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

VERÔNICA SANTANA DA SILVA

**Influência do inibidor de RAD51 (RI-1) em linhagens de glioblastoma, M059J e
M059K, irradiadas com raios-X**

Ribeirão Preto - SP

2014

VERÔNICA SANTANA DA SILVA

Influência do inibidor de RAD51 (RI-1) em linhagens de glioblastoma, M059J e M059K, irradiadas com raios-X

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

2014

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

Silva, Verônica Santana da

Influência do inibidor de RAD51 (RI-1) em linhagens de glioblastoma, M059J e M059K, irradiadas com raios-X / Ribeirão Preto, 2014
67f..il; 30cm

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

1. Glioblastoma; 2. Inibidor de RAD51; 3. raios-X; 4. Danos no DNA; 5. Reparo de DNA; 6. Inibição de reparo do DNA.

Nome: SILVA, Verônica Santana da

Título: Influência do inibidor de RAD51 (RI-1) em linhagens de glioblastoma, M059J e M059K, irradiadas com raios-X

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, para obtenção de título de
Mestre em Ciências. Área de concentração :
Genética

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc.nº 2009/10925-6).

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 **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pela orientação deste trabalho, apoio, conselhos, amizade e paciência comigo. Muito Obrigada!

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi**, pela simpatia, amizade e por nos proporcionar momentos de confraternização e muita descontração no laboratório.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP pelo apoio, paciência e simpatia.

Às **Professoras Dra. Zilá Luz Paulino Simões e Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi**, por gentilmente disponibilizar o uso de alguns aparelhos de seus laboratórios.

Às Secretárias do Departamento de Genética, **Susie e Sílvia**, pela atenção, simpatia e por sempre esclarecerem as minhas dúvidas.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade em analisar este trabalho e pelas sugestões e críticas.

Ao **Departamento de genética e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, pela estrutura oferecida para o desenvolvimento desse projeto.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Departamento de Genética da FMRP/USP, **Luís Augusto da Costa Junior e Sueli Aparecida Neves**, pela amizade, pelas longas e filosóficas conversas, ensinamentos e ótimas gargalhadas que me proporcionaram.

À **Dona Cleuza** por cuidar sempre com muito amor de todos nós.

À **FAPESP, CNPq e CAPES**, pelo auxílio financeiro, para a realização deste trabalho.

À todos os amigos e colegas de Laboratório de Citogenética e Mutagênese Ambiental: **Léo, Giovana, Paulinha, Danilo, Andrés, William, Ana Clara, João Paulo**. Agradeço a vocês imensamente por terem proporcionado um ótimo ambiente de trabalho.

Aos ex-alunos deste laboratório, **Tiago e Fernada C.**, pela amizade, conversas e ótima convivência.

Ana Paula e Paulo, pelas correções, planejamentos, orientações, por sempre estarem dispostos a me ajudar na execução e conclusão deste trabalho, vocês foram fundamentais. Muito Obrigada!

Aos meus queridos irmãos, **João, Gisele e Matheus**, pelo apoio e alegria que sempre me deram. Amo vocês.

Aos meus pais, **Mariene** (Dona Mari) e **José Alves** (seu José), por acreditarem nos meus sonhos, obrigada por todo o amor e dedicação que sempre tiveram comigo. Agradeço também pelo apoio material e espiritual, muito obrigada pela força. Sem o apoio de vocês, eu não chegaria até aqui. Amo muito vocês!!!

À todos os novos amigos que fiz em Ribeirão Preto, em especial a **Gabi, Kari, Lú, Mirna, Rena, Jerry, Zé, Nibs, Alberto, Liz e à Clélia**, uma grande amiga e um referencial de ser humano a ser seguido, muito obrigada pela amizade de vocês.

Às minha irmãs de coração, **Vanessa e Juliana**, por todos os momentos que passamos juntas, pelas conversas diárias, conselhos, risadas, carinho, atenção e por estarem sempre dispostas a me ajudar, não medindo esforços para isso. Obrigada meninas por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Amo vocês!

À **Deus**, acima de tudo e de todos por me dar saúde e força para concluir este trabalho.

RESUMO

SILVA, V. S. Influência do inibidor de RAD51 (RI-1) em linhagens de glioblastoma, M059J e M059K, irradiadas com raios-X. 2014, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O glioblastoma (GBM) é um tumor extremamente agressivo e resistente aos tratamentos convencionais. Os agentes utilizados na quimio- e radioterapia são indutores de danos no DNA, por induzirem quebras de fita simples (SSBs) e quebras de fita dupla (DSBs), as quais são letais para as células, mas quando eficientemente reparadas pelas células tumorais tornam estas resistentes. As principais vias de reparo de DSBs são: a via por recombinação homóloga (*Homologous Recombination* – HR) e por recombinação não- homóloga (*Non-homologous end joining* – NHEJ). As proteínas de reparo participantes dessas vias têm sido estudadas como potenciais alvos moleculares na terapia contra o câncer. A estratégia empregada no presente trabalho foi a de inibir a via de reparo HR em células já comprometidas para a via NHEJ. Para isso foi utilizado o inibidor de RAD51 (uma das principais proteínas da via HR), 3-chloro-1-(3,4-dichlorophenyl)-4-morpholinyl-1H-pyrrole-2,5-dione, conhecido como RI-1(Calbiochem), testado em células de glioma M059J e M059K (deficientes e proficientes para DNA-PK, respectivamente), irradiadas com raios-X. Diferentes ensaios foram realizados para o teste com o inibidor RI-1 em células irradiadas ou não e comparados ao controle sem tratamento. Os resultados dos ensaios de sobrevivência clonogênica mostraram que a concentração de 40 μ M do inibidor RI-1 exerceu um maior efeito inibitório sobre a capacidade de as células se dividirem e formarem colônias. O RI-1 induziu alterações significativas na cinética do ciclo celular predominantemente na linhagem selvagem M059K, nos tempos de 24 e 72 h. Apesar de a linhagem M059J não mostrar alterações significativas na cinética do ciclo celular, esta demonstrou sensibilidade à irradiação, conforme demonstrado pela cinética de reparo das DSBs, sendo mais lenta em relação à M059K, demonstrando o comprometimento do reparo NHEJ na linhagem mutante para DNA-PK. A expressão das proteínas LIG3, XRCC1 e PARP-1 foram analisadas no tempo de 15 minutos e 24 h após a irradiação. Na presença do inibidor RI-1, a expressão da LIG3 foi aumentada em células M059K

(15 min e 24 h) comparadas ao grupo controle. Já a linhagem M059J apresentou uma elevada expressão das proteínas XRCC1 e PARP-1 apenas em 15 min em relação ao controle; esses dados indicaram que um possível reparo de DSBs envolvendo essas proteínas pode ter sido ativado logo nos primeiros minutos após a indução de danos nessas células. O conjunto dos resultados deste trabalho sugere um papel atuante do inibidor RI-1 em células comprometidas para o reparo NHEJ, isto é, a linhagem M059J, levando à sugestão de que vias alternativas de reparo podem possivelmente estar envolvidas na resistência das células tumorais aos tratamentos convencionais.

Palavras-chave: glioblastoma, inibidor de RAD51 (RI-1), raios-X, resposta a danos no DNA, vias alternativas de reparo, estratégias terapêuticas.

ABSTRACT

SILVA, V. S. **Influence of the RAD51 inhibitor (RI-1) in glioblastoma cell lines, M059J and M059K, irradiated with X-rays.** 2014, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Glioblastoma (GBM) is an extremely aggressive and resistant tumor to conventional treatments. The agents used in chemotherapy and radiotherapy are inducers of DNA damage, since they induce single strand breaks (SSBs) and double-strand breaks (DSBs), which are lethal to cells, but when efficiently repaired by tumor cells make them resistant to antitumoral agents. The main repair pathways for DSBs are the homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) pathways. Proteins participating in these processes have been studied as potential molecular targets in cancer therapy. Thus, the strategy employed in this work involved the inhibition of HR repair pathway in cells already committed to the NHEJ pathway, aiming to sensitize irradiated GBM cells. An inhibitor of RAD51 (one of the major HR proteins) was used: 3-chloro-1-(3,4-dichlorophenyl) -4 morpholinyl-1H-pyrrole-2,5-dione, known as RI-1 (Calbiochem); this compound was tested in GBM cells, M059K and M059J (proficient and deficient for the DNA-PK, respectively) irradiated with X-rays. Various assays were performed to test the inhibitory property of RI-1 in irradiated cells and the combination of the inhibitor with X-irradiation, compared with the untreated control. The results of clonogenic survival showed that 40 μ M of RI-1 inhibitor exerted a higher inhibitory effect on the ability of cells to divide and form colonies. The RI-1 induced changes in cell cycle kinetics predominantly in the wild-type M059K, at 24 and 72 h. Although M059J did not show significant changes in cell cycle kinetics, these cells showed sensitivity to X-irradiation, as shown by the kinetics of DSB repair (*gamma-H2AX foci*), which was slower compared to M059K, demonstrating the commitment of the NHEJ repair in M059J (mutant for DNA-PK). The expression of LIG3, PARP-1 and XRCC1 proteins were analyzed at 15 min. and 24 h after irradiation. In the presence of the inhibitor RI-1, LIG 3 expression was increased in M059K cells (15 min. and 24 h) compared to the control group. M059J cells showed a high expression of XRCC1 and PARP-1 only at 15 min., compared to the control. These data indicated that a possible repair of DSBs

involving these proteins may have been activated in the first minutes after DNA damage induction. The overall results of this study suggest that RI-1 inhibitor was efficient to influence cellular responses in cells committed to the NHEJ repair, i.e. M059J cell line, leading to the hypothesis that alternative repair pathways may be possibly involved in the resistance of tumor cells.

Keywords: glioblastoma, RAD51 inhibitor (RI-1), X-rays, DNA damage responses, alternative DNA repair pathways, therapeutic strategies in cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de reparo de DSBs e principais proteínas envolvidas. A: Reparo por Recombinação Homóloga (HR); B: Reparo por recombinação não homóloga (NHEJ) (adaptado de PENG e LIN, 2011).....	6
Figura 2: Esquema das possíveis proteínas envolvidas na via A-NHEJ e sua sequência de eventos: reconhecimento e sinapse, processamento e ligação. As proteínas destacadas entre parênteses podem variar entre os diferentes organismos. (adaptado de FRIT et al., 2014).....	12
Figura 3 - Estrutura química do inibidor RI-1(BUDCKE et al., 2012b).....	15
Figura 4: Curvas de sobrevivência clonogênica obtidas para as células M059J e M059K, 15 dias após a irradiação com diferentes doses de raios-X (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 Gy). Os valores foram comparados ao controle não irradiado e os resultados estão apresentados em escala logarítmica. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$	27
Figura 5: Sobrevivência clonogênica analisada para as linhagens M059J (deficiente para DNA-PK) (A) e M059K (B), avaliadas 15 dias após tratamentos combinados, irradiação com raios-X (0,5 e 1Gy) e RI-1 em diferentes concentrações (10, 20 e 40 μ M). Os tratamentos foram comparados com o controle, DMSO (representados por um asterisco) e entre eles (representados por uma chave). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$	29
Figura 6: Distribuição das células M059J e M059K em diferentes fases do ciclo celular, avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 h (A, B e C respectivamente) após tratamento .As células foram tratadas com 40 μ M de RI-1, 1h antes de serem irradiadas com 4Gy. Os tratamentos foram comparados ao controle (representados por um * quando significativo) e entre eles (representados por uma chave e * quando significativo). Sendo (*), $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).....	32
Figura 7: Células das linhagens M059J e M059K marcadas com anticorpo para a proteína H2AX fosforilada mostrando os foci de γ -H2AX em função do tempo, em resposta à irradiação com raios-X (2Gy). Os foci de γ -H2AX são representados em verde (conjugado a AlexaFluor-488) e o núcleo representado em azul (DAPI).....	36

Figura 8: Cinética de reparo de quebras duplas no DNA pela detecção de foci de γ -H2AX nos tratamentos realizados em linhagens M059J e M059K. Foram utilizadas as médias de foci de γ -H2AX por célula. As células foram irradiadas com 2 Gy e fixadas após 15, 30, 60 min e 24 h. Os valores foram calculados a partir de dados de três experimentos independentes e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ 36

Figura 9: Expressão das proteínas Ligase III (LIG3), XRCC1, PARP-1 analisadas por Western blot em células M059K e M059J tratadas com o inibidor RI-1(40 μ M) e irradiadas (4Gy), comparada aos respectivos controles, avaliada nos tempos de 15 minutos e 24 horas após tratamentos. β -Tubulina e β -actina foram utilizadas como controle para normalização..... 39

Figura 10: Níveis de expressão das proteínas LIG3 (A), XRCC1 (B) e PARP-1 (C) nas linhagens M059K e M059J irradiadas (4 Gy) e submetidas ao tratamento com o inibidor RI-1(40 μ M), comparadas aos respectivos controles. As barras correspondem à expressão relativa obtida por densitometria das bandas avaliadas nos tempos de 15 minutos e 24 horas após tratamentos. Foram realizados dois experimentos independentes. Os valores foram normalizados em relação às proteínas β -Tubulina e β -Actina. Foi utilizado o software Gel Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetic)..... 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Porcentagens de formação de colônias nas linhagens M059J e M059K submetidas a diferentes doses de raios-X e avaliada após 15 dias. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP)..... 27
- Tabela 2: Porcentagens de formação de colônias nas linhagens M059J e M059K submetidas a diferentes tratamentos com o inibidor RI-1 (10, 20 e 40 μ M) associado ou não à irradiação, avaliadas após 15 dias. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP)..... 30
- Tabela 3: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo celular nas linhagens M059J e M059K, submetidas a diferentes tratamentos com o inibidor RI-1 associado à irradiação (raios-X). As células foram tratadas com 40 μ M do inibidor RI-1 adicionado 1 hora antes de as células serem irradiadas com 4Gy. Os dados foram obtidos utilizando o sistema Guava EasyCyte Mini System (Guava Technologies) e Guava CytoSoft 4.2.1 Software Enviroment (Guava Technologies). Os valores da tabela destacados com (*) foram significativos em relação ao controle ($p < 0,05$). Os valores foram calculados a partir dos dados de três experimentos independentes, expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP)..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS

A-NHEJ, a-NHEJ e alt-NHEJ : *Alternative non homologous end-joining*

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATR: *ATR serine/threonine kinase*

BER: *Base Excision Repair*

BLM: *Bloom syndrome, RecQ helicase-like*

b-NHEJ : *backup Non homologous end-joining*

BRCA1: Breast câncer 1, early onset

CHK2: Checkpoint kinase 2

C-NHEJ : classical Non homologou end-joining

CtIP : *choline transporter-like protein*

DNA : Ácido desoxiribonucleíco

DNA-PK: DNA-dependent protein kinase

DNA-PKs (*DNA-dependent protein kinase*).

DSB : *Double-strand breaks*

EGFR: epidermal growth factor receptor

GBM: Glioblastoma

H2AX: H2A histone family, member X

HEK : *Human Embryonic Kidney*

HRR: *Homologous Recombination Repair*

LIG1: DNA ligase I

LIG3: DNA ligase III

LIG4: DNA ligase IV

LOH: Loss of heterozygosity

MMEJ : microhomology-mediate

MMR: Mismatch Repair

MMS :Metilmetanosulfonato

MRN: *Mre11, Rad50 and Nbs1 complex*

NER: Nucleotide Excision Repair

NHEJ: Non Homologous end-joining)

p16ink4: Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A

PARP-1 : *Poly (ADP-ribose) polymerase*

PI3K : *fosfatidilinositol 3-quinase*

PTEN: Tumor-suppressor Phosphatase and Tensin homolog

RAD51: *RAD51 recombinase*

RI: Radiação ionizantes

RI-1: *RAD51 Inhibitor II*

RPA: Replication protein A

SNC : Sistema Nervoso Central

SSB : *Single-strand breaks*

TMZ: Temozolomida

TP53 : Tumor protein p53

UV: Radiação ultravioleta

XRCC1: X-Ray Repair Cross Complementing protein 1

XRCC4 : X-Ray Repair Cross Complementing protein 4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central.....	2
1.2. Danos no DNA.....	3
1.3 Vias de reparo para SSBs e DSBs.....	5
1.3.1 Reparo por Recombinação Homóloga (HR).....	6
1.3.2 Reparo por Recombinação Não Homóloga.....	8
1.3.3 Reparo alternativo por Recombinação não homóloga (A-NHEJ)...	9
1.4 Inibidores de proteínas da via HR.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Linhagens Celulares.....	19
3.2. Cultivo Celular.....	19
3.3. Inibidor de RAD51 e Radiação.....	19
3.4. Teste de Sobrevivência Clonogênica.....	20
3.5. Cinética do Ciclo Celular e Apoptose pelo método sub-G1.....	20
3.6. Detecção de gamma-H2AX por Imunofluorescência (p-H2AX Ser139).....	21
3.7. Expressão de proteína por Western-Blot.....	21
3.7.1. Extração de proteínas com Solução de Lise.....	21
3.7.2. Eletroforese de proteínas.....	22
3.7.3. Transferência Eletroforética.....	23
3.7.4. Imunodetecção e visualização das proteínas.....	23
3.8. Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Ensaio de sobrevivência Clonogênica.....	26
4.2. Avaliação da Cinética do Ciclo Celular e Detecção de morte por sub-G1.....	30
4.3. Avaliação da cinética de reparo através da proteína γ -H2AX.....	35
4.4. Expressão de proteínas de reparo por Western Blot.....	37
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	48
7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são agressivos, apresentando alta taxa de mortalidade. A maior frequência de desenvolvimento da doença ocorre na infância e na fase adulta, entre 45 e 70 anos de idade (REINFENBERGER e COLLINS, 2004).

Segundo Santarius et al (1997), os tumores cerebrais são classificados em gliomas, tumores neurais, neoplasias mal diferenciadas e meningiomas. O desenvolvimento dos diferentes tipos de tumores cerebrais pode estar relacionado tanto com o “background” genético quanto com o sistema imune (GARAMI, 2011).

Os gliomas malignos são os tumores primários mais comuns em adultos, correspondendo a mais de 70% de todas as neoplasias do SNC (OHGAKI, 2009). Esses são classificados na escala de I a IV de acordo com o seu grau de malignidade, sendo caracterizados por várias alterações histológicas acompanhadas por alterações genéticas (LOUIS et al., 2007). Considerando suas características invasivas e capacidade de causar necrose, os gliomas são assim classificados: Astrocitoma Pilocítico (Grau I); Astrocitoma (Grau II); Astrocitoma Anaplásico (Grau III) e Glioblastoma (GBM - Grau IV). O GBM localiza-se na região anterior do cérebro, apresenta crescimento astrocítico difuso, é considerado o mais agressivo, o que resulta em altos índices de mortalidade (CHINTALA et al., 1996; FURNARI et al., 2007; LOUIS et al., 2007; REINFENBERGER e COLLINS, 2004), devido à sua elevada taxa de infiltração, invadindo várias partes do cérebro através de corpos calosos, região que conecta os hemisférios cerebrais (NAKADA et al., 2007). Este tumor pode se desenvolver em qualquer idade porém é encontrado com maior frequência entre 50 e 70 anos. (FURNARI et al., 2007; REINFENBERGER e COLLINS, 2004).

O GBM pode ser classificado como primário, também chamado de *de novo* glioblastoma (desenvolve sem a evidência de um tumor precursor de menor grau), ou secundário (originado a partir de um tumor astrocítico de baixo grau). O GBM primário apresenta características que incluem perda de heterozigosidade (LOH) do cromossomo 10q (70%), amplificação do gene *EGFR* (40%), mutações no gene

TP53 (28%), deleção do *p16^{ink4}* (31%) e mutações no gene *PTEN* (25%). A mutação do gene *TP53* é uma alteração genética precoce e frequente (65%) na via de desenvolvimento do GBM secundário, sendo uma das primeiras alterações detectáveis em 2/3 dos astrocitomas difuso de baixo grau (grau II), entre outras mutações (OHGAKI e KLEIHUES, 2007).

Após o primeiro diagnóstico, os pacientes com GBM são encaminhados para os tratamentos convencionais, incluindo a cirurgia, quimio- e radioterapia. Entretanto, apesar disso, o prognóstico é desfavorável e a sobrevida média dos pacientes não ultrapassa 12-14 meses (MRUGALA, 2013). O elevado grau de heterogeneidade e transformação genética dos tumores dificulta o prognóstico (WELSH, 2010) e aumenta a resistência aos tratamentos convencionais, tornando-os refratários à maioria dos agentes antitumorais, pelo fato de apresentarem respostas de curta duração acompanhadas de um rápido desenvolvimento de resistência (KARSY, 2014; STUPP et al., 2008, 2014).

Assim, a resistência dos GBMs aos tratamentos constitui um grande problema a ser contornado e, apesar do crescente avanço na área de oncologia, o tratamento dos pacientes com GBM ainda constitui um grande desafio, requerendo novas modalidades terapêuticas mais eficazes (SCARINGI et al., 2013; STUPP et al., 2007, 2008).

1.2. Danos no DNA

A estrutura primária do DNA está constantemente sujeita a alterações causadas tanto por produtos do metabolismo celular quanto por agentes exógenos, os quais danificam o DNA (HOEIJMAKERS, 2009; SANCAR et al., 2004). Estima-se que 100.000 lesões por dia são geradas no genoma dos mamíferos em consequência de erros de duplicação e produtos próprios do metabolismo (HOEIJMAKERS, 2009). Dentre as várias lesões geradas no DNA, acredita-se que cerca de 10.000 são danos de bases oxidadas e quebras de fita simples. As alterações no genoma podem provocar mudanças de uma única base ou mudanças mais complexas, incluindo deleções, fusões, translocações e aneuploidias. Em última análise, tais alterações podem levar à morte celular de organismos unicelulares ou alterações degenerativas, bem como envelhecimento dos organismos multicelulares. Além disso, os danos no DNA podem perturbar o estado

de equilíbrio celular e ativar ou amplificar algumas vias bioquímicas que regulam o crescimento e a divisão celular, assim como vias que ajudam a coordenar a duplicação do DNA com a remoção de danos (SANCAR et al., 2004).

Segundo os trabalhos revisados em Wiseman e Haliwell (1996), as reações endógenas que também contribuem para o contínuo dano ao DNA são as reações de oxidação, metilação, depurinação e deaminação. Por outro lado, os responsáveis por danos exógenos ao material genético incluem os agentes físicos, químicos e biológicos, como por exemplo a luz ultra-violeta (UV), radiações ionizantes (RIs), metais pesados, agentes poluentes, vários tipos de medicamentos, incluindo os compostos antitumorais e os de ação anti-inflamatória (LINDAHL, 1993; SANCAR et al., 2004).

As RIs produzem uma ampla variedade de lesões no DNA, dentre elas as quebras de fita dupla (*double strand breaks*, DSBs), sendo essa o tipo de dano mais deletério ao DNA (HOEIJMAKERS, 2009) e por isso são consideradas as maiores responsáveis por desencadear a morte celular (HUHN et al., 2013). Quando as DSBs não são devidamente reparadas, estas contribuem para a formação de aberrações cromossômicas e o acúmulo de mutações, que muitas vezes podem levar a alterações na fisiologia e metabolismo celular, sendo que genes de várias classes podem ser afetados, incluindo os reguladores do ciclo celular, da transcrição e tradução, entre outros processos (JACKSON e BARTEK, 2009). As DSBs podem ser induzidas de forma direta por ação das RIs, por enzimas com atividade de endonuclease, ou por compostos químicos diversos; podem ser causadas de forma indireta por meio da indução de quebras de fita simples (*single strand breaks*, SSB), as quais são reparadas de forma errônea, resultando em quebras duplas secundárias (PENG e LIN, 2011). As RIs e a luz UV proveniente dos raios solares podem induzir até 105 lesões no DNA (dímeros de pirimidina e 6-4 foto-produtos) por célula por dia (HOEIJMAKERS, 2009).

Os agentes químicos usados na quimioterapia, tais como os agentes alquilantes, Metil-metanosulfonato (MMS), Temozolomida (TMZ) e inibidores de topoisomerasas, também podem causar uma variedade de lesões no DNA ao induzirem as SSBs ou DSBs. (CICCIA e ELLEDGE, 2010; HOEIJMAKERS, 2009).

No entanto, o genoma dos organismos possuem informações que codificam a proteção do seu próprio material genético, garantindo a sua integridade (LINDAHL e WOOD, 1999; WOOD et al., 2001). A grande variedade de agentes

causadores de danos no DNA seria um problema para as células se elas não tivessem uma eficiente capacidade de reparo do DNA lesado, conforme será abordado a seguir.

1.3 Vias de reparo do DNA (SSBs e DSBs)

Vários mecanismos de reparo do DNA e de controle do ciclo celular (*checkpoints*) atuam em conjunto para manter a integridade do genoma das células danificadas, sendo que em células eucarióticas, tem sido relatado cinco tipos principais de mecanismos: reparo por recombinação homóloga (*HR: Homologous Recombination*), reparo por recombinação não-homóloga (*NHEJ: Non-Homologous End-Joining*), reparo por excisão de base (*BER: Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (*NER: Nucleotide Excision Repair*) e reparo de pareamento errôneo (*MMR: Mismatch Repair*) (ALBERTS et al., 2002; HELLEDAY, 2010; PENG e LIN, 2011; SANCAR et al., 2004). Todos os tipos mencionados são importantes para a sobrevivência dos organismos, mas no presente trabalho serão abordados os processos de reparo de quebras duplas induzidas no DNA.

Basicamente, a sinalização em resposta a danos no DNA ocorre por mecanismos de transdução de sinais que se iniciam com proteínas “sensoras”, tais como ATM, ATR e DNA-PK, pertencentes à família de proteínas quinases relacionadas à família das PI3K (fosfatidilinositol 3-quinases), as quais estão localizadas no topo da cascata de sinalização. A ATM é conhecida como a principal ativadora primária do reparo de DSBs (ROUSE e JACKSON, 2002; SHILOH, 2003, 2003b). Essas proteínas sensoras detectam o dano e/ou alterações na cromatina e em seguida, transmitem um sinal para moléculas “transdutoras”, as quais conduzem os sinais para numerosos “efetores” envolvidos em vias específicas (ANDERSON e CARTER, 1996; LEES-MILLER, 1996; PENG e LIN, 2011; SIRBU e CORTEZ, 2013).

O complexo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) também atua como um sensor inicial para DSBs, recrutando e ativando ATM. Ambos, ATM e DNA-PK podem fosforilar a proteína H2AX, gerando a H2AX fosforilada (γ -H2AX) como primeiro passo no processo de sinalização (UZIEL et al., 2003). Segundo Shiloh (2003), ATM é o transdutor primário de alarme para DSBs, sendo rapidamente ativada, causando a fosforilação de vários substratos que possuem papéis fundamentais nas vias de resposta ao dano, como a TP53, H2AX, CHK2, RPA e BRCA1.

Em resposta às DSBs induzidas no DNA, as células eucarióticas podem ativar especificamente dois tipos de mecanismos de reparo: HR e NHEJ (**Figura-1**) (PENG e LIN, 2011). A maioria das células e organismos deficientes em recombinação exibem um aumento na sensibilidade a agentes danosos ao DNA, tais como raios-X, agentes alquilantes e agentes indutores de *crosslinks* (DEN BOSCH et al., 2002) e as RI (SAKAMOTO-HOJO e BALAJEE, 2008).

Figura 1: Vias de reparo de DSBs e principais proteínas envolvidas. **A:** Reparo por Recombinação Homóloga (HR); **B:** Reparo por recombinação não homóloga (NHEJ) (adaptado de PENG e LIN, 2011).

1.3.1 Reparo por Recombinação Homóloga (HR)

O reparo HR é a principal via que contribui para a manutenção da integridade genômica ao longo das gerações (pelo processo de meiose) e também durante o desenvolvimento ontogênico (DRAKE et al., 1998). Dessa forma, o reparo HR, desempenha papel fundamental na divisão meiótica, ao estabelecer a conexão física entre os cromossomos homólogos (garantindo a correta disjunção na primeira

divisão meiótica) e também no ciclo celular mitótico da maioria dos organismos eucariotos, por reparar DSBs provocadas por colapsos na forquilha de duplicação, seja por danos espontâneos de processamento ou por agentes externos causadores de danos (SYMINGTON, 2002).

A via HR pode ser conceitualmente dividida em três estágios: pré-sináptico, sináptico e pós-sináptico, tendo como a principal proteína de reparo a RAD51, a qual promove a invasão da fita homóloga e o pareamento homólogo entre as fitas complementares de DNA (BAUMANN et al., 1996; BENSON et al., 1994).

Em humanos, o HR envolve a ação de proteínas sinalizadoras de dano MRE11-RAD50-NBS1, complexo MRN (UZIEL et al., 2003), CtIP (proteínas transportadores de colinas responsáveis pela ressecção de DSBs), e a atividade helicase da BLM (cuja deficiência é responsável pela *Síndrome de Bloom*) (HEYER et al., 2010). Após as proteínas sensoras reconhecerem e localizarem o dano, o mesmo é processado e é formada uma extremidade de fita simples no DNA (*single-stranded DNA*- ssDNA), a qual é estabilizada pela RPA (proteína de replicação A), uma proteína de ligação à ssDNA. (SAN FILIPPO et al., 2008).

Embora a ligação de RPA às ssDNA elimine estruturas secundárias nas fitas simples de DNA, favorecendo a posterior montagem de filamentos de RAD51, a RPA ao mesmo tempo forma uma barreira cinética que impede a ligação de RAD51 às ssDNA. Por isso, se faz necessária a participação de proteínas mediadoras que permitam a ligação de RAD51 à ssDNA revestidas por RPA e, conseqüentemente, a formação dos nucleofilamentos de RAD51 (HEYER et al., 2010; SAN FILIPPO et al., 2008), que medeiam o pareamento homólogo pela invasão e troca de fragmentos da dupla hélice de DNA (BAUMAN et al., 1996; BENSON et al., 1994; GUPTA et al., 1997). Em mamíferos, as proteínas conhecidas como mediadoras são os parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D), XRCC2 e XRCC3. Essas proteínas compartilham o núcleo proteico com RAD51 mas não são capazes de catalisar as mesmas reações de pareamento tal como a RAD51 (HEYER et al., 2010). Outro exemplo de proteína mediadora da formação dos filamentos de RAD51 é a proteína supressora tumoral BRCA2, deficiente em pacientes com câncer de ovário e mama. Foi relatado que essa proteína é fundamental na busca por homologia na etapa de invasão da fita de DNA, finalizando o reparo por HR e assegurando a integridade do DNA (YANG ., et al 2005).

RAD51 é altamente expressa em células proliferativas nas fases S ou G2 do ciclo celular (CHEN et al.,1997; XIA et al., 1997; YAMAMOTO et al.,1996), o que justifica a sua relevância no reparo de DSBs que ocorre durante a duplicação (XIA et al.,1997). A sua atividade pode ser detectada através de visualização de *foci* em diversos pontos do núcleo durante a fase S e em células expostas a agentes que danificam o DNA. O papel central de RAD51 na integridade de HR é fortemente embasado por alguns trabalhos que demonstram quebras cromossômicas, aberrações e letalidade celular como consequência de sua supressão (LIM e HASTY, 1996; SONODA et al.,1998; TSUZUKI et al.,1996). Segundo Welsh et al (2009), 53% dos GBM possuem elevada expressão de RAD51, o mesmo ocorrendo para outros tipos de células tumorais , demonstrando sua relevância também na iniciação ou na progressão do processo da tumorigênese (RICHARDSON, 2005).

1.3.2 Reparo por Recombinação Não Homóloga

A via clássica (ou canônica) do reparo por NHEJ (C-NHEJ) é altamente conservada entre os eucariotos (CHIRUVELLA et al., 2013), sendo uma das vias destinadas ao reparo de DSBs, principalmente as causadas pelas RIs (BOECKMAN et al.,2005). A desregulação de algumas proteínas obrigatórias e específicas dessa via, como a ligase 4 (LIG4), causa a síndrome LIG4, letal em mamíferos (CHIRUVELLA et al., 2013; FRANK et al., 2000; RUCCI et al.,2010), destacando a grande relevância da via C-NHEJ.

Na via C-NHEJ, as proteínas ATM e H2AX fosforilada (γ -H2AX) exercem papéis tanto de sensoras como mediadoras, sendo recrutadas nos sítios de lesões no DNA, permitindo a formação do arcabouço de reparo nesses locais. Após a ligação de ATM e γ -H2AX, o complexo Ku em forma de anel (proteínas Ku70 e Ku80) é recrutado e envolve as fitas de DNA; esse complexo atua como um sítio de ancoragem para as proteínas que, de fato, finalizarão o reparo, isto é, as DNA-PKs (*DNA-dependent protein kinase*). As proteínas DNA-PKs se posicionam em ambas as extremidades da fita lesada de DNA, formando uma ponte de tal forma a proteger e aproximar as extremidades da quebra dupla do DNA. As DNA-PKs são então fosforiladas e passam a recrutar a nuclease Artemis, que se liga à subunidade

catalítica da DNA-PKcs, sendo também fosforilada por ATM e pela DNA-PK. Após essas proteínas estarem devidamente fosforiladas, ATM e γ -H2AX são então desfosforiladas e se separam da molécula de DNA. Com o complexo Ku formado, juntamente com as DNA-PKcs, o conjunto que finalizará o reparo é recrutado. A enzima LIG4 e a XRCC4 terminam de ligar as extremidades danificadas, completando o reparo da DSB (COLLIS et al., 2005; HARTLEY et al., 1995; MOLL et al., 1999; SANCAR et al., 2004).

1.3.3 Reparo alternativo por Recombinação não homóloga (A-NHEJ)

O NHEJ alternativo (A-NHEJ, a-NHEJ ou alt-NHEJ) é o terceiro e mais recente mecanismo de reparo de DSBs relatado na literatura, também conhecido por outros nomes (micro-homologia mediada MMEJ ou backup NHEJ - b-NHEJ). O A-NHEJ foi descoberto em fungos e em mamíferos quase que ao mesmo tempo, como um sistema de *backup* capaz de reparar DSBs em células deficientes para um ou mais fatores principais do C-NHEJ. (BOULTON e JACKSON, 1996; DERIANO e ROTH, 2013; KABOTYANSKI et al., 1998; LIANG e JASIN, 1996).

Como citado anteriormente, a ausência de qualquer componente das vias de reparo compromete a eficiência das mesmas, assim também ocorre com as proteínas da via do reparo C-NHEJ. No entanto, alguns autores mostraram que mesmo na ausência de alguns componentes do C-NHEJ, como DNA-PK ou até mesmo da LIG4 (ligase específica da via C-NHEJ), a maioria das DSBs induzidas por RIs, as quais tendem a ser reparadas em poucos minutos por C-NHEJ, foram reparadas utilizando uma via alternativa do NHEJ (PERRAULT et al., 2004; TAKATA et al 1998), a qual foi demonstrada operar com uma cinética de reparo 20 a 30 vezes mais lenta que a C-NHEJ (DIBIASE et al., 2000b; WANG et al., 2001b, 2001c).

Em todos os sistemas estudados, há uma porcentagem residual de A-NHEJ observada quando a via C-NHEJ está inoperante (quimicamente ou geneticamente comprometida), a qual atua como um *backup* para remover praticamente por completo todas as DSBs, embora com baixa cinética (DIBIASE et al., 2000b). A-NHEJ é independente de Ku e XRCC4 (FRANK et al., 1998) e está frequentemente

associado com a formação de anormalidades cromossômicas, como as deleções, translocações e inversões, apresentando elevadas taxas de mutações (BOBOILA et al., 2010; ILIAKIS et al., 2007; SIMSEK e JASIN, 2011; SIMSEK et al., 2011; ZHANG e JASIN, 2011) o que provoca o aumento da instabilidade genômica. A via alternativa de reparo é considerada altamente propensa a erro (*error-prone*) (SCHIPLER e ILIAKIS, 2013), fato este que pode contribuir para o desenvolvimento do câncer, o qual está diretamente relacionado à instabilidade cromossômica (BOVERI, 2008).

Inicialmente, alguns autores definiram três características específicas do A-NHEJ: a primeira como já citada (CHIRUVELLA et al., 2013), referindo-se às grandes deleções e frequente micro-homologia, a segunda referindo-se ao aumento das taxas de translocações cromossômicas, devido ao fato de que essa via é menos fidedigna que a C-NHEJ. A terceira característica dessa via alternativa seria a sua ocorrência apenas em células deficientes para C-NHEJ (GUIROUILH-BARBAT et al., 2007; SIMSEK e JASIN, 2010; ZHU et al., 2002). No entanto, a posterior descoberta de A-NHEJ em células proficientes para C-NHEJ, indicou que essa via não é simplesmente uma via de *backup* utilizada pelas células para sobreviver na ausência de C-NHEJ, conforme suposto inicialmente (DERIANO e ROTH, 2013). O A-NHEJ também atua em células selvagens para C-NHEJ quando este falha ou por razões desconhecidas (ILIAKIS et al., 2004; MLADENOV e ILIAKIS, 2011).

Ambas as vias C-NHEJ e A-NHEJ operam de forma complementar e cooperam para remover DSBs induzidas por radiações em uma ordem hierárquica bem definida, onde C-NHEJ é predominante e remove a maioria das DSBs (DIBIASE et al., 2000b). A ávida ligação de DNA-PKcs às extremidades de DNA pode explicar como C-NHEJ predomina em relação ao NHEJ *in vivo*. A completa inibição do A-NHEJ observada em análises bioquímicas com excesso de DNA-PKcs, sugere que o C-NHEJ possui uma considerável vantagem cinética sobre o alternativo e quando o número de extremidades de DNA excede o número de moléculas DNA-PKcs na reação, as extremidades que permanecem livres tendem a ser processadas por mecanismos independentes de DNA-PK, ou seja pelo A-NHEJ (PERRAULT et al., 2004).

Em geral, o C-NHEJ é mais rápido (tempo médio de reparo de 5 a 30 minutos), requer DNA-PKcs, Ku, LIG4 e provavelmente XRCC4 e religa as extremidades de DNA sem excessivas degradações (WANG et al., 2001b; 2003). A-

NHEJ, por outro lado, é lento (tempo médio de reparo de 2 a 20 horas), pode envolver degradação de extremidades de DNA (LOBRICH et al., 1995), opera mais eficientemente durante a fase G2 do ciclo celular (WU et al., 2008) e utiliza-se de componentes ainda desconhecidos (CHIRUVELLA et al., 2013; WANG et al., 2001b, 2001c; 2003). Apesar dos eventos moleculares do processo de iniciação de A-NHEJ ainda não estarem totalmente esclarecidos, algumas proteínas já conhecidas parecem ser fundamentais também na sinalização e reparo do A-NHEJ (BOBOILA et al., 2012).

Baseado no mecanismo de C-NHEJ, a reação de A-NHEJ pode ser dividida em alguns passos: primeiro, as duas extremidades de DNA devem ser reconhecidas e mantidas juntas; segundo, apesar de algumas vezes desnecessário, a maioria das extremidades livres de DNA requer processamento para se manterem capazes de se ligarem novamente. Várias enzimas podem participar nesse passo, como por exemplo, vários tipos de nucleases, dRP liases, quinases, fosfatases, helicases e polimerases. Terceiro, o passo final requer uma DNA ligase, que em mamíferos dependeria de DNA ligase III (LIG3) e /ou DNA ligase I (LIG1) (FRIT et al 2014) (**Figura 2**). A definição de qual ligase estaria de fato implicada na via A-NHEJ ainda é uma questão bastante discutida no meio científico. Segundo Paul et al (2013), a LIG1 também tem um papel funcional na via A-NHEJ, intercalando com a LIG3. Porém, experimentos *in vitro* apontam uma função da LIG3 na via A-NHEJ, como sendo a ligase mais importante do A-NHEJ em mamíferos (AUDEBERT et al., 2004; CHIRUVELLA et al., 2012; SALLMYR et al., 2008; SIMSEK et al., 2011; WANG et al., 2005), o que necessita ainda ser melhor elucidado.

A LIG3 funciona em um complexo com XRCC1 e é regulada por PARP-1 (MCKINNON e CALDECOTT, 2007). Como um co-fator da LIG3, a XRCC1 seria uma das proteínas possivelmente envolvida no reparo alternativo (AUDEBERT et al., 2004; SARIBASAK et al., 2011), apesar de estudos recentes sugerirem que XRCC1 pode ser dispensável para o A-NHEJ (BOBOILA et al., 2012).

Devido à ação da PARP-1 em regular o complexo LIG3/XRCC1, a sua participação na via alternativa é defendida por alguns autores, que afirmam o seu papel em recrutar os fatores de reparo (AUDEBERT et al., 2004; DELLA-MARIA et al., 2011), os quais competem pelas extremidades de DNA livres com o heterodímero Ku do C-NHEJ; a PARP-1 tem sido implicada também em sinalizar o dano no A-NHEJ (ARAVIND e KOONIN, 2001), podendo ainda interagir com ATM (AGUILAR-

QUESADA et al., 2007) e o complexo MRE11 (BENTLEY et al., 2009). O possível envolvimento de MRE11 no A-NHEJ reforça a suposição de que o processamento das extremidades de DNA é um passo importante na via alternativa, conforme demonstrado nos trabalhos de Dinkelman et al. (2009). Dessa forma, os reparos A-NHEJ e HR compartilham mecanismos comuns de ressecção inicial das extremidades de DNA promovidos pelas nucleases MRE11 e CtIP (DINKELMANN et al., 2009; RASS et al., 2009; ZHANG e JASIN, 2011).

Figura 2: Esquema das possveis protenas envolvidas na via A-NHEJ e sua seqncia de eventos: reconhecimento e sinapse, processamento e ligao. As protenas destacadas entre parnteses podem variar entre os diferentes organismos. (adaptado de FRIT et al., 2014).

Evidncias apontam a presena de micro-homologias nos pontos de quebras participao do A-NHEJ em neoplasias hematolgicas e em alguns tumores slidos (FRIT et al., 2014). Segundo Truong et al. (2013), as clulas tumorais parecem utilizar de forma mais significativa o reparo A-NHEJ relativamente s clulas normais, sugerindo a participao dessa via susceptvel ao erro no processo de carcinognese. O desequbrio entre C-NHEJ e A-NHEJ, favorecendo o reparo alternativo, contribui de forma relevante para este ltimo, de forma a aumentar a instabilidade genmica das clulas (FRIT et al., 2014).

1.4 Inibidores de proteínas da via HR

O estudo da via de reparo HR em mamíferos, como já citado anteriormente, é de extrema relevância, pois a maioria das proteínas de HR são essenciais para a viabilidade celular e manutenção da integridade do genoma. Partindo dessa premissa foram desenvolvidas pequenas moléculas inibidoras da via HR, como uma alternativa para o estudo dos mecanismos envolvidos nesse processo, os quais poderiam ser alvos de intervenção para sensibilizar as células tumorais aos agentes antitumorais. Considerando que os quimioterápicos e as radiações atuam de forma a induzir DSBs e *crosslinks* no DNA, os moduladores de HR podem ser estudados visando futuras aplicações na área clínica (HUANG e MAZIN, 2014).

RAD51 é a principal proteína da via HR, encontrada superexpressa em muitos tipos de tumores e também em células transformadas (HANNAY et al., 2007; HINE et al., 2008; MAACKE et al., 2000; RADERSCHALL et al., 2002; THACKER., 2005). Esse alto nível de expressão está associado com o aumento na resistência a quimio e radioterápicos (RADERSCHALL et al., 2002; VISPÉ et al., 1998; XU et al., 2005). Por outro lado, estudos de inibição de Rad51 por oligonucleotídeos antisense mostraram uma diminuição da radio-resistência em células de rato *in vitro* e *in vivo* (TAKI et al., 1996), bem como aumento da mortalidade de células Hela por danos causados pela cisplatina (ITO et al., 2005). Logo, RAD51 foi reconhecida como sendo um importante alvo para o desenvolvimento de possíveis moléculas inibidoras, com potencial para ser testada como alvo molecular na terapia do câncer (HUANG e MAZIN, 2014).

Nos últimos anos, várias moléculas foram descritas com a capacidade de inibir RAD51 (TAKAKO et al., 2009), entretanto, a maioria destas só puderam ser usadas em testes da atividade de RAD51 *in vitro*. Huang e colaboradores (2011) identificaram um inibidor (B02) com alta especificidade pela RAD51, a partir de um *screening* de aproximadamente 200.000 compostos. Em 2012, o mesmo grupo demonstrou que o inibidor B02 impedia a ligação de RAD51 ao DNA e a formação dos filamentos nucleoprotéicos durante o reparo HR, mostrando que o inibidor tem efeito no reparo de células humanas e de ratos, provando ainda que este, associado à cisplatina, foi capaz de sensibilizar células HEK. Na mesma época, Budke et al. (2012) partindo de uma biblioteca de aproximadamente 10.000 moléculas pela técnica de *High throughput screening*, buscando compostos que modificassem a

ligação de RAD51 as ssDNA, identificaram um inibidor chamado RI-1 (RAD51 Inhibitor II, 3-Chloro-1-(3,4-dichlorophenyl)-4-(4-morpholinyl)-1H-pyrrole-2,5-dione) que inativa RAD51 de forma direta através da ligação proteína-proteína, a qual é essencial para a formação de filamentos e atividade de recombinação. Experimentos em fibroblastos imortalizados mostraram que RI-1 inibe HR e sensibiliza células tumorais na presença da Mitomicina C, a uma concentração aproximada de 25 μ M. O RI-1 também gerou efeito sinérgico em células mutantes para a RAD51C e com um menor efeito em células suplementadas com RAD51 (BUDCKE et al., 2012, 2012b).

RI-1 ([®]Calbiochem) apresenta fórmula molecular, C₁₄H₁₁Cl₃N₂O₃ (**Figura 3**), massa molecular de 361,6 KDa, possuindo em sua estrutura o grupamento de Cloromaleimido, o qual reage com o grupo tiol da cisteína, seguido de reações químicas conjugadas de adição-eliminação. Um produto derivado do RI-1 permeável às células (1H-Pyrrole-2,3dione), apresenta uma meia-vida de reatividade relativamente curta em meio de cultura e em soluções aquosas contendo componentes sulfidrilas. Ele se liga covalentemente e irreversivelmente aos resíduos de cisteína 319 no domínio N-terminal de RAD51 humana, desestabilizando a interface de interação proteína-proteína (BUDKE et al., 2012, 2012b), impedindo a formação de *foci* subnuclear de RAD51 após danos no DNA, sem afetar a proteína de replicação (RPA), sendo que seu IC₅₀ encontra-se na faixa de 5 a 30 μ M (BUDKE et al., 2012b).

O desenvolvimento de inibidores de HR alvejando células tumorais com defeitos genéticos específicos nos mecanismos de reparo representa uma oportunidade importante em otimizar as estratégias terapêuticas já existentes e em descobrir novas relações de letalidade sintética (quando mais de duas vias de reparo estão comprometidas). Muitos desafios na área da letalidade sintética ainda estão sendo superados (PEG e LIN, 2011).

Dessa forma, os estudos envolvendo a dupla inibição de vias de reparo do DNA ainda são necessários. Assim, a hipótese do trabalho baseia-se na ideia de que o comprometimento simultâneo das principais vias de reparo para DSBs (HR e C-NHEJ) parece ser um alvo importante em termos de estratégia terapêutica. Portanto, no presente trabalho, a proposta consistiu em investigar os efeitos do inibidor de HR (RI-1) em células comprometidas ou não para C-NHEJ associado à irradiação com raios-X. Ainda, análises adicionais foram propostas na busca de

dados relevantes que possam contribuir para o esclarecimento do mecanismo de reparo da via A-NHEJ, que ainda permanece pouco esclarecida.

Figura 3 - Estrutura química do inibidor RI-1(BUDCKE et al., 2012b)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

Avaliar as respostas celulares à irradiação com raios-X em linhagens de GBM proficientes e deficientes para DNA-PK (M059K e M059J, respectivamente) em associação com o inibidor de RAD51 (RI-1), focalizando também o estudo da expressão de alguns genes de reparo de quebras duplas no DNA.

2.2. *Objetivos específicos*

1) Avaliar a cinética de reparo das DSBs nas linhagens M059K e M059J em resposta à irradiação com raios-X, pela aplicação do ensaio de imunofluorescência para a detecção de *foci* de γ -H2AX.

2) Avaliar as taxas de sobrevivência por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica em células M059K e M059J irradiadas com raios-X (0,25 a 2Gy), em associação ou não com o inibidor de RAD51, RI-1 (5 a 30 μ M).

3) Analisar a progressão das células no ciclo celular e morte celular por apoptose (método sub-G1), nas linhagens M059K e M059J irradiadas e tratadas com o inibidor de RAD51.

4) Verificar a expressão ao nível protéico (*Western-Blot*) de algumas proteínas de reparo nas linhagens M059K e M059J irradiadas e tratadas com o inibidor de RAD51 .

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Celulares

Foram utilizadas duas linhagens celulares isogênicas de Glioblastoma (M059K e M059J), proficientes e deficientes respectivamente para DNA-PK, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Estados Unidos) e cedidas gentilmente pelo professor A.S. Balajee (Universidade de Columbia, NY-Estados Unidos).

3.2. Cultivo Celular

As linhagens celulares, previamente mantidas congeladas em nitrogênio líquido (-195°C), foram cultivadas em monocamada, em meio HAM-F10 + DEM (*Sigma Aldrich*) e 10% de soro bovino fetal (SBF- Cultilab), a 5% de CO₂ e a 37°C, até atingirem o estado de semiconfluência sendo posteriormente subcultivadas e preparadas para os experimentos.

3.3. Inibidor de RAD51 e Radiação

O inibidor utilizado no presente trabalho foi o RI-1 (*RAD51 Inhibitor II*, 3-Chloro-1-(3,4-dichlorophenyl)-4-(4-morpholinyl)-1H-pyrrole-2,5-dione) ® *Calbiochem*. Inicialmente foi preparada uma solução estoque a 100 mM do RI-1, diluído em DMSO, sendo a solução estocada na ausência de luz a -20°C. Posteriormente, o inibidor foi diluído novamente a uma concentração de 1 mM, a qual foi utilizada para preparo das diluições de trabalho. As células foram irradiadas no setor de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, sob supervisão do físico responsável. O aparelho utilizado foi o *RS 2000 Biological Research Irradiator (Rad Source)*, emissor de raios-X destinado apenas para pesquisas científicas. As células foram irradiadas com doses de 0,25 a 4,0 Gy a uma taxa de dose de 1,15 Gy/min.

3.4. Teste de Sobrevivência Clonogênica

Foram semeadas 1000 células por tratamento em triplicata em placas de cultivo (6 poços), sendo incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24 h antes de serem tratadas com inibidor RI-1 (5 a 30µM) e irradiação (0,25 a 2Gy). Após tratamentos, as células foram incubadas em estufa por aproximadamente 12 a 15 dias. Foram contadas as colônias com 50 células ou mais, coradas com Giemsa (1:20) e analisadas com o auxílio de uma lupa. Nesse ensaio, foram calculadas e comparadas as médias das triplicatas de cada um dos três experimentos independentes para cada linhagem gerando assim as curvas de sobrevivência. Os resultados foram analisados pelo test-t de *Student* e *Mann-Whitney Rank Sum Test* sendo $p < 0,05$ o valor considerado como significativo.

3.5. Cinética do Ciclo Celular e Apoptose pelo método sub-G1

Para proceder a análise do ciclo celular, foram semeadas 30.000 a 50.000 células em placas de cultivo (6 poços) e incubadas em estufa a 37°C. Após 24h, as células foram tratadas com o inibidor RI-1 (40 µM), sendo que após 1h estas foram irradiadas com 4 Gy de raios-X. As células foram então coletadas em diferentes tempos, 24, 48 e 72 h após a irradiação. No momento da colheita o meio foi removido e armazenado, as células foram lavadas com PBS (1X), tripsinizadas e coletadas juntamente com o meio previamente armazenado. As células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante (meio de cultura) foi removido e as células foram lavadas com PBS, sendo então novamente centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos). Após a centrifugação, o PBS foi removido e o precipitado de células foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 70% gelado, e mantido a -20° C até o momento da leitura no citômetro de fluxo. Antes de se proceder a leitura das amostras, o material armazenado à -20° C foi centrifugado (1000 rpm por 5 minutos) e o etanol 70% foi removido. O precipitado foi ressuspensionado em 1mL de PBS gelado e novamente centrifugado (1000 rpm por 5 minutos). Seguido à centrifugação, o PBS foi removido e as células foram

ressuspendidas em 200 µL de solução de iodeto de propídeo. Após um período de incubação de 30 minutos ao abrigo da luz, o material foi analisado utilizando o citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System (Guava Technologies)* através do *Guava CytoSoft 4.2.1 Software Environment (Guava Technologies)*. A análise de detecção de morte celular por apoptose (determinação do conteúdo sub-G1) foi realizada ao mesmo tempo e nas mesmas amostras utilizadas para análise do ciclo celular.

3.6. Detecção de gamma-H2AX por Imunofluorescência (p-H2AX^{Ser139})

Foram semeadas 100.000 células sobre lamínulas (22x22mm) e incubadas em estufa a 37°C. Após 24h as células foram irradiadas com 2 Gy e então fixadas nos tempos de 15, 30, 60 minutos e 24 h após a irradiação. As células foram fixadas (PBS-paraformaldeído 3% e sucrose 2%) por 10 minutos em temperatura ambiente (TA), sendo posteriormente lavadas com PBS (1X) e permeabilizadas (PBS-Triton X-100 0,5%) por mais 10 minutos em TA. Após lavagem as células foram incubadas em PBS-BSA 2% contendo anticorpo primário anti-rabbit p-H2AX (*Santa Cruz Biotechnology*) na proporção de 1:800 por 30 minutos a 37°C e posteriormente lavadas. 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 3 lavagens com PBS (1X). As células então foram coradas com DAPI (corante fluorescente do DNA) a 0,15 µg/ml na ausência de luz por 10 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas contendo *Vectashield (Vector Labs)* e analisadas em microscópio de fluorescência.

As imagens foram fotografadas em microscópio de fluorescência *Zeiss (Apotome.2)* e analisadas pelo software *ImageJ 1.43u* (software de domínio público desenvolvido por *Richard Stallman in 1986*).

3.7. Expressão protéica por *Western-Blot*

3.7.1. Extração de proteínas

Para a extração de proteínas foi utilizado o reagente *ProteoJT™ Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas Life Sciences)*. Foram semeadas 1×10^6 células em frasco de 25cm² e incubados por 24h até o tratamento com inibidor RI-1 e radiação. Nos tempos determinados, as células foram tripsinizadas e lavadas uma vez com PBS gelado. Posteriormente, foi adicionada a solução de lise gelada (20 vezes o volume do precipitado celular) com 1% de inibidores de proteases *Halt™ Protease Inhibitor -Cocktail Kit (Thermo Scientific)*. As células foram ressuspensas por agitação rápida e permaneceram por 10 minutos a temperatura ambiente no agitador rotatório (900-1200rpm). Logo após, as células foram centrifugadas a 18.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e estocado a -80°C. As proteínas foram detectadas e quantificadas em um espectrofotômetro, utilizando-se o *Kit BCA Protein Assay (Pierce -Thermo Scientific)* pela comparação colorimétrica com uma curva-padrão obtida para uma proteína já conhecida, BSA: Soro albumina bovina.

3.7.2. Eletroforese de proteínas

O perfil das proteínas foi analisado utilizando-se géis Bis-Tris com dimensões 8 x 8x 0,1cm (*Invitrogen*). As amostras foram preparadas com 30µg de proteína, as quais foram desnaturadas a 90°C por cinco minutos e posteriormente aplicadas no gel. O lisado total de Hela foi utilizado como controle positivo. Os marcadores de peso molecular empregados foram *Magic Mark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen)* e *Spectra Multicolor (Pierce-Thermo Scientific)*. A eletroforese foi realizada a 200V por 50 minutos em cuba eletroforética (*Xcell SureLock Mini-Cell – Invitrogen*) contendo tampão SDS (*Invitrogen*).

3.7.3. Transferência Eletroforética

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas *PVDF (Invitrogen)* utilizando-se o sistema *XCell II™ Blot Module (Invitrogen)*. Os componentes da transferência foram previamente imersos em tampão de transferência antes de serem colocados na cuba. A voltagem aplicada foi de 30V por cerca de cinco horas. Para a confirmação da transferência das proteínas, os géis foram corados por 30 minutos com o corante *Simply Blue™ Safe Stain (Invitrogen)*. Posteriormente, as membranas foram lavadas e submetidas à imunodeteção.

3.7.4. 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 7 mL de solução bloqueadora e incubada durante 30 minutos em um agitador rotatório. Em seguida, a mesma foi enxaguada com 20 mL de água ultrapura durante cinco minutos e incubada “*over night*” com 7 mL da solução de anticorpo primário a 4°C. Após esse passo, foram realizadas 3 lavagens de cinco minutos com 20 mL de solução de lavagem para anticorpos. Então, a membrana foi incubada em 7 mL da solução de anticorpo secundário por 30 minutos, sendo em seguida, novamente lavada 3 vezes por cinco minutos com solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados dois enxágues com 20 mL de água por 2 minutos. Após este último, a membrana foi incubada com 5 mL de substrato cromogênico até o aparecimento de bandas roxas em sua superfície. Finalmente, as membranas foram lavadas 3 vezes em água ultrapura, sendo posteriormente secas em papel filtro. Os anticorpos empregados neste trabalho foram os seguintes: anti-mouse DNA Ligase III (proporção 1:500 - *GeneTex*), anti-mouse XRCC1 (proporção 1:200 - *Santa Cruz Biotechnology*), anti-rabbit PARP-1(1:200 - *Santa Cruz Biotechnology*) além dos endógenos anti-rabbit β -Actina (proporção 1:2000 - *Cell Signaling Technology*) ou anti-mouse β -tubulina (proporção 1:1000 - *Santa Cruz Biotechnology*), usados como controle para normalização.

As membranas foram escaneadas e as bandas foram quantificadas utilizando o programa *Gel Pro Analyzer 4 (Media Cybernetic)*, sendo os valores de expressão relativa das proteínas estudadas normalizados em relação às proteínas endógenas .

3.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo test-t de *Student* e *Mann-Whitney Rank Sum Test* sendo $p < 0,05$ o valor considerado como significativo. Para todos os ensaios foi utilizado o programa *Sigma Stat v. 3.5 (Jandel Scientific Software)*, no entanto, os gráficos foram construídos com o auxílio do software Microsoft Excel, pertencente ao pacote de programas do *Microsoft Office Professional Plus 2010 (Microsoft Corporation)*. Foram realizados três experimentos independentes, exceto para a realização do *Western blot*, para o qual dois experimentos foram conduzidos. Os resultados mostrados nos gráficos correspondem às médias dos experimentos e as barras ao desvio padrão, sendo (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de sobrevivência clonogênica

Na primeira etapa do trabalho foi realizado o ensaio de sobrevivência clonogênica para as linhagens M059J e M059K irradiadas com doses de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 Gy de raios-X, com o objetivo de verificar a dose de radiação capaz de reduzir em cerca de 30% (LD_{30}) a sobrevivência das células irradiadas. Para a linhagem M059K a dose obtida foi 1,0 Gy enquanto que para a M059J (deficiente para DNA-PK) foi 0,5 Gy (**Figura 4**). As curvas de sobrevivência evidenciam a maior radiosensibilidade da linhagem M059J em relação à M059K. As doses escolhidas com base na LD_{30} foram utilizadas posteriormente no ensaio de sobrevivência clonogênica na presença do inibidor de RAD51, o RI-1, em diferentes concentrações (10, 20 e 40 μ M), sendo este adicionado 1 hora antes da irradiação das células, na tentativa de sensibilizar previamente as células. Os resultados da sobrevivência clonogênica possibilitou estimar a equação da curva de regressão para a M059J ($Y=100,24e^{-U_{30}x}$) e M059K ($Y=105,37e^{-0,314x}$).

Figura 4: Curvas de sobrevivência clonogênica obtidas para as células M059J e M059K, 15 dias após a irradiação com diferentes doses de raios-X (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 Gy). Os valores foram comparados ao controle não irradiado e os resultados estão apresentados em escala logarítmica. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$.

Tabela 1: Porcentagens de formação de colônias nas linhagens M059J e M059K submetidas a diferentes doses de raios-X e avaliada após 15 dias. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

Linhagem	Sobrevivência Clonogênica (%) ($\pm$ Desvio Padrão)				
	Dose de Raio-X (Gy)				
	0	0,25	0,5	1,0	2,0
M059J	100 $\pm$ 0	100,5 $\pm$ 9,8	74,4 $\pm$ 9,6	53,5 $\pm$ 9,3	44,2 $\pm$ 2,6
M059K	100 $\pm$ 0	100,9 $\pm$ 41,9	85,3 $\pm$ 4,23	75,1 $\pm$ 8,47	53,4 $\pm$ 25,92

Para a linhagem M059J (**Figura 5-A**), a dose de raios-X utilizada nos tratamentos combinados foi 0,5 Gy e para a linhagem M059K (**Figura 5-B**) foi 1,0 Gy, ambas escolhidas com base na LD₃₀. Para a linhagem M059J, a concentração de 20 µM do inibidor RI-1 reduziu significativamente ($p<0,05$) o número de colônias, em relação ao grupo controle. Já a concentração de 40 µM reduziu o número de colônias (aproximadamente 50%), mas a diferença em relação ao controle não foi significativa ($p=0,1$). Nos tratamentos combinados (inibidor + irradiação), as concentrações de 10 e 40 µM reduziram significativamente ($p<0,05$) a sobrevivência celular, sendo que para a concentração de 40 µM, a redução foi cerca de 80%, indicando a interferência do inibidor na linhagem M059J.

A linhagem M059K não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, embora essas células tenham mostrado certa sensibilidade para RI-1 40µM no tratamento associado à irradiação, com uma redução de aproximadamente 60% no número de colônias.

Esses resultados indicam que o inibidor RI-1 apresentou um efeito aditivo no sentido de reduzir a capacidade reprodutiva das linhagens de GBM, M059J e M059K, sendo a linhagem M059J mais sensível ao inibidor associado à irradiação. (**Figura 5**).

Figura 5: Sobrevivência clonogênica analisada para as linhagens M059J (deficiente para DNA-PK) (A) e M059K (B), avaliadas 15 dias após tratamentos combinados, irradiação com raios-X (0,5 e 1Gy) e RI-1 em diferentes concentrações (10, 20 e 40 μ M). Os tratamentos foram comparados com o controle, DMSO (representados por um asterisco) e entre eles (representados por uma chave). Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Tabela 2: Porcentagens de formação de colônias nas linhagens M059J e M059K submetidas a diferentes tratamentos com o inibidor RI-1 (10, 20 e 40 μ M) associado ou não à irradiação, avaliadas após 15 dias. Os valores são provenientes de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

Linhagens	Sobrevivência Clonogênica (%) ($\pm$ Desvio Padrão)							
	Tratamentos							
	DMSO	0,5Gy	10 μ M	20 μ M	40 μ M	10 μ M+0,5Gy	20 μ M+0,5Gy	40 μ M+0,5Gy
M059J	100 $\pm$ 0,0	73,4 $\pm$ 16,2	83,2 $\pm$ 7,0	84 $\pm$ 5,5	55 $\pm$ 32,8	63,5 $\pm$ 5,4	53,4 $\pm$ 30,1	25,5 $\pm$ 12,7
	Tratamentos							
	DMSO	1Gy	10 μ M	20 μ M	40 μ M	10 μ M+1Gy	20 μ M+1Gy	40 μ M+1Gy
M059K	100 $\pm$ 0,0	83,6 $\pm$ 17,6	99,8 $\pm$ 3,1	79,8 $\pm$ 5,1	74,4 $\pm$ 24,1	72,3 $\pm$ 23,7	60,4 $\pm$ 22,1	41,8 $\pm$ 23,4

4.2. Cinética do Ciclo Celular e detecção de morte celular (fração sub-G1)

Para a análise da cinética do ciclo celular a dose escolhida para o ensaio foi 4 Gy, estabelecida com base na curva de regressão dos experimentos de sobrevivência clonogênica para as linhagens M059J e M059K e a concentração do inibidor RI-1 utilizada nesse ensaio foi 40 μ M (concentração que mais reduziu a sobrevivência de ambas as linhagens), sendo os resultados obtidos para três tempos, 24, 48 e 72 h (**Figura-6**).

No tempo de 24 h, o tratamento com o inibidor RI-1 causou um aumento significativo na porcentagem de células M059K em G0/G1, sendo observados 61,6% de células nessa fase, ao passo que no grupo controle obteve-se 54,2% de células (**Figura 6-A**). A irradiação (4Gy) causou um aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de células (37,4%) em G2/M para M059K, em relação ao controle (32,2%) e também um aumento na porcentagem de células M059J (34,8%) em G2/M, embora não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (22,4%).

Para o tempo de 48 h (**Figura 6-B**), em relação ao grupo controle, a proporção de células em G0/G1 também foi levemente aumentada na presença do inibidor RI-1 para ambas as linhagens, mas o aumento não foi significativo. A irradiação causou um pequeno aumento de células em G2/M apenas para a linhagem M059J, apesar de não significativo em relação ao controle.

Em 72h, a radiação reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o número de células M059K em G0/G1 (53%) quando comparado ao controle (61,7%), aumentando assim o número de células nas fases S (12,4%) e G2/M (24%) em relação aos controles (8,5% e 20,1% respectivamente) (**Figura 6-C**).

Na comparação entre os grupos, a diferença entre o tratamento com o inibidor RI-1 sozinho e o tratamento combinado foi significativa apenas para a M059K nos tempos de 24 e 72h (**Figura 6 e tabela 3**).

Em 24h, a associação do RI-1 com a irradiação causou um aumento no conteúdo de células em G2/M (32%) em relação ao RI-1 sozinho (24%) e um aumento em sub-G1 (10,6%) em relação ao RI-1 sozinho (5,15%). Em 72h a porcentagem de células em G2/M também foi aumentada para o tratamento combinado (23,2%) quando comprado ao RI-1 (19,4%).

Para ambas as linhagens a irradiação sozinha causou um aumento na porcentagem de células na fase G2/M para os tempos analisados, quando comparadas ao tratamento combinado. Esses resultados sugerem que o aumento de células observado em sub-G1 para o tratamento combinado em ambas as linhagens, foi devido apenas aos efeitos da irradiação (4Gy).

Não foram observadas diferenças na cinética do ciclo celular entre as linhagens.

Figura 6: Distribuição das células M059J e M059K em diferentes fases do ciclo celular, avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 h (A, B e C respectivamente) após tratamento. As células foram tratadas com 40 µM de RI-1, 1h antes de serem irradiadas com 4Gy. Os tratamentos foram comparados ao controle (representados por um * quando significativo) e entre eles (representados por uma chave e * quando significativo). Sendo (*), $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Os valores são provenientes de três experimentos independentes e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

Tabela 3: Porcentagens de células em diferentes fases do ciclo celular nas linhagens M059J e M059K, submetidas a diferentes tratamentos com o inibidor RI-1 associado à irradiação (raios-X). As células foram tratadas com 40 µM do inibidor RI-1 adicionado 1 hora antes de as células serem irradiadas com 4Gy. 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 da tabela destacados com (*) foram significativos em relação ao controle ($p < 0,05$). Os valores foram calculados a partir dos dados de três experimentos independentes, expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP).

Distribuição de células nas fases do ciclo celular (%) ($\pm$ Desvio Padrão)					
Tempo de coleta (h)					
24h					
Fases do ciclo celular					
Linhagens	Tratamentos	G0-G1	S	G2	Sub-G1
M059J	Controle	57,8 $\pm$ 5,5	11,3 $\pm$ 7,3	22,4 $\pm$ 2,1	8,4 $\pm$ 1,8
	RI-1 40µM	58,8 $\pm$ 4,3	11,5 $\pm$ 4,6	20,9 $\pm$ 6,1	8,3 $\pm$ 3,0
	4Gy	45,8 $\pm$ 1,6	10,8 $\pm$ 6,0	34,8 $\pm$ 3,6	8,3 $\pm$ 6,9
	RI-1 40µM + 4Gy	54,7 $\pm$ 1,8	11,7 $\pm$ 6,5	27,4 $\pm$ 3,1	6 $\pm$ 8,2
M059K	Controle	54,2 $\pm$ 1,4	9,0 $\pm$ 3,3	32,3 $\pm$ 1,6	4,6 $\pm$ 2,3
	RI-1 40µM	* 61,6 $\pm$ 2,2	9,1 $\pm$ 1,4	* 24,0 $\pm$ 1,7	5,1 $\pm$ 3,3
	4Gy	43,0 $\pm$ 5,3	10,6 $\pm$ 6,2	* 37,4 $\pm$ 1,0	10,2 $\pm$ 3,4
	RI-1 40µM+ 4Gy	48,8 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 3,2	32,0 $\pm$ 1,1	10,6 $\pm$ 2,5
48h					
Fases do ciclo celular					
Linhagens	Tratamentos	G0-G1	S	G2	Sub-G1
M059J	Controle	52,8 $\pm$ 3,3	10,4 $\pm$ 5,1	21,6 $\pm$ 3,2	15 $\pm$ 5
	RI-1 40µM	57,3 $\pm$ 1,5	10,5 $\pm$ 1,7	18,4 $\pm$ 2,5	14,2 $\pm$ 3,4
	4Gy	43,2 $\pm$ 6	7 $\pm$ 4,3	27,4 $\pm$ 0,1	23,1 $\pm$ 7,7
	RI-1 40µM + 4Gy	49 $\pm$ 4,3	7,53 $\pm$ 4	25,4 $\pm$ 1,1	17,4 $\pm$ 6,6
M059K	Controle	52,2 $\pm$ 1,7	12,5 $\pm$ 2,4	30,6 $\pm$ 2,3	4,3 $\pm$ 1,8
	RI-1 40µM	56,3 $\pm$ 4,6	12,4 $\pm$ 3,3	25,4 $\pm$ 3,6	5,6 $\pm$ 1,8
	4Gy	53,2 $\pm$ 4,4	11 $\pm$ 4,8	25,8 $\pm$ 3,1	9,8 $\pm$ 4,3
	RI-1 40µM+ 4Gy	51,4 $\pm$ 9,0	12,9 $\pm$ 2,8	26,8 $\pm$ 2,2	8,4 $\pm$ 4,2

continuação

72h					
Fases do ciclo celular					
Linhagens	Tratamentos	G0-G1	S	G2	Sub-G1
M059J	Controle	61±4,4	13,4±2,7	19,2±0,5	11,7±1,2
	RI-1 40µM	64,3±2,4	9,8±0,8	18±0,5	8,6±3,3
	4Gy	52,7±2,7	8,7±0,6	24±3,0	14,4±0,3
	RI-1 40µM + 4Gy	55,1±1,4	8,3±0,7	22,4±0,2	15,1±2,7
M059K	Controle	61,7±3,3	8,5±0,3	20,1±2	8,7±1,7
	RI-1 40µM	64,1±2,7	8,5±1,4	19,4±2,2	6,7±0,9
	4Gy	*53±3,2	12,4±6,3	24±3	10,6±6,7
	RI-1 40µM+ 4Gy	55,2±1,3	8,1±0,5	23,2±1,3	13,2±0,5

4.3. Cinética de reparo de DSBs detectas por imunofluorescência com o anticorpo para a proteína γ -H2AX

No intuito de avaliar a cinética de reparo das quebras induzidas no DNA nos experimentos com as linhagens de GBM (M059J e M059K), realizou-se o ensaio de imuno-marcação da proteína H2AX fosforilada na serina 139 (γ -H2AX) e marcada com AlexaFluor-488; esse ensaio tem sido bastante utilizado como uma ferramenta para medir a indução de quebras duplas no DNA por meio da formação de *foci* de γ -H2AX, sendo que a análise em função de diferentes tempos possibilita estimar a cinética de reparo do DNA num dado intervalo de tempo.

As células foram semeadas e 24 h depois foram irradiadas com 2 Gy (raios-X) e então fixadas nos tempos de 15, 30, 60 minutos e 24 h. Os *foci* de γ -H2AX foram analisados em microscópio de fluorescência, visualizados em verde e os núcleos na cor azul. Foram analisadas 50 células por lâmina e a quantificação dos *foci* foi realizada pelo software Image J, sendo calculadas as médias de *foci* por célula. Em ambas as linhagens, a indução de DSBs foi maior nos tempos iniciais, mas observou-se um declínio acentuado ao longo do tempo, havendo diferença na cinética apresentada pelas linhagens (**Figura 8**), sendo que a linhagem M059K mostrou valores maiores que a M059J, com exceção do tempo de 24 h.

Para a linhagem M059J, a qual é deficiente para um dos tipos de reparo de DSBs, C-NHEJ, observa-se que o número médio de *foci* de γ -H2AX por célula se manteve praticamente constante entre os tempos de 60 minutos e 24 h, enquanto que para a linhagem M059K, o número médio de *foci* de γ -H2AX sofreu uma queda drástica em função do tempo, até alcançar níveis do controle em 24 h (**Figuras 7 e 8**). Esses resultados indicam uma menor eficiência de reparo do DNA na linhagem M059J (que é deficiente para DNA-PK) em relação à M059K.

Figura 7: Células das linhagens M059J e M059K marcadas com anticorpo para a proteína H2AX fosforilada mostrando os *foci* de γ -H2AX em função do tempo, em resposta à irradiação com raios-X (2Gy). Os *foci* de γ -H2AX são representados em verde (conjugado a AlexaFluor-488) e o núcleo representado em azul (DAPI).

Figura 8: Cinética de reparo de quebras duplas no DNA pela detecção de foci de γ -H2AX nos tratamentos realizados em linhagens M059J e M059K. Foram utilizadas as médias de *foci* de γ -H2AX por célula. As células foram irradiadas com 2 Gy e fixadas após 15, 30, 60 min e 24 h. Os valores foram calculados a partir de dados de três experimentos independentes e expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\pm$ DP). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

4.4. Expressão de proteínas de reparo (Western Blot)

Com base no ensaio da cinética de reparo, foram escolhidos os tempos de 15 minutos e 24 h após a irradiação das células buscando analisar a expressão de algumas proteínas de reparo supostamente envolvidas no reparo A-NHEJ. O tempo de 15 minutos foi o que apresentou um maior número de *foci* de γ -H2AX, sendo que nesse tempo logo após a irradiação, é esperado que as proteínas de reparo sejam recrutadas para o local do dano com maior intensidade; após 24 h observou-se uma redução no número médio de *foci* de γ -H2AX em relação ao tempo de 15 minutos para ambas as linhagens (**Figura 7 e 8**). As células M059K e M059J foram tratadas com o inibidor RI-1 associado ou não à irradiação, sendo as proteínas extraídas nos tempos de 15min e 24 h após a irradiação. Após as etapas de eletroforese, transferência e imunodeteção, as membranas foram então escaneadas e analisadas. (**Figura 9**)

As bandas correspondentes às proteínas foram quantificadas por densitometria e o valor relativo foi calculado pela divisão entre o valor obtido para as proteínas estudadas (LIG3, XRCC1 e PARP-1) e o observado para β -actina ou β -tubulina, utilizadas como controle endógeno de normalização. Os valores quantitativos foram utilizados para a comparação entre os tratamentos. Não foram realizados testes estatísticos para esse ensaio.

Com relação aos níveis de expressão da LIG3, foi observado que para a linhagem M059K a irradiação diminuiu os níveis de expressão enquanto que o inibidor RI-1 causou um pequeno aumento (**Figura 10A**). Já para a M059J, a irradiação por si só causou um aumento da expressão de LIG3 e o tratamento combinado reduziu acentuadamente os níveis de expressão analisada em 15 min. em relação ao controle. Para o tempo de 24h, as linhagens responderam aos tratamentos de forma antagônica quanto à expressão da LIG3; enquanto a linhagem M059K sofreu um aumento moderado nos níveis de expressão, a M059J mostrou uma redução nos níveis de expressão dessa proteína.

Avaliando-se a expressão de XRCC1 entre as linhagens (**Figura 10-B**), observa-se que no tempo de 15 min a linhagem M059K apresentou uma diminuição nos níveis de expressão, relativamente ao grupo controle, ao contrário da linhagem M059J, na qual os tratamentos induziram um aumento nos níveis de expressão de

XRCC1, principalmente nas células tratadas apenas com o inibidor RI-1, comparados ao grupo controle. Para o tempo de 24 h, os níveis de expressão de XRCC1 nas células M059J diminuíram consideravelmente em função dos tratamentos realizados em relação ao controle. Por outro lado, a linhagem M059K não apresentou nenhuma diferença perceptível entre o controle e os grupos tratados.

A análise de expressão da proteína PARP-1 mostrou que os níveis de expressão desta diminuíram em função dos tratamentos realizados para ambas as linhagens, conforme dados obtidos no tempo de 15 minutos, exceto para a M059J tratada apenas com o RI-1, o qual causou um aumento na expressão de PARP-1 (**Figura 10-C**). No tempo de 24 horas os níveis de PARP-1 não apresentaram diferenças entre os tratamentos realizados em células M059K, enquanto que em M059J, os níveis diminuíram de forma considerável.

Observou-se que a linhagem M059K apresentou um aumento nos níveis de expressão da LIG3 no tempo de 24 horas para todos os tratamentos comparados ao controle. Já o seu par isogênico, a linhagem M059J, apresentou uma maior expressão nos níveis de XRCC1 e PARP-1 no tempo de 15 minutos na presença do inibidor de HR (RI-1) quando comparados ao controle sem tratamento (**Figura 9**). Os resultados sugerem que a linhagem M059J, deficiente para o reparo C-NHEJ, quando também comprometida para o reparo HR, pode de forma alternativa utilizar outros mecanismos de reparo envolvendo as proteínas XRCC1 e PARP-1, as quais supostamente estão envolvidas no reparo alternativo por recombinação não-homóloga (A-NHEJ).

Figura 9: Expressão das proteínas Ligase III (LIG3), XRCC1, PARP-1 analisadas por *Western blot* em células M059K e M059J tratadas com o inibidor RI-1(40μM) e irradiadas (4Gy), comparada aos respectivos controles, avaliada nos tempos de 15 minutos e 24 horas após tratamentos. β-Tubulina e β-actina foram utilizadas como controle para normalização.

Figura 10: Níveis de expressão das proteínas LIG3 (A), XRCC1 (B) e PARP-1 (C) nas linhagens M059K e M059J irradiadas (4 Gy) e submetidas ao tratamento com o inibidor RI-1(40μM), comparadas aos respectivos controles. As barras correspondem à expressão relativa obtida por densitometria das bandas avaliadas nos tempos de 15 minutos e 24 horas após tratamentos. Foram realizados dois experimentos independentes. Os valores foram normalizados em relação às proteínas β-Tubulina e β-Actina. Foi utilizado o software *Gel Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetic)*.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços na área de oncologia nas últimas décadas, os gliomas malignos ainda são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade. Novas estratégias de tratamento estão sendo estudadas com agentes antiangiogênicos, oligonucleotídeos antisense e inibidores de transdução de sinais, as quais constituem alguns exemplos das novas modalidades em fase experimental. Uma das estratégias de tratamento futuros para gliomas malignos provavelmente envolve combinações sinérgicas de agentes visando atingir alvos moleculares específicos, ou vias de controle do ciclo celular e reparo do DNA (WICK et al., 2011).

Os mecanismos de reparo das células tumorais como já relatado na literatura, são as principais causas de resistência à radio e quimioterapia (STUPP et al., 2007; 2008). O comprometimento das principais vias de reparo, como o reparo de DNA por recombinação homóloga, tem se tornado um alvo potencial em terapias contra o câncer. Como já apresentado em trabalhos anteriores, os efeitos da expressão de RAD51 (proteína central de HR) está diretamente relacionado com a resistência de células tumorais aos tratamentos convencionais. (VISPÉ et al., 1998). Conforme citado por Koehn et al. (2007) e Hannay et al. (2007), a expressão de RAD51 contribui de forma significativa à resistência de células ao quimioterápico doxorubicina. Essa observação sugere que a inibição de RAD51 através de pequenas moléculas pode aumentar a resposta aos tratamentos por reduzir a eficiência do reparo pela via HR.

Dentre as várias estratégias antitumorais, foram propostas numerosas moléculas inibidoras da atividade de RAD51 (RENODON-CORNIERE et al., 2013), sendo que uma dessas moléculas, o inibidor RI-1, foi utilizado nesse trabalho.

O RI-1 impede a formação dos nucleofilamentos da RAD51 de forma irreversível, comprometendo assim o reparo HR (BUDKE et al., 2012). Utilizando-se da característica genética de M059J (deficiente para o reparo C-NHEJ), objetivamos sensibilizar células de glioma por meio do comprometimento simultâneo das vias de reparo específicas para DSBs. Para isso primeiramente foi estabelecida a LD₃₀ para ambas as linhagens; conforme esperado, a linhagem M059J, deficiente para C-NHEJ, por não apresentar atividade da DNA-PK, mostrou-se mais sensível à radiação quando comparada a M059K, proficiente para a atividade da DNA-PK e

consequentemente para o reparo C-NHEJ. (ALLALUNIS-TURNER et al., 1995; YOSHIDA et al., 2002). Os resultados da cinética de reparo de quebras duplas no DNA detectadas pela visualização dos *foci* de γ -H2AX, confirmam a deficiência da M059J em reparar DSBs quando comparada à M059K, corroborando os dados da literatura que indicam a participação da DNA-PK no reparo de DSBs (LEES-MILLER et al., 1995). Estudos relatam que a possível radiosensibilidade da M059J estaria relacionada também a um possível comprometimento de ATM (proteína sinalizadora de dano para DSBs) e não apenas à falta da atividade da DNA-PK. (CHAN et al., 1998; HOPPE et al., 2000).

Para a linhagem deficiente para DNA-PK (M059J) a concentração de 40 μ M do inibidor reduziu a sobrevivência em até 50% e para a linhagem proficiente (M059K) a redução foi cerca de 30%. Esse resultado indica que o inibidor de RAD51 de fato pode ter causado um possível comprometimento no reparo HR para ambas as linhagens, sugerindo ainda a possibilidade de uma inibição realmente irreversível de algumas proteínas da família de RAD51, conforme citado por Budke et al. (2012).

Os efeitos do RI-1 na sobrevivência das células confirmam os trabalhos de Taki et al. (1996), no qual demonstraram que o silenciamento de RAD51 inibiu a proliferação de fibroblastos de maneira dose-dependente. Em 1998, o mesmo grupo demonstrou que a inibição de RAD51 aumentou a radiosensibilidade de células de gliomas *in vitro* e *in vivo*. (OHNISHI et al., 1998)

Diversos trabalhos recentes têm provado a eficácia da inibição de RAD51 por silenciamento gênico e destacado a inibição dessa proteína como a mais nova estratégia em sensibilizar células de gliomas (QUIROS et al., 2011; SHORT et al., 2011), confirmando a relevância dos resultados encontrados nesse trabalho.

Nos tratamentos combinados com a irradiação foi possível observar uma redução na proliferação celular também para a concentração de 40 μ M do RI-1 para ambas as linhagens, com destaque para a linhagem deficiente para o reparo C-NHEJ, (M059J), a qual apresentou uma redução significativa de aproximadamente 80% quando comparada ao controle. Ao analisar os efeitos do inibidor sozinho e associado a radiação, pode-se concluir que o RI-1 apresentou um efeito de sensibilização aditivo ao reduzir a sobrevivência das células irradiadas.

Esses resultados corroboram os dados da literatura relativos à observação de que células de GBM podem ser radiosensibilizadas pela inibição de RAD51. (OHNISHI et al., 1998; RUSSEL et al., 2003).

No trabalho de Bee et al. (2013) foi observado que as DSBs geradas na presença do RI-1 apresentaram níveis elevados em até 6h após a irradiação dos fibroblastos, comprovando o papel do RI-1 no reparo HR.

Os resultados de sobrevivência clonogênica obtidos nesse trabalho demonstram que as células M059J já comprometidas para uma das vias de reparo para DSBs (C-NHEJ) ao se depararem com a falta de ativação da via HR, também comprometida pelo inibidor, mostrou a sua sobrevivência afetada, o que foi acentuado ainda mais com a indução direta e indireta de DSBs causadas pela irradiação-X. Por outro lado, a M059K, por apresentar a via C-NHEJ intacta, a qual é responsável por remover a maioria das DSBs (DIBIASE et al., 2000b), foi mais resistente quando comparada ao seu par isogênico, com uma redução de aproximadamente 60% sob condições de tratamento combinado RI-1 + irradiação.

A presença do RI-1 associado à irradiação-X provavelmente deve ativar uma possível via alternativa ao reparo não homólogo, na tentativa de suprir a deficiência do reparo de DSBs em ambas as linhagens (DERIANO e ROTH, 2013; ILIAKIS et al., 2004; MLADENOV e ILIAKIS, 2011), podendo ser essa via mais atuante em células M059J, as quais já possuem a via C-NHEJ comprometida (DIBIASE et al., 2000b; PERRAULT et al., 2004).

Adicionalmente aos resultados de sobrevivência, a cinética do ciclo celular mostrou um aumento de células na fase G0/G1, na presença do inibidor RI-1 para ambas as linhagens em relação ao grupo controle. Esse resultado sugere que a redução da eficiência do HR pelo inibido, pode ter direcionado as células de forma mais intensa para a via C-NHEJ, a qual se apresenta funcional durante todo o ciclo celular, mas possui maior relevância em G0/G1 (LIEBER et al., 2003).

Foi relatado que as células M059J e M059K não possuem checkpoint normal em G0/G1, pelo fato de serem deficientes para o gene supressor tumoral *TP53*, (ANDERSON e ALLALUNIS-TURNER, 2000; HOLGERSSON et al., 2005). Entretanto, a grande quantidade de células em G0/G1 na presença do RI-1, explicaria a tentativa da maquinaria celular em reparar os possíveis danos causados pelo inibidor antes das células entrarem na fase S.

O fato do RI-1 causar um aumento semelhante na porcentagem de células em G0/G1, tanto para a linhagem proficiente (M059K), como para a deficiente na atividade da DNA-PK (M059J), havendo pouca diferença na cinética do ciclo celular, sugere que as células M059J podem ter contornado o problema da sua deficiência

em DNA-PK, mesmo na presença de um inibidor de RAD51, pela utilização de uma via de reparo alternativa.

Os resultados obtidos para as células irradiadas foram condizentes com os encontrados na literatura, mostrando que os danos gerados pelos raios-X provocaram um aumento de células na fase G2/M do ciclo celular para ambas as linhagens (ALLALUNIS-TURNER et al., 1997; HOLGERSSON et al., 2005).

O aumento do conteúdo de sub-G1 (indicativo de morte celular) em resposta à irradiação também corrobora os dados existentes na literatura sobre a indução de morte celular (AZZAM et al., 2012; NAMBIAR et al., 2011; WARTERS, 1992).

O tratamento RI-1 + irradiação-X quando comparado ao controle, comprometeu pelo menos parcialmente os mecanismos de reparo das células, levando à morte celular, conforme observado pelo aumento de células em sub-G1 para ambas as linhagens. No entanto, ao observar a fração sub-G1 sob os efeitos da irradiação versus tratamento combinado (RI-1 + irradiação), nota-se que o aumento de células em sub-G1 foi devido apenas aos efeitos da irradiação, não apresentando o RI-1 o efeito sinérgico esperado quanto à progressão do ciclo celular para os tempos analisados (24, 48 e 72h). Esses resultados confirmam os encontrados por Short et al. (2011), que apesar de ter obtido uma redução considerável na sobrevivência de células de GBM (T98) ao combinar raios-X, TMZ e siRNA Rad51 não encontrou nenhum sinergismo para a combinação simultânea.

Com a finalidade de obter um perfil de expressão para algumas proteínas de reparo e desta forma verificar se estas poderiam ter apresentado alterações em sua expressão devidas ao tratamento das células foram realizados ensaios de expressão para três proteínas: LIG3, XRCC1 e PARP-1.

Tais proteínas foram escolhidas com base em trabalhos recentes quanto a um possível papel de A-NHEJ como o mecanismo de reparo mais recentemente descrito em respostas a DSBs (FRITZ et al., 2014). A LIG3 atua em um complexo com XRCC1 que é regulado por PARP-1 (AUDEBERT et al., 2004; MCKINNON e CALDECOTT, 2007; MLADENOV e ILIAKIS, 2011).

Os níveis de expressão da proteína LIG3 mostraram-se elevados na presença do RI-1 para a M059K quando comparado ao controle (tempos de 15min e 24h), indicando que essa enzima, considerada um componente do reparo por excisão de base (BER) (MACKEY et al., 1999) pode ter sido recrutada também no reparo de DSBs, como sugerido por Wang e colaboradores (2005), logo nas primeiras horas,

mantendo-se elevada até 24h após o tratamento com o RI-1. Já para a linhagem M059J não se observou nenhuma expressão elevada da LIG3 na presença do RI-1, o que leva à suposição de um possível papel da LIG3 nas vias de reparo alternativo (FRITZ et al., 2014; PAUL et al 2013; SIMSEK et al., 2011) para essa linhagem.

Embora trabalhos anteriores tenham mostrado que a LIG3 e XRCC1 possam interagir física e bioquimicamente formando um complexo (CALDECOTT et al., 1994,1995,1996; MACKEY et al.,1999; MLADENOV e ILIAKIS, 2011), no presente estudo não foi possível observar perfis semelhantes de expressão destas; por exemplo, não foi observado um aumento da expressão de XRCC1 para a M059K. Por outro lado, houve um aumento na expressão de XRCC1 e PARP-1 em células M059J tratadas com o inibidor de RAD51 (tempo de 15 min). A expressão dessas proteínas em M059J corrobora os trabalhos que estudam a fase inicial do reparo A-NHEJ, sendo que esses evidenciam a participação de XRCC1 e PARP-1 nessa via alternativa (AUDEBERT et al.,2004; CALDECOTT, 2003).

A elevada expressão da PARP-1 em M059J quando comparada à M059K, provavelmente evidencia uma maior quantidade de danos nessas células, já que essa proteína possui um relevante papel de sensora e sinalizadora de danos no DNA (WANG et al., 2006). Segundo alguns autores, as proteínas XRCC1 e PARP-1 seriam fundamentais no A-NHEJ (AUDEBERT et al.,2004; CHIRUVELLA et al.,2013), embora Boboila et al. (2012) em estudos mais recentes tenham sugerido que a XRCC1 pode ser dispensável para a funcionalidade do A-NHEJ.

Analisando esses resultados para ambas as linhagens, sugere-se que um possível reparo por A-NHEJ possa atuar em resposta a danos nas células M059J, quando C-NHEJ não se apresenta funcional. No entanto, uma avaliação mais direcionada a essa via alternativa de reparo necessita ser investigada por outros métodos e análises.

O entendimento dos mecanismos específicos que de fato regulam a maquinaria celular em repostas a danos ao DNA, é de fundamental importância para o aprimoramento e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer (KELLEY e FIHEL, 2008). Embora várias moléculas participem no reparo do DNA, a RAD51 parece ser uma candidata promissora na radiosensibilização seletiva de células tumorais (RUSSEL et al.,2003), como observado no trabalho de Russel e colaboradores (2003), onde o *Gleevec* (inibidor de tirosina-kinase que regula RAD51) mostrou capacidade para sensibilizar apenas células tumorais.

As várias abordagens de inibição do reparo HR e a busca por tratamentos direcionados para alvos moleculares pode ser um complemento promissor no sentido de aumentar a eficácia das terapias contra o câncer (SHORT et al.,2011).

CONCLUSÕES

A partir dos resultados observados neste trabalho pode-se concluir que:

- A cinética de reparo de quebras duplas no DNA (DSBs), estimada pelo número médio de *foci* de γ -H2AX por células, mostrou-se menos eficiente para a linhagem M059J quando comparada com a linhagem M059K. A linhagem M059J, comprometida para o C-NHEJ devido à deficiência de DNA-PK, mostrou maior sensibilidade aos tratamentos testados com RI-1 associado ou não à irradiação-X, demonstrado pelos ensaios de sobrevivência clonogênica.
- O inibidor de RAD51 (RI-1) provavelmente pode ter comprometido a via de reparo HR, conforme esperado para ambas as linhagens, visto a sua influência nas taxas de sobrevivência clonogênica, cinética do ciclo celular e expressão das proteínas LIG3, XRCC1 e PARP-1.
- O aumento da expressão de LIG3 em M059K e XRCC1 e PARP-1 em M059J na presença de RI-1, sugere um papel relevante dessas proteínas no reparo em respostas às DSBs.
- A expressão aumentada de XRCC1 e PARP1 na linhagem M059J, indica a provável atuação da via alternativa A-NHEJ nessa linhagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-QUESADA R; MUÑOZ-GÁMEZ JA; MARTÍN-OLIVA D; PERALTA A; VALENZUELA MT; MATÍNEZ-ROMERO R; QUILES-PÉREZ R; MENISSIER-DE MURCIA J; MURCIA G; RUIZ ALMODÓVAR RM; OLIVER FJ. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. **BMC Mol Biol**. v.25, p.8-29, 2007.

ALBERTS B; JOHNSON A; LEWIS J; RAFF M; ROBERTS K; WALTER P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition, New York, Garland Science, 2002.

ALLALUNIS-TURNER J; BARRON GM; DAY RS. Intact G2-phase checkpoint in cells of a human cell line lacking DNA-dependent protein kinase activity. **Radiat Res**. v.147(3), p.284-7, 1997.

ALLALUNIS-TURNER MJ; ZIA PK; BARRON GM; MIRZAYANS R; DAY RS. Radiation-induced DNA damage and repair in cells of a radiosensitive human malignant glioma cell line. **Radiat Res**. v.144(3), p. 288-93, 1995.

ANDERSON CW; ALLALUNIS-TURNER MJ. Human TP53 from the malignant glioma-derived cell lines M059J and M059K has a cancer-associated mutation in exon 8. **Radiat Res**. v.154(4), p.473-6, 2000.

ANDERSON CW; CARTER TH. The DNA-activated protein kinase-DNA-PK. **Curr Top Microbiol Immunol**. v.217, p.91-111. 1996.

ARAVIND L; KOONIN EV. Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. **Genome Res**. v.11, p.1365–74, 2001.

AUDEBERT M; SALLES B; CALSOU P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. **J Biol Chem**. v.279(53), 2004.

AZZAM EI; JAY-GERIN JP; PAIN D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer Lett.** v.327, 2012.

BAUMANN P; BENSON FE; WEST SC. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. **Cell.** v.87(4), p.757-66, 1996.

BEE L; FABRIS S; CHERUBINI R; MOGNATO M; CELOTTI L. The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression. **PLoS One.** v.8(7), 2013.

BENSON FE; STASIAK A; WEST SC. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. **EMBO J.** v.13(23), p.5764-71, 1994.

BENTLEY J; L'HÔTE C; PLATT F; HURST CD; LOWERY J; TAYLOR C; SAK SC; HARNDEN P; KNOWLES MA; KILTIE AE. Papillary and muscle invasive bladder tumors with distinct genomic stability profiles have different DNA repair fidelity and KU DNA-binding activities. **Genes Chromosomes Cancer.** v.48(4), p.310-21, 2009.

BOBOILA C; ALT FW; SCHWER B. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. **Adv. Immunol.** v.116, p.1-49, 2012.

BOBOILA C; JANKOVIC M; YAN CT; WANG JH; WESEMANN DR; ZHANG T; FAZELI A; FELDMAN L; NUSSENZWEIG A; NUSSENZWEIG M; ALT FW. Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.107(7), p.3034-9, 2010.

BOBOILA C; OKSENYCH V; GOSTISSA M; WANG JH; ZHA S; ZHANG Y; CHAI H; LEE CS; JANKOVIC M; SAEZ LM; NUSSENZWEIG MC; MCKINNON PJ; ALT FW; SCHWER B. Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.109(7):2473-8, 2012.

BOECKMAN HJ; TREGO KS; HENKELS KM; TURCHI JJ. Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of non-homologous end joining. **Mol Cancer Res.** v. 3(5), p.277–285, 2005.

BOULTON SJ; JACKSON SP. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone. DNA repair pathways. **EMBO J.** v.15, p.5093–103, 1996.

BOVERI T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris, **J. Cell Sci.** v.121 (Suppl. 1) p.1-84, 2008.

BUDKE B; KALIN JH; PAWLOWSKI M; ZELIVIANSKAIA AS; WU M; KOZIKOWSKI AP; CONNELL PP. An optimized RAD51 inhibitor that disrupts homologous recombination without requiring Michael acceptor reactivity. **J Med Chem.** v.56(1), p.254-63, 2012b.

BUDKE B; LOGAN HL; KALIN JH; ZELIVIANSKAIA AS; CAMERON MCGUIRE W; MILLER LL; STARK JM; KOZIKOWSKI AP; BISHOP DK; CONNELL PP. RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. **Nucleic Acids Res.** v.40(15), p.7347-57, 2012.

CALDECOTT KW. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair (Amst).** .v.2(9):955-69, 2003.

CALDECOTT KW; AOUFOUCHI S; JOHNSON P; SHALL S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. **Nucleic Acids Res.** v.24(22), p.4387-94, 1996.

CALDECOTT KW; MCKEOWN CK; TUCKER JD; LJUNGQUIST S; THOMPSON LH. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. **Mol Cell Biol.** v.14(1), p.68-76, 1994.

CALDECOTT KW; TUCKER JD; STANKER LH; THOMPSON LH. Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. **Nucleic Acids Res.** v.;23(23), p.4836-43, 1995.

CHAN, DW; GATELY DP; URBAN S; GALLOWAY AM; LEES-MILLER SP; YEN T; ALLALUNIS-TURNER J. **Int. J. Radiat. Biol.** v.74, p. 217-224, 1998.

CHEN F; NASTASI A; SHEN Z; BRENNEMAN M; CRISSMAN H; CHEN DJ. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. **Mutat Res.** v.384(3), p.205-11,1997.

CHINTALA SK; SAWAYA R; GOKASLAN ZL; RAO JS. Modulation of matrix metalloprotease-2 and invasion in human glioma cells by $\alpha 3\beta 1$ integrin. **Cancer Letters** .v.103, Issue 2, p201–208, 1996.

CHIRUVELLA KK; LIANG Z; WILSON TE. Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* v.5(5),2013.

CHIRUVELLA KK; SEBASTIAN R; SHARMA S; KARANDE AA; CHOUDHARY B; RAGHAVAN SC. Time-dependent predominance of nonhomologous DNA end-joining pathways during embryonic development in mice. **J Mol Biol.** v. 417(3), p.197-211, 2012.

CICCIA A; ELLEDGE SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell.** V.40(2), p.179-204, 2010.

COLLIS SJ; DEWEESE TL; JEGGO PA; PARKER AR. **The life and death of DNA-PK.Oncogene.** p.949–961, 2005.

DELLA-MARIA J; ZHOU Y; TSAI MS; KUHNLEIN J; CARNEY JP; PAULL TT; TOMKINSON AE. Human Mre11/human Rad50/Nbs1 and DNA ligase III α /XRCC1 protein complexes act together in an alternative nonhomologous end joining pathway. **J Biol Chem.** v.286(39), p.33845-53, 2011.

DERIANO L; ROTH DB. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. **Annu Rev Genet.** v.47, p.433-55, 2013.

DIBIASE SJ; ZENG ZC; CHEN R; HYSLOP T; CURRAN WJ JR; ILIAKIS G. DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. **Cancer Res.** v.60(5), p.1245-53, 2000b.

DINKELMANN M; SPEHALSKI E; STONEHAM T; BUIS J; WU Y; SEKIGUCHI JM; FERGUSON DO. Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. **Nat Struct Mol Biol** v.16(8), p.808-13, 2009.

DRAKE JW; CHARLESWORTH B; CHARLESWORTH D; CROW JF. Rates of spontaneous mutation. **Genetics.** v.148(4), p.1667-86, 1998.

FRANK KM; SEKIGUCHI JM; SEIDL KJ; SWAT W; RATHBUN GA; CHENG HL; DAVIDSON L; KANGALOO L; ALT FW. Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. **Nature.** v.396, p.173-7, 1998.

FRANK KM; SHARPLESS NE; GAO Y; SEKIGUCHI JM; FERGUSON DO; ZHU C; MANIS JP; HORNER J; DEPINHO RA; ALT FW. DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. **Mol Cell.** v. (6):993-1002, 2000.

FRIT P; BARBOULE N; YUAN Y; GOMEZ D; CALSOU P. Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. **DNA Repair(Amst),** v.17,p.81-97, 2014.

FURNARI FB; FENTON T; BACHOO RM; MUKASA A; STOMMEL JM; STEGH A; HAHN C; LIGON KL; LOUIS DN; BRENNAN C; CHIN L; DEPINHORA, CAVENEE WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development** . v21: 2683–2710, 2007.

GARAMI M. Genetic Instability in Pediatric and Adult Brain Tumors. In: Molecular Targets of CNS Tumors. **In Tech,** 2011.

GUIROUILH-BARBAT J; RASS E; PLO I; BERTRAND P; LOPEZ BS. Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.104, 2007.

GUPTA RC; BAZEMORE LR; GOLUB EI; RADDING CM. Activities of human recombination protein Rad51. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.94(2), p.463-8, 1997.

HANNAY JA; LIU J; ZHU QS; BOLSHAKOV SV; LI L; PISTERS PW; LAZAR AJ; YU D; POLLOCK RE; LEV D. Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. **Mol Cancer Ther.** v.6(5):1650-60, 2007.

HARTLEY KO; GELL D; SMITH GC; ZHANG H; DIVECHA N; CONNELLY MA; ADMON A; LEES-MILLER SP; ANDERSON CW; JACKSON SP. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. **Cell**. v.82(5):849-56, 1995.

HELLEDAY T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. **Carcinogenesis** vol.31 no.6, p.955–960, 2010.

HEYER WD. Biochemistry of eukaryotic homologous recombination. **Top Curr Genet.** v.17, p.95-133, 2007.

HEYER WD; EHMSSEN KT; LIU J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. **Annu Rev Genet.** v.44, p.113-39. 2010.

HINE CM; SELUANOV A; GORBUNOVA V. Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.105(52), 2008.

HOEIJMAKERS JH. DNA damage, aging, and cancer, **N. Engl. J. Med.** v.361, p.1475–1485, 2009.

HOLGERSSON A; HEIDEN T; CASTRO J; EDGREN MR; LEWENSOHN R; MEIJER AE. Different G2/M accumulation in M059J and M059K cells after exposure to DNA double-strand break-inducing agents. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. v.61(3), p.915-21, 2005.

HOPPE BS; JENSEN RB; KIRCHGESSNER CU. Complementation of the Radiosensitive M059J Cell Line. **Radiation Research**, 2000.

HUANG F; MAZIN AV. Targeting the homologous recombination pathway by small molecule modulators. **Bioorg Med Chem Lett**. v.24(14), p.3006-13. 2014.

HUHN D; BOLCK HA; SARTORI AA. Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. **Swiss Med Wkly**. v.143, 2013.

ILIAKIS G; WU W; WANG M; TERZOUDI GI; PANTELAS GE . Backup Pathways of Nonhomologous End Joining May Have a Dominant Role in the Formation of Chromosome Aberrations. **Chromosomal Alterations**. p 67-85, 2007.

ILIAKIS G; WANG H; PERRAULT AR; BOECKER W; ROSIDI B; WINDHOFER F; WU W; GUAN J; TERZOUDI G; PANTELAS G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. **Cytogenet Genome Res**. v.104, p.14-20, 2004.

ITO M; YAMAMOTO S; NIMURA K; HIRAOKA K; TAMAI K; KANEDA Y. Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. **J Gene Med**. v.7(8), p.1044-52, 2005.

JACKSON SP; BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**. v.461, p.1071–8, 2009.

KABOTYANSKI EB; GOMELSKY L; HAN J-O; STAMATO TD; ROTH DB. Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. **Nucleic Acids Res**. v.26, p.5333–42, 1998.

KARSY M;HUANG T; KLEINMAN G; KARPEL-MASSLER G. Molecular, histopathological, and genomic variants of glioblastoma. **Front Biosci** (Landmark Ed). v.1;19, p1065-87, 2014.

KELLEY MR; FISHEL ML. DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. **Anticancer Agents Med Chem**. v.8(4) p.417-25, 2008.

KOEHN H; MAGAN N; ISAACS RJ; STOWELL KM. Differential regulation of DNA repair protein Rad51 in human tumour cell lines exposed to doxorubicin. **Anticancer Drugs**. v.18(4), p.419-25, 2007.

LEES-MILLER SP. The DNA-dependent protein kinase, DNA-PK: 10 years and no ends in sight. **Biochem Cell Biol**. v.74(4), p.503-12,1996.

LEES-MILLER SP; GODBOUT R; CHAN DW; WEINFELD M; DAY RS; BARRON GM; ALLALUNIS-TURNER J. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. **Science**.v.24, 1995.

LIANG F; JASIN M. Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. **J Biol Chem**. v.271, p.14405–11, 1996.

LIEBER MR; MA Y; PANNICKE U; SCHWARZ K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.4(9), p.712-20, 2003.

LIM DS; HASTY P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. **Mol Cell Biol**. v.16(12), p.7133-43, 1996.

LINDAHL T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**. v.362 p.709-15,1993.

LINDAHL T; WOOD RD. Quality control by DNA repair. **Science**. v.286, p.1897-905, 1999.

LOBRICH M; RYDBERG B; COOPER PK. Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.92(26), 1995.

LOUIS DN; OHGAKI H, WIESTLER OD, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, SCHEITHAUER BW, KLEIHUES P. The 2007 WHO Classification of tumors of the central Nervous System. **Acta Neuropathol**. v.114(2), p97-109, 2007.

MAACKKE H; OPITZ S; JOST K; HAMDORF W; HENNING W; KRÜGER S; FELLER AC; LOPENS A; DIEDRICH K; SCHWINGER E; STÜRZBECHER HW. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. **Int J Cancer**. v.88(6), p.907-13, 2000.

MACKEY ZB; NIEDERGANG C; MURCIA JM; LEPPARD J; AU K; CHEN J; MURCIA G; TOMKINSON AE. DNA ligase III is recruited to DNA strand breaks by a zinc finger motif homologous to that of poly(ADP-ribose) polymerase. Identification of two functionally distinct DNA binding regions within DNA ligase III. **J Biol Chem**. v.274(31), 1999.

MCKINNON PJ; CALDECOTT KW. DNA strand break repair and human genetic disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet**. v.8, p.37-55, 2007.

MLADENOV E; ILIAKIS G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. **Mutat Res**. v.711(1-2), p.61-72, 2011.

MOLL U, LAU R; SYPES MA; GUPTA MM; ANDERSON CW. DNA-PK, the DNA-activated protein kinase, is diferentially expressed in normal and malignant human tissues. **Oncogene**. v.18, p.3114-3126, 1999.

MRUGALA MM. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discov Med**. v.15(83), p221-30, 2013.

NAKADA M; NAKADA S; DEMUTH T; TRAN N.L; HOELZINGER D.B; BERENS ME. Molecular targets of glioma invasion. **Cell. Mol. Life Sci**. v.64 , p458 – 478, 2007.

NAMBIAR D; RAJAMANI P; SINGH RP. Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. **Mutat Res.** v.728(3):139-57, 2011.

OHGAKI H. Epidemiology of brain tumors” **Methods Mol Biol.** p.472:323-42, 2009

OHGAKI H; KLEIHUES P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol.** V.170(5), p1445-53, 2007.

OHNISHI T; TAKI T; HIRAGA S; ARITA N; MORITA T. In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. **Biochem Biophys Res Commun.** v.245(2), p.319-24, 1998.

PAUL K; WANG M; MLADENOV E; BENCSIK-THEILEN A; BEDNAR T; WU W; ARAKAWA H; ILIAKIS G. DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. **PLoS One.** v.8(3), 2013.

PENG G; LIN SY. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. **World J ClinOncol.** v. 2(2), p.73-79, 2011.

PERRAULT R; WANG H; WANG M; ROSIDI B; ILIAKIS G. Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. **J Cell Biochem.** v.92(4), p.781-94, 2004.

QUIROS S; ROOS WP; KAINA B. Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs. **PLoS One.** v.6(11), 2011.

RADERSCHALL E; STOUT K; FREIER S; SUCKOW V; SCHWEIGER S; HAAF T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. **Cancer Res.** v.62(1):219-25, 2002.

RASS E; GRABARZ A; PLO I; GAUTIER J; BERTRAND P; LOPEZ BS. Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. **Nat Struct Mol Biol.** v.16(8), p.819-24, 2009.

REIFENBERGER, G. ;COLLINS, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic Gliomas. **J MolMed.** v.82, 2004. 656–670p

REIFENBERGER G; COLLINS VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J Mol Med.** v.82(10), p.656-70, 2004.

RENODON-CORNIERE A; WEIGEL P; LE BRETON M; FLEURY F. New Potential Therapeutic Approaches by Targeting Rad51- Dependent Homologous

RICHARDSON C. RAD51, genomic stability, and tumorigenesis. **Cancer Lett.** v. 218(2), p.127-39, 2005.

ROUSE J; JACKSON SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. **Science.** v. 297, p.547-51, 2002.

RUCCI F; NOTARANGELO LD; FAZELI A; PATRIZI L; HICKERNELL T; PAGANINI T; COAKLEY KM; DETRE C; KESZEI M; WALTER JE; FELDMAN L; CHENG HL; POLIANI PL; WANG JH;BALTER BB; RECHER M; ANDERSSON EM; ZHA S; GILIANI S; TERHORST C; ALT FW; YAN CT. Homozygous DNA ligase IV R278H mutation in mice leads to leaky SCID and represents a model for human LIG4 syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.107(7), p.3024-9, 2010.

RUSSELL JS; BRADY K; BURGAN WE; CERRA MA; OSWALD KA; CAMPHAUSEN K; TOFILON PJ. Gleevec-mediated inhibition of Rad51 expression and enhancement of tumor cell radiosensitivity. **Cancer Res.** v.63(21), p.7377-83, 2003.

SAKAMOTO-HOJO ET; BALAJEE AS. Targeting poly (ADP) ribose polymerase I (PARP-1) and PARP-1 interacting proteins for cancer treatment. **Anticancer Agents Med Chem.** v.8(4), p.402-16. 2008.

SALLMYR A; FAN J; RASSOOL FV. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. **Cancer Lett.** v.270(1), p.1-9, 2008

SAN FILIPPO J; SUNG P; KLEIN H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annu Rev Biochem.** v.77, p.229-57, 2008.

SANCAR A; LINDSEY-BOLTZ LA; UNSAL-KAÇMAZ K; LINN S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.** v.73, p.39–85, 2004.

SANTARIUS T, KIRSCH M, ROSSI ML, BLACK PM. Molecular aspects of neuro-oncology. **Clinical Neurology and Neurosurgery.** v.99. 1997. 184-195p

SARIBASAK H; MAUL RW; CAO Z; MCCLURE RL; YANG W; MCNEILL DR; WILSON DM; GEARHART PJ. XRCC1 suppresses somatic hypermutation and promotes alternative nonhomologous end joining in Igh genes. **J Exp Med.**, v.208(11), p.2209-16, 2011.

SCARINGI C; ENRICI RM; MINNITI G. Combining molecular targeted agents with radiation therapy for malignant gliomas. **Onco Targets Ther.** v.6, p.1079-95, 2013.

SCHIPLER A; ILIAKIS G. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. **Nucleic Acids Res.** v.;41(16), p.7589-605, 2013.

SHILOH Y. ATM And Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity. **Nature**, Reviews Cancer, v.3, 2003.

SHILOH Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. **The EMBO Journal.** v. 22, No. 20, p. 5612-5621, 2003b.

SHILOH Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. **TRENDS in Biochemical Sciences** v.31, No.7 ,2006.

SHORT SC; GIAMPIERI S; WORKU M; ALCAIDE-GERMAN M; SIOFTANOS G; BOURNE S; LIO KI; SHAKED-RABI M; MARTINDALE C. Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells. **Neuro Oncol.**v.13(5), p.487-99, 2011.

SIMSEK D, JASIN M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. **Nat. Struct. Mol. Biol.** v.4, p.410–16, 2010.

SIMSEK D; BRUNET E; WONG SY; KATYAL S; GAO Y; MCKINNON PJ; LOU J; ZHANG L; LI J; REBAR EJ; GREGORY PD; HOLMES MC; JASIN M. DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. **PLoS Genet.** v.7(6), 2011.

SIMSEK D; JASIN M. DNA ligase III: a spotty presence in eukaryotes, but an essential function where tested. **Cell Cycle.** V.10(21):3636-44, 2011.

SIRBU BM; CORTEZ D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v.5(8), 2013.

SONODA E; SASAKI MS; BUERSTEDDE JM; BEZZUBOVA O; SHINOHARA A; OGAWA H; TAKATA M; YAMAGUCHI-IWAI Y; TAKEDA S. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. **EMBO J.** v.17(2), p.598-608, 1998.

STUPP R; ALESSIA P; RENÉ O. M; OLIVIER M. Un guide pratique au traitement des gliomes. **Bull Cancer** . v.94 (9), p. 817-22, 2007.

STUPP R; HOTTINGER AF; VAN DEN BENT MJ; DIETRICH PY; BRANDES AA. Frequently asked questions in the medical management of high-grade glioma: a short guide with practical answers. **AnnOncol:** Symposium article, v.19, 2008.

STUPP R; BRADA M; VAN DEN BENT MJ; TONN JC; PENTHEROUDAKIS G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, 2014.

SYMINGTON LS. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.66(4), p.630-70, 2002.

TAKAKO I; TAKIZAWA Y; KAINUMA T; INOUE J; MIKAWA T; SHIBATA T; SUZUKI H; TASHIRO S; KURUMIZAKA H. DIDS, a chemical compound that inhibits RAD51-mediated homologous pairing and strand exchange. **Nucleic Acids Res.** v.37(10), p.3367-76, 2009.

TAKATA M; SASAKI MS; SONODA E; MORRISON C; HASHIMOTO M; UTSUMI H; YAMAGUCHI-IWAI Y; SHINOHARA A; TAKEDA S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. **EMBO J.** v.17(18), p.5497-508, 1998.

TAKI T; OHNISHI T; YAMAMOTO A; HIRAGA S; ARITA N; IZUMOTO S; HAYAKAWA T; MORITA T. Antisense inhibition of the RAD51 enhances radiosensitivity. **Biochem Biophys Res Commun.** V.223(2), p.:434-8, 1996.

THACKER J. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. **Cancer Lett.** v.219(2), p.125-35, 2005.

TSUZUKI T; FUJII Y; SAKUMI K; TOMINAGA Y; NAKAO K; SEKIGUCHI M; MATSUSHIRO A; YOSHIMURA Y; MORITAT. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.93(13), p.6236-40, 1996.

UZIEL T; LERENTHAL Y; MOYAL L; ANDEGEKO Y; MITTELMAN L; SHILOH Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. **The EMBO Journal.** Vol. 22 No. 20, p. 5612-5621, 2003.

VAN DEN BOSCH M., LOHMAN PHM; PASTINK A. DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination. **Biol. Chem.** v.383, p. 873-892, 2002.

VISPÉ S; CAZAUX C; LESCA C; DEFAIS M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. **Nucleic Acids Res.** v.26(12), p.2859-64, 1998.

WANG H; PERRAULT AR; TAKEDA Y; QIN W; WANG H; ILIAKIS G. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* v.31(18), p.5377-88, 2003.

WANG H; ROSIDI B; PERRAULT R; WANG M; ZHANG L; WINDHOFFER F; ILIAKIS G. DNA ligase III as candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. **Cancer Res.** v.;65(10), p. 4020-30, 2005.

WANG H; ZENG ZC; PERRAULT AR; CHENG X; QIN W; ILIAKIS G. Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells. **Nucleic Acids Res.** v.29(8), p.1653-60, 2001b.

WANG H; ZENG ZC; BUI TA; SONODA E; TAKATA M; TAKEDA S; ILIAKIS G. Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. **Oncogene.** V.20(18), p.2212-24, 2001c.

WARTERS RL. Radiation-induced apoptosis in a murine T-cell hybridoma. **Cancer Res.** v.52(4), p.883-90 1992.

WELSH C. Molecular Mechanisms of Pathogenesis in Glioblastoma and Current Therapeutic Strategies. **Glioblastoma**, ed, Swapan K. Ray. p85-93, 2010.

WELSH JW; ELLSWORTH RK; KUMAR R; FJERSTAD K; MARTINEZ J; NAGEL RB; ESCHBACHER J; STEA B. Rad51 protein expression and survival in patients with glioblastoma multiforme. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** v.74(4), p.1251-5, 2009.

WICK W; WELLER M; WEILER M; BATCHELOR T; YUNG AW; PLATTEN M. Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. **Neuro Oncol.** v.13(6):566-79, 2011.

WISEMAN H; HALLIWELL B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem J.** v.313, p.17-29, 1996.

WOOD RD. DNA repair. Variants on a theme. **Nature**. v.399, p.639-40,1999.

WOOD RD; MITCHELL M; SGOUROS J; LINDAHL T. Human DNA repair genes. **Science**. v.291, p.1284-9, 2001.

WU W; WANG M; WU W; SINGH SK; MUSSFELDT T; ILIAKIS G. Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair (Amst)*. V.7(2):329-38, 2008.

XIA SJ; SHAMMAS MA; REIS SRJ. Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. **Mol Cell Biol**. v.17(12), p.7151-8, 1997.

XU ZY; LOIGNON M; HAN FY; PANASCI ; ALOYZ R. Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis. **J Pharmacol Exp Ther**. v.314(2), p.495-505, 2005.

YAMAMOTO A; TAKI T; YAGI H; HABU T; YOSHIDA K; YOSHIMURA Y; YAMAMOTO K; MATSUSHIRO A; NISHIMUNE Y; MORITA T. Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. **Mol Gen Genet**. v.251(1), p.1-12, 1996.

YANG H; LI Q; FAN J; HOLLOMAN WK; PAVLETICH NP. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. **Nature**. New York, v.433, p.653-7, 2005.

YOSHIDA M; HOSOI Y; MIYACHI H; ISHII N; MATSUMOTO Y; ENOMOTO A; NAKAGAWA K; YAMADA S; SUZUKI N; ONO T. Roles of DNA-dependent protein kinase and ATM in cell-cycle-dependent radiation sensitivity in human cells. *Int J Radiat Biol*. v.78(6),p.503-12, 2002.

ZHANG Y; JASIN M. An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. **Nat Struct Mol Biol**. v.18(1), p.80-4, 2011.

ZHU C; MILLS KD; FERGUSON DO; LEE C; MANIS J; FLEMING J; GAO Y; MORTON CC; ALT FW. Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. **Cell**. v.109(7), p.811-21, 2002.