é bem conhecido que *PTEN* é um dos genes mais frequentemente mutados nos diversos tipos de câncer (Navarro et al., 2015), mas sabe-se também que a distribuição celular de PTEN varia entre os diferentes tecidos e nas diferentes células tumorais, e talvez, por essa razão, *PTEN* tenha um grau de influência variável no processo de tumorigênese dependendo do tecido (Salmena, Carracedo e Pandolf, 2008; Yin e Shen, 2008).

PTEN está localizado na região 10q23, um *locus* que é altamente susceptível à mutação em cânceres humanos. A perda completa de *PTEN* tem sido frequentemente observada em câncer de endométrio e glioblastoma, sendo associada com cânceres em estágios avançados e metástases (Salmena, Carracedo e Pandolf, 2008; Perez-Ramirez et al., 2015), pois com a perda de *PTEN*, a via PI3K/AKT permanece ativada continuamente, o que torna as células resistentes à quimio- e à radioterapia, pois essas células com AKT ativo não ativam as cascatas para a morte celular (Hunt et al., 2012; Carletti et al., 2015).

Ge e Rudikoff (2000) constataram que células de mieloma deficientes para *PTEN* têm aumento na fosforilação de AKT, impedindo que as células morram por apoptose. Além disso, ao utilizarem linhagens de mieloma com expressão diferencial de *PTEN* em

camundongos, 100% dos camundongos que receberam células sem *PTEN* apresentaram a formação de tumores, enquanto apenas 50% dos animais com células de expressão reduzida de *PTEN* mostraram a formação de tumores. Li et al. (2015) analisaram 198 amostras de câncer colorretal e identificaram que 79,8% das amostras possuíam alterações em *PTEN*; entre estas, 34,3% tiveram perda da expressão da proteína, 27,3 % apresentaram metilação na região promotora do gene e 18,2 % mostraram redução do número de cópias de *PTEN*. O grupo identificou também que tumores em estágio I tinham perda de expressão de *PTEN* de 20% enquanto que em tumores de estágio IV essa perda aumentou, de forma significativa, para 56,9%.

O glioblastoma multiforme apresenta alta frequência de mutações em *PTEN* (60%) (Ohgakiet al., 2004); entretanto, mesmo com essa alta taxa de mutação, não há estudos suficientes que possam elucidar o papel de *PTEN* no processo de tumorigênese e a relação desse gene com outras proteínas celulares. O trabalho de Shen et al. (2007) mostraram evidências que comprovaram a relação de *PTEN* com proteínas de reparo e ciclo celular, mas muito ainda deverá ser pesquisado sobre o papel de outras proteínas que interagem com esse gene ou que são capazes de influenciar a sinalização envolvendo o mesmo. A compreensão desses mecanismos é de extrema importância, uma vez que o esclarecimento dessas relações ajudará a compreender o papel de *PTEN* na malignização das células e nas respostas às drogas antitumorais.

O etoposídeo é um medicamento muito utilizado na quimioterapia, sendo que o principal alvo desse quimioterápico é a enzima nuclear topoisomerase II. O mecanismo de ação do etoposídeo consiste em estabilizar o complexo covalente intermediário formado entre o DNA e a topoisomerase II, impedindo a ligação da topoisomerase II ao DNA, resultando na formação de quebras simples e duplas e o acúmulo destas (Montecucco1, Zanetta e Biamont, 2015). Havendo acúmulo de DSBs, uma das vias possíveis de reparo é o HR, conforme mencionado anteriormente. Uma das proteínas chaves do reparo por HR é a RAD51. Esta, juntamente com proteínas parálogas (RAD51C, RAD51B, RAD51D, XRCC2 e XRCC3) e outras proteínas, se ligam nos sítios de DSBs, promovendo o reparo das quebras utilizando a fita homóloga como molde. Tanto a quimio- como a radioterapia induzem, além de outros tipos de danos no

DNA, uma grande quantidade de DSBs, as quais são capazes de induzir morte celular, caso as células não possam repará-las.; dessa maneira, ocorre a regressão do tumor, ou resistência das células tumorais, alternativamente. Em diferentes tipos celulares, foi relatado que a expressão de PTEN interfere na expressão de RAD51 e de parálogas (Shen et al, 2007; Mukherjee e Karmakar, 2013; Mendes-Pereira et al, 2009). Entretanto, em células de GBM, não é conhecido como a expressão de PTEN interfere na expressão de RAD51 e de suas parálogas em resposta a uma droga antitumoral que causa danos do tipo DSBs.

Assim, a hipótese do presente trabalho se baseia nas informações mencionadas sobre PTEN e o seu potencial em interferir na expressão da proteína RAD51 e parálogas em GBM, uma vez que essas proteínas são cruciais para que as células consigam reparar as DSBs geradas pelas drogas antitumorais. Buscar o conhecimento sobre quais proteínas de reparo podem ser reguladas por *PTEN* em GBM poderá fornecer informações importantes. Considerando que células com reparo defeituoso de HR são mais sensíveis à quimio- e à radioterapia, conforme mencionado, neste trabalho, a proposta consistiu em testar se o gene *PTEN* está envolvido na expressão de RAD51 e de duas proteínas parálogas (RAD51C e RAD51B) em células de GBM submetidas a tratamento com a droga etoposídeo.

Para testar essa hipótese, foram utilizadas linhagens de GBM com diferentes níveis de expressão de *PTEN*, sob condições de tratamento com uma droga indutora de quebras no DNA, o antitumoral etoposídeo, visando estudar a expressão de PTEN e de RAD51 e proteínas parálogas e, consequentemente, se *PTEN* interfere na eficiência do reparo por HR em GBM, por meio de análises de proliferação, cinética do ciclo celular e indução de gama-H2AX e de apoptose, além de estudo da expressão das proteínas citadas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar se, em linhagens de Glioblastoma Mutiforme, após o tratamento com um agente antitumoral indutor de quebras de fita duplas no DNA, o gene *PTEN* é capaz de interferir na expressão de RAD51 e parálogos (RAD51C e RAD51B), e consequentemente, interferir também na eficiência do reparo por HR e assim no mecanismo de indução de morte celular e de resposta a danos no DNA.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar entre as linhagens celulares de glioblastoma (LN18 e T98G) a diferença da taxa de proliferação celular, na presença de quebra dupla induzida pelo etoposídeo (25, 50, 75 e 100 μ M) por meio do *Cell Proliferation Kit II* (XTT), nos tempo de 24, 72 e 120 horas após o tratamento.
- b) Analisar, através de citometria de fluxo, a diferença entre as linhagens LN18 e T98G quanto à progressão no ciclo celular na presença de quebras duplas induzidas por etoposídeo (50 e 75 μ M) em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) após o tratamento.
- c) Avaliar a indução de quebras no DNA pelo etoposídeo (50 e 75 μ M) nas linhagens celulares de glioblastoma (LN18 e T98G), pela aplicação do ensaio de imunofluorescência para a proteína γ -H2AX, avaliada por citometria de fluxo.
- d) Investigar se há diferença na indução de apoptose e necrose, por meio da coloração corante Anexin V, entre as linhagens celulares de glioblastoma (LN18 e T98G) em resposta ao tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M).

- e) Analisar a expressão proteica do gene *PTEN* nas linhagens de glioblastoma (LN18, T98G e U87MG), utilizando a metodologia de *Western-blot*.
- f) Analisar a expressão proteica de RAD51 e paralogas (RAD51C e RAD51B), por meio da técnica *Wester-blot*, nas linhagens de glioblastoma (LN18, T98G e U87MG) em resposta ao tratamento com etoposídeo.
- g) Silenciar *PTEN* na linhagem LN18 e, utilizando a metodologia de *Western-blot*, avaliar se o silenciamento de *PTEN* na linhagem LN18 altera a expressão da proteína RAD51 e de suas paralogas.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares

As linhagens T98G e LN18 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC®) e a linhagem U87MG foi doada pela Prof. Dra. Mari Cleide Sogayar (IQ-USP).

As linhagens LN18 e T98G têm o background genético muito similar no que concerne às principais mutações em células de GBM: ambas têm atividade da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), ambas têm mutações *missense* do gene *TP53* e ambas têm deleção do gene *p16* e *p14ARF* (Ishii et al.,1999). Entretanto, essas linhagens diferem entre si quanto à expressão de *PTEN*: LN18 apresenta *PTEN* do tipo selvagem e apresenta proteína funcional, sendo que T98G apresenta uma mutação em *PTEN* que compromete a atividade de fosfatase da proteína (Ishii et al.,1999). Ou seja, a linhagem T98G apresenta o gene *PTEN*, mas com comprometimento de função da proteína, pois esta não é completamente funcional.

A linhagem U87MG não é similar à T98G e à LN18 quanto aos genes *TP53*, *p16*, *p14ARF* e à enzima MGMT. Por essa razão, esta não foi empregada para realizar as análises a nível celular. Utilizamos a linhagem U87MG apenas para os experimentos de expressão proteica (*Western-blot*), já que essa linhagem apresenta uma mutação no gene *PTEN* que impede a tradução da proteína, e, por isso, ela foi usada apenas para comparação com as outras duas linhagens para mostrar a relação entre *PTEN* e RAD51 e parálogas.

3.2 Agente indutor de dano no DNA – Etoposídeo

O etoposídeo é um medicamento muito utilizado na quimioterapia, tanto para tratamentos de tumores sólidos como de câncer hematológico. O principal alvo desse medicamento é a enzima nuclear topoisomerase II. Quando a topoisomerase se liga ao DNA, forma-se um complexo covalente intermediário (denominado complexo clivável) entre o DNA e a enzima topoisomerase II. O etoposídeo estabiliza esse covalente por formar pontes de hidrogênio com o DNA, e esse processo impede a religação da enzima com o DNA. Em resposta a danos no DNA induzido por etoposídeo, as células acumulam quebras, tanto DSBs como SSBs. Esse tipo de dano tem sido considerado o principal mecanismo responsável pelo etoposídeo (Novello et al., 2014).

O medicamento Vepesid® (*Bristol-Myers Squibb*) foi utilizado no presente trabalho, sendo que o conteúdo da ampola foi diluído em água deionizada e, em seguida, filtrado em filtro com poro de 0,45 μ (*Merck Milipore*) e estocado a -20°C . A solução estoque estava na concentração de 33,9mM, e utilizamos ela pra fazer as soluções necessárias para cada tratamento.

3.3 Cultivo celular

Foram utilizadas células previamente congeladas em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de 1×10^6 células/mL, em uma solução de congelamento (90% meio de soro fetal bovino e 10% DMSO). Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de cultura de 25 cm^2 (TPP) com 10 mL de meio HAM-F10 + DEMEM (*Sigma Aldrich*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF- Cutilab); as culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 até as células atingirem o estado de semiconfluência, sendo posteriormente subcultivadas e preparadas para os experimentos.

3.4 Tratamento com etoposídeo

Todos os experimentos desta pesquisa foram realizados com células cultivadas entre a quarta e a décima passagem após o descongelamento. Para cada experimento, as células foram semeadas nos respectivos frascos, e 24h após, eram tratadas com diferentes concentrações do etoposídeo. A droga permaneceu no meio de cultura das células por 2 horas, sendo posteriormente retirada, e as culturas lavadas com PBS 1x para a remoção total da droga. Os tempos de colheita dos experimentos variaram de acordo com o teste empregado.

3.5 Análise da proliferação celular utilizando o *Cell Proliferation Kit II* (XTT) *Sigma-Aldrich* (USA)

O ensaio com o kit-XTT possibilita detectar células viáveis, com base no princípio de que a clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas forma um corante alaranjado (formazam). Essa conversão somente ocorre nas células viáveis e, por isso, esse experimento foi utilizado com a finalidade de determinar a quantidade de células sobreviventes após o tratamento com várias concentrações de etoposídeo.

Em cada poço de uma placa de 96 poços (Corning), foram semeadas células das linhagens T98G e LN18 nas proporções de 1×10^4 para o tempo de 24 horas e de 5×10^3 para o tempo de 48 horas. Já para o tempo de 120 horas, foram semeadas 1×10^3 células da linhagem T98G e 3×10^3 da linhagem LN18. Para esse último tempo, foi necessário semear quantidades diferentes das duas linhagens, pois elas crescem em tempos diferentes. As células foram semeadas nos poços e, 24 horas depois, tratadas com as concentrações de etoposídeo: 25, 50, 75 e 100 μM , durante 2 horas. Depois do

tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x, sendo reincubadas em um novo meio completo sem a droga.

O kit XTT foi utilizado no momento da colheita, sendo que os reagentes permaneceram em cultura por cerca de 60 minutos, até o momento da leitura colorimétrica em um espectrofotômetro, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem dos poços, 100 µL da solução XTT/eléctron (preparada de acordo com as instruções do fabricante) foi utilizada. O resultado da absorbância, medida em 492 e 690 nm, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra. Na análise estatística, foram feitas duas análises diferentes: uma análise que comparava as taxas observadas para as concentrações diferentes da droga com o controle, para cada linhagem individual, para analisar isoladamente o efeito do etoposídeo em cada linhagem; e outra análise estatística, comparando a mesma concentração da droga para as duas linhagens, para identificar se existia diferença estatisticamente significativa entre a taxa de proliferação das linhagens T98G e LN18 para a mesma concentração de etoposídeo. Em ambas as análises, média das triplicatas dos três experimentos independentes foram comparadas pelo teste-T de *Student* ($p < 0,05$ considerado como valor significativo) no qual, foram determinadas as taxas de proliferação de diferentes linhagens para uma mesma concentração da droga.

3.6 Detecção de danos no DNA por imunofluorescência da proteína γ -H2AX

Uma das principais respostas celulares às quebras duplas no DNA (DSBs) é a fosforilação da histona H2AX, uma proteína histona pertencente à família H2A. A histona H2AX, quando é fosforilada na serina 139, forma *foci* de H2AX nos sítios de lesão. A histona, quando fosforilada, passa a ser chamada γ -H2AX (Bonner et al., 2008; Scully, 2013). Para esse experimento, foram semeadas 2×10^5 células das linhagens T98G e LN18, em placas de cultivo de 12 poços (Corning), seguindo-se o tratamento com etoposídeo de 50 e 75 µM durante duas horas. Depois do tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x e reincubadas em um novo meio sem etoposídeo.

As células foram colhidas logo após as duas horas de tratamento com etoposídeo – tempo que chamamos de 0 hora – e 24 horas depois do tratamento. Essas células foram fixadas (PBS-paraformaldeído 3% e sucrose 2%) por dez minutos, em temperatura ambiente (TA), e posteriormente lavadas com PBS (1X) e centrifugadas a 1000 rpm, por cinco minutos, para a retirada da solução de fixação. Em seguida, as células foram permeabilizadas (PBS-Triton X-100 0,5%), por mais dez minutos, em TA, lavadas com PBS (1X) e centrifugadas a 1000 rpm, por cinco minutos, para a retirada da solução de fixação. Após a lavagem, as células foram incubadas em PBS-BSA 2% contendo anticorpo primário anti-rabbit γ -H2AX (Santa Cruz Biotechnology) na proporção de 1:800, por 45 minutos, a 37°C, e posteriormente lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 1000 rpm, por cinco minutos, para a retirada da solução de incubação com o anticorpo primário. Em seguida, as células foram incubadas (PBS-BSA 2%) com anticorpo secundário fluorescente anti-rabbit Alexa Fluor® 488 chicken (Invitrogen) diluído a uma proporção de 1:400. A incubação ocorreu no escuro, por 30 minutos, a 37°C, seguida de uma lavagem com PBS (1X) e centrifugadas a 1000 rpm, por cinco minutos, para a retirada da solução de incubação com o anticorpo secundário. Após a centrifugação, o PBS foi removido e o precipitado ressuspensionado em 200µL de PBS (1X) para a análise no citômetro de fluxo *GuavaCytoSoft 4.2.1 Software Environment* (*Guava Technologies*): foram analisados 5.000 eventos para cada amostra. Na análise estatística, a média dos três experimentos independentes foi comparada pelo teste-T de *Student* ($p < 0,05$, valor considerado como significativo) no qual, correlacionamos as intensidades de fluorescência relativa das diferentes linhagens em uma mesma concentração da droga, para identificar se existia diferença estatisticamente significativa entre as intensidades de fluorescência relativa das linhagens T98G e LN18 para a mesma concentração de etoposídeo

3.7 Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo

Foram semeadas 2×10^4 células das linhagens T98G e LN18 em placas de cultivo de 12 poços (*Corning*), e, 24 horas depois, foi realizado o tratamento com etoposídeo de

50 e 75 μ M, durante 2 horas: depois do tratamento as células foram lavadas com PBS, sendo reincubadas em um novo meio, sem etoposídeo. As células foram colhidas após 24, 48 e 72 horas. No momento da colheita, o meio foi removido e armazenado, e as células foram lavadas com PBS (1X), tripsinizadas e coletadas com o meio previamente guardado; depois foram centrifugadas a 1000 rpm, por cinco minutos, e o sobrenadante (meio de cultura) foi removido, e o precipitado de células lavado com PBS (1X). As células foram novamente centrifugadas (1000 rpm, por cinco minutos) e, após a centrifugação, o PBS (1X) foi removido e o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de etanol 70% gelado, mantido a -20°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Antes de proceder à leitura das amostras, o material armazenado a -20°C foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos e o etanol 70% foi removido. O precipitado foi ressuspensionado em 1mL de PBS (1X) gelado e novamente centrifugado. Após a centrifugação, o PBS foi removido e o precipitado ressuspensionado em 200 μ L da solução de iodeto de propídio. Após 15 minutos de incubação a 37°C, o material foi analisado no citômetro de fluxo *GuavaCytoSoft 4.2.1 Software Environment* (Guava Technologies), e 5.000 eventos foram analisados para cada amostra. Na análise estatística, as médias das triplicatas dos três experimentos independentes foram comparadas por meio do teste One Way RM ANOVA, seguido pelo método de comparação de Bonferroni. Nesse teste, $p < 0,05$ foi o valor considerado como significativo.

3.8 Detecção de morte celular por citometria de fluxo

Foram semeadas 2×10^4 células das linhagens T98G e LN18 em placas de cultivo de 12 poços (Corning). A detecção de apoptose e necrose foi realizada pelo método da anexina-V, utilizando-se o citômetro de fluxo *GuavaCytoSoft 4.2.1 Software Environment* (Guava Technologies). No momento da colheita, o meio foi removido e armazenado, as células foram lavadas com PBS (1X), tripsinizadas e coletadas com o meio previamente guardado. Após isso, as células foram centrifugadas a 1000 rpm, por

cinco minutos, e o sobrenadante (meio de cultura) foi retirado. Em seguida as células foram ressuspensas em 100 µL de meio de cultura acrescido de 100 µL do reagente anexina-V e incubadas, por 20 minutos a 37°C no escuro. Em seguida, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo, em que 5.000 células por amostra foram analisadas. No momento da leitura, as células marcadas com o corante Annexin V são caracterizadas como células apoptóticas e as células coradas com o corante 7 ADD são classificadas como necróticas. Dessa maneira, faz-se a distinção entre as células que estão em processo de necrose daquelas que estão em apoptose.

Na análise estatística, as médias das triplicatas dos três experimentos independentes foram comparadas por meio do teste Teste-T. Nesse teste, $p < 0,05$ foi o valor considerado como significativo.

3.9 Experimentos para avaliação da expressão proteica por *Western Blotting*

3.9.1 Extração de proteínas com solução de lise

Para a extração de proteínas, foi utilizado o reagente *ProteoJTTM Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas Life Sciences)*. As células foram tripsinizadas e lavadas com PBS (1X). Posteriormente, foi adicionada a solução de lise gelada (100-200µL/10⁶ células), com 1% de inibidores de proteases *HaltTM Protease Inhibitor Cocktail Kit (ThermoScientific)*. As células foram ressuspensas por agitação e permaneceram, por dez minutos, no agitador rotatório (1200rpm): foram centrifugadas a 18.000g, por 15 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi transferido para um tubo e estocado a -80°C. As proteínas foram quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão obtida para uma proteína conhecida utilizando-se o *kit BSA (Pierce)*.

3.9.2 Eletroforese de proteínas

O perfil das proteínas foi analisado utilizando-se géis de Bis-Tris com dimensões 8x 0,1cm (*Invitrogen*). As amostras foram preparadas com 40 µg de proteína. As

amostras foram desnaturadas no termociclador a 90 °C por dez minutos e, posteriormente, aplicadas no gel. Os marcadores de peso molecular empregados foram o *Magic Mark™ XP Western Protein Standard* e o *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard*, ambos da *Invitrogen*. A eletroforese foi realizada a 100V, por duas horas, em cuba (*XCellSureLock™ Mini-Cell – Invitrogen*) contendo tampão SDS (*Invitrogen*).

3.9.3 Transferência eletroforética

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas *Invitrolon PVDF (Invitrogen)* utilizando-se o sistema *XCell II™ Blot Module (Invitrogen)*. Os itens utilizados na transferência foram previamente imersos em tampão de transferência antes de serem colocados na cuba. A voltagem aplicada foi de 30V, por cinco horas. Posteriormente, as membranas foram ativadas com metanol e submetidas à imunodeteção

3.9.4 Imunodeteção e visualização das proteínas

A imunodeteção e a visualização das proteínas foram realizadas com o auxílio do kit *Western Breeze Chromogenic (Invitrogen)*. A membrana foi imersa em 8 mL de solução bloqueadora e incubada, durante 60 minutos, em um agitador rotatório. Em seguida, a membrana foi lavada com 20 mL de água ultrapura, durante cinco minutos, e incubada com 8 mL da solução de anticorpo primário, por cinco horas. Após a incubação com o anticorpo primário, foram realizadas três lavagens, por cinco minutos, com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos. Dessa vez, a membrana foi incubada com 8 mL da solução do anticorpo secundário por 30 minutos; depois da incubação, recebeu três lavagens, por cinco minutos, com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados dois enxágues com 20 mL de água, por dois minutos. Após a última lavagem com água, a membrana foi incubada com 1 mL de substrato quimioluminescente, por cinco minutos, e depois foram analisadas no equipamento *Image Quant Las 500 (GE Healthcare Life Sciences)* para a detecção das bandas. As bandas foram quantificadas usando o programa gel *Pro Analyser4 (Media Cybernetic)*,

e os valores relativos à quantificação das bandas foram normalizados em relação às proteínas endógenas.

Os anticorpos primários utilizados neste trabalho foram os seguintes: anti-rabbit PTEN (proporção de 1:1000 – *CellSignalingTechonology*), anti-mouse AKT (proporção de 1:500 – *CellSignalingTechonology*), anti-mouse AKT fosforilado (proporção de 1:500 – *CellSignalingTechonology*), anti-rabbit Rad51C (proporção de 1:250 – *ABCCAM*®), anti-rabbit Rad51B (proporção de 1:250 – *ABCCAM*®), além dos endógenos anti-rabbit β -Actina (proporção de 1:2000 – *CellSignalingTechonology*) e anti-mouse β -Tubulina (proporção de 1:1000 – *CellSignalingTechonology*), usados como controle para a normalização.

3.10 Ensaio de Inibição da Expressão Gênica por RNA de Interferência (siRNA)

As células foram cultivadas em placas de seis poços (*Corning*) 3×10^5 , suplementado com 10% de SBF. Em seguida, as células foram incubadas até atingirem 60-80% de confluência. Para proceder ao silenciamento do gene *PTEN*, foi utilizado o oligômero PTEN siRNA (Santa Cruz Biotechnology) que apresenta sequências de 20-25 nucleotídeos para o gene. O oligômero foi transfectado para a linhagem LN18 utilizando-se a *Lipofectamina 2000* (*Invitrogen*). Inicialmente, o oligômero foi centrifugado e ressuspedido em água livre de nuclease. Para a transfecção, 15 μ L de *Lipofectamina 2000* (*Invitrogen*) foram diluídas em 100 μ L do meio Opti-MEM (*Life Technologies Corporartion*) pré-aquecido a 37°C e incubado, por 5 minutos, em temperatura ambiente. A seguir, o oligômero foi diluído em 100 μ L do Opti-MEM (*Life Technologies Corporartion*) para uma concentração final de 100nM. Após cinco minutos de incubação, a *Lipofectamina 2000* (*Invitrogen*) diluída foi combinada com o oligômero diluído e incubada, por 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o complexo oligômero-lipofectamina foi adicionado a 2,8 mL de meio de cultura sem

antibióticos, produzindo um volume final de 3 mL. A transfecção ocorreu por seis horas, quando as células foram lavadas e um novo meio foi adicionado. Após esse procedimento, as células transfectadas foram incubadas em diferentes tempos: 24, 48 e 72 horas, a 37°C, e a eficiência da transfecção foi monitorada por *Western blot*. Como controle do silenciamento, foi utilizado o *scrambled* (sc-37007, *Santa Cruz Biotechnology Inc*) na mesma concentração que o siRNA. Após a padronização, foi escolhida a concentração de siRNA e o tempo de incubação.

RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1 Proliferação celular

Com intuito de verificar a sensibilidade individual das linhagens T98G e LN18 em resposta ao tratamento com o antitumoral etoposídeo foi avaliada a proliferação dessas células, nos tempos de 24, 72 e 120 horas, posteriores ao tratamento. Para a análise estatística, primeiramente foram comparadas as taxas de proliferação das diferentes concentrações relativamente aos seus respectivos controles negativos, a fim de analisar isoladamente o efeito do etoposídeo individualmente.

Os resultados obtidos para a linhagem LN18, avaliada após 24 horas do tratamento mostram que nesse tempo não se observou uma redução da viabilidade das células nas concentrações testadas (25, 50, 75 e 100 μM) (**Figura 6.A**). Entretanto, os efeitos do etoposídeo foram visualizados após 72 horas do tratamento, com reduções de 35,5 a 61,2% na viabilidade entre a menor e a maior concentração ($p < 0,001$) (**Figura 6.B**), quando comparadas ao controle. Após 120 horas do tratamento, a mesma linhagem se mostrou ainda mais sensível à droga, com redução estatisticamente significativa em todas as concentrações do etoposídeo: 25 ($p < 0,01$), 50, 75 e 100 μM ($p < 0,001$) atingindo 92,2% de redução na maior concentração testada (**Figura 6.C**). Portanto, nos tempos de 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo, a quantidade de danos acumulados na linhagem LN18 afetou a proliferação das células para todas as concentrações avaliadas.

Com relação à proliferação da linhagem T98G, observamos que os tempos de 24 e 72 horas após o tratamento com etoposídeo (**Figura 6.A; Tabela 1**), não foram suficientes para reduzir significativamente a proliferação celular, quando comparamos as taxas de proliferação das diferentes concentrações com o respectivo controle. Somente após 120 horas do tratamento, a linhagem T98G mostrou uma redução

estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na taxa de proliferação celular nas concentrações de 50, 75 e 100 μM (75,6; 77,7 e 85,2%, respectivamente).

Figura 6: Proliferação celular (*Cell Proliferation Xit II (XTT)*) em escala de $\log_{10}$ avaliada 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (25, 50, 75 e 100 μM), nas linhagens LN18

e T98G. Os valores são provenientes de três experimentos independentes, realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Tabela 1: Porcentagens de viabilidade celular obtidas no ensaio de proliferação para as linhagens T98G e LN18 tratadas com 25, 50, 75 e 100 μM de etoposídeo, e avaliadas 24, 72 e 120 horas após o tratamento. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Linhagem	Tratamentos	Proliferação celular (%) ($\pm$ Desvio Padrão)		
		Tempo (horas)		
		24	72	120
LN18	0 μM	100 $\pm$ 7,2	100 $\pm$ 2,0	100 $\pm$ 5,1
	25 μM	86,0 $\pm$ 23,3	64,5 $\pm$ 4,8	49,2 $\pm$ 15,7
	50 μM	98,9 $\pm$ 4,4	53,6 $\pm$ 3,5	24,4 $\pm$ 10,5
	75 μM	95,5 $\pm$ 3,5	45,1 $\pm$ 6,2	14,7 $\pm$ 3,6
	100 μM	75,2 $\pm$ 17,8	38,8 $\pm$ 6,2	7,8 $\pm$ 1,2
T98G	0 μM	100 $\pm$ 3,9	100 $\pm$ 12,9	100 $\pm$ 40,2
	25 μM	123,4 $\pm$ 6,1	106,9 $\pm$ 10,3	44,1 $\pm$ 32,4
	50 μM	114,3 $\pm$ 13,2	93,9 $\pm$ 2,9	24,4 $\pm$ 8,9
	75 μM	126,2 $\pm$ 4,7	86,3 $\pm$ 11,6	22,3 $\pm$ 18,7
	100 μM	111,6 $\pm$ 2,2	87,7 $\pm$ 13,4	14,8 $\pm$ 8,8

Alternativamente, a fim de comparar as taxas de proliferação para uma mesma concentração de etoposídeo e tempo entre as linhagens, realizou-se uma segunda análise estatística, em que as taxas de proliferação celular de cada linhagem foram normalizadas com seus respectivos controles. Dessa forma, foram comparadas as taxas de proliferação normalizadas apresentadas pelas duas linhagens para os dados obtidos para uma mesma concentração, a fim de identificar se as linhagens diferiam quanto à resposta sob uma mesma dose de etoposídeo (**Figura 7**).

Após 24 horas do tratamento, as linhagens não apresentaram diferenças significativas nas taxas de proliferação sob os tratamentos empregados, embora a

linhagens T98G mostrasse uma tendência de viabilidade maior nesse tempo (**Figura 7.A**). A linhagem T98G se mostrou mais resistente aos tratamentos no tempo de 72 horas (**Figura 7.B**), resultando em uma viabilidade maior em relação à linhagem LN18, para todas as concentrações de etoposídeo testadas ($p < 0,05$). Em 120 horas após tratamento, observa-se que a viabilidade das duas linhagens, nas diferentes concentrações de etoposídeo, foram semelhantes, não resultando em diferenças estatisticamente significativas (**Figura 7.C**). Em geral, as linhagens responderam de forma semelhante ao tratamento com etoposídeo, mas diferiram quanto ao tempo em que levaram para manifestar as consequências relativas ao tratamento em termos de morte celular. De maneira interessante, após 72 horas de tratamento, as células LN18 apresentaram taxas de morte significativamente maiores que as células T98.

Figura 7: Proliferação celular relativa (*Cell Proliferation Xit II (XTT)*) em células LN18 e T98G tratadas com etoposídeo 25, 50, 75 e 100 μM, avaliada 24, 72 e 120 horas após o tratamento. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média ± desvio padrão. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

4.2 Cinética do ciclo celular em células tratadas com etoposídeo

Para a detecção de células em diferentes estágios do ciclo celular foi utilizada uma solução de iodeto de propídeo, sendo possível distinguir células em G0/G1, S e G2

pela quantidade de DNA presente na célula. As linhagens T98G e LN18 foram tratadas com 50 e 75 μM por duas horas, sendo que o grupo controle foi composto por células sem tratamento com a droga, analisadas no tempo de 24, 48 e 72 horas (**Figura 8**).

Nos experimentos realizados 24 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μM), observou-se um bloqueio estatisticamente significativo das células LN18 e T98G ($p > 0,01$) na fase G2 do ciclo celular, quando comparadas ao controle (**Figura 8.A**).

Após 48 horas do tratamento com etoposídeo (**Figura 8.B**), a linhagem LN18 apresentou diminuição de células em G1, estatisticamente significativa ($p < 0,001$), nas duas concentrações da droga (50 e 75 μM), quando comparadas ao controle. Em comparação, a linhagem T98G também apresentou diminuição de células em G1 e, adicionalmente, apresentou aumento da taxa de células em G2 ($p < 0,001$), na concentração de 50 μM .

Os efeitos do tratamento com etoposídeo no sentido de induzir um acúmulo de células em G2 foram novamente observados após 72 h para ambas as linhagens, nas duas concentrações testadas ($p < 0,05$), quando comparadas ao controle. Adicionalmente, um elevação na população de células nas fase S também foram observadas para ambas as linhagens, sob os mesmos tratamentos ($p < 0,05$) (**Figura 8.C**). Apesar, das duas linhagens apresentarem bloqueio em S e G2, pode-se verificar que a linhagem LN18 apresenta maior porcentagem de células em S (até 36,3%) e G2 (até 45,9%) em comparação com a T98G (até 17,7% em S e 21,6% em G2).

Com base nos resultados encontrados nos diferentes tempos, é possível concluir que: a linhagem LN18 responde ao tratamento com etoposídeo com um maior bloqueio (G2) logo nas primeiras 24 h do tratamento, bem como mais tardiamente (120 h), ao passo que a linhagem T98G também apresentou bloqueio em S e G2, porém com menos intensidade em 24 h e maior no tempo de 72 h.

Figura 8: Distribuição das células T98G e LN18, em diferentes fases do ciclo celular, quando submetidas ao tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M). 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 $\pm$ desvio padrão (DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. O asterisco com a chave representa a comparação entre os grupos indicados.

Tabela 2: Porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular em linhagens T98G e LN18 submetidas ao tratamento com 50 e 75 μ M de etoposídeo. 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP)

		Distribuição de células nas fases do ciclo celular (%) (± Desvio Padrão)								
		Tempos de coleta (horas)								
		24			48			72		
		Fases do ciclo celular								
Linhagens	Tratamento	G1	S	G2	G1	S	G2	G1	S	G2
LN18	0 μM	54,5±4,7	18,3±5,4	26,6±3,5	61,6±0,7	13,3±2,4	24,3±2,2	60,6±8,0	19,4±5,5	19,9±4,1
	50 μM	33,2±4,1	18,4±2,6	47,9±4,7	55,8±4,9	14,3±1,2	19,2±7,5	36,3±2,8	27,2±3,5	36,3±3,6
	75 μM	26,6±0,2	23,0±6,3	49,8±9,3	46,4±2,5	13,5±0,7	27,5±3,9	28,1±6	36,3±2,8	45,9±7,4
T98G	0 μM	64,5±1,2	15,2±0,8	15,08±1,1	58,2±3,2	16,0±2,4	18,1±1,2	78,2±1,1	9,2±1,2	12,4±0,4
	50 μM	44,2±4,1	17,3±1,2	32,7±3,8	52,8±0,8	18,6±0,7	25,2±0,3	70,6±2,1	17,7±1,0	18,1±1,2
	75 μM	38,7±3,6	21,3±4,6	34,5±5,1	42,3±2,2	19,3±2,5	22,3±2,5	65,6±1,2	12,6±0,7	21,6±0,6

4.3 Indução de danos no DNA por imunofluorescência da proteína γ -H2AX

No presente trabalho avaliou-se a porcentagem de células positivas para a proteína γ -H2AX, a qual participa na resposta ao dano induzido no DNA (DSBs). A quantidade dessa proteína na célula foi avaliada logo após o tratamento com o etoposídeo (50 e 75 μ M) (tempo referido como 0 hora), utilizado como um indutor de danos, e após 24 horas. Duas diferentes análises estatísticas foram feitas: em uma primeira análise, a porcentagem de células positivas para γ -H2AX de cada linhagem foi estimada, comparando-se com as intensidades dos seus respectivos controles; e em uma segunda análise, a fim de comparar a porcentagem de células positivas para γ -H2AX entre as linhagens relativa a uma mesma concentração da droga, os valores do tratamento foram normalizados com seus respectivos controles.

Após o tratamento com as duas concentrações de etoposídeo (50 e 75 μ M), no tempo inicial (zero hora), tanto a linhagem LN18 quanto a T98G, comparada com o seu grupo controle, apresentaram aumento na quantidade de células positivas para a proteína γ -H2AX, com porcentagens em torno de 1,5 a 2,0 vezes maiores que seus respectivos controles (**Figura 9.A**). Mas quando comparadas as duas linhagens, em relação ao efeito da indução de γ -H2AX sob o tratamento com a mesma concentração da droga (após normalização), não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de γ -H2AX induzida pelo tratamento.

Passados 24 horas do tratamento, a elevação nas porcentagens de células que expressaram γ -H2AX foi ainda maior (4,0 a 6,5 vezes, respectivamente) para ambas as linhagens (LN18 e T98G) nos tratamentos empregados (**Figura 9.B**). Quando foram comparadas as duas linhagens em relação a uma mesma concentração da droga, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na quantidade da proteína γ -H2AX induzida pelo tratamento apenas na concentração de 75 μ M (comparação representada pelo colchete no gráfico), em que a LN18 mostrou um aumento de 1,3 na quantidade de células com γ -H2AX, relativamente à T98G (**Figura 9.B**).

Os resultados obtidos mostraram que as duas linhagens, de uma maneira geral, respondem quanto à indução da proteína γ -H2AX, de forma semelhante logo após do tratamento (0h). Por outro lado, na maior concentração de etoposídeo (75 μ M), a linhagem LN18 mostrou uma persistência maior de positividade para γ -H2AX em relação à células T98G.

Figura 9: Células positivas para a proteína γ -H2AX, relativas ao controle, em linhagens celulares LN18 e T98G tratadas com etoposídeo 50 e 75 μ M e avaliadas logo após o tratamento com etoposídeo, 0 horas, e 24 após o tratamento. Os valores dos grupos tratados foram normalizados com os valores dos grupos controles respectivos. 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.

Tabela 3: Porcentagem de células positivas para a proteína γ -H2AX em linhagens celulares LN18 e T98G tratadas com etoposídeo 50 e 75 μ M e avaliadas logo após o tratamento com etoposídeo, 0 horas, e 24 após o tratamento. Os valores dos grupos tratados foram normalizados com os valores dos grupos controles respectivos. 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

Linhagens	Tratamentos	γ -H2AX positivas (relativa) $\pm$ Desvio Padrão (DP)	
		Tempo (horas)	
		0	24
LN18	0 μ M	1,0 $\pm$ 9,2	1,0 $\pm$ 0,4
	50 μ M	2,0 $\pm$ 0,4	6,7 $\pm$ 0,7
	75 μ M	2,1 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,4
T98G	0 μ M	1,0 $\pm$ 2,5	1,0 $\pm$ 1,9
	50 μ M	1,5 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,6
	75 μ M	1,6 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,8

4.4 Indução de morte celular por apoptose e necrose

A avaliação da indução de apoptose e necrose para as linhagens T98G e LN18 foi realizada nas células tratadas com etoposídeo e colhidas nos tempos de 24, 72 e 120 horas após o tratamento. Foram utilizados os mesmos tempos de análise do ensaio de proliferação celular, a fim de obter informações sobre os processos de morte celular que estavam sendo ativados nas células, os quais justificariam as reduções na proliferação observadas.

A linhagem LN18, no tempo de 24 horas, apresentou um aumento significativo ($p < 0,01$) no número de células apoptóticas somente para a concentração de 75 μ M

(18,5%) (**Figura 10.A e Tabela 4**). Após 72 horas do tratamento com a droga nas concentrações de 50 e 75 μM observou-se uma elevação da população de células apoptóticas (28,7 e 33,4% respectivamente) quando comparada ao controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). As taxas de apoptose continuaram elevadas após 120 horas do tratamento com etoposídeo, mostrando porcentagens de 29,7 e 42,3% nas concentrações de 50 e 75 μM ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (**Figura 10.C**).

No tempo de 24 horas, a linhagem T98G mostrou um aumento significativo no número de células apoptóticas para a concentração de 50 (13,8%; $p < 0,001$) e 75 μM (16,1%; $p < 0,01$) (**Figura 10.A e Tabela 4**). Após 72 horas do tratamento com etoposídeo, a linhagem mostrou aumento de 17,4% (50 μM , $p < 0,01$ e 75 μM , $p < 0,001$) para os tratamentos com relação à porcentagem de células apoptóticas comparada ao controle. Nas análises realizadas 120 horas após o tratamento com a droga, as células T98G apresentaram aumento significativo ($p < 0,01$) no número de células apoptóticas na concentração de 50 e 75 μM (**Figura 9.C**).

Com relação à indução de necrose avaliada em ambas as linhagens, embora diferenças estatisticamente significativas fossem encontradas, as mesmas não contribuíram substancialmente para eliminação das células por meio desse tipo de morte, uma vez que as porcentagens não ultrapassaram 4,4%, como observado na linhagem LN18 tratada com 75 μM (120 h) (**Figura 11 e Tabela 5**).

De modo geral, as duas linhagens apresentaram indução de morte por apoptose e necrose após o tratamento com etoposídeo, mas em ambas, a porcentagem de células apoptóticas foi muito maior do que as células necróticas. Portanto, ao serem comparadas a indução de apoptose e necrose entre as duas linhagens, pode-se constatar que a linhagem LN18 apresentou uma indução maior de apoptose e necrose, após o tratamento com etoposídeo, do que a T98G. Assim, os dados da quantificação de células necrótica e apoptóticas e os de proliferação celular demonstram que a linhagem LN18 se mostrou mais sensível aos danos causados no DNA pelo etoposídeo, relativamente à T98G; por essa razão, é provável que as células LN18 entraram em apoptose e necrose em maior quantidade do que as células T98G.

Figura 10: Porcentagem de células apoptóticas ($\pm$ Desvio Padrão) em células LN18 e T98G, avaliadas em 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M). Os dados foram obtidos utilizando o sistema *Guava Easy Cyte 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Tabela 4: Porcentagem de células apoptóticas ($\pm$ Desvio Padrão) em células LN18 e T98G, avaliadas em 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M). 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

		Células Apoptóticas (%) $\pm$ Desvio Padrão (DP)		
		Tempo (horas)		
Linhagens	Tratamento	24	72	120
LN18	0 μ M	13 $\pm$ 0,0	11,7 $\pm$ 1,5	12,0 $\pm$ 0,6
	50 μ M	15,2 $\pm$ 1,3	28,7 $\pm$ 5,1	29,7 $\pm$ 0,7
	75 μ M	18,5 $\pm$ 2,0	33,4 $\pm$ 0,7	42,3 $\pm$ 2,8
T98G	0 μ M	5,3 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,1	9,9 $\pm$ 0,6
	50 μ M	13,8 $\pm$ 1,9	17,4 $\pm$ 0,4	27,1 $\pm$ 0,7
	75 μ M	16,1 $\pm$ 4,3	18,6 $\pm$ 0,4	34,7 $\pm$ 2,8

Figura 11: Porcentagem de células necróticas ($\pm$ Desvio Padrão) nas linhagens LN18 e T98G, avaliadas em 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M). Os dados foram obtidos utilizando pelo 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Tabela 5: Porcentagem de células necróticas ($\pm$ Desvio Padrão) em células LN18 e T98G, avaliadas em 24, 72 e 120 horas após o tratamento com etoposídeo (50 e 75 μ M). 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 $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

		Células Necróticas (%) $\pm$ Desvio Padrão (DP)		
		Tempo (horas)		
Linhagens	Tratamento	24	72	120
LN18	0 μ M	6,7 $\pm$ 0,5	6,4 $\pm$ 0,6	11,9 $\pm$ 1,1
	50 μ M	7,2 $\pm$ 1,4	14,0 $\pm$ 1,0	21,8 $\pm$ 0,1
	75 μ M	8,2 $\pm$ 1,7	14,7 $\pm$ 0,3	28,0 $\pm$ 0,8
T98G	0 μ M	2,9 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,2
	50 μ M	6,9 $\pm$ 1,3	11,6 $\pm$ 0,8	19,8 $\pm$ 0,7
	75 μ M	8,4 $\pm$ 1,1	15,4 $\pm$ 0,6	28,8 $\pm$ 2,2

4.6 Expressão das proteínas PTEN, RAD51 e parálogas

As linhagens LN18 e T98G são portadoras das mesmas alterações nos genes que estão frequentemente alterados em GBM, as quais incluem mutação *missense* em *TP53*, deleção na região do gene *p14ARF* e *p16* (Ishii et al., 1999), além da proficiência para a enzima MGMT (Hermisson, 2006). Entretanto, as mesmas diferem quanto ao *status* de *PTEN*, razão pela qual foram consideradas as mais adequadas para testar a hipótese deste trabalho, que era investigar se o *status* de *PTEN* interfere na expressão de RAD51 e suas parálogas.

A linhagem LN18 apresenta *PTEN* selvagem e proteína funcional, enquanto T98G apresenta mutação *missense* (códon 42) em *PTEN*; essa região envolve a atividade de fosfatase e tensina homóloga, sendo que alteração nessa região resulta em uma proteína com redução dessa atividade (Ishii et al., 1999). Para os estudos de expressão proteica foi também adicionalmente testada a linhagem U87MG, pois a mesma não expressa nenhuma forma da proteína PTEN, uma vez que essas células são portadoras de várias mutações na sua região codificadora. Não foi utilizada a linhagem U87MG nos ensaios celulares descritos anteriormente, pois essa linhagem, a qual é proficiente para *TP53*, mostrou-se muito sensível ao tratamento com etoposídeo.

Primeiramente, foi avaliada a expressão proteica de PTEN nas linhagens LN18, T98G e U87MG. A proteína PTEN foi detectada nas linhagens LN18 e T98G, mas foi ausente nas células U87MG (**Figura 12**), conforme relatado na literatura.

A via PI3K/AKT, a qual é regulada por PTEN, é responsável por inibir PIP3, que, por sua vez, quando está ativo, ativa AKT pela sua fosforilação; portanto, se PTEN não for funcional, ou tiver redução de função da sua proteína, grande parte de PIP3 não será inibido, e a célula terá maior quantidade de AKT fosforilado (Song, Salmena e Pandolfi, 2014; De Araujo, 2016). Pela análise foi possível notar que a linhagem LN18 apresenta baixa quantidade de AKT fosforilado, motivado pela presença de PTEN. Entretanto, mesmo PTEN presente na linhagem T98G, na qual houve uma expressão maior de AKT

fosforilado em relação à LN18, resulta da redução da sua atividade de fosfatase. Por outro lado, a linhagem U87MG mostrou elevada expressão de AKT fosforilado, possivelmente devido à ausência total de PTEN (**Figura 12**). Verificou-se que, quanto aos níveis de AKT não fosforilado, não houve variação dependente da linhagem, e, portanto, os níveis de AKT não fosforilados são independentes do *status* de *PTEN*, como esperado. Esses resultados confirmam os perfis de expressão esperados para essas linhagens.

Figura 12: Expressão das proteínas PTEN (~54kDa), AKT (~57kDa), AKT fosforilado (~60kDa) e β-actina (~40kDa) em células HeLa, T98G, LN18 e U87MG, analisada por *Western Blot* e quantificadas pelo programa *Gel Pro Analyzer 4*.

Para avaliar a expressão proteica de RAD51 e parálogas, foram comparadas a linhagem LN18 (proficiente para PTEN com a T98G (com *PTEN* mutado), que tem a proteína com redução de função, além da linhagem U87MG com uma mutação em *PTEN*, que impede a tradução da proteína. Para avaliar a expressão de RAD51 e parálogas, foram realizados tratamentos das células (etoposídeo, 75 μM por 2 horas, seguido de remoção da droga) para a indução de DSBs no DNA. De acordo com a hipótese proposta neste trabalho, seria esperado que a linhagem LN18 apresentasse maiores níveis de RAD51 e parálogas, comparativamente à T98G e U87MG.

Buscando uma expressão diferencial de RAD51 e suas parálogas em linhagens com proficiências diferentes para *PTEN*, foi proposto avaliar as linhagens: LN18, selvagem para *PTEN* e consequentemente uma proteína funcional; T98G, com mutação em *PTEN*, a qual confere redução na função da proteína; e U87MG, apresentando mutações em *PTEN*, que impede a tradução da proteína. Assim, a expressão de RAD51 e parálogas foi analisada após o tratamento com etoposídeo (75 μ M) em pulsos de duas horas (com remoção da droga após esse tempo), sendo avaliadas nos tempos 0, 6 e 24 horas a partir da remoção da droga. Na presença de danos (possivelmente DSBs) induzidos pelo etoposídeo, RAD51 aumentou seus níveis de expressão 6 horas após o tratamento, sendo que a mesma continuou aumentada, porém em menores níveis após 24 horas, em relação ao controle, indicando que as DSBs ainda permaneceram em reparo pela RAD51 (**Figura 13 e Figura 14**). Já nas linhagens T98G e U87MG não houve aumento da expressão da proteína após o tratamento, em nenhum dos tempos analisados, sugerindo que RAD51 não deve ter sido recrutada para o reparo de DSBs nessas células.

Figura 13: Expressão das proteínas RAD51 (~37kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG, nos tempos de 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com

etoposídeo (75 μ M). Os sinais de expressão foram quantificados pelo programa *Gel Pro Analyzer 4*.

Figura 14: Níveis de expressão da proteína RAD51 (~37kDa) analisada por *Western Blot* em células (A) LN18, (B) T98G e (C) U87MG, quantificadas após 0, 6 e 24 horas do tratamento com etoposídeo (75 μ M). Os valores de expressão de RAD51 foram normalizados com a proteína β -tubulina utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4*. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

Foi também analisada a expressão de duas proteínas parálogas de RAD51: RAD51C e RAD51B, sendo observado um padrão de expressão semelhante ao que foi observado para RAD51 nas linhagens estudadas. A linhagem LN18 mostrou aumento nos níveis da expressão de RAD51C e RAD51B, nos tempos de 6 e 24 horas depois do tratamento com etoposídeo (75 μ M), quando comparada ao controle (**Figura 15 e Figura 17**). Entretanto, assim como ocorreu para RAD51 nas linhagens T98G e U87MG, as proteínas parálogas RAD51C e RAD51B não exibiram aumento expressivo após o tratamento com o etoposídeo (**Figura 16 e Figura 18**), sugerindo novamente uma possível relação do *status* de *PTEN* com a elevação da expressão de RAD51 e suas parálogas em resposta a danos no DNA induzidos pela droga.

Figura 15: Expressão das proteínas RAD51C (~42kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG, nos tempos 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μ M); as bandas foram quantificadas pelo programa *Gel Pro Analyzer 4*.

Figura 16: Níveis da expressão da proteína RAD51C (~37kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG. A análise das proteínas foi feita 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μM). Os valores foram normalizados com a proteína β-tubulina para as linhagens (A) LN18, (B) T98G e (C) U87MG utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4*. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, expressos como média ± desvio padrão (±DP).

Figura 17: Expressão das proteínas RAD51B (~42kDa) e β-tubulina (~55kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG. A análise das proteínas foi feita 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μM).

Figura 18: Níveis da expressão da proteína RAD51B (~42kDa) analisada por *Western Blot* em células T98G, LN18 e U87MG. A análise das proteínas foi feita 0, 6 e 24 horas após o tratamento das células com etoposídeo (75 μM). Os valores foram normalizados com a proteína β-tubulina para as linhagens (A) LN18, (B) T98G e (C) U87MG utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4*. Os valores são representativos de dois experimentos independentes, expressos como média ± desvio padrão (±DP)

A linhagem LN18 (*PTEN* selvagem) apresenta proteína funcional, enquanto T98G apresenta *PTEN* mutado e proteína com redução de função, enquanto que U87MG não apresenta expressão da proteína PTEN. A expressão da proteína RAD51 e de suas parálogas (RAD51C e RAD51B), de maneira geral, mostra uma tendência em aumento dos níveis de expressão destas proteínas, nas células LN18 tratadas com etoposídeo e consequentemente, apresentaram danos por DSBs; mas não foi observada essa mesma tendência de aumento dos níveis de RAD51 e parálogas nas células T98G e U87MG tratadas com etoposídeo. Neste trabalho, testamos a hipótese de que a expressão de PTEN nas células interfere na expressão de RAD51 e parálogas, com base em dados publicados na literatura científica. Os resultados obtidos sobre a expressão proteica de RAD51 e parálogas corroboram a hipótese do presente trabalho, uma vez que a linhagem que apresenta *PTEN* selvagem, com expressão proteica normal, foi a única que apresentou aumento nos níveis de RAD51 e suas parálogas sob a condição de indução de DSBs promovida pelo etoposídeo. Por outro lado, a linhagem T98G (a qual expressa proteína PTEN com função reduzida) e U87MG (deficiente para a proteína PTEN) não mostraram relação entre a expressão de RAD51 e parálogas com a indução de DSBs e, provavelmente, com o mecanismo de reparo por HR. Tais resultados indicam que a expressão de PTEN nas células parece estar, de alguma maneira, relacionada à expressão de RAD51 e parálogas quando há indução de DSBs.

4.7 Consequências do silenciamento de *PTEN* na linhagem LN18

Para elucidar se a expressão de PTEN interfere na expressão de RAD51 e parálogas, realizou-se o silenciamento de *PTEN* na linhagem LN18 (*PTEN* selvagem) pelo método de RNA interferente (siRNA), visando impedir a tradução da proteína, uma vez que essa linhagem teve níveis de RAD51 e parálogas aumentados devido ao tratamento com etoposídeo. Inicialmente, realizou-se uma série de experimentos para a padronização da concentração de siRNA do gene *PTEN*, e também, da sequência *scrambled* (SCR- sequência aleatória) para a linhagem LN18. As concentrações de siRNA testadas foram 25, 50 e 100 nM; esta última foi a concentração que mostrou uma

maior inibição da proteína PTEN. Assim, para siRNA 100 nM, analisou-se a inibição do siRNA no tempo de 24, 48 e 72 horas após a transfecção. A confirmação da redução da expressão proteica de PTEN foi realizada por *Western Blot*, e como controle endógeno, utilizou-se a expressão da proteína constitutiva β -actina.

A redução da expressão da proteína *PTEN*, apresentada pela linhagem LN18, foi observada em todos os tempos avaliados após a transfecção, resultando em reduções de 27% (24h); 50,5% (48h) e 69,9% (72h) (**Figura 19**).

Figura 19: Expressão das proteínas PTEN (~54kDa) analisada por *Western Blot* em células LN18 transfectadas com 100 nM do siRNA para o gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção. A quantificação foi analisada usando *Gel Pro Analyser 4* e normalizada através da expressão de β -actina (~ 45kDa).

Figura 20: Níveis da expressão da proteína PTEN após 24, 48 e 72 horas do silenciamento com 100 nM de siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas

após a transfecção. Os valores foram normalizados com a proteína β -actina para a linhagem LN18.

Figura 21: Porcentagens de redução da expressão proteica de PTEN após 24, 48 e 72 horas do silenciamento com 100 nM de siRNA-*PTEN* para a linhagem LN18. Os valores foram normalizados com base na expressão da β -actina

Nas células LN18 apenas silenciadas para *PTEN* também foi avaliada a expressão de RAD51 e o parálogo (RAD51C). No tempo de 24 horas após a transfecção, observou-se uma sutil diminuição nos níveis de expressão de RAD51 na células tratadas com siRNA em comparação ao controle. Após 48 horas, não houve diminuição de RAD51 nas células silenciadas em comparação ao grupo controle. Contudo, no tempo de 72 horas, no qual houve maior redução da expressão de PTEN (69,9%), a expressão de RAD51 mostrou-se reduzida (no tempo de 72 horas) quando comparada ao controle (**Figura 22**).

Figura 22: Expressão das proteínas RAD51 (~37kDa) e β -actina (~45kDa) analisada por *Western Blot* em células LN18 transfectadas com 100 nM do siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção.

Figura 23: Níveis da expressão da proteína RAD51 após 24, 48 e 72 horas do silenciamento com 100 nM de siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção. Os valores foram normalizados com a proteína a β -actina para a linhagem LN18.

A expressão do parálogo RAD51C também seguiu a mesma tendência observada para a expressão de RAD51. No tempo de 24 horas também notou-se uma sutil diminuição nos níveis de expressão de RAD51C na células silenciadas, se comparadas ao controle. No tempo de 48 horas, assim como ocorreu para RAD51 não houve diminuição de RAD51C. De forma similar ao RAD51, no tempo de 72 horas, a expressão de RAD51C mostrou-se reduzida quando comparada ao controle (**Figura 24**).

Figura 24: Expressão das proteínas RAD51C (~42kDa) e β -actina (~45kDa) analisada por *Western Blot* em células LN18 transfectadas com 100 nM do siRNA do gene *PTEN* e a sequência *scrambled*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a transfecção.

Figura 25: Níveis da expressão da proteína RAD51C após 24, 48 e 72 horas do silenciamento das células LN18 com 100 nM de siRNA-*PTEN*. Os valores foram normalizados com a proteína β -actina.

As células LN18 silenciadas para o gene *PTEN* e avaliadas no tempo de 72 horas, no qual houve a maior redução de *PTEN*, mostraram níveis de expressão de RAD51 e parálogo (RAD51C) levemente reduzidos. Esses resultados, juntamente com os resultados de expressão proteica observados para as células LN18, T98G e U87MG tratadas com etoposídeo indicam que, em resposta às lesões causadas por essa droga, a expressão de *PTEN* está de alguma maneira associada com a expressão de RAD51 e parálogas, de forma que os níveis basais dessas proteínas encontram-se já reduzidos nas células pelo simples fato destas não apresentarem *PTEN* proficiente. Estes resultados deverão ser confirmados em experimentos adicionais, pois até então, só foi feito um experimento.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor com maior grau de malignidade do sistema nervoso central (Ohgaki Kleihues, 2007), sendo constituído por uma população de células heterogêneas, geneticamente instáveis, com elevada capacidade de se infiltrar nos tecidos e resistentes à quimioterapia; tais células abrigam uma série de mutações que fornecem a elas vantagens que promovem a proliferação, a sobrevivência e o crescimento em um ambiente hostil e de hipóxia (Ramirez et al., 2013). Entre essas alterações destacam-se as mutações no gene *PTEN*, as quais são encontradas em uma frequência de 40-60% em GBM (Ohgaki et al., 2004) e resultam na ativação constitutiva da via PI3K/AKT (via de sobrevivência e proliferação) (Su et al., 2016). O *PTEN* é classificado como um supressor tumoral, pelo seu papel em vários processos celulares associados com a polaridade celular, migração, metabolismo, crescimento, progressão do ciclo celular e renovação das células (Song, Salmena e Pandolfi, 2014; Naguib et al., 2015).

Assim, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas em alterações no gene *PTEN* é promissor no sentido de aumentar a sensibilidade das células a drogas antitumorais. Em tumores de mama, células com alterações nos genes *BRCA1/2* são sensibilizadas à quimio/radioterapia associadas a inibidores PARP (Schayek et al., 2009). De forma semelhante, em linhagens de glioma, foi demonstrado que o bloqueio de componentes do HR (*RAD51* ou *BRCA2*) sensibiliza essas células a agentes alquilantes sob tratamento com inibidor de PARP (Quiros et al., 2011).

A proteína chave para que ocorra o reparo por HR é a *RAD51* e trabalhos controversos na literatura tem ressaltado o papel de *PTEN* na regulação de *RAD51* (Puc et al., em 2005; Shen et al., 2007; McEllin et al., 2010), o qual tem sido demonstrado ser dependente de tipos celulares específicos. Assim, faz-se necessário compreender a real contribuição de *PTEN* no reparo HR, especificamente no contexto dos GBM e, por essa razão, neste trabalho, com base nas informações da literatura acima mencionadas,

a proposta foi testar se o status de *PTEN* interfere nos níveis de expressão de RAD51 e parálogas em linhagens de GBM submetidas a tratamento com a droga etoposídeo.

5.1 Redução da função de PTEN promove a sobrevivência após tratamento com etoposídeo

Pelos análises de proliferação (XTT) e análise de células apoptóticas e necrótica, encontramos que as linhagens T98G (gene *PTEN* mutado e redução da função proteica) e LN18 (gene *PTEN* selvagem e proteína funcional) foram sensibilizadas igualmente ao tratamento com etoposídeo, droga utilizada como indutor de DSBs na molécula de DNA. Contudo, a linhagem T98G foi inicialmente mais resistente relativamente à linhagem LN18, a qual mostrou taxas de proliferação reduzidas a partir de 72h do tratamento. Para essa linhagem (LN18) observou-se uma maior indução de morte apoptótica nesse tempo em relação à T98G, mas sem a indução de morte necrótica, justificando assim as reduções nas taxas de proliferação. Entretanto, após 120 h do tratamento com a droga, as taxas de proliferação se equipararam com indução de apoptose em ambas as linhagens, porém pouco maior na linhagem LN18. Vale ressaltar que, embora a linhagem T98G seja mutante para *PTEN*, essa alteração confere apenas redução da atividade e não bloqueio total da proteína, como observado nesse trabalho, na avaliação de AKT fosforilado. Dessa forma, a ativação constitutiva da via PI3K/AKT nessa linhagem poderia ter acarretado efeitos mais acentuados, o que levaria a uma distinção mais evidente nas respostas das linhagens ao tratamento com a droga.

Araújo et al. (2015) utilizando linhagens celulares de câncer de cólon com superexpressão de *PTEN*, constataram que, após tratadas com doxíciclina ou lítio, as mesmas apresentaram maior redução na proliferação celular em relação às células sem expressão aumentada de *PTEN*. O trabalho demonstrou ainda que mesmo sem o tratamento com a doxíciclina, as taxas de proliferação foram menores nas células de câncer de cólon que superexpressam *PTEN*. Chen et al. (2015) comprovaram que as

células de carcinoma renal com *PTEN* silenciado apresentaram maiores taxas de proliferação e menor indução de apoptose, em comparação com as células com *PTEN* funcional, utilizando também o etoposídeo como indutor de danos no DNA. Os resultados do presente trabalho, aliados aos obtidos por Chen et al. (2015) e Araújo et al. (2015) mostraram que a deficiência de *PTEN* estimula a proliferação e torna as células resistentes à indução de morte por apoptose.

Sabe-se que o grau de funcionalidade da proteína PTEN interfere diretamente nas vias de proliferação e sobrevivência celular, uma vez que PTEN inibe PIP3, que é a molécula principal na fosforilação de AKT (Shearn et al., 2011). Assim, *PTEN* atua como o principal regulador negativo da via PI3K/AKT (Bononi et al., 2015). Possivelmente, as diferenças observadas entre as taxas de proliferação e morte por apoptose e necrose apresentadas pelas linhagens ocorreram pela regulação distinta da via PI3K/AKT. A linhagem T98G apresenta a via PI3K/AKT constitutivamente ativada (fosforilação de AKT), causada pela reduzida atividade de fosfatase da proteína PTEN. Essas células possivelmente toleram os danos no DNA (decorrente do tratamento com etoposídeo), ativando moléculas-alvo responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular e, dessa maneira, resistindo por um tempo mais prolongado ao tratamento.

É relatado que a perda de *PTEN* e, consequentemente, a ativação constitutiva da AKT, leva à fosforilação de alvos moleculares, os quais incluem a inibição de proteínas pró-apoptóticas, bem como ativação de fatores de transcrição NFkB e CREB, levando à transcrição de genes anti-apoptóticos (Boosani e Agrawal, 2013; Pérez-Ramírez et al., 2015). Esse fato pode ter influenciado as respostas aos tratamentos observadas nessas células. Em comparação, linhagem LN18, por ter a proteína PTEN funcional e consequentemente a via PI3K/AKT regulada, a apoptose pode ter sido induzida em resposta à presença de danos no DNA de forma mais intensa. Possivelmente, a ativação de AKT pode desempenhar um papel crucial nas respostas dessas células aos danos induzidos no DNA.

5.2 PTEN promove bloqueio em S e G2 do ciclo celular em resposta ao etoposídeo.

A desregulação do ciclo celular está intimamente correlacionada com o comportamento biológico agressivo de tumores malignos e, portanto, desempenha um papel crucial na progressão do câncer (Zhang et al., 2015). Nesse contexto, sendo PTEN um regulador chave da progressão do ciclo celular, pelo controle que exerce na via PI3K/AKT (Atif, Yousuf e Stein, 2015), no presente trabalho, foi testada a hipótese de que as diferenças no *status* de *PTEN* apresentadas pelas linhagens estudadas possam interferir na progressão do ciclo celular após o tratamento com uma droga (etoposídeo) indutora de danos no DNA.

No presente trabalho, a análise da cinética do ciclo celular realizada para as duas linhagens mostrou aumento de células na fase G2, logo nos tempos iniciais (24h) do tratamento, porém esse aumento foi mais intenso na linhagem LN18. Esta mesma linhagem, após 72h, mostrou um bloqueio ainda mais acentuado em G2, bem como na fase S, o que não ocorreu para a linhagem T98G.

O bloqueio em G2 causado pelo tratamento com etoposídeo, o qual foi observado tanto na linhagem LN18 como na T98G (em menor extensão), provavelmente ocorreu devido à formação quebras no DNA, principalmente DSBs. A formação de DSBs desencadeia a ativação de ATM e ATR e da sua quinase *downstream* CHK2 (Montecucco, Zanetta e Biamonti, 2015). CHK2 é responsável pelo *checkpoint* em G2 e, na presença de quebras no DNA, há o bloqueio dessas células em G2, impedindo a progressão das células para a fase M (Kwon et al., 2015).

Outros autores também encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Mukherjee e Karmakar (2013) mostraram em células embrionárias humanas silenciadas para *PTEN* quantidades menores de células em G2 do que as células proficientes para *PTEN*, avaliadas após 24 h do tratamento com etoposídeo. Chiang et al. (2015) analisaram células de câncer de mama com *PTEN* silenciado e verificaram que nestas, houve uma recuperação do bloqueio em G2 mais rapidamente que as células com *PTEN* funcional. Esses dois estudos mostraram que na presença de danos induzidos

no DNA, as células sem a expressão regular de *PTEN*, apesar de sofrerem bloqueio no ciclo celular em G2, são capazes de sair desse bloqueio mais rapidamente do que as células com *PTEN* normalmente expresso, corroborando os resultados aqui apresentados.

A atividade de AKT e a fosforilação de seus substratos é um dos pontos de verificação do ciclo, o qual é governado pela quinase CHK1 (King et al., 2004; Weng et al., 1999). CHK1 não fosforilado é responsável pelo bloqueio das células na fase S quando ocorre danos no DNA, impedindo assim que as células passem para G2, até que o reparo ocorra. AKT fosforilada impede o bloqueio de CHK1 durante a fase S (Hunt et al., 2012), o que provavelmente pode ter ocorrido na linhagem T98G, uma vez que não foi observado bloqueio na fase S, como na linhagem LN18.

O etoposídeo, ao inibir a topoisomerase II nas células, leva à formação de quebras simples e duplas no DNA. É muito provável que o bloqueio das células LN18 na fase S do ciclo celular tenha resultado de DSBs geradas pelo etoposídeo, as quais são reparadas pelo reparo HR durante o bloqueio nessa fase (Ceccaldi, Rondinelli e D'Andrea, 2015). Nossos resultados de expressão proteica revelaram que T98G apresenta maiores níveis de AKT fosforilada, em comparação com a LN18, sugerindo que na linhagem T98G, AKT fosforilada possa inibir a ação de CHK1 no controle do ciclo, de forma a promover a passagem pela fase S, mesmo na presença de danos, confirmado pela detecção de H2AX fosforilada (γ -H2AX), a qual também foi avaliada no presente estudo.

Quebras de fita simples (SSBs) e DSBs no DNA são detectadas por complexos de proteínas especializados em detectar essas lesões e recrutam duas proteínas quinases, ATR e ATM (sensores de danos), resultando na fosforilação da histona H2AX em sítios específicos da mesma, a qual é denominada γ -H2AX; esta por sua vez, recruta o complexo ATM em um ciclo de *feedback* positivo, aumentando assim a atividade de ATM local, resultando na propagação de γ -H2AX ao longo da cromatina com a formação do foci de γ -H2AX. Portanto, os níveis dessa proteína estão positivamente correlacionados com a quantidade de quebras no DNA (Oliveira-Costa et al., 2014). Em seguida, γ -H2AX recruta proteínas de reparo, especialmente BRCA1 e RAD51, a fim

de ativar o reparo por HR para a resolução das quebras duplas causadas no DNA (Short et al., 2011; Suwaki, Klare e Tarsounas, 2011).

Assim, foram analisadas células com diferentes *status* de *PTEN* visando verificar se houve ou não a indução diferencial de γ -H2AX frente ao dano provocado pelo etoposídeo nas linhagens de GBM. Ambas as linhagens exibiram respostas semelhantes quanto à presença de γ -H2AX logo após o tratamento. Porém, em 24 horas, a linhagem LN18 mostrou uma maior indução da proteína γ -H2AX nas duas concentrações do etoposídeo (50 e 75 μ M) relativamente à T98G. A análise de γ -H2AX no tempo de 0 hora revelou que as duas linhagens responderam de maneira semelhante à indução de DSBs. Entretanto, a persistência das DSBs na linhagem LN18 (não observada na T98G) ao longo do ciclo celular sugerem que as células reparam tais quebras de maneiras diferentes.

Apesar de não existirem relatos sobre uma possível relação entre PTEN e H2AX, estudos revelam que a fosforilação de H2AX é crucial para a formação de *foci* de RAD51 na região de danos de DSBs em diferentes tipos celulares (Bassing et al., 2002; Sonoda et al., 2007; Chanoux et al., 2009; Short et al., 2011). Sonoda et al. (2007) e Bassing et al. (2002) demonstraram que células de roedores e galináceos, respectivamente, as quais eram deficientes para H2AX mostraram uma menor formação de *foci* de RAD51, na presença de DSBs. Xie et al. (2010) demonstraram, utilizando células de roedores, que o reparo por HR era menos eficiente nas células H2AX^{-/-}, sugerindo que a fosforilação de H2AX é muito importante para o recrutamento de MDC1, que por sua vez irá recrutar BRCA1, a qual é responsável pelo recrutamento das proteínas que participam do HR.

Neste trabalho, as linhagens estudadas apresentaram quantidades diferentes de células positivas para γ -H2AX. Baseado nos trabalhos científicos já publicados, é plausível questionar se talvez o recrutamento de H2AX diferencial das linhagens possa estar, de alguma maneira, interferindo no recrutamento de proteínas do HR nas células testadas. Os resultados obtidos sobre a expressão proteica, revelaram que LN18 (*PTEN* selvagem) apresenta mais células positivas para γ -H2AX e maiores níveis de expressão

de RAD51 e parálogas, comparativamente à T98G (*PTEN* mutado). Pode-se especular que as células LN18, por apresentarem maior quantidade de γ -H2AX, são mais eficientes em recrutar RAD51 e suas parálogas para os sítios de reparo dos danos. As taxas menores de γ -H2AX nas células T98G, podem provavelmente prejudicar o recrutamento de RAD51 e parálogas nos sítios das lesões e assim comprometer a eficiência do HR.

5.3 O status de *PTEN* pode interferir na expressão de RAD51 e parálogas em células de GBM após tratamento com etoposídeo

O HR é uma importante via de reparo de DSBs, as quais sofrem inicialmente a ressecção por diferentes proteínas para gerar cadeias simples de DNA (ssDNA), sendo a RAD51 a proteína responsável por se ligar às ssDNA, promover a invasão da fita simples na fita homóloga e iniciar o reparo (Prakash et al., 2015; Ward, Khanna e Wiegman, 2015). Cinco proteínas de uma mesma família (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 XRCC3) são classificadas como parálogas de RAD51. Os genes que codificam tais parálogas derivaram do gene de *RAD51* por eventos de duplicação, conferindo às proteínas correspondentes novas funcionalidades (Cao et al., 2014; Elhag, Mazzio e Soliman, 2015).

Funções da proteína PTEN no citoplasma, as quais incluem regulação da proliferação, ciclo celular e diferenciação celular (Wang et al., 2015), já são bem descritas e estudadas na literatura, entretanto, novos estudos vêm mostrando que PTEN participa em processos que acontecem dentro do núcleo da célula; dentre eles, um dos processos envolve a sua relação com a expressão de RAD51. Ao serem analisadas diferentes linhagens de GBM com distintos *status* de *PTEN*, e com expressão diferente da proteína codificada por esse gene, foi observado que essas linhagens, em resposta ao etoposídeo, expressaram níveis diferentes de proteína RAD51, bem como de duas proteínas parálogas (RAD51B e RAD51C). A linhagem LN18 (*PTEN* selvagem)

apresentou maiores níveis de expressão de RAD51 e de duas de suas parálogas (RAD51B e RAD51C), relativamente à linhagem T98G (*PTEN* mutado, proteína com atividade de fosfatase reduzida) e U87MG (*PTEN* mutado, sem expressão da proteína) (Elhag, Mazzio e Soliman, 2015; Prakash et al., 2015).

O silenciamento de *PTEN* na LN18 indicou essa relação entre o *status* de *PTEN* e RAD51, uma vez observada redução dos níveis basais da expressão de RAD51 e RAD51C, esta última sendo a única proteína paróloga avaliada, sugerindo fortemente a relação de *PTEN* funcional com a expressão de RAD51, mesmo na ausência de danos no DNA.

Não há trabalhos científicos que revelem que *PTEN* interfira na expressão de RAD51 e parálogas em células de GBM, porém, a relação entre *PTEN* e RAD51 já foi demonstrada para outros tipos celulares. Mukherjee e Karmakar (2013) encontraram expressão de RAD51 dependente de *PTEN* em células renais humanas. Ao silenciarem *PTEN* nessas células, os autores detectaram níveis reduzidos da proteína RAD51. Mendes-Pereira et al. (2009) utilizando células tumorais do intestino, as quais eram deficientes para *PTEN*, observaram uma menor expressão de RAD51 e menor quantidade de *foci* nuclear desta, em relação às células que expressavam *PTEN*. O presente trabalho, assim como o de Mukherjee e Karmakar (2013) e Mendes-Pereira et al. (2009), demonstra que a ausência de *PTEN* leva a uma diminuição dos níveis de expressão de RAD51.

Outros trabalhos relacionaram *PTEN* aos níveis de expressão de RAD51 pela participação direta deste no recrutamento e a transcrição de RAD51 em células de camundongo, demonstrando assim que *PTEN* interage fisicamente com RAD51 na forquilha de replicação. Foi demonstrado que em células *PTEN* $-/-$ havia menos RAD51 na forquilha de replicação e ocorria uma quantidade maior de forquilhas de replicação bloqueadas ou em colapso, comparadas com as células *PTEN* $+/+$ (He et al., 2009). Shen et al. (2007) já haviam demonstrado anteriormente, pela técnica de RNAchip, que *PTEN* se liga ao sítio de transcrição de RAD51, facilitando a ligação de E2F1 ao promotor de RAD51, dessa maneira otimizando a transcrição da proteína. Portanto, os autores

demonstraram que a falta de PTEN, ou a perda de função da proteína, comprometem a transcrição de RAD51.

McEllin et al. (2005) demonstraram em astrócitos nulos para *PTEN* níveis reduzidos das parálogas de RAD51, sugerindo que essa pode ser a razão pela qual tais células não possuem reparo HR eficiente, segundo os autores. De maneira interessante, no presente trabalho, ao utilizar células tumorais também do sistema nervoso, foi possível identificar redução dos níveis de expressão das proteínas parálogas de RAD51 nas linhagens com expressão reduzida (T98G) e mais acentuadamente sem expressão de *PTEN* (U87G) após tratamento. Em suporte a esses dados, quando o gene *PTEN* foi silenciado na LN18, foi observada uma diminuição de RAD51C. Takata et al. (2001) demonstraram que as proteínas parálogas de RAD51 desempenham papel chave na manutenção da integridade genômica, durante as fases iniciais do desenvolvimento e durante a proliferação celular normal. O grupo mostrou ainda que células deficientes para as parálogas de RAD51 impedem a formação de *foci* dessa proteína, após exposição aos raios-X, o que sugere haver participação dessas proteínas para facilitar a montagem de *foci* nos sítios de DSBs. Sabe-se que as parálogas de RAD51 desempenham papel essencial no reparo do DNA via HR (Shen et al., 2007); portanto, é provável que a baixa expressão das parálogas de RAD51 seja um fator que contribua na redução da eficiência do reparo por RAD51 e, consequentemente, de HR nas células analisadas.

Os dados de expressão proteica revelam que LN18 recruta RAD51 para os sítios de reparo das DSBs, enquanto o mesmo não é observado na linhagem T98G. A análise de γ -H2AX mostrou que as duas linhagens responderam de maneira semelhante à indução de DSBs (logo após tratamento com etoposídeo). Entretanto, a persistência de γ -H2AX (consequentemente, DSBs) ao longo do ciclo celular na linhagem LN18, mas não na T98G, evidencia que as células podem ter reparado de maneiras diferentes esse danos. Os dados obtidos sobre a cinética de progressão do ciclo celular também demonstraram que a LN18 apresentou maior bloqueio em S do que a T98G, sugerindo que a linhagem LN18 pode provavelmente ter ativado a via HR para o reparo dessas DSBs, ao passo que as células T98G sofreram apenas um leve bloqueio em G2, exibindo uma menor quantidade de γ -H2AX. É possível que as células T98G tenham utilizado

um mecanismo de reparo mais rápido do que o HR para corrigir as DSBs. Entretanto, isso depende da fase do ciclo celular, sendo que alternativamente, existe o mecanismo de reparo por NHEJ, o qual é mais rápido e ocorre durante todas as fases do ciclo, mas preferencialmente em G0/G1 e G2; diferentemente, a via HR é restrita à fase S, por requerer uma fita de DNA homóloga (Ceccaldi, Rondinelli e D'Andrea, 2015).

Desta forma, as células T98G, possivelmente por não apresentar HR eficiente, pode provavelmente ter utilizado a via de reparo por NHEJ para a resolução das quebras no DNA. Sabe-se que a via NHEJ é considerada altamente propensa a erro (*error-prone*) (Ceccaldi, Rondinelli e D'Andrea, 2015). Esse reparo pode, em primeira instância, ter promovido a sobrevivência dessas células em tempos iniciais logo após o tratamento, no entanto, por ser um mecanismo mais propenso a erros, pode ter conduzido as células à morte (apoptose) mais tardiamente, como observado após cinco dias, devido ao acúmulo de alterações. Estudos adicionais de proteínas ligadas a essas vias de reparo são necessários para a comprovação dessa hipótese.

Neste estudo, ao analisar células de GBM com *status* diferentes de PTEN, identificou-se respostas diferenciadas entre as linhagens com relação à proliferação, cinética do ciclo, formação de γ -H2AX e expressão de RAD51 e proteínas parálogas. A linhagem LN18 (*PTEN* selvagem) apresentou menores taxas de proliferação como consequência de alta indução de células apoptóticas após o tratamento com a droga etoposídeo; além disso, observou-se um número sutilmente maior de células com bloqueio em S e G2; maior indução de γ -H2AX (24 horas) e maiores níveis de expressão da proteína RAD51 e RAD51C e RAD51B (pico de expressão das três proteínas, 6 horas após o tratamento), em comparação com a linhagem T98G, a qual apresenta *PTEN* mutado.

Em face a estes resultados, pode-se sugerir que as linhagens com expressão distintas de PTEN divergem quanto à intensidade das respostas celulares frente aos danos no DNA causados pelo etoposídeo e, provavelmente, a eficiência do reparo pela via HR pode ser distinta em cada uma das linhagens, o que requer estudos adicionais com a utilização de ferramentas que permitam analisar a interação entre proteínas. Vale

ressaltar que a linhagem T98G apresenta uma função residual de PTEN, uma vez que a mutação encontrada nesse gene apenas reduz a atividade, porém não inibe a tradução da proteína (Ishii et al., 1999), como ocorre na linhagem U87MG, de forma que as respostas observadas entre as linhagens poderiam ser mais evidentes.

Assim, conforme o exposto, diferentes hipóteses sobre como *PTEN* pode interferir na regulação do reparo por HR e na expressão de RAD51 já foram levantadas (Takata et al., 2001; McEllin et al., 2005; Shen et al., 2007; He et al., 2009). Entretanto, pouco se sabe sobre como PTEN pode influenciar os diferentes mecanismos celulares relacionados ao reparo HR, bem como sobre as proteínas citoplasmáticas ou nucleares com as quais esse gene é capaz de se ligar e/ou regular. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que de alguma maneira PTEN possa interferir na expressão de RAD51 e suas parálogas, e que há uma possível correlação entre o *status* de *PTEN* e os níveis de expressão de RAD51 e parálogas nas células de GBM, quando tratadas com etoposídeo (**Figura 25**).

Figura 25: Esquema ilustrativo sobre as vias moleculares implicadas nas respostas das linhagens de GBM à indução de danos pelo etoposídeo, segundo os dados do presente trabalho. Na linhagem LN18 (*PTEN* proeficiente), PTEN desfosforila PIP3 a PIP2 e impede a fosforilação de AKT. Uma vez que AKT não é fosforilada, está ativa a via de proliferação

celular e o bloqueio da apoptose e do ciclo celular. No núcleo celular, na presença de DSBs, PTEN, por meio de um mecanismo desconhecido, promove o aumento da expressão de RAD51 e parálogas. Por outro lado, na linhagem T98G (*PTEN* deficiente), a proteína alterada *PTEN* não é capaz de promover de forma eficiente a desfosforilação de PIP3, mas fosforila AKT. AKT fosforilada então ativa vias de sobrevivência, bem como o bloqueio dos processos de apoptose e do ciclo celular. No núcleo, PTEN com função reduzida prejudica de alguma forma, os níveis de RAD51 e parálogas, reduzindo a expressão dessas proteínas.

Assim, a compreensão dos mecanismos de ação de genes que estão mutados em GBM é de suma importância, sendo que os dados obtidos no presente trabalho possuem o potencial para contribuir no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas e eficazes, os quais sejam capazes de eliminar as células tumorais que apresentam mutações que conferem a sobrevivência frente a quimio e radioterapia.

Adicionalmente, vale ressaltar que outras ferramentas de estudo são requeridas para definir com mais clareza, ou demonstrar possíveis interações e complexos proteicos, os quais possam elucidar as vias moleculares segundo as quais PTEN possa influenciar a expressão de RAD51 e suas proteínas parálogas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as linhagens de GBM, LN18 e T98G, quando tratadas com etoposídeo, divergiram nas respostas ao tratamento e diferiram nos parâmetros celulares e moleculares analisados, conforme seguem:

- A linhagem LN18 foi mais sensível aos tratamentos com etoposídeo nos tempos iniciais em comparação com a T98G, embora no tempo mais tardio de análise, as duas linhagens tenham sofrido redução acentuada na taxa de proliferação. T98G apresentou maiores níveis de AKT fosforilada, sugerindo que essa proteína tenha ativado vias de sobrevivência, mesmo na presença de danos, devido à deficiência de PTEN.
- Nas duas linhagens foi observado bloqueio na fase G2 do ciclo celular, porém, apenas as células LN18 apresentaram bloqueio em S. Adicionalmente, LN18 exibiu maior porcentagem de células apoptóticas e necróticas em comparação com a linhagem T98G. Os altos níveis de AKT fosforilada em T98G provavelmente impedem o bloqueio do ciclo celular na fase S e a apoptose.
- Logo após o tratamento com etoposídeo, as duas linhagens apresentaram níveis semelhantes de γ -H2AX. Entretanto, a linhagem LN18 exibiu um maior número de células positivas para γ -H2AX 24 horas após o tratamento, em comparação com a T98G, sugerindo que, provavelmente, a resolução de DSBs pode ter ocorrido de maneira diferente nas duas linhagens.
- LN18 apresenta expressão regular de PTEN, baixos níveis de AKT fosforilada e níveis regulares de AKT não fosforilada. Apesar de T98G apresentar expressão regular de PTEN, essas células apresentam maiores níveis de AKT fosforilada relativamente à LN18, e níveis regulares de AKT não fosforilado. Em contraste,

U87MG (utilizada para efeito de comparação) não apresenta expressão de PTEN, mostra altos níveis de AKT fosforilada, o maior entre LN18 e T98G, e níveis regulares de AKT não fosforilado.

- Os níveis da proteína RAD51 analisadas para as linhagens LN18, T98G e U87MG revelaram que a linhagem LN18 (*PTEN* selvagem) mostraram maiores níveis da proteína RAD51, após o tratamento com etoposídeo, do que as linhagens com mutação em *PTEN* (T98G e U87MG).
- Os níveis de parálogas de RAD51 (RAD51C e RAD51B) avaliados para as linhagens LN18, T98G e U87MG revelaram que a linhagem LN18 (*PTEN* selvagem) apresentou maiores níveis das proteínas parálogas após o tratamento com etoposídeo, comparativamente às linhagens com mutação em *PTEN* (T98G e U87MG).
- O silenciamento de *PTEN* na linhagem LN18, por si só, foi capaz de reduzir a expressão de RAD51 e de RAD51C no tempo de 72 horas, em que houve a maior redução da expressão de PTEN.

Os dados do presente trabalho mostraram que o *status* de *PTEN* é crucial para as vias de sobrevivência, controle do ciclo celular e indução de apoptose nas células de GBM, podendo ser sugerido a existência de uma possível relação entre o gene *PTEN* e a expressão de RAD51 e parálogas em células de GBM, fornecendo informações relevantes para investigar a interação molecular entre as mesmas.

— REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIFIERIS C.; TRAFALIS D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacol Ther.** v. 152, p. 63-82, 2015. ISSN 10.1016

ANNOVAZZI, L. et al. The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. **Int J Oncol**, v. 46, n. 6, p. 2299-308, 2015. ISSN 1019-6439.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/>>. Acesso em: 9 de Novembro de 2015

ATIF, F.; YOUSUF, S.; STEIN, D. G. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 146, p. 62-73, 2015. ISSN 0960-0760.

BASSING, C. H. et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 8173-8, 2002. ISSN 0027-8424.

BERMUDEZ BRITO, M.; GOULIELMAKI, E.; PAPAKONSTANTI, E. A. Focus on PTEN Regulation. **Front Oncol**, v. 5, p. 166, 2015. ISSN 2234-943x.

BHOWMIK, A.; KHAN, R.; GHOSH, M. K. Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 320941, 2015.

BONNER, W. M. et al. GammaH2AX and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 12, p. 957-67, 2008. ISSN 1474-175x.

BONONI, A.; PINTON, P. Study of PTEN subcellular localization. **Methods**, v. 77-78, p. 92-103, 2015. ISSN 1046-2023.

BOOSANI, C. S.; AGRAWAL, D. K. PTEN modulators: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, v. 23, n. 5, p. 569-80, 2013. ISSN 1354-3776.

CANITROT, et al. DNA polymerase beta overexpression stimulates the Rad51-dependent homologous recombination in mammalian cells. **Nucleic Acids Res.** v. 27, n. 32, p. 5104-12, 2004. ISSN 15452277

CAO, Y. et al. Utilization of Rad51C promoter for transcriptional targeting of cancer cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 7, p. 1805-11, 2014. ISSN 1949-2553.

CARLETTI, M. et al. Stochastic modelling of PTEN regulation in brain tumors: A model for glioblastoma multiforme. **Math Biosci Eng**, v. 12, n. 5, p. 965-81, 2015. ISSN 1547-1063.

CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. **Trends Cell Biol**, v. 26, n. 1, p. 52-64, 2016. ISSN 0962-8924.

CHANG, C. J. et al. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 10, p. 3281-9, 2008. ISSN 0270-7306.

CHANOUX, R. A. et al. ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. **J Biol Chem**, v. 284, n. 9, p. 5994-6003, 2009. ISSN 0021-9258.

CHEN, J. et al. Low expression of phosphatase and tensin homolog in clearcell renal cell carcinoma contributes to chemoresistance through activating the Akt/HDM2 signaling pathway. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 2, p. 2622-8, 2015. ISSN 1791-2997.

CHIANG, K. C. et al. PTEN insufficiency modulates ER+ breast cancer cell cycle progression and increases cell growth in vitro and in vivo. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 4631-8, 2015. ISSN 1177-8881.

CHO, N. W.; GREENBERG, R. A. DNA repair: Familiar ends with alternative endings. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 174-6, 2015. ISSN 0028-0836.

CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3-34, 2003. ISSN 0300-483X.

CHUN, J.; BUECHELMAIER, E. S.; POWELL, S. N. Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 2, p. 387-95, 2013. ISSN 0270-7306.

DE ARAUJO, W. M. et al. PTEN Overexpression Cooperates With Lithium to Reduce the Malignancy and to Increase Cell Death by Apoptosis via PI3K/Akt Suppression in Colorectal Cancer Cells. **J Cell Biochem**, v. 117, n. 2, p. 458-69, 2016. ISSN 0730-2312.

ELHAG, R.; MAZZIO, E. A.; SOLIMAN, K. F. The effect of silibinin in enhancing toxicity of temozolomide and etoposide in p53 and PTEN-mutated resistant glioma cell lines. **Anticancer Res**, v. 35, n. 3, p. 1263-9, 2015. ISSN 0250-7005.

GE, N. L.; RUDIKOFF, S. Expression of PTEN in PTEN-deficient multiple myeloma cells abolishes tumor growth in vivo. **Oncogene**, v. 19, n. 36, p. 4091-5, 2000. ISSN 0950-9232.

GHOSH S, RAO P.B. Brain Metastases from Solid Tumors: an Institutional Study from South India. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 16, n 13, p. 5401-6, 2015. ISSN 26225685.

HE, J. et al. PTEN regulates DNA replication progression and stalled fork recovery. **Nat Commun**, v. 6, p. 7620, 2015. ISSN 2041-1723.

HO, J.; BASSI, C.; STAMBOLIC, V. Characterization of nuclear PTEN and its post translational modifications. **Methods**, v. 77-78, p. 104-11, 2015. ISSN 1046-2023.

HOPKINS, B. D. et al. PTEN function: the long and the short of it. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 4, p. 183-90, 2014. ISSN 0968-0004.

HUANG, F.; MAZIN, A. V. Targeting the homologous recombination pathway by small molecule modulators. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, n. 14, p. 3006-13, 2014. ISSN 0960-894x.

HUNT, C. R. et al. Does PTEN loss impair DNA double-strand break repair by homologous recombination? **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 4, p. 920-2, 2012. ISSN 1078-0432.

ISHII, N. et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. **Brain Pathol**, v. 9, n. 3, p. 469-79, 1999. ISSN 1015-6305.

KHEIROLLAHI, M. et al. Brain tumors: Special characters for research and banking. **Adv Biomed Res**, v. 4, p. 4, 2015. ISSN 2277-9175.

KING, F. W. et al. Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt. **Cell Cycle**, v. 3, n. 5, p. 634-7, 2004. ISSN 1538-4101.

KRAJEWSKA, M. et al. Regulators of homologous recombination repair as novel targets for cancer treatment. **Front Genet**, v. 6, p. 96, 2015. ISSN 1664-8021.

KWON, H. K. et al. Etoposide Induces Necrosis Through p53-Mediated Antiapoptosis in Human Kidney Proximal Tubule Cells. **Toxicol Sci**, v. 148, n. 1, p. 204-19, 2015. ISSN 1096-0929.

LI, D. M.; SUN, H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15406-11, 1998. ISSN 0027-8424.

LIM, H. J.; CROWE, P.; YANG, J. L. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 141, n. 4, p. 671-89, 2015. ISSN 0171-5216.

LIN, P. C. et al. A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. **World J Surg Oncol**, v. 13, p. 186, 2015. ISSN 1477-7819.

LIPKIN, J. S. et al. Therapeutic approach guided by genetic alteration: use of MTOR inhibitor in renal medullary carcinoma with loss of PTEN expression. **Cancer Biol Ther**, v. 16, n. 1, p. 28-33, 2015. ISSN 1538-4047.

MALOISEL, L.; FABRE, F.; GANGLOFF, S. DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 4, p. 1373-82, 2008. ISSN 0270-7306.

MCELLIN, B. et al. PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. **Cancer Res**, v. 70, n. 13, p. 5457-64, 2010. ISSN 0008-5472.

MEHTA, A.; HABER, J. E. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 9, p. 164-28, 2014.

MENDES-PEREIRA, A. M. et al. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. **EMBO Mol Med**, v. 1, n. 6-7, p. 315-22, 2009. ISSN 1757-4676.

MILELLA, M. et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. **Front Oncol**, v. 5, p. 24, 2015. ISSN 2234-943x.

MINAMI, A. et al. Connection between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair. **Front Oncol**, v. 4, p. 318, 2014. ISSN 2234-943x.

MISRA, S.; MUKHERJEE, A.; KARMAKAR, P. Phosphorylation of PTEN at STT motif is associated with DNA damage response. **Mutat Res**, v. 770, p. 112-9, 2014. ISSN 0027-5107.

MONTECUCCO, A.; ZANETTA, F.; BIAMONTI, G. Molecular mechanism of etoposide. **EXCLI J**, v. 19, n. 14, p. 95-108, 2015. ISSN 107868

MOROKOFF, A. et al. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. **J Clin Neurosci**, v. 22, n. 8, p. 1219-26, 2015. ISSN 0967-5868.

MUKHERJEE, A.; SAMANTA, S.; KARMAKAR, P. Inactivation of PTEN is responsible for the survival of Hep G2 cells in response to etoposide-induced damage. **Mutat Res**, v. 715, n. 1-2, p. 42-51, 2011. ISSN 0027-5107.

NAGUIB, A. et al. PTEN functions by recruitment to cytoplasmic vesicles. **Mol Cell**, v. 58, n. 2, p. 255-68, 2015. ISSN 1097-2765.

NAVARRO, L. et al. Alteration of major vault protein in human glioblastoma and its relation with EGFR and PTEN status. **Neuroscience**, v. 297, p. 243-51, 2015. ISSN 0306-4522.

NOVELLO, C. et al. p53-dependent activation of microRNA-34a in response to etoposide-induced DNA damage in osteosarcoma cell lines not impaired by dominant negative p53 expression. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114757, 2014. ISSN 1932-6203.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res**, v. 64, n. 19, p. 6892-9, 2004. ISSN 0008-5472.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1445-53, 2007. ISSN 0002-9440.

OLIVEIRA-COSTA, J. P. et al. BRCA1 and gammaH2AX as independent prognostic markers in oral squamous cell carcinoma. **Oncoscience**, v. 1, n. 5, p. 383-91, 2014. ISSN 2331-4737.

OPEL, D. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis. **Cancer Res**, v. 68, n. 15, p. 6271-80, 2008. ISSN 0008-5472.

PENG, G. et al. Genome-wide transcriptome profiling of homologous recombination DNA repair. **Nat Commun**, v. 5, p. 3361, 2014. ISSN 2041-1723.

PEREZ-RAMIREZ, C. et al. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 16, p. 1843-62, 2015. ISSN 1462-2416.

PRAKASH, R. et al. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 4, p. a016600, 2015.

PUC, J.; PARSONS, R. PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. **Cell Cycle**, v. 4, n. 7, p. 927-9, 2005. ISSN 1424-2020

RAMIREZ, Y. P. et al. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 1475-506, 2013. ISSN 1424-8247.

REIFENBERGER, G.; COLLINS, V. P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J Mol Med (Berl)**, v. 82, n. 10, p. 656-70, 2004. ISSN 0946-2716.

RODGERS, K.; MCVEY, M. Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 1, p. 15-24, 2016. ISSN 0021-9541.

SALMENA, L.; CARRACEDO, A.; PANDOLFI, P. P. Tenets of PTEN tumor suppression. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 403-14, 2008. ISSN 0092-8674.

SARBAJNA, S.; WEST, S. C. Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 9, p. 409-19, 2014. ISSN 0968-0004.

SCHAYEK, H. et al. The rate of recurrent BRCA1, BRCA2, and TP53 mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo Horizonte, Brazil. **Cancer Genet**, v. 209, n. 1-2, p. 50-2, 2016. ISSN 2210-776.

SCULLY, R.; XIE, A. Double strand break repair functions of histone H2AX. **Mutat Res**, v. 750, n. 1-2, p. 5-14, 2013. ISSN 0027-5107.

SESEN, J. et al. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123721, 2015. ISSN 1932-6203.

SHEARN, C. T. et al. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) inhibition by 4-hydroxynonenal leads to increased Akt activation in hepatocytes. **Mol Pharmacol**, v. 79, n. 6, p. 941-52, 2011. ISSN 0026-895x.

SHEN, W. H. et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 157-70, 2007. ISSN 0092-8674.

SHORT, S. C. et al. Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells. **Neuro Oncol**, v. 13, n. 5, p. 487-99, 2011. ISSN 1522-8517.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 283-96, 2012. ISSN 1471-0072.

SONODA, E. et al. Collaborative roles of gammaH2AX and the Rad51 paralog Xrcc3 in homologous recombinational repair. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 3, p. 280-92, 2007. ISSN 1568-7864.

SRIVASTAVA, M.; RAGHAVAN, S. C. DNA double-strand break repair inhibitors as cancer therapeutics. **Chem Biol**, v. 22, n. 1, p. 17-29, 2015. ISSN 1074-5521.

SUWAKI, N.; KLARE, K.; TARSOUNAS, M. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 8, p. 898-905, 2011. ISSN 1084-9521.

TAKATA, M. et al. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 8, p. 2858-66, 2001. ISSN 0270-7306.

WATSON, J. et al. Biologia molecular do gene. 7ª Edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2015.

WANG, H. et al. Relevance and therapeutic possibility of PTEN-long in renal cell carcinoma. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e114250, 2015. ISSN 1932-6203.

WANG, X.; HUANG, H.; YOUNG, K. H. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 12, p. 1032-49, 2015. ISSN 1945-4589.

WARD, A.; KHANNA, K. K.; WIEGMANS, A. P. Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51. **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 1, p. 35-45, 2015. ISSN 0305-7372.

WENG, L. P. et al. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. **Cancer Res**, v. 59, n. 22, p. 5808-14, 1999. ISSN 0008-5472.

WHITEMAN, D. C. et al. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. **Int J Cancer**, v. 99, n. 1, p. 63-7, 2002. ISSN 0020-7136.

WOIWODE, A. et al. PTEN represses RNA polymerase III-dependent transcription by targeting the TFIIIB complex. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 12, p. 4204-14, 2008. ISSN 0270-7306.

CHO, N.W, GREENBERG, R.A. DNA repair: Familiar ends with alternative endings. **Nature**. v. 12; n. 518, p. 174-6, 2015. ISSN 10.1038.

WORBY, C. A.; DIXON, J. E. PTEN. **Annu Rev Biochem**, v. 83, p. 641-69, 2014. ISSN 0066-4154.

XIE, A. et al. H2AX post-translational modifications in the ionizing radiation response and homologous recombination. **Cell Cycle**, v. 9, n. 17, p. 3602-10, 2010. ISSN 1551-4005.

YIN, Y.; SHEN, W. H. PTEN: a new guardian of the genome. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5443-53, 2008. ISSN 0950-9232.

ZACHARAKI, E. I. et al. Classification of brain tumor type and grade using MRI texture and shape in a machine learning scheme. **Magn Reson Med**, v. 62, n. 6, p. 1609-18, 2009. ISSN 0740-3194.

ZENG, T.; CUI, D.; GAO, L. Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 20, p. 1104-15, 2015. ISSN 1093-4715.

ZHANG, J. et al. MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 10, p. 902-9, 2005. ISSN 1545-9993.

ZHANG, J. et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. **Clin Chim Acta**, v. 444, p. 182-92, 2015. ISSN 0009-8981.