UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Juliana Ferreira de Sousa

**A redução de DDB2 está relacionada ao pior prognóstico de sobrevida dos
pacientes com glioma e a maior agressividade de células U138MG**

Ribeirão Preto, SP

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Juliana Ferreira de Sousa

**A redução de DDB2 está relacionada ao pior prognóstico de sobrevida dos
pacientes com glioma e a maior agressividade de células U138MG**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação
em Biologia Celular e Molecular da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP,
como parte das exigências para obtenção do
título de doutora em Biologia Celular e
Molecular.

Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientadora: Prof^ª Dr^a Valeria Valente

Ribeirão Preto, SP

2018

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.

De Sousa, Juliana Ferreira

A redução de DDB2 está relacionada ao pior prognóstico de sobrevida dos pacientes com glioma e a maior agressividade de células U138MG. Ribeirão Preto, 2018.

90 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Valente, Valeria.

1. DDB2. 2. Reparo de DNA. 3. Astrocitomas. 4. Prognóstico. 5. Assinaturas gênicas.

DE SOUSA, JF. **A redução de DDB2 está relacionada ao pior prognóstico de sobrevida dos pacientes com glioma e a maior agressividade de células U138MG.** 2018. 90f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Não seria possível citar todos os nomes.

Agradeço a Prof^a Dr^a Valeria Valente (USP/Unesp) pela orientação e parceria ao longo dos últimos seis anos.

Agradeço o Dr. Kevin Camphausen (NIH/NCI/ROB) pela oportunidade concedida, por acreditar no meu potencial e no meu trabalho, pelos valiosos conselhos e orientação.

Agradeço em especial à minha mãe que compartilhou de todas as minhas dúvidas, incertezas e lágrimas ao longo do caminho.

Agradeço meu companheiro de caminhada e marido pelo apoio de sempre.

Agradeço especialmente o senhor Jorge Padilha que assumiu o papel de meu pai com muito amor e carinho. A ele serei eternamente grata.

À agência de fomento CAPES pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

DE SOUSA, JF. **A redução de DDB2 está relacionada ao pior prognóstico de sobrevida dos pacientes com glioma e a maior agressividade de células U138MG.** 2018. 90f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os astrocitomas são os tumores cerebrais primários mais frequentes, dentre os quais, o glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais agressivo, sendo classificado como astrocitoma de grau IV. O tratamento envolve remoção cirúrgica seguida de quimio e radioterapias, porém essa abordagem não é eficaz devido à alta resistência das células tumorais. Em um trabalho anterior, buscando caracterizar os mecanismos associados à esta característica, investigamos a expressão de genes de reparo de DNA em astrocitomas de diferentes graus. Foram encontradas alterações em 19 genes. Através da combinação destas alterações em todos os arranjos possíveis, definimos um grande conjunto de assinaturas de expressão gênica que foi utilizado como filtro para a busca de correlação em bancos de dados públicos. No total, 421 assinaturas foram associadas à redução na sobrevida dos pacientes, sendo que cinco dos genes (EXO1, NEIL3, BRCA2, BRIP1 e DDB2) foram isoladamente relacionados ao pior prognóstico. Notavelmente, DDB2 foi o único gene subexpresso a apresentar esta correlação, levando a um risco de morte aproximadamente três vezes maior. No presente estudo *in vitro*, após radiação ionizante, observamos que células com baixos níveis de DDB2 reparam mais rapidamente as quebras induzidas no DNA, saem mais facilmente da parada de ciclo na fase G2/M e se tornam ainda mais resistentes a este tratamento. Além disso, o silenciamento de DDB2 induziu o aumento dos níveis de Zeb1, um importante promotor da transição epitélio-mesênquima, bem como dos índices de invasão e migração celular. Estes dados mostram que a redução nos níveis de DDB2 induz um fenótipo mais agressivo, corroborando a correlação com pior prognóstico dos pacientes observado anteriormente. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a função de DDB2 não está limitada ao âmbito do reparo de DNA, apontam uma potencial relação com o controle da transição epitélio-mesênquima e mostram que este gene possui papel fundamental no estabelecimento da agressividade e resistência de GBM.

Palavras-chave: DDB2. Reparo de DNA. Astrocitomas. Prognóstico. Assinatura gênica.

ABSTRACT

DE SOUSA, JF. **DDB2 downregulation is related with worse survival prognosis of glioma patients and higher aggressiveness of U138MG cells.** 2018. 90f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Astrocytomas are the most common primary brain tumors. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive type and is classified as grade IV astrocytoma. The treatment involves surgical resection followed by chemo and radiotherapies, however this approach is not effective due to the high resistance of tumor cells. In a previous work, to characterize the cellular mechanisms associated to this characteristic, we investigated the expression of DNA repair genes in samples of different astrocytoma grades. We found alterations in 19 genes. By combining these expression changes in all possible arrangements, a large set of gene expression signatures was defined and used as a filter to seek correlations in public databases. As a result, 421 signatures were associated with reduced patient survival. Among them, five genes (EXO1, NEIL3, BRCA2, BRIP1 and DDB2) were individually related to worse prognosis. Notably, DDB2 was the only down regulated gene to exhibit this correlation, making the risk of death approximately three times higher. In the present *in vitro* study, after ionizing radiation, we observed that cells with low levels of DDB2 are capable of faster DNA breaks repair, easily exit the G2/M arrest and become even more resistant to this treatment. Furthermore, DDB2 silencing enhanced the levels of Zeb1, an important promoter of the epithelial-mesenchymal transition, as well as the rates of cell invasion and migration. These data indicate that DDB2 knockdown leads to a more aggressive cell behavior, corroborating the association with worse prognosis previously observed. Taken together, these results suggest that DDB2 function is not limited to DNA repair, they point out its potential participation in epithelial-mesenchymal transition control and show that this gene might play a key role in GBM's aggressiveness and resistance.

Keywords: DDB2. DNA repair. Astrocytoma. Prognosis. Gene signature.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	9
1.1	Classificação dos gliomas	9
1.2	Tratamento	12
1.3	Alterações genéticas mais comuns.....	13
1.4	Genes de reparo de DNA como marcadores de prognóstico	15
1.5	Reparo de DNA na tumorigênese e progressão de astrocitomas	16
1.6	Reparo de DNA e a resistência ao tratamento	19
2	Objetivos	23
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	Materiais e Métodos	24
3.1	Identificação de correlações com prognóstico	24
3.2	Linhagens celulares e cultivo.....	24
3.3	Transfecção, checagem da expressão de DDB2 e confirmação do silenciamento	25
3.4	formação de focos e expressão de DDB2 em amostras tumorais humanas	26
3.5	Curva de crescimento, ensaio clonogênico e análise de ciclo celular.....	27
3.6	ensaio do cometa neutro.....	28
3.7	Western blot	29
3.8	Quantificação de ROS.....	29
3.9	Ensaio de migração e invasão	31
4	Resultados	32
4.1	Busca por correlações com prognóstico	32
4.2	Avaliação da expressão de DDB2 em astrocitomas de diferentes graus	33
4.3	Expressão de DDB2 nas linhagens celulares e confirmação do silenciamento	34
4.4	Imapcto do silenciamento de DDB2 no crescimento, resistência à radiação ionizante e dinâmica do ciclo celular de células U138MG	36

4.5	Avaliação de proteínas de sinalização e reparo de danos no DNA após silenciamento e irradiação.....	39
4.6	Acúmulo de espécies reativas de oxigênio	42
4.7	Indução de EMT, migração e invasão.....	44
5	Discussão.....	47
6	Conclusões	52
7	Referências	53
	APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS	63

1 INTRODUÇÃO

Os gliomas constituem um grupo altamente heterogêneo de tumores originados a partir de células da glia, com diferentes perfis patológicos, histológicos e moleculares. Embora a taxa de incidência seja baixa, apenas 2% de todos os casos de câncer, os gliomas apresentam alta mortalidade, especialmente quando se trata do tipo mais comum, o glioblastoma multiforme (GBM). Pacientes diagnosticados com GBM apresentam sobrevida média de 14,6 meses e somente 5% sobrevive mais que 5 anos após o diagnóstico. Suas principais características são: alta desdiferenciação celular, infiltração difusa no tecido adjacente, proliferação exacerbada, presença de necrose e angiogênese, resistência à apoptose e notável instabilidade genômica. Trata-se de um tipo tumoral altamente agressivo e resistente aos tratamentos empregados atualmente, que envolvem remoção cirúrgica, radioterapia (RT) e quimioterapia (QT) com temozolamida (TMZ) [1, 2].

1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOMAS

A primeira classificação sistemática, publicada em 1929 por Baily & Cushing, era baseada nos perfis histológico e clínico dos gliomas. Este trabalho tornou-se a primeira base comum para que pesquisadores e médicos pudessem compartilhar informações e discutir casos clínicos [3]. Quase vinte anos depois, Kernohan e colaboradores propuseram o sistema de classificação conhecido até os dias de hoje, que é baseado no estadiamento do tumor em diferentes graus, variando do grau I ao IV, que definem a escala de malignidade [4]. Somente no ano de 2007 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira classificação completa e robusta de tumores do sistema nervoso central (SNC), incluindo os gliomas [5]. Esta publicação foi alicerçada no sistema de Kernohan, definindo os tumores de grau I como benignos, com baixo potencial proliferativo e passíveis de cura após a remoção cirúrgica; grau II como lesões com capacidade infiltrativa e tendência à progressão para graus de maior malignidade; grau III que correspondem a tumores com evidências histológicas de malignidade, como atipia nuclear e alta atividade mitótica; e o grau IV se refere a tumores com altos níveis de atipia, angiogênese e necrose, além de exacerbada atividade mitótica, crescimento rápido e alta mortalidade (Figura 1) [3-5].

Figura 1. Micrografias representativas de astrocitomas de grau II, III e IV (GBM).

(A) Astrocitoma de grau II, representa o início da progressão tumoral e mostra anaplasia, (B) Astrocitoma de grau III, exibe atividade mitótica aumentada (célula metafásica no detalhe ampliado) e (C) GBM apresenta regiões de necrose com pseudopaliçada (setas). Aumento de 40x. WHO: *World Health Organization* (OMS). Fonte: adaptado de [6].

Mais recentemente, em 2014, a Sociedade Internacional de Neuropatologia estabeleceu um guia para a incorporação de achados moleculares no diagnóstico de tumores cerebrais [7], abrindo caminho para a reedição da classificação, refeita em 2016 pela OMS [8]. A nova abordagem integra o perfil genético, novos marcadores moleculares e o tradicional exame histológico. O critério de agrupamento foi atualizado, gliomas difusos foram redefinidos, novas entidades tumorais foram incluídas e o diagnóstico de tumores de difícil definição, como os oligoastrocitomas, foi desencorajado. Três principais tipos de gliomas foram assinalados - astrocíticos, oligodendrogliais e ependimais - o sistema de estadiamento em graus foi mantido e o status genético de IDH, H3K27M e 1p/19q foi incluído (Tabela 1) [5, 8]. Além disso, tumores de grau II foram considerados como lesões de baixo grau de malignidade (*low grade glioma* – LGG) devido ao seu comportamento menos agressivo, e os graus III e IV foram considerados de alto grau (*high grade glioma* – HGG), pois apresentam pior prognóstico [8]. Considerando que aproximadamente 76% dos gliomas exibem origem astrocítica [8, 9] e que

astrocitomas são o objeto deste estudo, os termos LGG e HGG serão empregados em referência somente a este subtipo tumoral.

Tabela 1. Classificação dos gliomas pela OMS[■]

Astrocitomas difusos e oligodendrogliomas	Grau
Astrocitoma difuso IDH mutante	II
Astrocitoma anaplásico IDH mutante	III
Glioblastoma IDH selvagem	IV
Glioblastoma IDH mutante	IV
Glioma difuso H3K27M mutante	IV
Oligodendroglioma IDH mutante e 1p/19q codeletados	II
Oligodendroglioma anaplásico, IDH mutante e 1p/19q codeletados	III
Outros tumores astrocíticos	
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma subependimal de células gigantes	I
Xantoastrocitoma pleomórfico	II
Xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico	III
Tumores ependimais	
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
Ependimoma, RELA positivo	II ou III
Ependimoma anaplásico	III

■Adaptado de [8]

LGGs apresentam comportamento brando, porém aproximadamente 70% dos casos sofrem progressão para os graus III e IV em 5-10 anos após o diagnóstico. Ocorrem principalmente em crianças, representando mais que 30% das neoplasias do SNC nesta população [10]. Dentre os HGGs, os GBMs (astrocitoma de grau IV) são os mais comuns e agressivos, representando 16% dos tumores cerebrais e 60-75% dos astrocitomas [11]. O GBM ocorre principalmente em adultos de 45-75 anos de idade, levando o paciente a morte em aproximadamente 12-15 meses após o diagnóstico. Mesmo sob tratamento intensivo, a maioria dos casos sofre recidiva em 1-2 anos após a cirurgia e menos que 5% dos pacientes sobrevivem por 5 anos ou mais [2, 12]. Os GBMs são ainda classificados em primário e secundário, de acordo com o histórico clínico. GBMs primários ocorrem sem evidência de lesão prévia e representam 90% dos casos; GBMs secundários são o resultado da progressão de lesões de menor grau e representam 10% dos casos [7, 13]. GBMs primários e secundários apresentam diferenças genéticas significativas e uma distinta atividade transcricional, que os identifica como entidades únicas e pode auxiliar na predição do prognóstico [14-17].

1.2 TRATAMENTO

O tratamento padrão-ouro preconizado atualmente é multimodal e envolve a remoção cirúrgica do tumor, em sua máxima extensão possível e segura, seguida de RT e QT adjuvantes. As especificidades do protocolo de tratamento adotado são estabelecidas de acordo com as necessidades de cada caso. Embora complexa, devido à natureza infiltrativa das células de GBM, a cirurgia possui alto valor diagnóstico e contribui para pesquisa. Além disso, ela reduz a tensão mecânica exercida pelo tumor, diminuindo a pressão intra-craniana, favorece o controle de invasão e proliferação e influencia positivamente na farmacocinética e dinâmica do tratamento quimioterápico [18-21]. Adicionalmente, quando a ressecção total é possível, a sobrevida do paciente sofre impacto muito positivo, representando um importante fator de predição de prognóstico [21, 22]. Estudos mostram que pacientes com GBM apresentam sobrevida média de 18,8 meses após ressecção total e 9,4 meses quando somente a biópsia pode ser feita [23]. A remoção subtotal de pelo menos 78% do tumor propicia um benefício de sobrevida de aproximadamente 13,5 meses [22, 24]. Estas estatísticas tendem a melhorar ainda mais com a introdução de ferramentas modernas na prática clínica, como por exemplo a realização de cirurgias guiadas por fluorescência [25], que maximizam a extensão da ressecção tumoral. No entanto, em 90% dos casos o tumor reaparece no sítio primário, mesmo quando o paciente está sob tratamento com RT e QT intensas [19].

As terapias adjuvantes são substancialmente importantes na melhoria do prognóstico dos pacientes após a cirurgia e se baseiam na indução de danos no DNA, que visam levar as células tumorais à morte [23, 26, 27]. A RT pode provocar: substituições e/ou deleções de bases nitrogenadas; ligações covalentes intra ou inter-fitas ou ainda entre o DNA e proteínas; quebras simples-fita (*single-strand breaks* – SSB); e quebras de dupla-fita (*double-strand breaks* – DSB), sendo este o tipo mais letal de dano no DNA. A RT pode provocar ainda a ionização de moléculas de água, levando à formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) que podem causar danos adicionais ao DNA [28, 29]. No caso de pacientes com GBM, a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) encoraja o emprego de RT em tratamento de fase única, que consiste de 30 frações de 2 Grays (Gy) ao longo de 6 semanas. A EORTC recomenda ainda que a dose total de radiação que atinge o tecido cerebral normal deve ser menor do que 60% da dose prescrita, neste caso 36 Gy [30]. Porém, a RT sozinha resulta em uma prolongação de apenas 2 a 3 meses na sobrevida [21], oferecendo maior benefício aos pacientes quando administrada juntamente com a QT [23, 27, 31].

O fármaco de primeira linha no tratamento quimioterápico de GBM, a TMZ, é um agente alquilante de alta citotoxicidade que possui habilidade de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE) [32, 33]. A QT convencionada atualmente consiste de dose diária de 150 a 200 mg por metro quadrado de área da superfície corporal por 5 dias, a ser administrada em ciclos de 28 dias [27]. Uma vez disponível na corrente sanguínea, a TMZ é convertida de maneira não-enzimática a seu metabólito ativo, o 5-(3-metiltriazeno-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC), que é capaz de alquilar o DNA [32]. Essa ativação da droga é favorecida pelo pH alcalino intra-tumoral, concentrando o metabólito no tumor [34]. MTIC pode induzir metilações nas posições N7 de guaninas (N7-MeG, 60-80%), N3 de adeninas (N3-MeA, 10-20%) e/ou O6 de guaninas (O6-MeG, 5-10%). Embora menos frequente, o produto O6-MeG é o que possui o melhor efeito terapêutico [32, 35, 36].

Muitos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de QTs adjuvantes que possam sensibilizar o GBM à TMZ e/ou RT. Moléculas descobertas recentemente, como bevacizumab, erlotinib [37], tipifarnib [38], 1,3-bis (2-chloroethyl)-1 nitrosourea (BCNU) [39] e gliadel [40], estão sendo massivamente exploradas. Algumas delas mostraram bons resultados e já estão em estudos clínicos de fase II. No que tange estudos clínicos de fase III, o implante de pastilhas de gliadel e BCNU no leito tumoral após a cirurgia levou a uma melhora de 2 meses na sobrevida global dos pacientes [41]. Outra droga em estudo é o sorafenib, um inibidor de múltiplos receptores tirosina quinase que demonstrou ter propriedades antitumorais em estudos *in vivo* e *in vitro* com linhagens de GBM [42]. Esta droga também está sendo testada em estudos clínicos para a avaliação de sua eficácia e segurança, tanto em monoterapia quanto em combinação com TMZ, bevacizumab ou RT [43].

Apesar de todos os esforços, o protocolo de tratamento reportado por Stupp e colaboradores em 2005 ainda é considerado o melhor, preconizando cirurgia seguida de 6 semanas de RT+QT (TMZ) e 6 ciclos adicionais de TMZ isoladamente [23, 27]. Embora este protocolo reduza o risco de morte em 37%, a sobrevida desses pacientes ainda é considerada baixa devido à alta resistência e frequente recorrência do tumor. Estes dados enfatizam a urgência de uma melhor compreensão da doença e o desenvolvimento de terapias mais eficazes que permitam aumento significativo na sobrevida dos pacientes.

1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS MAIS COMUNS

Apesar da grande heterogeneidade, a maioria dos LGGs apresentam alterações no gene *BRAF* que levam à perda da região reguladora N-terminal. Outras anormalidades em *BRAF*

também já foram descritas, e na maioria dos casos elas levam a ativação constitutiva da via das MAP (*mitogen-activated protein*) quinases [8, 44-47]. Além de *BRAF*, translocações envolvendo os genes dos receptores tirosina quinase neurotróficos (*neurotrophic tyrosine kinase receptors* – NTRK) 2 e 3 foram documentadas. Elas provocam fusões da região N-terminal com outros genes, fazendo com que os NTRKs adquiram a habilidade de interagir com actina, topoisomerase I ou GTP. Fusões de *NTRKs* também foram observadas em casos de HGG pediátricos [48], sugerindo um potencial papel desse tipo de fusão na progressão de gliomas. Ademais, mutações no gene do receptor de fator de crescimento de fibroblastos 1 (*fibroblast growth factor receptor 1* – *FGFR1*) são a segunda mutação mais comum em LGGs [49].

Recentemente, o consórcio internacional *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* realizou uma análise genômica detalhada e revelou o intrincado perfil genético de GBMs e LGGs através da caracterização de mais de 2000 amostras humanas. A maioria dos casos avaliados apresentaram alterações na expressão dos genes *MGMT*, *IDH1*, *TP53*, *RB1*, *RTK*, *RAS*, *EGFR*, *ciclinas D1/D3*, *MDM2*, *PTEN*, *CDK4*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *NF1*, *PIK3R1*, *LZTR1*, *BRAF*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *ATRX*, *TERT*, *NOTCH1*, *FUBP1* e *CIC* [50-54]. Foram identificadas três principais vias de sinalização envolvidas na patogênese de GBM: receptores tirosina quinase, p53 e retinoblastoma. Este importante estudo permitiu uma classificação mais refinada dos GBMs, de acordo com os padrões globais de expressão gênica, nos subgrupos proneural, neural, clássico e mesenquimal [50, 51].

O subtipo clássico é caracterizado pela perda do cromossomo 10 e amplificação do 7 com concomitante amplificação/mutação em *EGFR*, reduzidos níveis de proteínas pró-apoptóticas, ativação constitutiva da via das MAP quinases, bem como das proteínas Notch1 e Notch3. O subgrupo proneural foi associado a alterações nos genes *PDGFRA*, *CDK6*, *CDK4* e *IDH1*, ativação constitutiva de PI3K e inibição do repressor de tradução *4EBP1*. Ao conjunto dos GBMs considerados mesenquimais foram associadas deleções e mutações em *NF1* (17q11.2), mutações pontuais em *PTEN*, ativação da via MAPK e redução na sinalização por mTOR. Por fim, os tumores neurais são caracterizados pela expressão de sinaptotagmina I e superexpressão de *EGFR* [50, 51]. Adicionalmente, foi caracterizado um subtipo de GBM proneural que apresenta um fenótipo hipermetilado de ilhas CpGs, chamado G-CIMP (*Glioma-CpG Island Methylated Phenotype*). Embora mais prevalente em LGGs, o fenótipo G-CIMP está associado com uma melhor sobrevida dos pacientes com GBM [51, 55].

Quando se trata de alterações genéticas estruturais, GBMs primários apresentam amplificações e/ou mutações no gene *EGFR* em 36–60% dos casos enquanto os secundários

com este tipo de alteração somam somente 8%; similarmente, mutações em *PTEN* ocorrem em 25% dos casos primários e apenas 4% dos GBMs secundários; deleções em *CDKN2A-p1* totalizam 31–78% dos primários *versus* 8% dos secundários [14]. Em contrapartida, algumas aberrações genéticas aparecem mais frequentemente em GBMs secundários do que em primários, como por exemplo mutações em *TP53* (65% dos casos secundários contra 28% dos primários) [14], metilações no promotor de *MGMT* (75% dos secundários e 36% dos primários) [56], e mutações em *IDH1* (75% dos secundários e 5% dos primários) [57].

Apesar da diversidade de alterações genéticas, todos os subtipos identificados apresentam pronunciados índices de proliferação, infiltração difusa e angiogênese robusta, o que confere alta resistência ao tratamento e inevitável recorrência. Todas essas características, somadas à alta heterogeneidade intra-tumoral e instabilidade genômica, fazem de GBM um dos mais complexos tipos de câncer, frequentemente associado a um prognóstico muito pobre [50, 51, 55]. A caracterização detalhada disponível atualmente inclui ainda o perfil epigenético e o proteoma, revelando novos biomarcadores e assinaturas gênicas únicas capazes de proporcionar um diagnóstico mais preciso e a previsão de prognóstico e resposta ao tratamento [55, 58-61].

1.4 GENES DE REPARO DE DNA COMO MARCADORES DE PROGNÓSTICO

O status de metilação do promotor de *O*-6-Metilguanina-DNA-Metiltransferase (*MGMT*) foi o primeiro biomarcador a ser empregado na estratificação de pacientes com GBM para ensaios clínicos, sendo um fator preditor da resposta ao tratamento com agentes alquilantes. *MGMT* é responsável pela remoção de alquilações O6-MeG, induzidas por TMZ, transferindo o aduto metila para um resíduo de cisteína de sua própria estrutura, recuperando assim a guanina lesada. A metilação do promotor de *MGMT* provoca redução na expressão da proteína, o que desabilita a capacidade de reparar o dano induzido por TMZ, melhorando a resposta ao tratamento [35, 62, 63].

Em um estudo clínico randomizado de fase III envolvendo 206 pacientes de GBM, 45% dos casos apresentaram metilações no promotor de *MGMT*. Quando tratados com QT e RT, os pacientes nesta condição, tiveram sobrevida melhor quando comparados a pacientes com genótipo não metilado, em média 21,7 e 15,3 meses, respectivamente [23]. O status de metilação do promotor de *MGMT* foi então considerado um fator independente de predição de prognóstico [27, 64] e portanto, muitos estudos têm por objetivo o desenvolvimento de estratégias capazes de reduzir a atividade de *MGMT* e/ou sua expressão [65-67]. Além disso, *MGMT* metilado foi detectado na corrente sanguínea de pacientes com GBM e mostrou forte

correlação com o perfil de *MGMT* observado no tecido tumoral [64], mostrando que o exame de amostras de sangue pode representar uma ferramenta confiável e pouco invasiva para a predição de sensibilidade ao tratamento com TMZ [68]. O status de metilação de *MGMT* revelou-se muito importante como biomarcador também para outros tipos tumorais, incluindo câncer de mama [69], colorretal [70], próstata [71], cervical [72], gástrico [73] e de pulmão [74].

O nível de expressão da *Holiday Junction Recognizing Protein* (HJURP) foi também correlacionado com o prognóstico de pacientes com astrocitoma. HJURP está envolvida no reparo de DSBs [75] através de mecanismos que ainda não foram completamente caracterizados e possui importante papel na deposição da proteína centromérica A (CENP-A) na cromatina [76], permitindo sua expansão [77] e a montagem dos cinetocóros [78]. Em estudos conduzidos pelo nosso grupo, foi observado que astrocitomas expressam níveis extremamente altos de HJURP [79] e essa condição possui capacidade preditiva de sobrevida, independentemente de outros fatores [80]. HJURP é considerada fator independente de predição de prognóstico também para pacientes com câncer de mama, atuando como fator indicativo da sensibilidade à RT [81, 82], o que reforça o envolvimento desta proteína com a agressividade tumoral e pior prognóstico.

1.5 REPARO DE DNA NA TUMORIGÊNESE E PROGRESSÃO DE ASTROCITOMAS

Tumorigênese e progressão tumoral são processos que envolvem múltiplos passos e que requerem o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas envolvidas em vias celulares cruciais para o controle da capacidade de proliferação, migração e invasão celular. A resposta a danos no DNA (*DNA damage response* - DDR) e a maquinaria de reparo recrutada à jusante envolvem vias de sinalização celular consideradas características marcantes ou “*hallmarks*” do câncer [83, 84]. DDR e proteínas executoras de reparo atuam em conjunto, formando uma rede complexa e ordenada de vigilância do genoma que identifica e restaura lesões no DNA, protegendo as células de qualquer tipo de estresse genotóxico [85, 86]. Este sistema pode apresentar papéis opostos ao longo da tumorigênese e da progressão tumoral. Vários estudos mostram que genes envolvidos na DDR e no reparo podem ser desativados no início da tumorigênese, levando à instabilidade genômica e ao desenvolvimento de tumor [87-90], enquanto mutações secundárias garantem vantagem seletiva [91]. Uma vez que o tumor foi estabelecido, a atividade das vias de reparo é restaurada e progressivamente exacerbada,

evitando o colapso celular e permitindo a progressão tumoral [92-95], sendo ainda associada à resistência ao tratamento [94, 96-98].

Evidências sugerem que a ativação do sistema DDR-reparo pode funcionar como uma barreira contra o estabelecimento de tumor [90, 99, 100], e mutações ou alterações que levam à perda ou redução de função podem representar um gatilho para a gliomagenese [101]. Respalhando esta hipótese, foi demonstrado em modelo de desenvolvimento de glioma *in vivo* que a expressão induzida de RAD51, proteína crucial na via de recombinação homóloga (*homologous recombination* - HR), reduz a incidência de gliomas induzidos pela ativação de oncogenes bem como a instabilidade genômica [102], bloqueando a carcinogênese. Utilizando um modelo experimental similar, Squatrito e colaboradores mostraram que os componentes da DDR são frequentemente alterados em gliomas e que a perda de função de ATM ou de seus alvos acelera a formação do tumor [103]. Ademais, a perda de ATRX, uma proteína importante na via de reparo através de junção não homóloga de pontas (*Non-Homologous End Joining* - NHEJ), é também capaz de promover a formação de GBM em modelo animal [104].

Neste mesmo contexto, um estudo conduzido na população brasileira mostrou que pacientes portadores do polimorfismo Thr241Met no gene *XRCC3* apresentam maior risco de desenvolvimento de tumor [105]. O gene *XRCC3* codifica uma proteína envolvida no reparo por HR e este polimorfismo pode afetar sua função enzimática e capacidade de interação com outras proteínas, predispondo os portadores ao desenvolvimento do GBM. Similarmente, um polimorfismo no gene *EXO1* pode estar associado à susceptibilidade a GBM. EXO1 é uma importante exonuclease da via de HR e o polimorfismo em questão promove uma drástica troca de aminoácidos, afetando a estrutura interna da enzima e, portanto, sua interação com outras proteínas [106]. Muitos outros polimorfismos em genes de reparo de DNA também têm sido associados ao risco de desenvolvimento de GBM [107-111].

Deficiências na DDR e no reparo podem ainda levar à ativação de mecanismos compensatórios, através de vias alternativas de reparo com reduzida fidelidade genômica, mediando os passos iniciais da tumorigênese. Estes mecanismos secundários podem causar alterações em qualquer gene, incluindo aqueles envolvidos na atividade de reparo, levando a um ciclo vicioso que aumenta sobremaneira a instabilidade genômica [83, 112, 113]. Assim, o estudo de vias compensatórias tem sido realizado para a identificação de letalidade sintética objetivando a melhoria da eficiência do tratamento e/ou o desenvolvimento de novas terapias [83, 114, 115].

Paradoxalmente, após o estabelecimento do tumor, a atividade da maquinaria de reparo é comumente exacerbada, permitindo a progressão tumoral e protegendo as células malignas do estresse replicativo e das altas taxas de mutação [92-95]. Sabe-se ainda que a DDR é constitutivamente ativa em LGGs e GBMs, mas não em tecido cerebral normal nem em tecido adjacente ao tumor. Curiosamente, embora os GBMs apresentem maior taxa de proliferação que LGGs, a quantidade de danos no seu DNA é significativamente menor, sugerindo que a atividade de reparo se torna mais eficiente ao longo da progressão LGG-GBM. Esta competência possivelmente contribui para que células progressivamente mais malignas possam lidar com a crescente instabilidade genômica, evitando seu colapso e morte [93].

Em estudo recente conduzido pelo nosso grupo, foi observado que vários genes de reparo são superexpressos em astrocitomas de diferentes graus e apresentam forte correlação com a sobrevida dos pacientes e a viabilidade de células de GBM [116]. Identificamos 19 genes com expressão significativamente alterada em astrocitomas de diferentes graus. Dentre eles, 14 genes apresentaram maior expressão em astrocitomas de grau II, 4 genes foram subexpressos e 7 superexpressos no grupo de astrocitomas de grau III e 7 genes foram notavelmente mais expressos em amostras de GBM. Embora o número de genes alterados tenha sido menor em amostras de GBM, as diferenças de expressão foram consideravelmente maiores, sugerindo uma relação íntima entre o aumento gradual da expressão de genes de reparo de DNA e a progressão de astrocitomas.

Os sete genes alterados em GBM (APEX1, BRAC2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L e XRCC2) foram escolhidos para validação de expressão em um painel expandido de amostras, abrangendo 55 casos clínicos de astrocitomas de grau II, III e IV. A superexpressão foi confirmada para todos os genes, excetuando-se apenas RAD54L em amostras de grau II, apresentando níveis ainda mais altos do que aqueles observados anteriormente. Notavelmente, EXO1 apresentou um dos valores mais extremos de expressão, atingindo aumento de mais de 100 vezes em amostras de grau III e GBM. *EXO1* codifica uma 5'-3' exonuclease que promove a ressecção de extremidades de DSBs, gerando a cauda simples-fita necessária para a invasão da dupla-fita usada como molde durante o reparo por HR [117]. O silenciamento de *EXO1* na linhagem T98G levou à restauração mais rápida das lesões no DNA provocadas por radiação ionizante, sugerindo que a redução de EXO1 possivelmente direciona o reparo para a via NHEJ que é mais rápida, porém mais susceptível a erros [116]. Esses dados indicam a potencial participação de EXO1 na escolha de mecanismos de reparo, favorecendo a progressão tumoral,

e concordam com o aumento na atividade de NHEJ durante a progressão observada por Turner e colaboradores [95].

Durante a progressão, as células malignas podem adquirir ainda outras alterações que levam a um aumento na sua atividade migratória, podendo ocasionar a formação de metástases. Muitos modelos têm sido propostos para esclarecer como esse processo acontece [118, 119]. Sabe-se que células de GBM são altamente infiltrativas e que a recorrência se dá localmente, no entanto, elas podem se espalhar facilmente ao longo de nervos, meninges e vasos, formando metástases no SNC [120, 121]. Porém, menos de 2% dos casos sofre metástase fora do SNC [122]. O papel de genes de reparo de DNA no processo de formação de metástases ainda é controverso; em melanomas, por exemplo, a superexpressão destes genes está associada à formação de metástases, enquanto para outros tipos tumorais a relação oposta já foi reportada [92]. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o progressivo requerimento das vias de envolvidas na DDR e uma maior competência na atividade de reparo são fundamentais para que a progressão tumoral ocorra.

1.6 REPARO DE DNA E A RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO

O aumento na expressão de genes de reparo de DNA tem sido frequentemente relacionado com a resistência ao tratamento. MGMT é a proteína mais estudada no que tange as associações com a resposta ao tratamento. No entanto, alguns pacientes não apresentam melhora clínica após a administração de TMZ, mesmo quando os níveis de MGMT estão reduzidos, o que indica que a metilação do seu promotor nem sempre significa sucesso no tratamento [61]. Além do reparo direto por MGMT, o tratamento com TMZ leva à ativação das vias: reparo por excisão de bases (*base excision repair* – BER) [35], pareamento errôneo de bases (*mismatch repair* – MMR), reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair* – NER), NHEJ e HR [123], que portanto também devem ser consideradas na predição de resistência ao tratamento.

Bases N-metiladas não são reconhecidas por MGMT, mas ativam a via de BER, sugerindo que esta maquinaria pode representar um possível alvo para a melhoria da resposta a TMZ. De fato, a inibição da enzima alquilpurina-DNA-N-glicosilase (APNG), responsável pela remoção de lesões N3-MeA e N7-MeG na via BER, reduziu a resistência à TMZ, mesmo em células MGMT competentes. A superexpressão de APNG está relacionada com a sobrevida reduzida dos pacientes de GBM [124], corroborando a hipótese. Adicionalmente, foi demonstrado que a interrupção na atividade das enzimas Ape1 [125] e DNA polimerase β [126]

também sensibiliza ao tratamento com TMZ. Aumento na atividade da via NER foi igualmente detectado após o tratamento [123] e a inibição de ERCC1, enzima envolvida nesta via, promoveu aumento na sensibilidade à TMZ, similarmente ao efeito observado após a inibição de MGMT [127].

A via MMR atua durante a replicação, reconhecendo e corrigindo inserções, deleções e pareamentos errôneos, como o que ocorre entre uma O6-MeG e uma timidina. No entanto, somente a fita-filha é passível deste reparo, logo O6-MeGs que estejam presentes na fita-molde não são reparadas através de MMR. Este mecanismo ocorre repetidamente produzindo ciclos fúteis de reparo, gerando DSBs, ativando ATR e Chk1 e, em último caso, provocando parada no ciclo celular e morte das células [36]. Alterações na via MMR têm sido associadas com a resistência a TMZ, pois o não reconhecimento das lesões evita a parada de ciclo. Por exemplo, a redução de MSH6, proteína envolvida na iniciação da via MMR, provocou aumento na resistência a TMZ. Adicionalmente, dados clínicos mostraram a presença de mutações no gene *MSH6* em amostras de GBM após o tratamento com TMZ. Este fenômeno não foi observado antes do tratamento, sugerindo que as alterações observadas são resultantes da quimioterapia e podem contribuir para a resistência e recorrência da doença [128-130]. Contudo, estudos mais aprofundados e detalhados são necessários para a completa elucidação da relação entre a via MMR e a resistência a TMZ.

As DSBs são reparadas por duas vias principais: NHEJ e HR. NHEJ funciona em qualquer momento do ciclo celular, já HR atua preferencialmente durante as fases S e G2, quando as cromátides-irmãs estão disponíveis para servir de molde no processo de reparo. Já foi demonstrado que mutações ou silenciamento de ATM ou ATR, que são sensores de DSBs, sensibilizam as células a TMZ [96]. De modo análogo, a inibição farmacológica ou o silenciamento de proteínas à jusante na via HR, como BRCA2, RAD51 e Chk2, também leva à sensibilização ao tratamento [96, 131]. Células de GBM tratadas com outros agentes alquilantes também se tornaram mais sensíveis após a inibição de MRE11, um componente do complexo MRN que reconhece lesões no DNA e recruta a ATM quinase na via HR [132].

Ainda no que se refere ao reparo de DSBs, a enzima Poli-ADP-ribose polimerase 1 (PARP1) é responsável pelo recrutamento de MRE11 and NBS1 [133], proteínas essenciais para o correto funcionamento das vias de HR e NHEJ [134]. Assim, a inibição farmacológica de PARP1 pode representar uma excelente terapia adjuvante, pois sensibiliza o GBM à TMZ e à radiação ionizante, independentemente do status do promotor de MGMT. Muitos ensaios clínicos utilizam esta estratégia em pacientes com GBM [135-137]. A inibição de PARP1 pode

ainda intensificar a ocorrência de SSBs, que são posteriormente convertidas a DSBs durante a replicação. Efeito que é ainda mais pronunciado em células deficientes de *BRCA1/2* pois a restauração de DSBs fica prejudicada, levando à morte celular [138]. Embora mutações nos genes *BRCA1/2* sejam raras em GBM, mutações em *PTEN* provocam fenômeno similar e prejudicam igualmente a HR. Diferentemente de *BRCA*, mutações em *PTEN* são encontradas em um terço dos casos de GBM, permitindo a exploração do potencial de letalidade sintética desta estratégia [139, 140]. Evidências apontam que RAD51 (HR) and DNA-PKcs (NHEJ) também podem estar relacionadas à resistência do GBM à RT [141-143], sugerindo que agentes inibidores das vias NHEJ e HR também possuem potencial terapêutico.

Recentemente mostramos que o silenciamento de *NEIL3*, um gene altamente superexpresso nos GBMs, induz maior percentual de dano ao DNA e morte celular após tratamento com radiação ionizante [116]. *NEIL3* codifica uma DNA glicosilase que participa no reparo por BER, removendo bases oxidadas pela radiação e, assim, gerando sítios apurínicos ou apirimidínicos que são reconhecidos pela endonuclease APEX2 e convertidos a SSB [144]. Essas observações sugerem que *NEIL3* auxilia no gerenciamento do estresse oxidativo gerado pela radiação ionizante, contribuindo para a resistência das células a este tipo de tratamento.

A alta resistência de GBM ao tratamento tem sido igualmente associada à presença de células-tronco tumorais, que possuem capacidade de auto-renovação ilimitada e apresentam baixa taxa de proliferação. Essas características certamente contribuem para a resistência tumoral, uma vez que o tratamento visa eliminar células altamente proliferativas. As células-tronco de GBM podem ser facilmente identificadas através da expressão dos marcadores *CD133*, *SOX-2* e *Nestin* [145, 146]. Todos eles são diretamente relacionados à sobrevida dos pacientes [147, 148], evidenciando a importância da caracterização deste tipo celular. Estudos demonstram que esta sub-população exibe maior eficiência na ativação de sensores de dano no DNA, como ATM, 53BP1 e H2AX, e são, portanto, mais resistentes a QT e RT. Além disso, a inibição de proteínas de reparo, como RAD51, em células-tronco de GBM reduziu o reparo de DSBs e diminuiu a população total destas células [141, 143]. Células-tronco podem ainda entrar em um estado de dormência na presença de drogas, voltando a proliferar normalmente após a retirada da droga [149, 150]. Deste modo, o bloqueio ou redução da atividade de reparo sensibiliza também as células-tronco, podendo assim melhorar significativamente a eficiência do tratamento.

De modo geral, todas essas informações mostram a necessidade de uma análise global e abrangente das vias de reparo de DNA, o que pode revelar novas oportunidades e

estratégias terapêuticas que possibilitem a sensibilização das células de GBM aos tratamentos disponíveis ou ainda, a identificação de alvos promissores para desenvolvimento de novas drogas. Buscando suprir esta carência, em um trabalho anterior, investigamos a expressão de genes de reparo de DNA em astrocitomas de diferentes graus. Alterações de expressão foram identificadas em 19 genes de diferentes vias. No presente estudo, levantamos a hipótese de que as importantes variações observadas previamente pudessem estar relacionadas à progressão tumoral e pior prognóstico. Assim, utilizamos uma estratégia *in silico* para a combinação dos genes alterados em todos os possíveis arranjos, identificando assinaturas gênicas que foram posteriormente empregadas como filtro na busca de correlações com dados clínicos publicamente disponíveis. Foram caracterizadas assinaturas com alto impacto no risco de morte dos pacientes com GBM e, posteriormente, escolhemos uma delas para avançar na caracterização molecular em linhagens celulares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar genes de reparo de DNA com participação relevante no estabelecimento do fenótipo altamente agressivo e resistente às terapias do glioblastoma, visando caracterizar a biologia tumoral e encontrar potenciais novos marcadores de prognóstico e/ou alvos terapêuticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Explorar possíveis correlações entre alterações na expressão dos genes de reparo de DNA e parâmetros clínicos de pacientes com astrocitoma para identificação de genes-alvo promissores para estudos funcionais;
- Avaliar o nível de expressão do alvo selecionado nas linhagens celulares: Res186 (grau I), Res259 (grau II), UW467 (grau II), UW479 (grau III), U343MG (mista, grau II-III), U251MG (mista, grau III-IV), U87MG (grau IV), U138MG (grau IV) e T98G (grau IV); e com base na informação obtida, escolher a(s) linhagem(s) mais adequada para ensaios de silenciamento;
- Padronizar condições efetivas de silenciamento para o gene selecionado na(s) linhagem(s) mais conveniente;
- Utilizando a linhagem silenciada, realizar ensaios funcionais para:
 - a) Investigar o crescimento celular e a modulação da resistência à radiação ionizante após o silenciamento;
 - b) Investigar a distribuição das células modificadas nas fases do ciclo celular, bem como o comportamento de proteínas associadas à regulação do ciclo;
 - c) Avaliação da cinética de recrutamento de proteínas de reparo após a indução de DSBs;
 - d) Verificar a capacidade de reparo de DSBs após o tratamento com radiação;
 - e) Avaliar a habilidade das células modificadas em gerenciar o estresse oxidativo causado pela radiação através da quantificação de espécies reativas de oxigênio;
 - f) Examinar a ocorrência da transição epitélio-mesênquima e a ocorrência de eventos associados a este fenótipo, como capacidade de migração e invasão das células.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata técnica, repetidos três vezes independentemente (réplica biológica) e acompanhados de controles negativo, positivo e não irradiado. Com exceção do item 3.1, a análise estatística foi realizada utilizando o software “Graphpad Prism 5.0” com o teste mais adequado para cada situação, conforme indicado nos experimentos.

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE CORRELAÇÕES COM PROGNÓSTICO

Uma estratégia *in silico* foi desenvolvida para a identificação de assinaturas gênicas relacionadas ao prognóstico dos pacientes (Torrieri, R. et al, em preparação). Basicamente, foram utilizados 3 conjuntos de dados disponíveis *online* na página do TCGA contendo informações de *RNA-seq count* (RSEM) e dados clínicos; o *download* foi feito em 23-03-2015. Foram geradas assinaturas de expressão gênica contendo todas as combinações possíveis dos 19 genes identificados em um estudo anterior através de *PCR-array*. O primeiro componente principal (PC1) de cada assinatura foi computado, possibilitando a divisão da coorte de assinaturas em dois grupos, de acordo com um *cut-off* estabelecido por meio da construção de uma curva ROC (área sob a curva mínima de 0,7). As informações utilizadas na regressão Cox [151] foram: idade, sexo, grau do tumor e status de expressão, nomeando portadores e não-portadores das assinaturas, de acordo com o *cut-off*. Com base na idade, os pacientes foram ainda estratificados em dois grupos: menor que 30 anos e maior que 30 anos. O status de metilação do promotor de MGMT não estava disponível nos dados utilizados (<http://www.cbioportal.org/>). Com base na regressão Cox ($P\text{-value} \leq 0.001$), as assinaturas consideradas parâmetros independentes de correlação com prognóstico foram submetidas a uma análise de Kaplan-Meier.

3.2 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO

As linhagens celulares Res186 (grau I), Res259 (grau II), UW467 (grau II), UW479 (grau III) foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr Fausto Jose Rodriguez (Faculdade de Medicina Johns Hopkins, Baltimore, MD, Estados Unidos), com autorização do Professor Dr Michael Bobola (Universidade de Washington, Washington, DC, Estados Unidos) que estabeleceu o cultivo destas linhagens. O cultivo foi feito em DMEM/F12 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone™ FetalClone™ III Serum HI – GE Healthcare Life Sciences) até 70% de confluência para plaqueamento e realização de ensaios.

As linhagens U343MG (grau III), U251MG (mista, grau III-IV), U87MG (grau IV), U138MG (grau IV) e T98G (grau IV) foram adquiridas comercialmente do repositório *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, VA, Estados Unidos). Estas linhagens foram cultivadas em DMEM (Gibco®) acrescido de 10% de soro fetal bovino até 70% de confluência para realização dos experimentos. Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.3 TRANSFEÇÃO, CHECAGEM DA EXPRESSÃO DE DDB2 E CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO

Os oligos de RNA (siRNA) para o silenciamento de DDB2 (Hs_DDB2_1 NM000107, prod. no. 1027417, cat. no. SI00002086), bem como uma sequência capaz de induzir morte celular para controle positivo da transfecção (AllStars Hs Cell Death siRNA, cat. no. SI04381048) e uma sequência *scramble* para controle negativo (cat. no. 1022076), foram comercialmente adquiridos (FlexiTube siRNA, predesigned, Qiagen®).

Nesta metodologia, a introdução de oligonucleotídeos curtos de RNA dupla fita (*small interfering RNA* - siRNA) é feita nas células utilizando vesículas lipídicas artificiais (Lipofectamine RNAiMax, Invitrogen®), que se fundem com a membrana celular liberando o seu conteúdo no citoplasma. Para o silenciamento foram utilizadas placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo do experimento. Adicionou-se meio Opti-MEM (Gibco®) seguido de siRNA (solução estoque a 20 µM) dirigidos para DDB2 ou sequência-controle e lipofectamina, nesta ordem, na proporção 200:1:2. A mistura foi então homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 20-30 minutos para que o complexo lipossomal de silenciamento fosse formado. Com o complexo pronto para uso, foi gotejada a suspensão celular na densidade mais adequada para cada tipo de ensaio. A placa foi então tampada, homogeneizada e incubada por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação, metade do meio de transfecção foi trocado por meio de cultura fresco e a placa foi incubada novamente por pelo menos mais 24 horas, podendo variar até 120 horas de acordo com o experimento funcional realizado. Os níveis de expressão de DDB2 e a eficiência do silenciamento foram avaliados através de western blot (anticorpo anti-DDB2 ThermoFischer Scientific®, cat. no. PA5-63568). A quantificação das bandas foi feita com o software “ImageJ” e o teste t pareado bicaudal foi empregado na análise estatística para cada par siCtrl-siDDB2.

3.4 FORMAÇÃO DE FOCOS E EXPRESSÃO DE DDB2 EM AMOSTRAS TUMORAIS HUMANAS

O ensaio de formação de focos após tratamento com radiação ionizante (XRAD 320 Precision X-Ray Inc. N. Brandford, CT) e a detecção de DDB2 em um microarranjo de cortes histológicos de amostras tumorais humanas (US Biomax Inc., cat. no. BS17017a) foram realizados por imunofluorescência.

Para a avaliação da formação de focos, as células U138MG foram transfectadas em placas de 24 poços contendo uma lamínula de vidro em cada poco na densidade de 80×10^3 células/ml. No terceiro dia após a transfecção, as células foram submetidas a radiação ionizante em dose de 4Gy. Nos tempos de 5, 15 e 30 minutos e 1, 6 e 24 horas após a radiação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, bloqueadas e permeabilizadas por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação, com uma solução contendo soro fetal bovino 5%, albumina bovina (BSA) 0.5% e Triton X-100 0.1% em tampão fosfato (PBS 1x). Após o bloqueio, as células foram incubadas *overnight*, a 4°C, sob agitação, em solução de bloqueio acrescida de 0.05% Tween 20 contendo anticorpo primário anti-DDB2 (cat. no. ab51017 1:10, Abcam®), anti- γ H2AX (cat. no. 05-636 1:500, EMD Millipore®), anti-53BP1 (cat. no. CST4937S 1:100, Cell Signaling Technologies®) ou anti-RAD51 (cat. no. ab63801 1:100, Abcam®). No dia seguinte a solução de anticorpo primário foi removida e as células foram lavadas com PBS 1x. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (cat. no. A11008 1:500 ou A11017 1:2000, ThermoFischer Scientific®) em solução de bloqueio com Tween 20 por 1 hora, à temperatura ambiente, protegido da luz e sob agitação leve. As células foram então lavadas com PBS 1x, as lamínulas foram removidas dos poços e montadas em lâminas com meio de montagem contendo DAPI (Prolong gold antifade mountant with DAPI, cat. no. P36941, ThermoFischer Scientific®). As lâminas foram analisadas em microscopia de fluorescência (Axio Imager Microscope, Zeiss®), adquirindo-se pelo menos 10 fotos de cada condição de tratamento, em aumento de 63x. Os focos foram contados utilizando o software “ImageJ” contendo o macro de contagem (Bram van den Broek, Netherlands Cancer Institute, 2012-2015). Na análise estatística foi empregado o Teste t bicaudal seguido do pós-teste de Mann-Whitney.

A análise do arranjo de amostras tumorais humanas foi realizada de modo semelhante à formação de focos, porém com um pré-tratamento: as lâminas foram primeiramente desparafinizadas e desidratadas em soluções sequenciais de xileno, etanol puro, etanol 95% e etanol 70%, nesta ordem; na sequência as lâminas foram lavadas com água deionizada, acondicionadas em panela de pressão (Digital decloaking chamber, BioCare Medical™) e

submetidas a 110°C por 1 hora e meia em tampão de ácido cítrico (Vector Laboratories, cat. no. H3300) para recuperação de antígeno. Os procedimentos de bloqueio, incubação dos anticorpos primário anti-DDB2 e secundário foram semelhantes àqueles realizados no ensaio de formação de focos. Foram tiradas pelo menos 3 fotos de cada corte histológico em microscopia de fluorescência (Axio Imager Microscope, Zeiss®), aumento de 40x.

3.5 CURVA DE CRESCIMENTO, ENSAIO CLONOGÊNICO E ANÁLISE DE CICLO CELULAR

Para avaliar o crescimento da linhagem U138MG após o silenciamento de DDB2, as células foram transfectadas em placas de 96 poços a uma densidade de 10×10^3 células/ml e, nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, foram fixadas com paraformaldeído 4%, coradas com cristal violeta 0.01% (w/v) em água e lavadas com água deionizada. Após a secagem da placa *overnight* em temperatura ambiente, o cristal violeta foi solubilizado em 100µl de metanol puro e foi procedida a leitura da absorbância a 570nm. As absorbâncias foram transferidas a uma planilha do Excel (Microsoft Office®) e o crescimento relativo das células em cada condição foi calculado com base na razão entre as absorbâncias de cada tempo, subtraídas do branco, e o tempo zero [por exemplo: (absorbância do tempo de 24h – absorbância branco) / absorbância do tempo zero)]. Na análise estatística foi empregado One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

Para avaliar a resistência das células à radiação ionizante após o silenciamento de DDB2, foi feito o ensaio clonogênico. As células foram transfectadas em placas de 6 poços com baixa densidade (100-250 células/ml) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4-6 horas, tempo suficiente para que as células aderissem à placa. Após a adesão, as células foram submetidas a radiação ionizante, em doses de 2, 4, 6 ou 8Gy, e mantidas em estufa condicionada por 20 dias. No vigésimo dia as células foram fixadas/coradas com cristal violeta 0.5% em metanol e lavadas. Após a secagem das placas as colônias foram contadas, as médias foram calculadas e normalizadas em relação ao controle não irradiado. Foi feito o teste t bicaudal pareado na análise estatística.

O ensaio de ciclo celular foi realizado com base no conteúdo de DNA, evidenciado pelo corante iodeto de propídeo. As células foram transfectadas em placas de 6 poços, densidade de 64×10^3 células/ml. No terceiro dia após a transfecção as células foram irradiadas (8Gy). Nos tempos de 24 e 48h, as células foram tripsinizadas da placa, colocadas em tubos de 1.5ml e centrifugadas (5 minutos, 2000RPM). Em seguida, o pellet foi lavado com PBS-EDTA 5mM 1x e ressuspenso em 1 ml de etanol 70% gelado seguido de incubação *overnight* a -20°C para

fixação das células. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados novamente (5 minutos, 3000RPM) e o pellet foi lavado com PBS-EDTA 5mM 1x; após a lavagem o pellet foi ressuspensionado em 225µl de PBS-EDTA acrescido de 25µl de RNase A (10mg/ml, PureLink RNase A, cat. no.12091021, ThermoFischer Scientific®) e incubado a 37°C por 30 minutos, para a degradação do conteúdo de RNA celular, deixando somente o DNA disponível para identificação com corante. Por fim, foram adicionados 250µl de iodeto de propídeo (100µg/ml, cat. no. P3566, ThermoFischer Scientific®), um corante intercalante de DNA, e feita a leitura em citômetro de fluxo (LSRFortessa™, BD). Histogramas de distribuição nas fases do ciclo celular foram construídos no software “ModFit LT 5.0”, as porcentagens de cada fase foram transferidas para o software “Graphpad Prism 5.0”, onde o teste t bicaudal seguido do pós-teste de Mann-Whitney foram utilizados na análise estatística.

3.6 ENSAIO DO COMETA NEUTRO

O teste do cometa neutro foi realizado para a avaliação da capacidade de reparo de DSBs induzidas pela radiação ionizante. Para isso, as células foram transfectadas em placas de 12 poços a uma densidade de 80×10^3 células/ml. No terceiro dia após o silenciamento, as células foram submetidas a 4Gy e nos tempos de 5, 15 e 30 minutos e 1, 6 e 24 horas após o tratamento as células foram lavadas, tripsinizadas, cetrifugadas (2000RPM, 5min), ressuspensionadas em ágar de baixo ponto de fusão (cat. no. 4250-500-02, Trevigen®) e colocadas em lâminas de microscopia. Após a solidificação do ágar contendo as células tratadas, as lâminas foram incubadas a 4°C por 1 hora em tampão de lise (CometAssay Lysis solution cat. no.4250-050-01, Trevigen®). Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão TBE 1x (cat. no. 15581044, ThermoFischer Scientific®) e colocadas em cuba de eletroforese. A corrida foi feita em TBE 1x com a aplicação de uma tensão de 1V/cm por 20 minutos. Ao final da corrida, as lâminas foram lavadas com água deionizada e incubadas em etanol 70% gelado por 5 minutos para a fixação das células. Em seguida, as lâminas foram deixadas em superfície plana, à temperatura ambiente, *overnight* para secagem. No dia subsequente as lâminas foram coradas com *SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain* (cat. no. S11494, ThermoFischer Scientific®) diluído em tampão TE 1x e uma lamínula foi então posicionada, prendendo o ágar na lâmina. Imediatamente após a adição do corante, foram tiradas 5 fotos de cada condição em microscopia de fluorescência, aumento de 5x. As imagens foram submetidas a análise no software TriTek CometScore™ e a análise estatística foi feita com o teste One-Way ANOVA bicaudal, seguido do pós-teste de Mann-Whitney.

3.7 WESTERN BLOT

O comportamento de proteínas envolvidas em diferentes vias celulares foi observado através de western blot. As células foram transfectadas em placas de 6 poços (63×10^3 células/ml). No terceiro dia após a transfecção, as células foram irradiadas (4Gy) e os lisados (Pierce RIPA buffer, cat. no. 89900, ThermoFischer Scientific®) foram feitos nos tempos de 5, 15 e 30 minutos e 1, 6 e 24 horas. Os experimentos envolvendo proteínas relacionadas a transição epitélio-mesênquima (EMT) não foram submetidos à radiação. Os lisados foram quantificados (Pierce BCA Protein Assay Kit, cat. no. 23225, ThermoFischer Scientific®) para que cerca de 80µg de proteína fossem aplicados em gel de poliacrilamida (4-20% Mini-PROTEAN TGX Gels, cat. no. 456-1094, BioRad®) e submetidos à eletroforese em tampão Tris-glicina-SDS (cat. no. 1610732) com tensão de 90V por 100min. Foi feita então a transferência (Trans-Blot Turbo Nitrocellulose Transfer Packs, BioRad®) seguida do bloqueio com 5% de leite desnatado em tampão TBS-Tween 0.01%, por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. A incubação com anticorpos primários (Tabela 2) foi feita em solução de bloqueio, *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-Tween e incubadas com anticorpo secundário (IRDye 800CW cat. no. P/N925-32210, LI-COR®) por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação, protegidas da luz. As imagens foram adquiridas em equipamento com detecção *near-infrared* (Odyssey CLx, LI-COR®) e as bandas foram quantificadas usando o software “ImageJ”. A análise estatística foi feita com o teste t bicaudal pareado comparando cada par siCtrl-siDDB2.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE ROS

Com base nos primeiros resultados obtidos, se fez necessária a quantificação de ROS. Para isso, as células foram transfectadas em placas de 24 poços com lamínula (80×10^3 células/ml). No terceiro dia após o silenciamento as células foram incubadas com solução contendo DAPI 10µg/ml, Triton X-100 3% e CM-H₂DCFDA 10µM (cat. no. C6827, ThermoFischer Scientific®) por 30 minutos a 37°C, protegido da luz. Nesta etapa, o reagente CM-H₂DCFDA se difunde livremente através da membrana celular e é retido no interior da célula através de ligações covalentes que estabelece com componentes intracelulares, o que leva à perda do grupamento cloro-metil (CM).

Tabela 2. Anticorpos utilizados em ensaios de western blot

anticorpo	cat. no.	diluicao	fabricante
anti-Zeb1	PAB19268	1:1000	AbNova
anti-vimentina	3390S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-E-caderina	3195S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-N-caderina	4061S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-Snail	3895S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-EZH2	5246S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-SOD2	13194S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-Catalase	14097S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-53BP1	4937S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-p53BP1	2675S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-ATM	MA5-15816	1:1000	ThermoFischer Scientific
anti-pATM	4526S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-ATR	PA1-450	1:1000	ThermoFischer Scientific
anti-pATR	58014S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-RAD51	ab63801	1:1000	Abcam
anti-pRAD51	ab61111	1:500	Abcam
anti-p21	2947S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-Ku70	4588S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-Ku80	2753S	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-H2AX	05-636	1:500	EMD Millipore

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DMEM fresco sem adição de soro fetal bovino por mais meia hora, protegido da luz. Durante este período as esterases intracelulares removem os grupamentos acetato presentes na molécula do reagente de detecção, convertendo-o a H_2DCF que é passível de oxidação. As células foram então submetidas a tratamento com 4Gy de radiação ionizante, que sabidamente provoca a formação de ROS; estes por sua vez provocaram a oxidação de H_2DCF a DCF, que emite fluorescência (detecção no canal verde, em 510nm), permitindo a quantificação indireta de ROS. Nos tempos de 5 e 15 minutos após o tratamento, as células foram lavadas com PBS, lâminas foram montadas e analisadas imediatamente após a montagem. Foram tiradas 5 fotos de cada condição em microscopia de fluorescência com aumento de 10x. A intensidade da fluorescência foi quantificada no software “ImageJ” e a análise estatística foi feita utilizando One-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

3.9 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO E INVASÃO

Para avaliar o impacto do silenciamento de DDB2 na capacidade migratória das células, foi realizado o “*scratch test*”. No terceiro dia após a transfecção, feita em placas de 24 poços com densidade de 80×10^3 células/ml, com o auxílio de uma ponteira de 200µl a monocamada celular foi riscada. Foram tiradas pelo menos 3 fotos de cada condição em microscopia de campo claro (aumento de 4x) nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas após a ranhura da monocamada celular. Posteriormente, a área das fendas foi medida usando o software “ImageJ”, o índice migratório foi calculado [(área do tempo zero - área do tempo-teste) / área do tempo zero] e o teste t pareado bicaudal foi empregado na análise estatística.

No ensaio de avaliação da capacidade de invasão celular, foram utilizadas placas de 24 poços com insertos contendo membrana porosa recoberta com matrigel (Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber, cat. no. 354480); bem como insertos-controle, com membrana porosa, mas sem matrigel (cat. no. 354578). No terceiro dia após a transfecção, as células de cada condição foram tripsinizadas, ressuspensas em DMEM sem soro (50×10^3 células/ml) e colocadas no interior dos insertos em 750µl de volume. Dentro do poço, parte inferior ao inserto, foram adicionados 500µl de DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Em seguida a placa foi incubada em estufa condicionada por 22 horas. Neste caso, o soro atua como quimioatrativo para as células que, se forem capazes de invadir a camada de matrigel, alcançam o compartimento contendo soro, permanecendo aderidas à parte inferior da membrana. Após a incubação, as células que não foram incapazes de invadir, bem como o matrigel, foram removidos do inserto com auxílio de um *swab* umedecido com DMEM. As células invasoras, ainda aderidas à outra face da membrana, foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal violeta 0.01% em água. Os insertos foram mantidos em temperatura ambiente *overnight* para secagem. No dia seguinte as membranas foram removidas dos insertos e montadas em lâminas, com adição de uma gota de óleo de imersão e lamínula. Foram tiradas cinco fotos de cada membrana em microscopia de campo claro colorida, em aumento de 20x, e o número de células em cada imagem foi contado usando “ImageJ”. A porcentagem [(média de células no inserto com matrigel / média de células no inserto controle) x 100] e o índice de invasão (% invasão siDDB2 / % invasão siCtrl) foram calculados; o teste t pareado bicaudal foi utilizado na análise estatística.

4 RESULTADOS

4.1 BUSCA POR CORRELAÇÕES COM PROGNÓSTICO

Em um estudo anterior investigamos a expressão de 84 genes envolvidos na sinalização e reparo de danos no DNA durante a progressão dos astrocitomas, através de *PCR array*. Entre eles, encontramos 19 genes com padrão de expressão significativamente alterado. Com base neste dado, buscamos identificar genes ou conjuntos de genes cujas alterações fossem relevantes para a biologia deste tipo tumoral. Por meio de uma análise *in silico*, estes genes foram dispostos em todos os arranjos possíveis, gerando 1.048.575 combinações, envolvendo desde um único gene até todos os 19 genes em uma única assinatura. As assinaturas foram então utilizadas para buscas de associação com o prognóstico de sobrevida de pacientes acometidos com astrocitomas no banco de dados do TCGA. Identificamos 3.357 assinaturas de expressão gênica com forte correlação com pior prognóstico. As 10 assinaturas mais relevantes, associadas aos maiores riscos de morte observados, estão destacadas na tabela 3. Dentre as assinaturas encontradas, 5 foram constituídas de um único gene. A redução na expressão de DDB2 e a superexpressão de NEIL3, EXO1, BRCA2 e BRIP1, isoladamente, mostraram correlação com taxas de risco (TR) de morte aumentadas, variando de 1,75 a 3,22 (Tabela 4).

Tabela 3. Assinaturas associadas aos maiores riscos de morte.

Assinatura	TR	Cox (valor de P)
DDB2	3.21	3.0E-08
NEIL3	2.15	3.9E-05
EXO1	2.13	6.5E-05
DDB2_EXO1	4.73	2.8E-12
DDB2_NEIL3	4.43	3.5E-11
DDB2_RAD54L	4.32	6.0E-11
DDB2_XRCC2	3.85	3.0E-10
DDB2_MSH6	3.22	3.6E-09
DDB2_LIG3	2.10	8.4E-05
DDB2_PNKP	2.05	3.8E-04

TR: taxa de risco

Tabela 4. Assinaturas de gene único e o risco associado.

Assinatura	TR	Cox (valor de P)
DDB2	3,22	3,00E-08
NEIL3	2,15	3,90E-05
EXO1	2,13	6,50E-05
BRCA2	1,95	8,90E-05
BRIP1	1,75	0,00037

TR: taxa de risco

Curiosamente, DDB2 foi o único gene sub-expresso em GBM e esta assinatura de gene único foi associada ao mais alto risco de morte (3,22), levando a uma redução expressiva na expectativa de vida dos pacientes (Figura 2). Além disso, DDB2 apareceu em 99,4% das assinaturas (Tabela 5) e, quando ordenadas da maior para a menor TR, as 67 primeiras incluem DDB2, indicando que esta alteração possui papel fundamental na progressão dos astrocitomas.

Estes dados são a base do presente estudo e já se encontram publicados no periódico “*Tumor Biology*” (2017, Apêndice A) [116]. Portanto, escolhemos DDB2 como alvo para aprofundar as análises de expressão e para realização de ensaios funcionais de silenciamento em linhagens celulares de GBM.

Figura 2. Curva de sobrevida de pacientes em função do nível de expressão de DDB2.

Curva Kaplan-Meier de sobrevida para pacientes portadores (vermelho) e não portadores (azul) da assinatura caracterizada pela redução na expressão de DDB2. A curva em vermelho denota pacientes com valor de PC1 acima do *cut-off* estabelecido pela curva ROC. A curva em azul se refere a pacientes com PC1 abaixo do *cut-off*. $P < 0,0001$.

Tabela 5. Frequência de cada gene nas assinaturas[■]

Gene	Contagem	Frequência (%)
<i>DDB2</i>	3336	99,40%
<i>NEIL3</i>	2013	59,98%
<i>EXO1</i>	2006	59,77%
<i>BRCA2</i>	1	0,03%
<i>BRIP1</i>	1	0,03%

■TR > 1,5, P(Cox) < 0,001.

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DDB2 EM ASTROCITOMAS DE DIFERENTES GRAUS

A expressão de DDB2 em nível proteico foi avaliada em um arranjo de cortes histológicos contendo astrocitomas de diferentes graus. O arranjo continha 7 astrocitomas de

grau I, 13 astrocitomas de grau II, 11 astrocitomas de grau III, 27 GBMs e 4 cortes de tecido cerebral normal adjacente ao tumor. Das 58 amostras avaliadas apenas duas apresentaram expressão de DDB2, uma amostra de astrocitoma de grau II, de uma paciente do sexo feminino com 52 anos de idade (Figura 3A e B), e uma amostra de astrocitoma de grau IV, GBM, de um paciente do sexo masculino com 11 anos de idade (Figura 3C e D). Curiosamente, a localização de DDB2 na amostra de grau II aparece de maneira perinuclear enquanto na amostra de grau IV, ocorre dentro do núcleo.

Figura 3. Micrografias de cortes histológicos de astrocitomas com detecção de DDB2.

Imagens com coloração em H/E (A e C) e imunofluorescência com marcação de DDB2 (verde) e núcleo corado com DAPI (azul, B e D), em aumento de 40x. A e B) Astrocitoma de grau II, paciente do sexo feminino com 52 anos de idade. C e D) Astrocitoma de grau IV, paciente do sexo masculino com 11 anos de idade.

4.3 EXPRESSÃO DE DDB2 NAS LINHAGENS CELULARES E CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO

Com o propósito de escolher uma linhagem para ensaios funcionais de silenciamento, o padrão de expressão de DDB2 foi avaliado nas linhagens de astrocitoma Res186, Res259, UW467, UW479, U251MG, U343MG, U87MG, U138MG e T98G, bem como em uma linhagem primária de astrócito normal (AN). Observamos que, no conjunto avaliado, U138MG foi a única linhagem de astrocitoma que apresentou altos níveis expressão de DDB2, sendo a única adequada para ensaios de silenciamento gênico (Figura 4). Após a escolha da linhagem U138MG, foram padronizadas as condições de silenciamento utilizando a tecnologia de transfecção de siRNAs em lipossomas. A expressão de DDB2 foi avaliada por western blot no

1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º e 15º dias após a transfecção (Figura 5A e B). Os melhores percentuais de redução da expressão de DDB2 foram observados no 3º, 4º e 5º dias após a transfecção (Figura 5C), com aproximadamente 76, 86 e 88% de diminuição na quantidade de proteína, respectivamente (Figura 5D). O período de três dias entre o 3º e o 5º dias foi, portanto, considerado como a janela de tempo mais adequada para a realização de experimentos. No caso do ensaio clonogênico, as células passaram por um segundo processo de silenciamento no 10º dia após a primeira transfecção, pois neste tempo as células retomaram a expressão DDB2 (Figura 5B).

Figura 4. Expressão da proteína DDB2 em linhagens de astrocitoma de diferentes graus.

Figura 5. Expressão de DDB2 após transfecção com siRNA.

A e B) Expressão de DDB2 antes e no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 10º e 15º dias após o silenciamento. **C)** Gráfico mostrando a quantificação relativa das bandas em células não-transfectadas (NT), siControle (Ctrl) ou siDDB2. A quantificação foi feita no software “ImageJ”, com base na expressão de β -actina. O gráfico foi feito usando o software “Graphpad Prism 5.0” com o Teste t pareado bicaudal, que compara cada par siCtrl-siDDB2. **D)** Percentual de silenciamento obtido em cada tempo avaliado. ua: unidade arbitrária. ■ após retransfecção no 10º dia. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4.4 IMPACTO DO SILENCIAMENTO DE DDB2 NO CRESCIMENTO, RESISTÊNCIA À RADIAÇÃO IONIZANTE E DINÂMICA DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS U138MG

O crescimento das células U138MG após o silenciamento foi avaliado ao longo de 5 dias. Quando comparado com células transfectadas com siCtrl e células não-transfectadas, observamos que o crescimento das células com reduzida expressão de DDB2 ocorre de maneira bastante similar nas três condições avaliadas (Figura 6A). Resultado análogo foi observado quando a resistência à radiação ionizante foi avaliada. Porém, quando irradiadas com uma dose de 8Gy, as células silenciadas para DDB2 apresentaram fração sobrevivente significativamente maior do que as células transfectadas com siCtrl e células não transfectadas (Figura 6B), evidenciando possível envolvimento de DDB2 em mecanismos de resistência a este tipo de tratamento.

Figura 6. Perfis de crescimento e resistência à radiação ionizante de células com silenciamento de DDB2.

A) Perfil de crescimento das células ao longo de cinco dias após o plaqueamento. A cada 24 horas uma placa foi corada com cristal violeta e a absorbância foi lida em 570nm. B) Fração de células sobreviventes 20 dias após o tratamento com radiação ionizante em doses de 2, 4, 6 e 8Gy. Gy: Grays. NT: células não transfectadas, siCtrl: controle negativo de silenciamento, siPos: controle positivo de silenciamento (indução de morte). *P<0,05.

Para a análise de ciclo celular, as células foram irradiadas (8Gy) no terceiro dia após o silenciamento e, nos tempos de 24 e 48 horas depois do tratamento, foi avaliada a distribuição da população no ciclo celular através do conteúdo de DNA. No tempo de 24 horas, quando comparado ao controle, pode-se observar aumento expressivo do percentual de células em G2/M e redução em G1. No entanto, não foram observadas diferenças entre células transfectadas com siCtrl e siDDB2. Passadas 48 horas do tratamento com radiação ionizante, o grupo siDDB2 apresentou percentual significativamente maior de células na fase G1 e menor na fase G2/M, em comparação com as células transfectadas com siCtrl (Figura 7A, B e C), o que sugere que o silenciamento de DDB2 facilita a resolução da parada em G2/M. Pode-se constatar ainda que p21 foi induzida após o tratamento, porém, essa ativação é atenuada com o silenciamento de DDB2, o que é observado de modo mais pronunciado 30 minutos após a radiação (Figura 7D e E). Considerando que a proteína p21 é uma importante reguladora do ciclo celular capaz de promover paradas em G1, S e/ou G2 [152], podemos supor que a retomada mais rápida do ciclo celular nas células silenciadas pode estar relacionada com a redução de p21.

Figura 7. Distribuição das células U138MG no ciclo celular e níveis de expressão de p21.

E) Quantificação das bandas mostradas em **D**, feita com o software “Graphpad Prism 5.0”, análise estatística baseada em One-Way ANOVA seguido do teste t pareado bicaudal, que analisa cada par siCtrl-siDDB2. NIR: não irradiado. ua: unidade arbitrária. Ctrl: Controle. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

A) Histogramas mostrando a distribuição no ciclo celular em 24 e 48 horas após o tratamento com 8Gy de radiação. As células foram irradiadas no terceiro dia após a transfecção (siCtrl ou siDDB2). Esta análise foi feita utilizando o software “ModFit LT 5.0”. **B)** Gráfico da distribuição das populações no ciclo celular, construído no software “Graphpad Prism 5.0”. **P<0,01. **C)** Tabela com a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. **D)** Western blot mostrando a expressão de p21 nos tempos indicados após 4Gy de radiação ionizante.

4.5 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO E REPARO DE DANOS NO DNA APÓS SILENCIAMENTO E IRRADIAÇÃO

A indução de quebras no DNA após o tratamento com radiação ionizante foi avaliada por meio do teste do cometa neutro, que detecta apenas quebras de dupla-fita. Examinando a quantidade de DNA fragmentado na cauda dos cometas (Figura 8A) e o *Olive moment* (Figura 8B), um cálculo que considera a quantidade de DNA e o tamanho das caudas dos cometas, notamos que as células transfectadas com siDDB2 apresentam quantidade de quebras significativamente maior do que as células-controle antes e 5 minutos após o tratamento (4Gy). No entanto, a partir de 15 minutos após o tratamento o percentual de DNA quebrado na cauda, bem como o *Olive moment*, apresentaram expressiva redução nas células silenciadas em todos os tempos avaliados. Notavelmente, 6 horas após a radiação, as células siDDB2 já haviam reparado completamente as DSBs, enquanto que as células siCtrl necessitaram de um intervalo de tempo maior para a restauração das quebras (Figura 8).

Figura 8. Cinética de reparo de quebras na dupla-fita de DNA após silenciamento de DDB2.

Os gráficos mostram a média do percentual de DNA quebrado nas caudas (A) e Olive moment (B). No terceiro dia após a transfecção com siDDB2 ou siCtrl as células foram irradiadas com 4Gy. O ensaio do cometa foi realizado com células fixadas nos tempos de 5, 15 e 30 minutos e 1, 6 e 24 horas após a radiação. O *Olive moment* é um cálculo que considera a quantidade de DNA fragmentado e o tamanho da cauda dos cometas. Análise estatística foi baseada no teste One-Way ANOVA seguido do teste t bicaudal pareado, sendo realizada com o software “Graphpad Prism 5.0”. NIR: não irradiado. Ctrl: Controle. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Através da realização de ensaios de imunofluorescência, analisamos a formação de focos de proteínas envolvidas na sinalização de danos e no reparo de DNA em células silenciadas e não silenciadas após exposição à radiação ionizante. Primeiramente, foi observada a capacidade de formação de focos das proteínas DDB2, após tratamento com 4Gy de radiação. Foi possível verificar que DDB2 é de fato recrutada para os locais de lesão, mostrando um pico de formação de focos 15 minutos após o tratamento (Figura 9A e E), o que revela seu

envolvimento no reparo de DSB geradas por radiação ionizante. Então, avaliamos a formação de focos de 53BP1 (marcador da via NHEJ), RAD51 (marcador da via HR) e γ H2AX (marcador de DBSs) em células silenciadas para DDB2 e irradiadas. Observamos uma redução significativa no número de focos de γ H2AX nas células silenciadas em relação às células controle nos tempos de 5 minutos, 1, 6 e 24 horas (Figura 9B e F), o que mostra menor ativação das vias de sinalização que respondem à presença de DSBs. Estes resultados estão em concordância com o teste do cometa, no qual notamos que as células com redução de DDB2 são capazes de restaurar quebras no DNA mais rapidamente, o que é observado a partir de 15 minutos pós-irradiação (Figura 8).

A formação de focos de 53BP1 mostrou-se levemente reduzida nas células silenciadas para DDB2 apenas nos tempos de 5 minutos e 24 horas após a irradiação (Figura 9C e G), o que é pouco conclusivo e deixa em aberto uma possível relação de DDB2 com a via NHEJ. A via de HR, avaliada pela formação de focos de RAD51, foi afetada de modo mais expressivo e consistente, sendo que foi detectado menor número de focos nas células silenciadas em todos os tempos avaliados (Figura 9D e H). Tomados em conjunto, os resultados mostram que as células silenciadas para DDB2, muito embora apresentem menor ativação da via de HR (Figura 9B e D), são mais competentes na função de reparo, uma vez que 6 horas após o tratamento já retomaram os níveis basais de fragmentação de DNA (Figura 8A), diferentemente das células controle.

Adicionalmente, analisamos a expressão/ativação de proteínas centrais na reposta à presença de danos ao DNA utilizando western blot. Avaliamos a ativação das proteínas ATM, ATR, 53BP1 e RAD51 para as formas fosforiladas, bem como os níveis de expressão de γ H2AX, Ku70, Ku80 e por fim, DDB2 para fins de verificação do silenciamento (Figura 10). Observamos claramente a fosforilação das proteínas ATM, ATR, 53BP1 e H2AX em resposta à radiação ionizante, porém não detectamos nenhum efeito significativo nos padrões de ativação ou na quantidade das proteínas analisadas frente ao silenciamento de DDB2.

Figura 9. Formação de focos de proteínas de sinalização e reparo de DNA após exposição à radiação ionizante.

Figura 10. Expressão de proteínas de sinalização e reparo de DNA após a radiação ionizante.

Imagens representativas de western blot mostrando a expressão/ativação de proteínas envolvidas na sinalização de DSBs e no reparo de DNA. No terceiro dia após a transfecção (siCtrl ou siDDB2), as células U138MG foram irradiadas (4Gy) e lisadas nos tempos de 5, 15 e 30 minutos (min) e 1, 6 e 24 horas (h) após o tratamento. NIR: não irradiado. Ctrl: Controle.

4.6 ACÚMULO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Alguns relatos da literatura mostram a associação de DDB2 com o controle do metabolismo de ROS e, portanto, julgamos pertinente a investigação da produção ROS e a expressão das enzimas antioxidantes catalase e superóxido-dismutase (SOD2) frente ao silenciamento de DDB2. Observamos que mesmo antes do tratamento com radiação, as células siDDB2 apresentaram uma quantidade consideravelmente alta de ROS em comparação com o controle. Situação semelhante ocorreu em 5 minutos após o tratamento. Contudo, 15 minutos após a incidência de radiação, as células silenciadas apresentaram uma diminuição significativa na quantidade de ROS quando comparadas às células siCtrl (Figura 11A e C).

Figura 11. Quantificação de ROS e expressão das enzimas antioxidantes catalase e SOD2.

Quantificação de ROS e níveis de expressão de catalase e SOD2 em células U138MG no terceiro dia após a transfecção com siCtrl ou siDDB2, antes e após tratamento com 4Gy de radiação ionizante. **A)** Imagens representativas de microscopia de fluorescência para cada condição. As ROS foram detectadas nos tempos indicados por CM-H₂DCFDA e núcleos corados com DAPI, aumento de 10x. **B)** Imagens representativas de western blot. Os lisados foram preparados nos tempos indicados após a radiação ionizante. **C)** Gráfico mostrando a intensidade média de fluorescência correspondente a figura **A**, no software “ImageJ”. **D e E)** Quantificação das bandas em **B**, feita com o software “ImageJ”. Análise estatística foi feita utilizando o software “Graphpad Prism 5.0” através do teste One-Way ANOVA seguido do teste t bicaudal pareado. ua: unidade arbitrária. m: minutos. h: horas. NIR: não irradiado. Ctrl: Controle. *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,001.

Além dos níveis de ROS, foi detectado aumento na expressão de catalase nos tempos de 5 e 15 minutos e 1 hora. No caso da enzima SOD2 observamos redução em todos os tempos avaliados (Figura 11B e E). Este dado sugere que a redução nos níveis de DDB2 provoca diminuição mais rápida no conteúdo celular de ROS, controlando de modo mais eficiente a

extensão dos danos oxidativos provocados pela radiação através da indução de catalase e, portanto, tornando as células silenciadas mais resistentes a este tratamento.

4.7 INDUÇÃO DE EMT, MIGRAÇÃO E INVASÃO

A função de DDB2 foi ainda associada ao controle da diferenciação celular, então avaliamos a expressão de genes envolvidos em transição epitélio-mesênquima (EMT) e a atividade migratória das células após o silenciamento de DDB2. Durante a caracterização das células modificadas, foi observado que a linhagem U138MG expressa regularmente vimentina, um tipo de filamento intermediário que caracteriza células mesenquimais, e não apresenta níveis detectáveis de E-caderina, proteína de adesão presente em linhagens epiteliais (Figura 12A). Este comportamento dificulta a detecção da ocorrência de EMT, uma vez que vimentina e E-caderina são frequentemente utilizadas como marcadores deste fenômeno. Portanto, avaliamos a indução de EMT por meio de outros marcadores, como EZH2, Snail, SOX2, Zeb1 e N-caderina (Figura 12B e C). Os resultados mostram que ocorre indução de Zeb1 e N-caderina em consequência do silenciamento de DDB2 (Figura 12C e D).

Avaliamos ainda a capacidade de invasão e migração das células silenciadas, habilidades intimamente relacionadas ao perfil mesenquimal. Foi observado que a redução de DDB2 provoca aumento significativo capacidade de invasão (índice médio de 1,6) e migração da linhagem U138MG (Figura 13), sugerindo que DDB2 possui papel fundamental no controle de EMT.

Figura 12. Avaliação dos níveis de marcadores de EMT.

A) Imagens de microscopia de fluorescência mostrando a expressão de E-caderina e vimentina (verde), sendo o núcleo corado por DAPI (azul). Aumento de 40x. **B)** Imagens de western blot para proteínas indicadoras de EMT em células não-transfectadas (NT), siCtrl ou DDB2. **C)** Quantificação das bandas em **B**, feita com o software “ImageJ”, com base na expressão de β -actina, e análise estatística com o “Graphpad Prism 5.0”, por meio do teste One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. ua: unidade arbitrária. Ctrl: Controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Figura 13. Perfil de invasão e migração das células silenciadas para DDB2.

A) Micrografias representativas de ensaios de invasão celular corados por cristal violeta, em microscopia de campo claro, aumento de 20x. Os pontos pequenos representam os poros da membrana que dá suporte ao matrigel (mg), as células invasoras aparecem em roxo. **B)** Gráfico do número médio de células invasoras por campo analisado. **C)** Fotos representativas do ensaio de migração nos tempos indicados após a ranhura da monocamada celular com uma ponteira de 200μl. Microscopia de campo claro, aumento de 4x. **D)** Gráfico das médias do índice de migração, calculado com base na área das fissuras adquiridas com o software “ImageJ”. Para os cálculos dos gráficos em **B** e **D**, foi usado o software “Graphpad Prism 5.0”, análise One-Way ANOVA seguido do teste t bicaudal pareado. Ctrl: controle. *P<0,05, **P<0,01.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho caracterizamos DDB2 como uma proteína central na progressão dos astrocitomas. Este estudo teve origem em um trabalho anterior, no qual identificamos 19 genes de reparo de DNA com expressão alterada em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Partindo deste ponto, fizemos então uma análise *in silico* visando a identificação de genes relacionados com a agressividade deste tipo tumoral. Para isso, as alterações observadas anteriormente foram combinadas em todos os arranjos possíveis, definindo assinaturas de expressão gênica que foram utilizadas para buscas de associação com o prognóstico de sobrevida. Identificamos um grande conjunto de assinaturas fortemente relacionadas com prognóstico dos pacientes que, portanto, certamente possuem um importante papel na progressão para estágios mais agressivos dos astrocitomas [116]. Devemos destacar os genes DDB2, NEIL3, EXO1, BRCA2 e BRIP1 que mostraram associação com prognóstico de forma isolada, ou seja, alteração na expressão de apenas um destes genes é suficiente para promover piora na sobrevida dos pacientes.

A maioria dos genes de reparo que se mostraram alterados sofrem expressiva indução nos astrocitomas de alto grau. Porém, a redução na expressão de DDB2 revelou ter um grande impacto sobre a agressividade das células tumorais, uma vez que foi correlacionada à maior taxa de risco de morte observada (Tabela 3, Figura 2) e foi encontrada em 99% das assinaturas associadas ao pior prognóstico (Tabela 4). Estes dados sugerem que a perda de DDB2 pode atribuir competências que facilitem a progressão a estágios mais avançados dos astrocitomas. Em estudo similar, também utilizando informações disponíveis no TCGA, o recente trabalho conduzido por Kun e colaboradores, mostrou que o padrão de expressão de 5 genes de reparo, incluindo *DDB2*, é um importante fator de predição de recorrência e sobrevida para pacientes de GBM [153]. Já no estudo realizado por Roversi e colaboradores, *DDB2* foi relacionado à progressão tumoral com base na análise do perfil genético de 25 linhagens primárias de gliomas de diferentes graus [154]. Esses dados corroboram as nossas observações, reforçando a relevância de DDB2 para progressão dos astrocitomas. Outras evidências sugerem que a redução da expressão de DDB2 também está correlacionada com o prognóstico pobre de pacientes com câncer de ovário [155] e progressão de câncer de cólon [156].

Codificada pelo gene *XPE*, DDB2 - *DNA damage binding protein 2* – atua nos passos iniciais da via NER como enzima remodeladora de DNA lesado. O complexo formado por DDB2 e DDB1 reconhece e se liga preferencialmente a danos induzidos por radiação UV, como dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD), fotoprodutos 6-4 (6-4 PP), sítios

apurínicos/apirimidínicos e pequenos trechos de pareamento errôneo, recrutando as proteínas subsequentes na cascata de ativação da via NER [157]. Além do papel na via NER, sua primeira função a ser documentada, DDB2 tem sido caracterizada pelo seu envolvimento em outras funções, como por exemplo, regulação da transcrição [158] e degradação [159] de outras proteínas, bem como pela interação com importantes vias oncogênicas como a de p53. Foi documentado que a indução da expressão de DDB2 leva a um aumento expressivo na resposta de p53 após tratamento com UV [160] e que a expressão de DDB2 é dependente de p53 [161], formando um ciclo de regulação mútua. Estes relatos mostram que DDB2 pode levar à aquisição de agressividade através de diferentes mecanismos celulares. Portanto, esta proteína foi escolhida como alvo para os estudos funcionais de silenciamento gênico, avaliação da resistência à irradiação, capacidade de reparo de DSBs, atividade de vias de sinalização e reparo de DSBs, metabolismo de ROS, habilidade de migração e invasão das células de GBM.

Inicialmente, confirmamos que amostras tumorais e linhagens celulares de astrocitoma expressam níveis muito baixos ou não detectáveis da proteína DDB2. Dentre 58 casos de astrocitomas (graus I-IV) analisados, apenas 2 mostraram expressão de DDB2 (Figura 3), e dentre as 9 linhagens avaliadas apenas uma (U138MG) apresentou níveis consideráveis da proteína (Figura 4). Portanto, U138MG foi a linhagem escolhida para os ensaios de silenciamento gênico. Vimos que, quando DDB2 é silenciada, estas células aumentam sua capacidade de sobreviver à radiação ionizante (Figura 6) e reparam mais rapidamente as DSBs induzidas pelo tratamento (Figura 7). Além disso, observamos a ocorrência de focos de DDB2 em resposta à radiação ionizante (Figura 9). A investigação da formação de focos de DDB2 é muito comum após o tratamento com UV, dado seu papel na via NER [162]. Porém, não existem relatos na literatura que evidenciem tal fenômeno após o tratamento com radiação ionizante, fazendo do nosso trabalho a primeira evidência desta natureza e sugerindo a participação de DDB2 na sinalização e/ou reparo de lesões induzidas pela radiação.

Curiosamente, associada à redução nos níveis de DDB2, observamos uma redução na formação de focos de γ H2AX e RAD51, o que sugere menor atividade da via de reparo por HR. Embora não tenhamos observado mudanças relevantes na formação de focos de 53BP1, não podemos descartar possíveis alterações em NHEJ pois, como esta via é predominante, as variações no número de focos são mais difíceis de se detectar. Dada a rapidez com que as células silenciadas efetuaram o reparo, é possível supor que haja um direcionamento para via de NHEJ, que não conseguimos detectar. Em uma etapa futura, pretendemos realizar experimentos

adicionais envolvendo sistemas-repórter da atividade de cada uma destas vias para responder definitivamente a esta questão.

Embora já tenha sido reportado um enriquecimento notável na atividade de reparo do DNA em ambas as vias NHEJ e RH durante a progressão de gliomas [95], nossos resultados sugerem a via NHEJ como mais provável no contexto de baixa expressão de DDB2, que é predominante nos GBMs. A via NHEJ, mesmo sendo mais sujeita a erros e mutações, permite que o reparo ocorra mais rapidamente, o que explicaria a maior rapidez na restauração de DSBs que observamos no ensaio do cometa. A indução preferencial da via NHEJ, em detrimento de HR, foi observada em um conjunto de 16 linhagens de GBM, incluindo linhagens primárias aderentes e neuroesferas, resistentes ao tratamento com TMZ [150], corroborando nossa interpretação. Evidências adicionais sugerem que células deficientes de DDB2 são igualmente resistentes ao tratamento com cisplatina [163].

Apesar da rapidez observada na cinética de reparo das células silenciadas quando comparadas às células controle, γ H2AX permanece em quantidades aumentadas no tempo de 6 horas (Figura 9), quando todas as quebras já foram reparadas (Figura 8). Este tipo de discrepância já foi documentada em outros estudos [164, 165], e pode estar relacionada à idiosincrasias metodológicas [166]. Por outro lado, existem evidências de que a presença persistente desta proteína pode não estar diretamente relacionada a DSBs [167], como, por exemplo, γ H2AX induzida por estresse oxidativo [168]. Neste caso ocorre indução desta proteína na ausência de quebras no DNA, mostrando que a presença de γ H2AX não deve ser considerada um marcador inequívoco de DSBs.

Adicionalmente, vimos que as células U138MG silenciadas para DDB2 são capazes de resolver a parada de ciclo celular em G2/M pós-irradiação mais rapidamente, o que possivelmente está relacionado com a diminuição nos níveis de p21 em decorrência do silenciamento (Figura 7). Corroborando nossos achados, Zou e colaboradores publicaram uma evidência de que DDB2 facilita a fosforilação de Chk1 após a radiação ionizante, e que seu silenciamento compromete a parada em G2 após tratamento [169], contribuindo para a ocorrência do fenômeno observado. Em contrapartida, em fibroblastos normais DDB2 é responsável pela poliubiquitilação de p21 (complexo DDB1-DDB2-CUL4A), levando esta proteína à degradação, e o silenciamento de DDB2 provoca um acúmulo de p21 [170], evento oposto ao observado neste estudo. A saída mais rápida da parada em G2/M, que observamos nas células U138MG silenciadas, pode também contribuir para a aceleração da cinética de reparo, pois na fase G1 predomina o mecanismo de NHEJ que é mais rápido. Estas observações

apoiam a hipótese de um potencial direcionamento do reparo para a via NHEJ, em detrimento da via HR, quando DDB2 é silenciada.

De acordo com a literatura, DDB2 atua ainda como o repressor epigenético da expressão de SOD2 e catalase [171] e a deficiência de DDB2 diminui o acúmulo de ROS após tratamento com UV, cisplatina ou aclarubicina [172]. Neste estudo, relação similar a esta foi observada apenas para a enzima catalase em células siDDB2 nos tempos de 5 e 15 minutos e 1 hora após a radiação (Figura 11B e D). A enzima catalase pertence ao grupo das enzimas antioxidantes heme-monofuncionais, sendo encontrada em altas concentrações nos eritrócitos, fígado e rins, predominantemente nos peroxissomos e citoplasma. Sua principal função é a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio [173], mas atua também na decomposição de proxinitrito, oxidação de óxido nítrico a dióxido de nitrogênio e possui funções peroxidase e oxidase fracas [174]. Embasando nossas observações, a literatura relata que a enzima catalase apresenta-se constitutivamente elevada em tecidos tumorais [175-177], conferindo proteção contra radiação ionizante [178]. De modo análogo, a inibição desta enzima na linhagem 36B10 de glioma murino provocou sensibilização ao tratamento com radiação ionizante ou peróxido de hidrogênio [179].

No caso de SOD2, observamos fenômeno oposto, ou seja, os níveis desta enzima foram diminuídos após o silenciamento de DDB2 (Figura 11B e E). E, embora tenhamos detectado aumento na expressão da catalase, observamos um acúmulo considerável de ROS nas células siDDB2, antes e logo após o tratamento com radiação. Entretanto, apesar do comportamento paradoxal das enzimas antioxidantes, as células silenciadas foram capazes de gerenciar a excessiva quantidade de ROS mais eficientemente, apresentando expressiva redução 15 minutos após o tratamento (Figura 11A e C). Este dado sugere que as células se tornam mais resistentes ao estresse oxidativo provocado pela radiação ionizante após o silenciamento de DDB2. No entanto, são necessários experimentos complementares para uma análise mais compreensiva do mecanismo de resposta ao estresse oxidativo e do comportamento de enzimas antioxidantes em células de GBM silenciadas para DDB2.

Observamos ainda que o silenciamento de DDB2 promove a ocorrência da transição epitélio-mesênquima, mediada pela indução de Zeb1 (Figura 12), e leva a um aumento considerável nas atividades de migração e invasão celular (Figura 13). O mesmo tipo de comportamento foi observado após o silenciamento de DDB2 em células de câncer de cólon. Roy e colaboradores mostraram que o silenciamento de DDB2 provoca EMT por meio da desrepressão transcricional dos genes Snail, Zeb1 e VEGF, com subsequente aumento na

capacidade de invasão e tumorigenicidade. DDB2 recruta Suv39h, uma histona metil transferase, levando à trimetilação (H3K9) em promotores de genes relacionados a EMT, reprimindo sua expressão [156]. Por outro lado, evidências apontam que a EMT pode ser ativada pelo acúmulo de ROS [180, 181], fenômeno observado nas células U138MG após o silenciamento. Embora níveis altos de ROS sejam prejudiciais, células com boa capacidade antioxidante podem limitar o montante de ROS a quantidades que permitam EMT mas sejam, ao mesmo tempo, insuficientes para causar senescência ou morte celular [182]. Em conjunto, estes resultados sugerem que o acúmulo de ROS associado à indução de catalase pode representar um mecanismo adicional na indução de EMT.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo demonstramos que a redução nos níveis de expressão de DDB2 é uma alteração extremamente frequente nos astrocitomas mais agressivos e, isoladamente, apresenta forte correlação com o pior prognóstico de sobrevida dos pacientes. Além disso, através de ensaios de silenciamento gênico, vimos que a diminuição nos níveis de DDB2 confere várias competências associadas com agressividade à linhagem celular U138MG. As células silenciadas mostraram maior resistência à radiação ionizante e capacidade de reparar DSBs, além de facilitação na retomada do ciclo celular após parada induzida por irradiação. Nossos dados indicam ainda que a alteração na dinâmica do ciclo celular está relacionada à diminuição nos níveis de p21, uma vez que esta proteína é reduzida nas células silenciadas em DDB2. Não foi possível elucidar os mecanismos que promovem a competência de reparar DSBs mais rapidamente. No entanto, sugerimos que haja um direcionamento para a via de NHEJ, em detrimento da via de HR, uma vez que detectamos uma consistente redução na ativação de RAD51 em células silenciadas e que a retomada do ciclo celular também desfavorece esta via.

Observamos ainda que DDB2 atua no controle do metabolismo de ROS, indução de EMT e atividade migratória das células U138MG. Constatamos que a redução de DDB2 promove aumento na expressão da enzima catalase e permite que ROS sejam metabolizadas mais rapidamente, o que reduz drasticamente o estresse oxidativo. Adicionalmente, observamos que após o silenciamento de DDB2 ocorre ativação de EMT através da indução de N-caderina e Zeb1, além de um incremento na atividade migratória e capacidade de invasão. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a redução de DDB2 possui papel fundamental na progressão dos astrocitomas para estágios mais avançados e que a redução na sobrevida dos pacientes é mediada pela indução de um fenótipo mais maligno nas células de GBM, que inclui resistência à radiação ionizante, competência para lidar com o estresse oxidativo e maior atividade migratória. Portanto, DDB2 é um forte marcador de prognóstico e seus níveis de expressão possivelmente estão relacionados com a resposta ao tratamento.

7 REFERÊNCIAS

1. Agnihotri, S., et al., *Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(1): p. 25-41.
2. McNeill, K.A., *Epidemiology of Brain Tumors*. Neurol Clin, 2016. **34**(4): p. 981-998.
3. Bailey, D. and H. Cushing, *A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis*. Philadelphia: Lippincott, 1929.
4. Kernohan, J. and M. RF, *A simplified classification of the gliomas*. Proc Staff Meet Mayo Clin, 1949. **24**(3): p. 5.
5. Louis DN, O.H., Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 12.
6. Huse, J.T., E. Holland, and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications*. Annu Rev Med, 2013. **64**: p. 59-70.
7. Louis DN, P.A., Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C, *International Society Of Neuropathology-Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading*. Brain Pathol, 2014. **24**: p. 6.
8. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.
9. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
10. Packer, R.J., et al., *Pediatric low-grade gliomas: implications of the biologic era*. Neuro Oncol, 2016.
11. Thakkar, J.P., et al., *Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(10): p. 1985-96.
12. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. Neuro Oncol, 2015. **17 Suppl 4**: p. iv1-iv62.
13. Fang, X., et al., *Targeted tissue proteomic analysis of human astrocytomas*. J Proteome Res, 2012. **11**(8): p. 3937-46.
14. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.
15. Maher, E.A., et al., *Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11502-13.
16. Tso, C.L., et al., *Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 159-67.
17. Phillips, H.S., et al., *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 157-73.
18. Sweeney, K.J., et al., *Validation of an imageable surgical resection animal model of Glioblastoma (GBM)*. J Neurosci Methods, 2014. **233**: p. 99-104.
19. Jovcevska, I., N. Kocevar, and R. Komel, *Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know?* Mol Clin Oncol, 2013. **1**(6): p. 935-941.
20. Stummer, W., M.J. van den Bent, and M. Westphal, *Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion*. Acta Neurochir (Wien), 2011. **153**(6): p. 1211-8.

21. Zinn, P.O., et al., *Extent of resection and radiotherapy in GBM: A 1973 to 2007 surveillance, epidemiology and end results analysis of 21,783 patients*. Int J Oncol, 2013. **42**(3): p. 929-34.
22. McGirt, M.J., et al., *Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma*. J Neurosurg, 2009. **110**(1): p. 156-62.
23. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 459-66.
24. Sanai, N., et al., *An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas*. J Neurosurg, 2011. **115**(1): p. 3-8.
25. Xiang, Y., et al., *Blood-Brain Barrier Disruption, Sodium Fluorescein, And Fluorescence-Guided Surgery Of Gliomas*. Br J Neurosurg, 2018: p. 1-8.
26. Santivasi, W.L. and F. Xia, *The role and clinical significance of DNA damage response and repair pathways in primary brain tumors*. Cell Biosci, 2013. **3**(1): p. 10.
27. Stupp R, M.W., van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 9.
28. Santivasi, W.L. and F. Xia, *Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(2): p. 251-9.
29. Jeggo, P.A., V. Geuting, and M. Lobrich, *The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair*. Radiother Oncol, 2011. **101**(1): p. 7-12.
30. Dhermain, F., *Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches*. Chin J Cancer, 2014. **33**(1): p. 16-24.
31. Kole, A.J., et al., *Concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for "biopsy-only" glioblastoma multiforme*. Cancer, 2016. **122**(15): p. 2364-70.
32. Thomas, A., et al., *Temozolomide in the Era of Precision Medicine*. Cancer Res, 2017.
33. Fan, C.H., et al., *O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e876.
34. Rottenberg, D.A., et al., *In vivo measurement of regional brain tissue pH using positron emission tomography*. Ann Neurol, 1984. **15 Suppl**: p. S98-102.
35. Yoshimoto, K., et al., *Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 186.
36. Zhang, J., M.F. Stevens, and T.D. Bradshaw, *Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance*. Curr Mol Pharmacol, 2012. **5**(1): p. 102-14.
37. Raizer, J.J., et al., *A phase II study of bevacizumab and erlotinib after radiation and temozolomide in MGMT unmethylated GBM patients*. J Neurooncol, 2016. **126**(1): p. 185-92.
38. Lustig, R., et al., *Phase II preradiation R115777 (tipifarnib) in newly diagnosed GBM with residual enhancing disease*. Neuro Oncol, 2008. **10**(6): p. 1004-9.
39. Vinjamuri, M., et al., *Comparative analysis of temozolomide (TMZ) versus 1,3-bis (2-chloroethyl)-1 nitrosourea (BCNU) in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) patients*. J Neurooncol, 2009. **91**(2): p. 221-5.
40. Xing, W.K., et al., *The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 3341-8.

41. Westphal, M., et al., *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma.* Neuro Oncol, 2003. **5**(2): p. 79-88.
42. Siegelin, M.D., et al., *Sorafenib exerts anti-glioma activity in vitro and in vivo.* Neurosci Lett, 2010. **478**(3): p. 165-70.
43. Wurth, R., F. Barbieri, and T. Florio, *New molecules and old drugs as emerging approaches to selectively target human glioblastoma cancer stem cells.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 126586.
44. Jones DT, K.S., Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP, *Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas.* Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 5.
45. Jones DT, G.J., Lichter P, Witt O, Pfister SM, *MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma.* Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(11): p. 12.
46. Collins VP, J.D., Giannini C, *Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers.* Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 7.
47. Zhang J, W.G., Miller CP, Tatevossian RG, Dalton JD, Tang B, Orisme W, Punchihewa C, Parker M, Qaddoumi I, Boop FA, Lu C, Kandoth C, Ding L, Lee R, Huether R, Chen X, Hedlund E, Nagahawatte P, Rusch M, Boggs K, Cheng J, Becksfort J, Ma J, Song G, Li Y, Wei L, Wang J, Shurtleff S, Easton J, Zhao D, Fulton RS, Fulton LL, Dooling DJ, Vadodaria B, Mulder HL, Tang C, Ochoa K, Mullighan CG, Gajjar A, Kriwacki R, Sheer D, Gilbertson RJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Baker SJ, Ellison DW; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project., *Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas.* Nat Genet, 2013. **45**(6): p. 10.
48. Wu, G., et al., *The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma.* Nat Genet, 2014. **46**(5): p. 444-50.
49. Jones DT, H.B., Jäger N, Korshunov A, Kool M, Warnatz HJ, Zichner T, Lambert SR, Ryzhova M, Quang DA, Fontebasso AM, Stütz AM, Hutter S, Zuckermann M, Sturm D, Gronych J, Lasitschka B, Schmidt S, Seker-Cin H, Witt H, Sultan M, Ralser M, Northcott PA, Hovestadt V, Bender S, Pfaff E, Stark S, Faury D, Schwartzentruber J, Majewski J, Weber UD, Zapatka M, Raeder B, Schlesner M, Worth CL, Bartholomae CC, von Kalle C, Imbusch CD, Radomski S, Lawerenz C, van Sluis P, Koster J, Volckmann R, Versteeg R, Lehrach H, Monoranu C, Winkler B, Unterberg A, Herold-Mende C, Milde T, Kulozik AE, Ebinger M, Schuhmann MU, Cho YJ, Pomeroy SL, von Deimling A, Witt O, Taylor MD, Wolf S, Karajannis MA, Eberhart CG, Scheurlen W, Hasselblatt M, Ligon KL, Kieran MW, Korbel JO, Yaspo ML, Brors B, Felsberg J, Reifenberger G, Collins VP, Jabado N, Eils R, Lichter P, Pfister SM; International Cancer Genome Consortium PedBrain Tumor Project, *Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma.* Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 6.
50. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.* Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
51. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma.* Cell, 2013. **155**(2): p. 462-77.
52. Ceccarelli, M., et al., *Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma.* Cell, 2016. **164**(3): p. 550-63.
53. Network., T.C.G.A.R., *Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas.* N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2481-98.
54. Network, T.C.G.A.R., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.* Nature, 2008. **455**(7216): p. 8.

55. Noushmehr H, W.D., Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network, *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma*. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 12.
56. Nakamura, M., et al., *Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene*. Carcinogenesis, 2001. **22**(10): p. 1715-9.
57. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
58. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
59. Jayaram S, G.M., Polisetty RV, Cho WC, Sirdeshmukh R, *Towards developing biomarkers for glioblastoma multiforme: a proteomics view*. Expert Rev Proteomics, 2014. **11**(5): p. 18.
60. Wang, H., et al., *The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas*. Neoplasia, 2015. **17**(3): p. 239-55.
61. Hegi ME, D.A., Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R, *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 8.
62. Karsy, M., et al., *A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma*. Neurosurg Focus, 2015. **38**(3): p. E4.
63. Wick, W., et al., *MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(7): p. 372-85.
64. Balaña C, R.J., Taron M, Roussos Y, Ariza A, Ballester R, Sarries C, Mendez P, Sanchez JJ, Rosell R, *O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 7.
65. Hegi, M.E., et al., *Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4189-99.
66. Vlachostergios, P.J., et al., *Bortezomib downregulates MGMT expression in T98G glioblastoma cells*. Cell Mol Neurobiol, 2013. **33**(3): p. 313-8.
67. Wang, C., et al., *Chemoproteomics-Enabled Discovery of a Potent and Selective Inhibitor of the DNA Repair Protein MGMT*. Angew Chem Int Ed Engl, 2016. **55**(8): p. 2911-5.
68. Fiano, V., et al., *MGMT promoter methylation in plasma of glioma patients receiving temozolomide*. J Neurooncol, 2014. **117**(2): p. 347-57.
69. Neto JC, I.M., Carvalho KC, Vassallo J, De Brot M, Gobbi H, Soares FA, Rocha RM, *MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer*. Exp Mol Pathol, 2012. **92**(1): p. 6.
70. Lee, B.B., et al., *Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6185-91.
71. Cortese, R., et al., *Epigenetic markers of prostate cancer in plasma circulating DNA*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(16): p. 3619-31.

72. Sun, Y., et al., *DAPK1, MGMT and RARB promoter methylation as biomarkers for high-grade cervical lesions*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(11): p. 14939-45.
73. Jin, J., et al., *Aberrant DNA methylation of MGMT and hMLH1 genes in prediction of gastric cancer*. Genet Mol Res, 2014. **13**(2): p. 4140-5.
74. Ostrow, K.L., et al., *Molecular analysis of plasma DNA for the early detection of lung cancer by quantitative methylation-specific PCR*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(13): p. 3463-72.
75. Kato, T., et al., *Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8544-53.
76. Foltz, D.R., et al., *Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP*. Cell, 2009. **137**(3): p. 472-84.
77. Perpelescu, M., et al., *HJURP is involved in the expansion of centromeric chromatin*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(15): p. 2742-54.
78. Barnhart, M.C., et al., *HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore*. J Cell Biol, 2011. **194**(2): p. 229-43.
79. Valente, V., et al., *Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR*. BMC Mol Biol, 2009. **10**: p. 17.
80. Valente, V., et al., *Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62200.
81. Hu, Z., et al., *The expression level of HJURP has an independent prognostic impact and predicts the sensitivity to radiotherapy in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(2): p. R18.
82. Montes de Oca, R., et al., *The histone chaperone HJURP is a new independent prognostic marker for luminal A breast carcinoma*. Mol Oncol, 2015. **9**(3): p. 657-74.
83. Wu, J. and S. Starr, *Low-fidelity compensatory backup alternative DNA repair pathways may unify current carcinogenesis theories*. Future Oncol, 2014. **10**(7): p. 1239-53.
84. Loeb, L.A., *Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(6): p. 450-7.
85. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
86. Hanawalt, P.C., *Historical perspective on the DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2015. **36**: p. 2-7.
87. Golmard, L., et al., *Germline mutation in the RAD51B gene confers predisposition to breast cancer*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 484.
88. Nissar, S., et al., *DNA repair gene--XRCC1 in relation to genome instability and role in colorectal carcinogenesis*. Oncol Res Treat, 2014. **37**(7-8): p. 418-22.
89. Liu, W.B., et al., *Molecular analysis of DNA repair gene methylation and protein expression during chemical-induced rat lung carcinogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **408**(4): p. 595-601.
90. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
91. Gorgoulis, V.G., et al., *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 907-13.
92. Broustas, C.G. and H.B. Lieberman, *DNA damage response genes and the development of cancer metastasis*. Radiat Res, 2014. **181**(2): p. 111-30.
93. Bartkova, J., et al., *Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas*. Oncogene, 2010. **29**(36): p. 5095-102.

94. Kauffmann, A., et al., *High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients*. *Oncogene*, 2008. **27**(5): p. 565-73.
95. Turner, K.M., et al., *Genomically amplified Akt3 activates DNA repair pathway and promotes glioma progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(11): p. 3421-6.
96. Eich, M., et al., *Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(11): p. 2529-40.
97. O'Grady, S., et al., *The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2014. **40**(10): p. 1161-70.
98. Atkins, R.J., et al., *Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment*. *J Clin Neurosci*, 2015. **22**(1): p. 14-20.
99. Bartek, J., J. Bartkova, and J. Lukas, *DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression*. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7773-9.
100. Squatrito, M. and E.C. Holland, *DNA damage response and growth factor signaling pathways in gliomagenesis and therapeutic resistance*. *Cancer Res*, 2011. **71**(18): p. 5945-9.
101. Cha, H.J. and H. Yim, *The accumulation of DNA repair defects is the molecular origin of carcinogenesis*. *Tumour Biol*, 2013. **34**(6): p. 3293-302.
102. Westermarck, U.K., et al., *RAD51 can inhibit PDGF-B-induced gliomagenesis and genomic instability*. *Neuro Oncol*, 2011. **13**(12): p. 1277-87.
103. Squatrito, M., et al., *Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(6): p. 619-29.
104. Koschmann, C., et al., *ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma*. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(328): p. 328ra28.
105. Custodio, A.C., et al., *Variation in DNA repair gene XRCC3 affects susceptibility to astrocytomas and glioblastomas*. *Genet Mol Res*, 2012. **11**(1): p. 332-9.
106. Chang, J.S., et al., *Pathway analysis of single-nucleotide polymorphisms potentially associated with glioblastoma multiforme susceptibility using random forests*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008. **17**(6): p. 1368-73.
107. Rodriguez-Hernandez, I., et al., *Analysis of DNA repair gene polymorphisms in glioblastoma*. *Gene*, 2014. **536**(1): p. 79-83.
108. Franceschi, S., et al., *Association between RAD 51 rs1801320 and susceptibility to glioblastoma*. *J Neurooncol*, 2016. **126**(2): p. 265-70.
109. Yuan, G., et al., *DNA repair gene ERCC1 polymorphisms may contribute to the risk of glioma*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(5): p. 4267-75.
110. Zhang, H., H. Liu, and J.L. Knauss, *Associations between three XRCC1 polymorphisms and glioma risk: a meta-analysis*. *Tumour Biol*, 2013. **34**(5): p. 3003-13.
111. Qi, L., et al., *A Comprehensive Meta-analysis of Genetic Associations Between Key Polymorphic Loci in DNA Repair Genes and Glioma Risk*. *Mol Neurobiol*, 2016.
112. Chapman, J.R., M.R. Taylor, and S.J. Boulton, *Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice*. *Mol Cell*, 2012. **47**(4): p. 497-510.
113. Jiang, C., et al., *Low-fidelity alternative DNA repair carcinogenesis theory may interpret many cancer features and anticancer strategies*. *Future Oncol*, 2016. **12**(16): p. 1897-910.
114. van Pel, D.M., et al., *An evolutionarily conserved synthetic lethal interaction network identifies FEN1 as a broad-spectrum target for anticancer therapeutic development*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(1): p. e1003254.
115. Fang, B., *Development of synthetic lethality anticancer therapeutics*. *J Med Chem*, 2014. **57**(19): p. 7859-73.

116. de Sousa, J.F., et al., *Expression signatures of DNA repair genes correlate with survival prognosis of astrocytoma patients*. Tumour Biol, 2017. **39**(4): p. 1010428317694552.
117. Kim, Y.J. and D.M. Wilson, 3rd, *Overview of base excision repair biochemistry*. Curr Mol Pharmacol, 2012. **5**(1): p. 3-13.
118. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
119. Hunter, K., *The role of individual inheritance in tumor progression and metastasis*. J Mol Med (Berl), 2015. **93**(7): p. 719-25.
120. Scherer, H., *Structural development in gliomas*. Am J Cancer, 1938. **34**(3): p. 18.
121. Awan, M., et al., *Extra-CNS metastasis from glioblastoma: a rare clinical entity*. Expert Rev Anticancer Ther, 2015. **15**(5): p. 545-52.
122. Beauchesne, P., *Extra-neural metastases of malignant gliomas: myth or reality?* Cancers (Basel), 2011. **3**(1): p. 461-77.
123. Nagel, Z.D., et al., *DNA Repair Capacity in Multiple Pathways Predicts Chemoresistance in Glioblastoma Multiforme*. Cancer Res, 2017. **77**(1): p. 198-206.
124. Agnihotri, S., et al., *Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 253-66.
125. Bobola, M.S., et al., *Apurinic/apyrimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(11): p. 3510-8.
126. Trivedi, R.N., et al., *Human methyl purine DNA glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predict sensitivity to temozolomide*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(2): p. 505-16.
127. Boccard SG, M.S., Geraci S, Pycroft L, Berger FR, Pelletier LA, *Inhibition of DNA-repair genes Ercc1 and Mgmt enhances temozolomide efficacy in gliomas treatment: a pre-clinical study*. Oncotarget, 2015. **6**(30): p. 12.
128. Hunter, C., et al., *A hypermutation phenotype and somatic MSH6 mutations in recurrent human malignant gliomas after alkylator chemotherapy*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 3987-91.
129. Cahill, D.P., et al., *Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2038-45.
130. Yip, S., et al., *MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(14): p. 4622-9.
131. Quiros, S., W.P. Roos, and B. Kaina, *Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27183.
132. Berte, N., et al., *Targeting Homologous Recombination by Pharmacological Inhibitors Enhances the Killing Response of Glioblastoma Cells Treated with Alkylating Drugs*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(11): p. 2665-2678.
133. Haince, J.F., et al., *PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1197-208.
134. Roos, W.P. and A. Krumm, *The multifaceted influence of histone deacetylases on DNA damage signalling and DNA repair*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(21): p. 10017-10030.
135. Barazzuol, L., et al., *Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 combined with radiotherapy and temozolomide in glioblastoma*. Radiat Oncol, 2013. **8**: p. 65.
136. Leonetti, C., et al., *Targeted therapy for brain tumours: role of PARP inhibitors*. Curr Cancer Drug Targets, 2012. **12**(3): p. 218-36.

137. Tentori, L., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor increases growth inhibition and reduces G(2)/M cell accumulation induced by temozolomide in malignant glioma cells*. *Glia*, 2002. **40**(1): p. 44-54.
138. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings*. *Mol Oncol*, 2011. **5**(4): p. 387-93.
139. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. *Science*, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
140. McEllin, B., et al., *PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. *Cancer Res*, 2010. **70**(13): p. 5457-64.
141. Short, S.C., et al., *Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells*. *Neuro Oncol*, 2011. **13**(5): p. 487-99.
142. Fischer, U. and E. Meese, *Glioblastoma multiforme: the role of DSB repair between genotype and phenotype*. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7809-15.
143. King, H.O., et al., *RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells*. *Stem Cell Reports*, 2017. **8**(1): p. 125-139.
144. Takao, M., et al., *Human Nei-like protein NEIL3 has AP lyase activity specific for single-stranded DNA and confers oxidative stress resistance in Escherichia coli mutant*. *Genes Cells*, 2009. **14**(2): p. 261-70.
145. Colleoni, F. and Y. Torrente, *The new challenge of stem cell: brain tumour therapy*. *Cancer Lett*, 2008. **272**(1): p. 1-11.
146. Ma, Y.H., et al., *Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades*. *J Neurooncol*, 2008. **86**(1): p. 31-45.
147. Stojnik, T., et al., *Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival*. *Surg Neurol*, 2007. **68**(2): p. 133-43; discussion 143-4.
148. Zeppernick, F., et al., *Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(1): p. 123-9.
149. Wang, Q.E., *DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies*. *World J Biol Chem*, 2015. **6**(3): p. 57-64.
150. Annovazzi, L., et al., *The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment*. *Int J Oncol*, 2015. **46**(6): p. 2299-308.
151. Cox, D., *Regression Models and Life-Tables*. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1972. **34**(2): p. 33.
152. Karimian, A., Y. Ahmadi, and B. Yousefi, *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*. *DNA Repair (Amst)*, 2016. **42**: p. 63-71.
153. Kun, S., et al., *Prognostic value of DNA repair genes based on stratification of glioblastomas*. *Oncotarget*, 2017. **8**(35): p. 58222-58230.
154. Roversi, G., et al., *Identification of novel genomic markers related to progression to glioblastoma through genomic profiling of 25 primary glioma cell lines*. *Oncogene*, 2006. **25**(10): p. 1571-83.
155. Han, C., et al., *DDB2 suppresses tumorigenicity by limiting the cancer stem cell population in ovarian cancer*. *Mol Cancer Res*, 2014. **12**(5): p. 784-94.
156. Roy, N., et al., *DDB2 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer*. *Cancer Res*, 2013. **73**(12): p. 3771-82.
157. Stoyanova T, Y.T., Kopanja D, Mokyr MB and Raychaudhuri P. , *The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 activates nucleotide excision repair by regulating the level of p21Waf1/Cip1*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**: p. 10.

158. Zhao, R., et al., *DNA damage-binding complex recruits HDAC1 to repress Bcl-2 transcription in human ovarian cancer cells*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(3): p. 370-80.
159. Qiao, S., et al., *DDB2 is involved in ubiquitination and degradation of PAQR3 and regulates tumorigenesis of gastric cancer cells*. Biochem J, 2015. **469**(3): p. 469-80.
160. Itoh, T., C. O'Shea, and S. Linn, *Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48(DDB2) and p53*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7540-53.
161. Hwang, B.J., et al., *Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 424-8.
162. El-Mahdy, M.A., et al., *Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13404-11.
163. Barakat, B.M., et al., *Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 977-88.
164. Brzozowska, K., et al., *In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy*. Int J Radiat Biol, 2012. **88**(5): p. 405-13.
165. Bouquet, F., C. Muller, and B. Salles, *The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage*. Cell Cycle, 2006. **5**(10): p. 1116-22.
166. Nakamura, A., et al., *Techniques for gamma-H2AX detection*. Methods Enzymol, 2006. **409**: p. 236-50.
167. Rybak, P., et al., *Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (gammaH2AX) is not associated with DNA double-strand breaks*. Oncotarget, 2016. **7**(31): p. 49574-49587.
168. Katsube, T., et al., *Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks*. J Biochem, 2014. **156**(2): p. 85-95.
169. Zou, N., et al., *DDB2 increases radioresistance of NSCLC cells by enhancing DNA damage responses*. Tumour Biol, 2016. **37**(10): p. 14183-14191.
170. Stoyanova, T., et al., *DDB2 decides cell fate following DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(26): p. 10690-5.
171. Minig, V., et al., *Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 14165-76.
172. Roy, N., et al., *DDB2, an essential mediator of premature senescence*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(11): p. 2681-92.
173. Kodydkova, J., et al., *Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases*. Folia Biol (Praha), 2014. **60**(4): p. 153-67.
174. Glorieux, C., et al., *Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells*. Free Radic Biol Med, 2015. **87**: p. 84-97.
175. Hwang, T.S., H.K. Choi, and H.S. Han, *Differential expression of manganese superoxide dismutase, copper/zinc superoxide dismutase, and catalase in gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa*. Eur J Surg Oncol, 2007. **33**(4): p. 474-9.
176. Rainis, T., et al., *Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(2): p. 526-30.
177. Sander, C.S., et al., *Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer*. Br J Dermatol, 2003. **148**(5): p. 913-22.

178. Lee, H.C., et al., *Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line*. Int J Mol Med, 2004. **13**(6): p. 883-7.
179. Smith, P.S., et al., *Inhibiting catalase activity sensitizes 36B10 rat glioma cells to oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(6): p. 787-97.
180. Giannoni, E., M. Parri, and P. Chiarugi, *EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy*. Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(11): p. 1248-63.
181. Kim, Y.M. and M. Cho, *Activation of NADPH oxidase subunit NCF4 induces ROS-mediated EMT signaling in HeLa cells*. Cell Signal, 2014. **26**(4): p. 784-96.
182. Kinugasa, H., et al., *Mitochondrial SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression*. Oncogene, 2015. **34**(41): p. 5229-39.

APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS

Expression signatures of DNA repair genes correlate with survival prognosis of astrocytoma patients

Tumor Biology

April 2017: 1–11

© The Author(s) 2017

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1010428317694552

journals.sagepub.com/home/tub

**Juliana Ferreira de Sousa^{1,2}, Raul Torrieri³,
Rodolfo Bortolozo Serafim^{1,2}, Luis Fernando Macedo Di Cristofaro^{1,2},
Fábio Dalbon Escanfella², Rodrigo Ribeiro²,
Dalila Lucíola Zanette^{4,5,6}, Maria Luisa Paçó-Larson²,
Wilson Araujo da Silva Jr^{4,5,6,7}, Daniela Pretti da Cunha Tirapelli⁸,
Luciano Neder⁹, Carlos Gilberto Carlotti Jr^{7,8} and Valeria Valente^{1,2,7}**

Abstract

Astrocytomas are the most common primary brain tumors. They are very resistant to therapies and usually progress rapidly to high-grade lesions. Here, we investigated the potential role of DNA repair genes in astrocytoma progression and resistance. To this aim, we performed a polymerase chain reaction array-based analysis focused on DNA repair genes and searched for correlations between expression patterns and survival prognoses. We found 19 genes significantly altered. Combining these genes in all possible arrangements, we found 421 expression signatures strongly associated with poor survival. Importantly, five genes (DDB2, EXO1, NEIL3, BRCA2, and BRIP1) were independently correlated with worse prognoses, revealing single-gene signatures. Moreover, silencing of EXO1, which is remarkably overexpressed, promoted faster restoration of double-strand breaks, while NEIL3 knockdown, also highly overexpressed, caused an increment in DNA damage and cell death after irradiation of glioblastoma cells. These results disclose the importance of DNA repair pathways for the maintenance of genomic stability of high-grade astrocytomas and suggest that EXO1 and NEIL3 overexpression confers more efficiency for double-strand break repair and resistance to reactive oxygen species, respectively. Thereby, we highlight these two genes as potentially related with tumor aggressiveness and promising candidates as novel therapeutic targets.

Keywords

DNA repair, astrocytoma, glioblastoma, tumor progression, genomic instability

Date received: 20 June 2016; accepted: 24 December 2016

¹Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, University of São Paulo State, Araraquara, Brazil

²Department of Cellular and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

³FAEPA, Center for Medical Genomics (CMG) of the Clinical Hospital, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

⁴Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

⁵Regional Blood Center of Ribeirão Preto and Center for Cell-Based Therapy—CEPID/FAPESP, Ribeirão Preto, Brazil

⁶National Institute of Science and Technology in Stem cell and Cell Therapy, Ribeirão Preto, Brazil

⁷Center for Integrative Systems Biology (CISBi), NAP/USP, Ribeirão Preto, Brazil

⁸Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

⁹Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil

Corresponding author:

Valeria Valente, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, University of São Paulo State, Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 s/n, Araraquara 14.801-902, São Paulo, Brazil.

Email: valenteval@gmail.com

Creative Commons Non Commercial CC-BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution-NonCommercial 3.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

Introduction

Astrocytomas comprise the most common and malignant type of primary brain tumors affecting adults.^{1,2} The World Health Organization (WHO) classifies astrocytomas into four grades: pilocytic astrocytomas (grade I), which appear mainly in children, present slow proliferation rates, and can be cured by surgical resection; diffuse astrocytomas (grade II), characterized by moderate cellular proliferation, the presence of pleomorphic cells, and infiltrative capacity, which compromises complete resection and favors malignant progression; anaplastic astrocytomas (grade III), depicted by high cellularity, occurrence of extensive atypia, and the presence of mitotic figures; and glioblastoma multiform (GBM, grade IV), the most malignant and frequent type of astrocytoma, characterized by extremely increased mitotic activity, pronounced angiogenesis, the presence of pseudopalisading necrosis, and proliferative ratios from 3 to 5 fold higher than grade III tumors.^{1,3,4}

The survival of patients diagnosed with GBM is usually 14 months, and less than 5% of them live through more than 3 years after diagnosis. This dismal prognosis is related with the intense mitotic activity and resistance of GBM cells to genotoxic treatments, which normally allows recurrence.^{2,5,6} Despite the impressive progress on research technologies and the intense efforts directed to GBM characterization, better diagnosis or advances on alternative therapies still seem remote. An increasing amount of genome scale profiling studies have recently provided a huge amount of data regarding genome structure and methylation and global patterns of gene expression of hundreds of GBM cases.^{7–11} Global analysis of genome structure and activity of currently available data confirmed previously reported genes as significantly mutated in GBM, namely, PTEN, TP53, EGFR, PIK3CA, PIK3R1, NF1, RB1, IDH1, and PDGFRA, and identified 61 additional genes. Furthermore, expression data analysis permitted a more refined classification of GBMs into four categories: proneural, neural, classical, and mesenchymal, which respond differently to treatment protocols.^{11,12} It was also demonstrated that a subset of proneural GBMs exhibits a hypermethylated phenotype of CpG islands (G-CIMP) associated with conspicuous better survivals, while non-G-CIMP proneural and not mesenchymal GBMs tended to show less-favorable outcomes.^{11,13} These patients usually present mutations in the IDH1 gene,^{12,13} which were independently associated with lower proliferation rates and better clinical outcomes in a cohort from China.¹⁴

In this scenario, several molecular biomarkers have been independently associated with malignancy and survival prognosis of GBM patients, such as the MGMT gene. Methylation of the MGMT promoter is consistently correlated with longer overall survivals and can be used as a response predictor for patients under treatment with alkylating agents.^{11,15,16} Additionally, we have demonstrated that

the overexpression of HJURP, a novel protein involved in centromeric chromatin assembly and DNA repair,^{17–19} is an independent factor of survival prediction for astrocytoma patients.²⁰ HJURP overexpression was also previously included in a four-gene signature associated with poor clinical outcome of high-grade gliomas.²¹

Once DNA repair genes have exhibited this robust correlation with astrocytoma prognosis and therapy response, we decided to explore the different pathways involved in DNA repair signaling and execution during astrocytoma progression. We found 19 DNA repair genes with expression significantly altered in different-grade astrocytomas. Among them, seven genes (EXO1, NEIL3, RAD54L, XRCC3, BRCA2, BRIP1, and APEX2) showed remarkable high levels in GBM. Moreover, combining these 19 genes in all possible arrangements, we found 421 expression signatures strongly associated with poor survival. Importantly, five genes (DDB2, EXO1, NEIL3, BRCA2, and BRIP1) were independently correlated with survival, revealing single-gene signatures predictive of worse prognoses. Additionally, functional studies suggested that EXO1 and NEIL3 overexpression confers more accuracy for the repair of double-strand breaks (DSBs) and resistance to reactive oxygen species (ROS) in GBM cells, respectively.

Methods

Ethics statement

All patients involved provided a written consent for the use of tissue samples for research proposals. The consent form and research investigation were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (HCRP 7645/99). Clinical procedures were conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Tissue samples and cell lines

Glioma samples were obtained from 55 patients submitted to surgical resection for tumor removal at the Clinical Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. The set analyzed comprised 06 grade II and 06 grade III astrocytomas and 42 GBMs. Tumor grade was determined according to WHO criteria.²² A total of 14 non-neoplastic white matter samples were obtained from patients undergoing amygdalohippocampectomy for drug-resistant epilepsy treatment at the same Hospital. In the polymerase chain reaction (PCR) array technique, 15 neoplastic samples (5 of each grade) and 5 non-neoplastic white matter samples were used. For quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), we utilized 55 neoplastic (6 ASTII, 7 ASTIII, and 42 GBM) and 9 non-neoplastic white matter samples. Tumors and non-neoplastic samples were quickly frozen in liquid nitrogen immediately after surgical resection.

Tumor fragments were microdissected to remove necrosis and non-neoplastic tissue and were kept in freezer at -80°C until RNA extraction. Glioblastoma cell lines utilized, T98G and U138MG, were kindly provided by Professor Elza Tiemi Sakamoto Hojo, FFCLRP-USP, in 2012. Both cell lines were originally obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).

Cell culture and transfection

T98G and U138MG cell lines were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) with 10% of fetal bovine serum following standard protocols. For knockdown experiments, cells were transfected with synthetic double-stranded RNA oligonucleotides (short interfering RNAs (siRNAs); Invitrogen) and RNAiMax Lipofectamine (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Oligonucleotide sequences are available upon request. Silencing of EXO1 and NEIL3 was confirmed by quantitative RT-PCR (Figure S1).

RNA extraction, PCR array, and quantitative RT-PCR

Total RNA from tissue samples was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions with an additional phenol/chloroform extraction to improve protein exclusion. Purity and integrity of RNA were evaluated as previously described.²³ Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with High Capacity Kit (Applied Biosystems) after treatment with DNase I (Invitrogen) in the presence of RNase inhibitor (RNaseOUT; Invitrogen), according to manufacturer's recommendations. PCR array analysis was carried out using the DNA Repair ChampionChIP™ PCR Array (SABiosciences), using Power SYBR Green PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems). Data obtained were processed with the software available online (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). qPCR reactions were conducted using the Power SYBR Green PCR Master Mix reagent and primers designed to seven selected DNA repair genes and for the HPRT gene, a control of constitutive expression previously demonstrated as adequate to this model.²³ Oligonucleotide sequences are available upon request. Reactions were performed in the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), and the analyses were based on the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ equation.²⁴ Statistical analysis was performed with the non-parametric two-tailed test of Mann–Whitney (analysis of variance (ANOVA)) using the software GraphPad Prism 5.0.

Identification of correlations with survival prognosis

We developed an *in silico* strategy to identify expression signatures correlated with patient prognosis. Briefly, we

utilized three datasets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) containing RNA-seq count (RSEM) and clinical data, downloaded on 23 March 2015. Expression signatures containing all possible combinations of the 19 differentially expressed genes were generated. We computed the first principal component (PC1) of each signature and then divided the cohort into two groups according to a cut-off established by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis (minimum area under the curve (AUC) of 0.7). The essential information used on Cox regression²⁵ was patient age, sex, tumor grade, and expression status, namely, carriers and non-carriers of signatures that were defined according to the cutoff. Patient age was stratified into two groups, <30 years and >30 years. MGMT methylation status was not available in the public datasets used (<http://www.cbiportal.org/>). Signatures considered independent parameters of prognosis correlation on Cox regression ($p \leq 0.001$) were subsequently submitted to Kaplan–Meier analysis. Signatures with significant ($p \leq 0.001$) predictive value of prognosis in both analyses are shown here.

Cell cycle, apoptosis and cell death, DNA damage, and proliferation assays

Cell-cycle analysis was performed through DNA content evaluation following standard protocols, and the data obtained were analyzed with the ModFit LT 3.3 software. Early apoptosis and effective cell death were measured with annexin V (Invitrogen) and propidium iodide labeling, respectively, followed by analysis in flow cytometer (FACSCanto; BD Biosciences). To evaluate the DSB amounts, cells were labeled with anti- γH2AX antibody (ABCAM), following the manufacturer's instructions, and analyzed in flow cytometer (FACSCanto). The proliferation was evaluated with crystal violet staining followed by absorbance measurement. Results of all functional analysis are the average of three independent experiments.

Results

DNA repair genes presented altered expression in astrocytomas

In order to investigate the role of DNA repair genes in astrocytoma progression, we evaluated the expression of 84 genes involved in DNA damage signaling and repair, in a cohort of 15 different-grade astrocytomas through PCR array. Among them, we found 19 genes presenting expression significantly altered with large heterogeneity among astrocytoma grades and even between samples of the same tumor group (data not shown). In diffuse astrocytoma group (grade II), 14 genes showed increased expression, with average fold changes varying from 4.1 to 10.2 when compared with non-tumoral white matter. In anaplastic astrocytoma (grade III), 4 genes were down regulated and 7 genes

Table 1. Average fold changes of significantly altered DNA repair genes in different-grade astrocytomas.

Genes	ASTII	ASTIII	GBM
APEX1	8.35	NA	10.47
APEX2	4.11	NA	NA
BRCA2	4.51	NA	9.25
BRIP1	4.81	5.71	11.1
DDB2	NA	0.05	NA
EXO1	10.24	15.67	18.23
FEN1	5.97	NA	NA
LIG3	5.11	0.14	NA
LIG4	NA	0.05	NA
MSH5	6.49	NA	NA
MSH6	NA	0.17	NA
NEIL2	4.98	NA	NA
NEIL3	4.14	10.57	20.91
OGG1	5.13	NA	NA
PNKP	5.18	4.57	NA
RAD54L	NA	NA	4.09
TOP3B	6.39	4.03	NA
XRCC2	NA	NA	6.58
XRCC3	7.61	4.58	NA

NA: not significantly altered.

were overexpressed, with fold change ranges extending from 0.005 to 0.17 and from 4.03 to 15.7, respectively. In GBM (grade IV), 7 genes were remarkably overexpressed varying from 4.1 to 20.9 fold (Table 1). These data revealed a meaningful amount of genes with altered expression and also suggested a correlation between fold change levels and tumor progression.

The seven genes altered in the highest grade astrocytoma, namely, APEX1, BRAC2, BRIP1, EXO1, NEIL3, RAD54L, and XRCC2, were chosen for validation analysis in an expanded panel of 55 clinical cases, also including astrocytoma samples of grades II, III, and IV. We confirmed the higher expression of these genes, which exhibited fold changes even greater than those observed primarily. Variation was not significant only for RAD54L in ASTII samples (Figure 1). Analyzing the number of cases per fold change range, we noticed that most samples were in the expression range from 2 to 10 fold for APEX1, RAD54L, and XRCC2; from 10 to 60 for BRCA2 and BRIP1; and over 60 for EXO1 and NEIL3 genes (Table 2). Remarkably, EXO1 and NEIL3 showed the most extreme fold change values, increasing more than a 100 fold in ASTIII and GBM samples. When the expression levels were compared among tumor groups, we observed significant differences only for NEIL3 between ASTII and GBM samples (Figure 1).

Expression signatures of DNA repair genes are correlated with patient survival

Pursuing for combinations of expression patterns correlated with patient's survival, we performed a bioinformatics

analysis to identify expression signatures of DNA repair genes associated with higher death risk. Initially, the 19 genes found as differentially expressed were combined to generate all feasible arrangements of variation (signatures). The 1,048,575 possible combinations, ranging from each individual gene to all 19 genes in a single signature, were searched in public expression databases and compared with patient's survival. We found 3357 signatures significantly correlated with worse survival prognosis. Patients carrying these signatures presented hazard ratios (HRs) above 1.62. We established a cutoff of 5 genes per signature and $HR \geq 2$ and selected 421 expression signatures strongly correlated with patient survival (Table S1). Among them, 5 occurred as signatures of unique genes. The overexpression of NEIL3, EXO1, BRCA2, and BRIP1 and the reduction of DDB2 were independently correlated with higher risk of patient's death, with HR varying from 1.75 to 3.22 (Table 3). Additionally, DDB2 gene was present in 99.4% of signatures, revealing the importance of DDB2 downregulation for GBM development (Table S2), and when signatures were ranked by HR values, the first 67 signatures included DDB2 with HR varying from 4.73 to 3.22. Importantly, the last one in this ranking encloses DDB2 downregulation as the single alteration (Table S1), reinforcing the major importance of DDB2 reduction for astrocytoma progression. The altered expression of RAD54L, XRCC2, MSH6, LIG3, PNKP, FEN1, and MSH5, although did not correlate with prognosis independently, also promoted a meaningful HR (from 4.32 to 2.03) when coupled with DDB2 downregulation (Table 3). Overexpression of EXO1 and NEIL3, which exhibited independent association with poor prognosis, revealed even greater HRs when combined with DDB2 reduction, showing an increment in death risk from 2.13 and 2.15 to 4.73 and 4.44 fold, respectively. Accordingly, patients who carry these signatures have a prominent reduction in life expectancy (Figure 2). Due to these observations, we chose EXO1 and NEIL3 for functional analysis of gene silencing in GBM cell lines.

Knockdown of EXO1 and NEIL3 affects cell-cycle dynamics and DNA repair activity of GBM cells

To further investigate the potential roles of EXO1 and NEIL3 overexpression in the resistance of GBM cells to DNA damage induction, we silenced these genes in T98G and U138MG cell lines, which express high levels of both genes (data not shown), and evaluated response to ionizing radiation (IR). As expected, IR promoted prominent changes in cell-cycle dynamics in the two cell lines analyzed, with reduction in the number of cells in G1 and increase in G2/M phases (Figure S2). However, when cells were irradiated and simultaneously silenced for EXO1, we did not observe additional alterations in cell-cycle dynamics. Interestingly, the isolated knockdown of EXO1 promoted a slight augment in the number of cells in G1 and a

Figure 1. Expression levels of selected DNA repair genes in a cohort of 55 different-grade astrocytomas. Expression levels of the indicated genes were evaluated by quantitative RT-PCR in samples of normal white matter (WM, $n=9$), diffuse astrocytoma (ASTII, $n=6$), anaplastic astrocytoma (ASTIII, $n=7$), and glioblastoma multiforme (GBM, $n=42$). Boxes represent lower and upper quartiles of relative expression ranges with medians indicated. Whiskers represent the 10th and 90th percentiles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.0001$, when comparing each tumor grade with WM (Mann-Whitney U test). Graphics were plotted using the software GraphPad Prism 5.0.

reduction in S phase for T98G cell line (Figure S2A), while U138MG was not significantly affected (Figure S2B; Figure 3(a)). Additionally, we observed that EXO1 knockdown supported a faster DNA DSB restoration after IR exposure in T98G (Figure S3A) but not in U138MG cells (Figure S3B). T98G cells silenced for EXO1 showed approximately 30% and 15% reduction in the amounts of DSBs 10 min and 3 h after irradiation, respectively; and 6 h

after IR exposure, there was no significant difference from cells treated with siCtrl RNAs (Figure 3(b)). Accordingly, T98G cells silenced for EXO1 presented higher proliferation rates (Figure 3(c)) and slightly reduced indexes of apoptosis (Figure 4), when compared to cells treated with scrambled siRNAs.

The isolated knockdown of NEIL3 did not impact cell-cycle dynamics of T98G and U138MG cells (Figure S2).

Table 2. Number of astrocytoma samples per fold change range when comparing tumor tissues with non-tumoral WM.

Fold change range	APEX1	BRCA2	BRIP1	EXO1	NEIL3	RAD54L	XRCC2
2–10	13	21	8	6	3	31	33
10–20	1	22	9	7	6	2	8
20–60	0	7	23	13	12	0	2
60–100	0	0	10	17	13	1	0
>100	1	0	3	10	20	0	1
Total	15	50	53	53	54	34	44

Table 3. Hazard ratios of patients carrying signatures containing one or two genes.

Signature	Hazard ratio	Cox–PVAL
DDB2	3.21	3.0E–08
NEIL3	2.15	3.9E–05
EXO1	2.13	6.5E–05
DDB2_EXO1	4.73	2.8E–12
DDB2_NEIL3	4.43	3.5E–11
DDB2_RAD54L	4.32	6.0E–11
DDB2_XRCC2	3.85	3.0E–10
DDB2_MSH6	3.22	3.6E–09
DDB2_LIG3	2.10	8.4E–05
DDB2_PNKP	2.05	3.8E–04
DDB2_FEN1	2.04	2.4E–04
DDB2_MSH5	2.03	1.8E–04

Otherwise, silencing of NEIL3 combined with irradiation affected both cell lines. We observed a reduction in the number of U138MG cells in G1 and an increase in G2/M phases (Figure S2B), while the number of T98G cells were diminished in S and augmented in G2/M phases (Figure S2A and Figure 3(a)). We also observed pronounced higher levels of DSB after IR treatment for T98G cells silenced for NEIL3 at all times evaluated (Figure S3A and Figure 3(b)), while for U138MG cells a discreet increase was observed only after 6 h of exposure (Figure S4). Consistently, we detected augmented levels of cell death in both cells after irradiation and NEIL3 knockdown (Figure 4 and Figure S5). Apoptosis rates, conversely, were greater only in U138MG, in accordance with the wild-type genetic status of *TP53* gene, which is mutated in T98G cells. These results reveal that cell death activation occurs by a mechanism other than apoptosis in these cells. We also observed that the unique reduction of NEIL3 promoted an increment in cell death for T98G cell line (Figure 4), correlating with the notable accumulation of DSBs after irradiation and NEL3 silencing (Figure 3(b)).

Discussion

In this work, we identified 19 DNA repair genes with altered expression in different-grade astrocytomas, the majority of them showed overexpression and 4 were

detected at reduced levels in tumor tissues. Interestingly, we observed a fewer number of altered genes in GBMs when compared to lower grade astrocytomas and a tendency to higher expression levels in more aggressive tumors. These data indicate that the upregulation of selected DNA repair genes develops in parallel with the cumulative genomic instability observed during tumor progression. Supporting this statement, it was reported that DNA damage response (DDR) activation and amounts of DSBs are reduced in higher grade gliomas.^{26,27} Recently, Turner et al.²⁸ have shown a reliable enrichment in DNA repair activity of non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination pathways during glioma progression mediated by Akt3 activation.

Additionally, we observed a strong correlation between the expression of DNA repair genes we found altered and patient survival prognoses. Among them, five genes (DDB2, NEIL3, EXO1, BRCA2, and BRIP1) showed an independent correlation with poor prognoses, defining signatures of single genes. DDB2 was detected at lower levels, while the other four showed higher expression in astrocytomas. Importantly, DDB2 downregulation presented the highest HR (3.22) among the single-gene signatures and was present in 99.4% of signatures. DDB2, which is involved in the nucleotide excision repair (NER) pathway, is a remodeling enzyme of damaged DNA that acts in initial steps of NER. DDB2–DDB1 complex recognizes DNA damage and facilitates the recruitment of XPC to lesion sites.^{29,30} Thus, downregulation of DDB2 possibly promotes accumulation of DNA damage allowing a bypass in the DDR triggered by replicative stress. Interestingly, the reduction in DDB2 expression was correlated with poor outcomes of ovarian cancer patients, and its overexpression suppressed the ability of ovarian cancer cells to recapitulate tumors in athymic nude mice by reducing the cancer stem cell population.³¹ DDB2 was also postulated as a suppressor of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in colon cancer,³² suggesting that when DDB2 is reduced tumor cells undergo EMT and acquire a more aggressive behavior. These results corroborate our findings that correlated DDB2 reduction with more aggressive phenotypes of GBM.

Curiously, the overexpression of the other four single-gene signatures was also associated with higher risk of death. Overexpression of EXO1 and NEIL3, which are

Figure 2. Kaplan–Meier survival curves for selected gene signatures. Dotted curves denote patients with PC1 value (first principal component) above the cutoff (defined by ROC curve analysis). Continuous curves denote patients with PC1 value below the cutoff. Log-rank tests resulted in $p < 0.001$.

enzymes involved in DNA repair execution, showed an increased HR when combined with downregulation of DDB2. Patients carrying the DDB2_EXO1 or DDB2_NEIL3 signatures presented a faster progression of the disease and an augmented risk of early death of 4.73 and 4.44 fold, respectively. The overexpression of RAD54L and XRCC2, which are involved in the homologous recombination repair pathway and did not correlate with prognosis independently, also promoted a meaningful HR when coupled with DDB2 of 4.32 and 3.85, respectively. Altogether, these results suggest that permissiveness for mutation accumulation allied to higher competence in DNA repair activity can favor tumor development, by preventing collapsing levels of genomic instability that could cause cell death. Bartek et al.³³ have recently proposed a dual role for the ATR-Chk1 pathway, tumor suppressive and tumor promoting in early and advanced stages of cancer, respectively, which supports this hypothesis.

Due to the remarkable impact of EXO1 and NEIL3 overexpression for patient prognosis, we evaluated the effects of silencing these genes in cell-cycle dynamics, DSB repair activity, proliferation capacity, and cell death indexes of T98G and U138MG cell lines after exposure to IR. When EXO1 was silenced, T98G cells repaired DNA damage faster and presented higher levels of proliferation, indicating that EXO1 reduction favored DSB restoration. EXO1 is a 5' to 3' exonuclease that resects DSB with blunt ends generating a single-strand tail that is necessary for the invasion of the intact double-strand DNA used as template for homologous recombination repair.³⁴ Thus, T98G cells presenting reduced levels of EXO1 possibly directs the repair activity of DSB for the NHEJ pathway, which is an error-prone mechanism that promotes a faster reparation of these DNA lesions. In agreement with our hypothesis, Tomimatsu et al.³⁵ have shown that EXO1-mediated DNA resection is a pivotal event in repair pathway choice

Figure 3. Cell-cycle dynamics, DNA damage, and proliferation of GBM cells after EXO1 or NEIL3 silencing. Cells were treated or untreated with 14 Gy of IR (RS 2000 X-ray irradiator, 25 mA and 160 kVp) 3 days after transfection with siRNAs directed to EXO1 or NEIL3. (a) At the fifth day after transfections, cells were fixed and stained with propidium iodide and cell-cycle distribution was evaluated by flow cytometry. (b) Cells were fixed at the fifth day after transfection, labeled with anti-γH2AX antibody (ABCAM), and analyzed by flow cytometry analysis. (c) Proliferation rates were estimated by staining with crystal violet at each 24 h after transfection during 5 days. The graphs were plotted with the software “GraphPad Prism 5.0” (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$).

between homologous recombination and NHEJ. Moreover, it was also demonstrated that NHEJ efficiency was not affected in a *Saccharomyces cerevisiae* strain mutant for EXO1, although repair accuracy was reduced.³⁶ In contrary, U138MG cells were not affected by EXO1 knock-down. This difference is probably associated with the genetic background and proliferation indexes of these cells, once T98G cell line is mutant for *TP53*³⁷ and present shorter doubling (data not shown).

NEIL3 knockdown affected both cell lines analyzed similarly. We observed cell-cycle arrest in G2/M phase, and higher percentage of damage and cell death when

cells were silenced for NEIL3 and irradiated, demonstrating that NEIL3 reduction sensitizes GBM cells to IR. NEIL3 is a glycosidase that excises oxidative damage of bases generating apurinic/apyrimidinic sites that are recognized and converted into DNA single-strand breaks by the endonuclease APEX2.³⁸ Coherent with a potential function in the handling of ROS, generated by replicative stress, it was reported that NEIL3 is upregulated in S phase of cell cycle and acts preferentially on single-stranded DNA.^{39,40} Accordingly, Takao et al.³⁸ demonstrated that an *Escherichia coli* strain double mutated for Nth and Nei presents higher sensibility to ROS, and when

Figure 4. Quantification of apoptosis and effective cell death in GBM cells after silencing EXO1 or NEIL3. Cells were treated or untreated with 14Gy of IR (RS 2000 X-ray irradiator, 25 mA and 160kVp) 3 days after transfection with siRNAs directed to EXO1 or NEIL3. Numbers of apoptotic or dead cells were estimated by flow cytometry detection of annexin V and propidium iodide at 48 h after irradiation. Graphs were plotted with the software *GraphPad Prism 5.0* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$).

Neil3 is overexpressed, the resistance was partially recovered. Similarly, Rolseth et al.⁴¹ demonstrated that the primary mouse embryonic fibroblast (MEFs), obtained from Neil3 knockout mouse, presented higher sensibility to the genotoxic agents cisplatin and paraquat, when compared to MEFs with normal expression of Neil3. Once secondary DNA damage inflicted from IR is promoted by ROS, our data suggest that similar to Takao et al.³⁸ and Rolseth et al.,⁴¹ NEIL3 could play an important role in the resistance of GBM cells to this type of genotoxic stress.

In this study, we identified important expression signatures of DNA repair genes strongly correlated with astrocytoma progression. Therefore, genes enclosed in these signatures could represent new biomarkers for the prediction of disease prognosis and are potential targets for treatment. Particularly, we highlight the overexpression of EXO1 and NEIL3, which were independently associated with more than 2 fold increment in death risk for astrocytoma patients. Functional studies corroborated the relevance of EXO1 and NEIL3 overexpression for DNA repair activity and resistance to IR, emphasizing the importance of these genes also as promising candidates for the development of adjuvant therapies. Further studies using more refined approaches are required to functionally characterize the exact roles of these genes in astrocytoma biology.

Acknowledgements

The authors thank Silvia Regina Andrade Nascimento and Benedita Oliveira Souza for technical assistance. The authors also thank Fabiana Rossetto de Moraes who supported all flow cytometry analyses.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

V.V. was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant no. 2013/13465-1) and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico (grant no. 204/2012) from Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara. W.A.d.S., C.G.C., and V.V. were supported by Center for Cell-Based Therapy (CEPID/FAPESP; grant no. 2013/08135-2). J.F.d.S., R.B.S., and L.F.M.D.C. received fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

References

1. Fang X, Wang C, Balgley BM, et al. Targeted tissue proteomic analysis of human astrocytomas. *J Proteome Res* 2013; 11: 3937–3946.
2. Agnihotori S, Burrell KE, Wolf A, et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models

- and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp* 2013; 61(1): 25–41.
3. Jiang Y and Uhrbom L. On the origin of glioma. *Ups J Med Sci* 2012; 117: 113–121.
 4. Marko NF and Weil RJ. The molecular biology of WHO Grade II gliomas. *Neurosurg Focus* 2013; 34(2): E1.
 5. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95(2): 190–198.
 6. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 2001; 15(11): 1311–1333.
 7. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9: 157–173.
 8. Nigro JM, Misra A and Zhang L. Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res* 2005; 65: 1678–1686.
 9. Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, et al. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 2000; 60(23): 6617–6622.
 10. The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455(7216): 1061–1068.
 11. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013; 155: 462–477.
 12. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17: 98–110.
 13. Noshmeh H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010; 17: 510–522.
 14. Yan W, Zhang W, You G, et al. Correlation of IDH1 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in primary glioblastoma: a report of 118 patients from China. *PLoS One* 2012; 7(1): e30339.
 15. Kim YS, Kim SH, Cho J, et al. MGMT gene promoter methylation as a potent prognostic factor in glioblastoma treated with temozolomide-based chemoradiotherapy: a single-institution study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 84(3): 661–667.
 16. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997–1003.
 17. Kato T, Sato N, Hayama S, et al. Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(18): 8544–8553.
 18. Foltz DR, Jansen LET, Bailey AO, et al. Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 2009; 137: 472–484.
 19. Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, et al. HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 2009; 137(3): 485–497.
 20. Valente V, Serafim RB, Oliveira LC, et al. Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. *PLoS One* 2013; 8(4): e62200.
 21. Tayrac M, Aubry M, Saïkali M, et al. A 4-gene signature associated with clinical outcome in high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 317–327.
 22. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114(2): 97–109.
 23. Valente V, Teixeira S, Neder L, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 17.
 24. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−(ΔΔC_T)}. *Methods* 2001; 4(25): 402–408.
 25. Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc* 1972; 34(2): 34.
 26. Bartkova J, Horejs Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434(14): 864–870.
 27. Bartkova J, Hamerlik P, Stockhausen M-T, et al. Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas. *Oncogene* 2010; 29: 5095–5102.
 28. Turner KM, Sun Y, Ji P, et al. Genomically amplified Akt3 activates DNA repair pathway and promotes glioma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(11): 3421–3426.
 29. Wittschieben BØ, Iwai S and Wood RD. DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem* 2005; 280: 39982–39989.
 30. Stoyanova T, Yoon T, Kopanja D, et al. The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 activates nucleotide excision repair by regulating the level of p21Waf1/Cip1. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 177–187.
 31. Han C, Zhao R, Liu X, et al. DDB2 suppresses tumorigenicity by limiting cancer stem cell population in ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2014; 12(5): 784–794.
 32. Roy N, Bommi PV, Bhat UG, et al. DDB2 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer. *Cancer Res* 2013; 73(12): 3771–3782.
 33. Bartek J, Mistrik M and Bartkova J. Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19(1): 5–7.
 34. Kim YJ and Wilson DM. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol* 2012; 5(1): 3–13.
 35. Tomimatsu N, Mukherjee B, Deland K, et al. EXO1 plays a major role in DNA end resection in human and influences double-strand break repair and damage signaling decisions. *DNA Repair* 2012; 11(4): 441–448.
 36. Bahmed K, Seth A, Nitiss KC, et al. End-processing during non-homologous end-joining: a role for exonuclease 1. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(3): 970–978.

37. Ishii N, Maier D, Merlo A, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999; 9: 469–479.
38. Takao M, Oohata Y, Kitadokoro K, et al. Human Nei-like protein NEIL3 has AP lyase activity specific for single-stranded DNA and confers oxidative stress resistance in *Escherichia coli* mutant. *Genes Cells* 2009; 14(2): 261–270.
39. Krokeide SZ, Laerdahl JK, Salah M, et al. Human NEIL3 is mainly a monofunctional DNA glycosylase removing spiro-imindiohydantoin and guanidinohydantoin. *DNA Repair* 2013; 12(12): 1159–1164.
40. Neurauter CG, Luna L and Bjørås M. Release from quiescence stimulates the expression of human NEIL3 under the control of the Ras dependent ERK–MAP kinase pathway. *DNA Repair* 2012; 11(4): 401–409.
41. Rolseth V, Krokeide SZ, Kunke D, et al. Loss of NEIL3, the major DNA glycosylase activity for removal of hydantoins in single stranded DNA, reduces cellular proliferation and sensitizes cells to genotoxic stress. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 1157–1164.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells

Laura Marise de Freitas¹, Rodolfo Bortolozo Serafim², Juliana Ferreira de Sousa², Thaís Fernanda Moreira¹, Cláudia Tavares dos Santos¹, Amanda Martins Baviera¹, Valeria Valente^{1,2}, Christiane Pienna Soares¹ and Carla Raquel Fontana^{1*}

Abstract

Background: Photodynamic therapy (PDT) has proven to be a promising alternative to current cancer treatments, especially if combined with conventional approaches. The technique is based on the administration of a non-toxic photosensitizing agent to the patient with subsequent localized exposure to a light source of a specific wavelength, resulting in a cytotoxic response to oxidative damage. The present study intended to evaluate in vitro the type of induced death and the genotoxic and mutagenic effects of PDT alone and associated with cisplatin.

Methods: We used the cell lines SiHa (ATCC® HTB35™), C-33 A (ATCC® HTB31™) and HaCaT cells, all available at Dr. Christiane Soares' Lab. Photosensitizers were Photogem (PGPDT) and methylene blue (MBPDT), alone or combined with cisplatin. Cell death was accessed through Hoechst and Propidium iodide staining and caspase-3 activity. Genotoxicity and mutagenicity were accessed via flow cytometry with anti-gama-H2AX and micronuclei assay, respectively. Data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's posthoc test.

Results: Both MBPDT and PGPDT induced caspase-independent death, but MBPDT induced the morphology of typical necrosis, while PGPDT induced morphological alterations most similar to apoptosis. Cisplatin predominantly induced apoptosis, and the combined therapy induced variable rates of apoptosis- or necrosis-like phenotypes according to the cell line, but the percentage of dead cells was always higher than with monotherapies. MBPDT, either as monotherapy or in combination with cisplatin, was the unique therapy to induce significant damage to DNA (double strand breaks) in the three cell lines evaluated. However, there was no mutagenic potential observed for the damage induced by MBPDT, since the few cells that survived the treatment have lost their clonogenic capacity.

Conclusions: Our results elicit the potential of combined therapy in diminishing the toxicity of antineoplastic drugs. Ultimately, photodynamic therapy mediated by either methylene blue or Photogem as monotherapy or in combination with cisplatin has low mutagenic potential, which supports its safe use in clinical practice for the treatment of cervical cancer.

Keywords: Photodynamic therapy, Methylene blue, Photogem, Cisplatin, Combined therapy, Caspase-independent cell death

* Correspondence: fontanacr@fcar.unesp.br

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara– Rod Araraquara-Jau km 01 s/n, Araraquara, São Paulo 14800-903, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Photodynamic Therapy (PDT) is a treatment modality considered an alternative to current treatments for cancer and infections. Briefly, it is based on the administration of a non-toxic dye (photosensitizing agent) to the patient with subsequent local exposure to a light source of specific wavelength [1], leading to the death of target cell via oxidative damage. PDT presents several advantages for the treatment of both tumors and infections, among which are noteworthy the minimum systemic adverse effects due to its double selectivity, resulting in localized treatment [2, 3].

Photodynamic therapy has been identified as a promising adjuvant therapy of conventional approaches due to its multiple mechanisms of action that individual drugs usually do not present. Therefore, the combination of therapies with different mechanisms of action may offer an advantage over monotherapies, since most diseases involve multiple and distinct pathologic processes [4]. Combining different approaches can result in benefits such as reaching several cellular targets, providing greater efficiency in destroying target cells and reducing doses of individual therapy components, with an overall improvement on therapeutic response and reduction of toxic effects [5].

With either a monotherapy or a combined modality, cancer treatment success is determined by the interaction of host immune cells and dying cancer cells, which can be achieved by merging the cytotoxic effect with immune stimulation capable of eliminating residual cells or possible micrometastasis [6, 7]. In fact, tumors responsive to PDT treatment are those presenting a great infiltrate of immune cells after the treatment [8]. Therefore, the ability of a cancer treatment to elicit host immune system stimulation via immunogenic cell death presents fundamental clinical relevance, since the anticancer immune response reinforces the therapeutic effect [7].

Besides inducing an immunogenic cell death, cancer therapies must not elicit additional mutations on surviving cells, since new mutations can result in cancer resistance to chemotherapy and, consequently, contribute to disease progression. Additionally, precaution is necessary regarding genotoxic damage, which could lead to the emergence of a secondary tumor, as an adverse effect of the anticancer agent on normal cells [9, 10].

PDT has the potential to attend all the requisites described above, either alone or combined with different approaches, as evidenced by a previous study of our group [5]. Then, we demonstrated that combining PDT with cisplatin significantly improved cell death, but information regarding the type of cell death induced by the combination treatment was lacking. Therefore, the aim of this study was to investigate the type of cell death

induced by PDT and PDT combined with cisplatin, as well as their potential to induce mutations in surviving cells, using cervical cancer cell lines as a model.

Methods

Cell cultures

The cell lines used in this study were provided by Dr. Christiane Pienna Soares and were: SiHa (cervical carcinoma infected with HPV16; ATCC® HTB35™), C-33 A (cervical carcinoma not infected with HPV; ATCC® HTB31™), and HaCaT (spontaneously immortalized human keratinocytes; Addexbio Catalog #:T0020001). Cell lines were routinely checked for mycoplasma contamination. All cell lines were grown in a 1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Co., St. Louis, USA) and Ham's Nutrient Mixture F10 (Sigma Co., St. Louis, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultlab, Campinas, Brazil), 1X antibiotic/antimycotic solution (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B; Sigma Co., St. Louis, USA) and 0.1 mg/mL kanamycin (Sigma Co., St. Louis, USA), which is referred to as "complete medium" hereafter. Cells were kept in 5% CO₂ atm, 95% relative humidity and a constant temperature of 37 °C.

Photosensitizers and drugs

All drugs and photosensitizers were prepared and stored protected from light.

Photogem (PG; Photogem LLC. Co., Moscow, Russia) and Methylene blue (MB; Sigma Co., St. Louis, USA) were dissolved in PBS and stored at -20 °C. Cisplatin (CisPT) was obtained as a 0.5 mg/mL solution (Tecnoplatin, Zodiac Produtos Farmaceuticos S/A, Brazil), stored at room temperature. Curcumin (CUR; Sigma Co., St. Louis, USA) was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20 °C. All drugs above were diluted to working concentrations prior to use. Doxorubicin (DOX) was obtained as doxorubicin hydrochloride powder (Cloridrato de doxorubicina, Eurofarma, Brazil) and solutions were prepared in sterile distilled water immediately prior to use.

Light source

Both light sources (630 and 660 nm) consisted of a compact LED array-based illumination system with a homogeneous illumination area and a cooling device, composed of 48 LEDs with variable intensities (IrradLED® – biopdi, Sao Carlos, SP, Brazil). The distance between the LED and the plate allowed an even distribution of light on each well. The power density of the incident radiation was measured using a power meter (Coherent®, Santa Clara, CA, USA).

Photodynamic therapy and cisplatin treatment

Treatment groups are summarized in Table 1.

Table 1 Treatment groups for photodynamic therapy and cisplatin monotherapies and combination therapies

GROUPS	[PS]	[CisPT]	LIGHT DOSE
methylene blue (MB)	19.5 μ M	0	0
Photogem (PG)	0.5 μ M	0	0
MBPDT	19.5 μ M	0	5.11 J/cm ²
PGPDT	0.5 μ M	0	2.76 J/cm ²
cisplatin (CisPT)	0	41.6 μ M	0
MBPDT + CisPT	19.5 μ M	1.3 μ M	5.11 J/cm ²
CisPT + PGPDT	0.5 μ M	1.3 μ M	2.76 J/cm ²

PS: photosensitizer; MBPDT: methylene blue-mediated photodynamic therapy; PGPDT: Photogem-mediated photodynamic therapy.

In the cisplatin-only group, cells were treated with 41.6 μ M of cisplatin for 6 h. For the PG-photodynamic therapy (PGPDT) group, the cells were exposed to 630 nm at 2.76 J/cm² after 2 h of incubation with 0.5 μ M of PG. In the MB-photodynamic therapy (MBPDT) group, the cells were exposed to 660 nm at 5.11 J/cm² after 20 min of incubation with 19.5 μ M of MB. In the combination group, 1.3 μ M of cisPT was administered for 6 h immediately after MBPDT or 6 h before PGPDT. All treatment conditions were determined based on previous studies of our group [5].

Death profile assays

Fluorescence microscopy with Hoechst 33342 and propidium iodide

This assay was performed in a semi-automatic way at the IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA). For the assay, cells were cultivated in 96 wells plates in a cell density of 5,000 cells per well (5.0×10^4 cell/mL) and, after 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, treated according to the section *Photodynamic Therapy and cisplatin treatment*. After incubation time was complete, the plate was centrifuged at 2,500 rpm for 5 min at 4 °C. Media containing treatment was removed carefully and 100 μ L of ice-cold PBS 1X were added to each well. The plate was centrifuged once more and PBS was removed. In a dark room, 100 μ L of fluorochromes mix (HO 1 mg/mL – 15%; PI 1 mg/mL 25%, FDA 1 mg/mL 35%) prepared in ice-cold PBS was added to each well and plate was incubated at room temperature in the dark for 10 min. IN Cell Analyzer 2000 was set to capture 12 fields per well in each of the four wavelengths (bright field, green, blue and red filters) using a 20X objective. Images obtained were merged using IN Cell Analyzer 1000 Workstation 3.7 software (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, EUA) and cells were counted manually. Five hundred cells were counted in each well and cell death was analyzed through the determination of live, apoptotic or necrotic cells based on cell

morphology and fluorescence. The assay was performed in triplicates and was repeated three times.

Caspase-3 activity

Cells at a density of 2×10^5 cell/mL were plated in 96 wells plates with a black bottom and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were treated according to the section *Photodynamic Therapy and cisplatin treatment* and placed over ice immediately after treatment period was over. Media containing treatment solutions were removed and each well received 100 μ L of lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.5% Triton X-100; EDTA 2 mM; DTT 5 mM). The plate was incubated on ice for 20 min and then 100 μ L of substrate (20 μ M Acetyl-Asp-Met-Gln-Asp-amino-4-methylcoumarin [Ac-DMQD-AMC]) prepared in lysis buffer were added to each well, in the dark. After substrate addition, the plate was read in a fluorometer (FLx800™ Fluorescence Reader, BioTek - Winooski, VT, USA; excitation 360/40 nm and emission 460/40 nm) by top reading after 30 s of gentle agitation. Reading was performed at 37 °C. Results were expressed as released 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) concentration, based on the standard curve, which was prepared with decreasing concentrations of AMC beginning with 4 μ M and ending in 0.0156 μ M (2-fold dilutions). The assay was performed in triplicates and was repeated three times.

Genotoxicity assays

Flow cytometry using anti- γ H2AX antibody

Cells at a density of 2×10^5 cells/well were plated in 24 wells plates, incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, and treated according to section *Photodynamic Therapy and cisplatin treatment*. After treatment, cells were collected from the wells via trypsinization and centrifuged at 2,500 rpm for 10 min. Cells pellets were suspended in 1 mL of 4% paraformaldehyde and incubated for 10 min at room temperature. Cells were centrifuged again at 2,500 rpm for 10 min and washed once with 1X PBS. Each cell pellet was then suspended in methanol 70% (obtained with 30% 1X PBS) and stored at –20 °C until flow cytometry analysis. In the following step, cells were centrifuged at 2,200 rpm for 5 min and washed with 1X PBS. For permeabilization, cells were suspended in 0.025% Triton-X-100 and incubated for 5 min at room temperature, being once more centrifuged at 2,200 rpm for 5 min. Cells were incubated with anti- γ H2AX antibody (2.5:1000) for 1 h at room temperature, without agitation. Again, cells were centrifuged at 2,200 rpm for 5 min and washed with 1X PBS. Then, cells were incubated with secondary antibody conjugated with Alexa Fluor® 488 (2.5:1000) for 30 min at room temperature, without agitation. Cells suspensions were centrifuged at 2,200 rpm for 5 min and washed with 1X PBS, being

suspended in 60 μ L of 1X PBS and analyzed by flow cytometry in a FACSCanto (BD - Becton, Dickinson, and Company, New Jersey, USA). The assay was performed in triplicates and was repeated three times.

Micronuclei assay

Five hundred cells were distributed in each well of a 96 wells plate. After 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, cells were treated according to section *Photodynamic Therapy and cisplatin treatment*; media containing treatment substances were removed and replaced by complete medium. Cells were left to recover for 24 h. The next day, each well received 100 μ L of complete medium containing 6 μ g/mL cytochalasin B (Sigma Co., St. Louis, USA) and the plate was incubated for additional 24 h. After incubation, cells were fixed with absolute ethanol for 30 min and stained with 1 mg/mL fluorescein isothiocyanate (FITC) for 30 min, and 10 μ g/mL Hoechst 33342 for 15 min. All procedures were performed at room temperature in the dark. Reading was performed in the IN Cell Analyzer 2000, which was set to capture 12 fields per well in each of the three wavelengths (bright field, green and blue filters) using a 20X objective. Images obtained were fused using IN Cell Analyzer 1000 Workstation 3.7 software (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, EUA) and cells were analyzed manually. The assay was performed in triplicates and was repeated three times.

Clonogenic survival

Cells were plated in duplicates at a density of 150 cells/well in six wells plates and incubated until attached to the bottom of the well (3 h at 37 °C and 5% CO₂; adhesion was confirmed by microscopic observation). Once adhered, cells were treated according to section *Photodynamic Therapy and cisplatin treatment* and, after each treatment time, the medium was removed and replaced by complete medium. The plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 7 days, without media exchange. After the 7 days, the medium was removed and cells were washed with 1X PBS, fixed with a mixture of methanol, acetic acid and water (1:1:8, respectively) for 30 min and stained with crystal violet for 15 min. Established colonies were analyzed using a magnifying lens (16X magnification). Colonies containing < 50 cells were not considered and results were expressed in plating efficiency (PE) and survival fraction (SF), according to Franken et al. [11]. The assay was performed in duplicates and was repeated three times.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean plus standard deviation (SD) and were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's posthoc or Kruskal-Wallis with Dunn's posthoc test using GraphPad Prism® Version 5.01 software (GraphPad

Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered to be significant when $p < 0.05$. The acceptable coefficient of variation was less than or equal to 25%.

Results

In previous studies of our group, we observed that both the photodynamic therapy mediated by methylene blue (MBPDT) and Photogem (PGPDT) were effective in reducing cell viability with cytotoxicity being dependent on the light dose, for all three cell lines analyzed (C-33 A, HaCaT and SiHa). Cisplatin was less effective over the three cell lines compared to PDT (Fig. 1). However, the combination cisplatin + PDT had a synergistic effect and caused greater cell death in all conditions tested (Fig. 1). The sequence of treatment application (PDT + cisplatin or cisplatin + PDT) influenced the response and effectiveness depended on the photosensitizer: for MBPDT we found that PDT prior to cisplatin was more effective; on the other hand, for PGPDT the efficiency increased when cisplatin treatment was performed before PDT [5]. Therefore, the aim of this study was to investigate the type of cell death induced by PDT and PDT combined with cisplatin, as well as their potential to induce mutations in surviving cells, using cervical cancer cell lines as a model.

Cell death profile characterization

Fluorochrome exclusion assay: Hoechst 33342 and propidium iodide

As expected, cells treated with doxorubicin and curcumin induced, primarily, necrosis and apoptosis, respectively, with the percentage of necrotic or apoptotic cells varying according to the cell line (Figs. 2 and 3), with C-33 A being the most sensitive one (Figs. 2 and 3a). When cells were treated only with LED light sources or photosensitizers in the dark we did not observe significant cell death in comparison with the negative control cells (Figs. 2 and 3a-c).

MBPDT induced a greater amount of cell death in SiHa cells, compared to C-33 A and HaCaT, accordingly to our previous results. However, opposing previous studies [12–14], MBPDT caused cell death with predominant necrotic morphology, with about 2/3 of dead cells identified as necrotic and 1/3 presenting morphology of typical apoptosis (Fig. 2).

The combination therapy of MBPDT and cisplatin kept the death profile, with a predominance of necrotic cells for SiHa and HaCaT, but cell death percentage was even higher than that with both MBPDT and cisplatin as monotherapies (Figs. 2, 3b-c). C-33 A also presented higher levels of cell death when submitted to the combined therapy in comparison to monotherapies; however, there was a predominance of typical apoptosis morphology, a death profile more similar to that of cisplatin monotherapy (Figs. 2 and 3a).

Fig. 1 Comparison of cytotoxic effects of Photodynamic Therapy and cisplatin, as monotherapies and combined. **a** cell lines were treated with MBPDT (19.5 μM ; 5.11 J/cm^2), cisplatin (1.3 μM for 6 h) and combined therapy (MBPDT + CisPT, using the same parameters of monotherapies). **b** cell lines were treated with PGPDT (0.5 μM ; 2.76 J/cm^2), cisplatin (1.3 μM for 6 h) and combined therapy (CisPT + PGPDT, using the same parameters of monotherapies). It is observed a great reduction in cell viability caused by combined therapies, compared to monotherapies. Asterisks indicate the statistical difference. Columns represent the average of four independent quadruplicates and bars represent the standard deviation. ANOVA one-way, with Tukey posthoc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

When cell lines were treated with PGPDT we also observed cells with both necrotic and apoptotic morphologies, but with a predominance of the apoptotic type (Figs. 2 and 3a-c). Contrary to what was observed for MBPDT + cisplatin, combined therapy of cisplatin and PGPDT did not induce a greater percentage of cell death when compared to PGPDT monotherapy, except for C-33 A, which again presented a distinct behavior from the other two cell lines. When compared to cisplatin as monotherapy, cisplatin + PGPDT was capable of inducing increased rates of cell death for all cell lines evaluated.

Caspase-3 activity assay

The Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) recommends that apoptosis, or other types of cell death,

has to be demonstrated by more than one methodology as a procedure to eliminate artifacts. Therefore, to complement and confirm the results of cytomorphological fluorochromes exclusion assay described above, we conducted a caspase-3 activity assay.

With the only exception of positive control (curcumin), none of the treatments induced detectable caspase-3 activation. Concerning negative control (NC), MB, PG, LED630 and LED660 the result confirmed the observed non-induction of cell death; similarly, doxorubicin did not induce caspase activation as expected, since it promotes death by necrosis, which is independent of caspases. Although cisplatin had promoted apoptosis as monotherapy, the slight toxic effect observed over the cell lines used in this study generated a few

apoptotic cells that probably did not produce a detectable signal.

Treatments with photodynamic therapy, either as monotherapy or combined with cisplatin, did not activate caspase-3. Such result indicates the cell death caused by PDT in the conditions employed in this study is caspase-independent, which agrees with previous studies that associated caspase-independent cell death (CICD) with increased amounts of reactive oxygen species [15–17], which are responsible for PDT’s mechanism of action.

Genotoxicity

Flow cytometry with anti- γ H2AX

Table 2 shows the results of γ H2AX labeling obtained for C-33 A, HaCaT e SiHa cells. Average fluorescence intensity is directly proportional to the frequency of DNA’s double strand breaks induced by the treatments [18–20]. Cells treated with light, the photosensitizers or cisplatin only did not suffer significant DNA damage, with the concentrations employed, comparing to non-treated cells.

Fig. 3 Cell death profile induced by each treatment, according to cell line. Cell lines C-33 A (panel **a**), HaCaT (panel **b**) and SiHa (panel **c**) were submitted to Hoechst 33342, propidium iodide and fluorescein diacetate staining after treatments (CUR [25 μ M for 6 h]; DOX [50 μ g/mL for 6 h]; CisPT [41.6 μ M for 6 h]; MB [19.5 μ M for 20 min]; LED 660 nm [5.11 J/cm²]; PG [0.5 μ M for 2 h]; LED 630 nm [2.76 J/cm²]; MBPDT [19.5 μ M MB + 5.11 J/cm² LED 660 nm]; MBPDT + CisPT [19.5 μ M MB + 5.11 J/cm² LED 660 nm + 1.3 μ M CisPT for 6 h]; PGPDT [0.5 μ M PG + 2.76 J/cm² LED 630 nm]; CisPT + PGPDT [1.3 μ M CisPT for 6 h + 0.5 μ M PG + 2.76 J/cm² LED 630 nm]). Columns represent the average of three independent assays and bars represent standard deviation. Asterisks indicate the statistical difference, relative to negative control. Kruskal-Wallis, with Dunn's post-hoc. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. NT: non-treated; CUR: curcumin; DOX: doxorubicin; CisPT: cisplatin; MB: methylene blue; MBPDT: photodynamic therapy mediated by MB; PG: Photogen; PGPDT: photodynamic therapy mediated by PG

On the other hand, it is possible to observe that MBPDT induced pronounced DNA double strand breaks in all cell lines, in an opposite way of PGPDT, which did not cause DNA damage. Similarly, the combined therapy MBPDT + cisplatin induced a higher number of breaks than the combined therapy PGPDT + cisplatin, which resulted in a damage index comparable to that of PGPDT.

To verify the mutagenic potential of the therapies evaluated here, treatments that caused DNA damage were analyzed regarding their ability to induce mutations, which was done using the micronuclei assay, described below.

Table 2 Detection of H2AX phosphorylation via flow cytometry

Treatments	Average fluorescence intensity		
	C-33 A	SiHa	HaCaT
No treatment	1256	1405	1545
Secondary antibody	1197	1465	1391
CisPT	1503	1575	1526
LED660	1318	1533	1591
MB	1211	1401	2069
MBPDT	2471**	2531**	2842*
MBPDT + CisPT	3362**	3115**	10547***
LED630	1376	1489	1669
PG	1452	1414	1677
PGPDT	1386	1428	1695
CisPT + PGPDT	1444	1534	10547

Cell lines C-33 A, HaCaT and SiHa were submitted to flow cytometry using anti- γ H2AX monoclonal antibody after treatments (CisPT [41.6 μ M for 6 h]; MB [19.5 μ M for 20 min]; LED 660 nm [5.11 J/cm²]; PG [0.5 μ M for 2 h]; LED 630 nm [2.76 J/cm²]; MBPDT [19.5 μ M MB + 5.11 J/cm² LED 660 nm]; MBPDT + CisPT [19.5 μ M MB + 5.11 J/cm² LED 660 nm + 1.3 μ M CisPT for 6 h]; PGPDT [0.5 μ M PG + 2.76 J/cm² LED 630 nm]; CisPT + PGPDT [1.3 μ M CisPT for 6 h + 0.5 μ M PG + 2.76 J/cm² LED 630 nm]). Asterisks indicate the statistical difference relative to non-treated samples. Kruskal-Wallis, with Dunn's post-hoc (ns: non significative; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). CisPT: cisplatin; MB: methylene blue; MBPDT: photodynamic therapy mediated by MB; PG: Photogen; PGPDT: photodynamic therapy mediated by PG

Micronuclei assay

For this assay, we considered only the treatments that induced DNA double strand breaks detected in the flow cytometry with anti- γ H2AX, i.e., MBPDT and MBPDT combined with cisplatin. However, we could not perform micronuclei counting after those treatments given that this damage is detected only when cells execute mitosis. Thus, it is mandatory that treated cells have kept their cellular division capacity after treatment. Nevertheless, as can be seen in Fig. 4, we could not find a single binucleated cell after MBPDT or MBPDT + cisplatin treatments, unlike the negative control cells.

In order to confirm that such outcome was indeed a result of the loss of cell division capacity, we performed a clonogenic survival assay. It was confirmed that cells have lost their normal cell division capability since the few surviving cells failed to divide even after 7 days of incubation (Fig. 5).

Discussion

In a previous study of our group [5], we employed the MTT assay to assess cell viability of C-33 A, HaCaT, and SiHa after treating those cell lines with PDT mediated either by methylene blue or Photogem, alone or combined with cisplatin. The cell viability of the combined therapy groups was significantly lower compared to monotherapies. The sequence of treatments (PDT + cisplatin or cisplatin + PDT) was important and had different results when varying the PS, but combination therapy resulted in an enhanced anticancer effect regardless of the

treatment protocol, enabling the use of cisplatin at a concentration 12.5-fold lower compared with cisplatin-only treatment. In the following step, we sought to investigate how the cells were dying and whether or not the therapies could induce mutations.

Regarding the type of induced cell death, MBPDT induced the typical morphology of necrosis (Figs. 2 and 3). Contrary of what is described in previous studies [12–14], MBPDT caused cell death with predominantly necrotic morphology, with about 2/3 of dead cells identified as necrotic and 1/3 presenting morphology typically apoptotic (Fig. 2c). Such difference can be due to the incubation time with the photosensitizer prior to LED irradiation. Differently of our work, most of the previous cell culture studies employed protocols with dark incubation of 1 h [13, 21]. The incubation for 20 min employed in this work may have been insufficient for MB to reach the cellular targets needed to trigger cell death by apoptosis. Therefore, if MB was restricted to the cytoplasmic membrane proximities at the moment of irradiation, it is possible that reactive oxygen species (ROS) and singlet oxygen formed might have induced peroxidation of membrane lipids [22], which could have led to loss of membrane integrity and favored cell death by necrosis [23].

Cisplatin predominantly induced apoptosis, and combined therapy induced different rates of apoptosis- or necrosis-like depending on the cell line, but always with a higher percentage of dead cells than monotherapies (Figs. 2 and 3). Those results highlight the synergistic effect between PDT and cisplatin and corroborate the data obtained in the cytotoxicity assays (Fig. 1). Moreover, the different cell death profiles observed among the three cell lines after treatment with combined therapies indicate that the cytotoxic effects elicited by each individual therapy are dependent on the cell type.

Morphology alterations induced by PGPDT were most similar to apoptosis (Figs. 2 and 3). Several studies have shown that Photogem can induce both types of cell death [24, 25]. Therefore, our results were as expected and were in concordance with the literature. In this study, in general, cell death rates obtained for PGPDT, both as monotherapy and combined with cisplatin, were unexpectedly low, taking into account the results obtained in the cytotoxicity assay (Fig. 1). It is possible that PGPDT induces cellular damages that culminate in cell death in later times, which could have generated the low estimative of the post-treatment death rate in this assay due to the incubation times employed.

Members of the cysteine protease family, caspases have a central role in the coordination of stereotyped events occurring during apoptosis [26]. Caspases are activated in response to various cell death stimuli and lead to disassembly of the cell by proteolysis of hundreds cellular targets [27, 28]. According to the phase of the

Fig. 5 Clonogenic survival. **a** Survival fraction of cell lines treated or not with MBPDT or MBPDT + CisPT. Columns represent the average number of colonies in each condition (a colony was considered so when presenting more than 50 cells), after three independent assays. Bars indicate the standard deviation. Asterisks indicate the statistical difference, relative to negative control. Kruskal-Wallis, with Dunn's posthoc (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **b** Representative images of colonies formed in each treatment condition. Cristal violet staining; 10X objective (Olympus CKX31 microscope). NT: non-treated; MBPDT: photodynamic therapy mediated by methylene blue (19.5 μ M MB + 5.11 J/cm² LED 660 nm) MBPDT + CisPT: MBPDT followed by cisplatin treatment for 6 h (1.3 μ M CisPT)

apoptotic process in which they operate, caspases are subdivided into initiator (caspases -8, -9 and -10), which connects the intrinsic or extrinsic cell death stimuli to the following caspases in the pathway, so-called effectors (caspase - 3, -6 and -7), which activate other cellular factors [26]. Caspase-3, for example, promotes cleavage of PARP1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1) and internucleosomal DNA fragmentation, one of the hallmarks of apoptosis [29]. Thus, detection of caspase-3 activity is a hallmark of classical apoptosis occurrence by the caspase-dependent pathway.

In this study, both MBPDT and PGPDT did not activate caspase-3 in any of the cell lines, indicating that those treatments induced caspase-independent cell death (CICD).

CICD is defined by some authors as the cell death that occur when stimuli that would usually cause apoptosis

fails to activate the caspase [29]. Although typical events of caspase action are not present, like phosphatidylserine externalization and nuclear fragmentation, other characteristics of CICD resembles those of apoptosis, such as permeabilization of the mitochondrial outer membrane, loss of proliferation capacity and nuclear condensation [29, 30]. However, cells undergoing CICD may present a wide variety of characteristics, depending mainly on the initial stimuli and cell type [29]. On Fig. 2 we can see treatment protocols involving MBPDT resulting in cell death with morphology similar to necrosis, while the protocols involving PGPDT produced cell morphologies more similar to those of apoptotic cells, which demonstrates that initial stimuli seem to be more important than cell type to determinate the characteristics of the death process that the cells will undergo.

Specialized literature brings a huge discussion concerning the type of cell death induced by photodynamic therapy and the subsequent antitumor immune response triggered. It is commonly accepted that cell death via necrosis prompts acute inflammatory response and, therefore, has an immunogenic role. Likewise, it is known that apoptotic cells are cleared from the tissue in a silent way, without leading to an inflammatory environment or an immunological response [31, 32]. However, the idea of immunogenic apoptosis was raised by several authors and has gained strength in recent years [1, 33, 34].

The concept of caspase-independent cell death is recent and, therefore, there are little enlightening studies on the subject. It is not known how the tissue responds to those cells, how they are removed from the tissue and what is the role of CICD in the development of antitumor immunity [15, 29]. However, since it presents characteristics both of apoptosis and necrosis, it is possible that CICD plays an important role in the development of antitumor immunity. In fact, it was observed that some cell lines that die in a caspase-independent manner are highly immunogenic [35].

Besides conflicting ideas, there is a consensus over the fact that the generation of an intense acute inflammatory response after photodynamic therapy exerts a positive role in immune system activation and, by doing so, triggers the establishment of a lasting antitumor immunity, with potential to control possible recurrences of the primary malignant tumor and micrometastasis [1, 7].

Therefore, treatment protocols that favor tumor cell death by both apoptosis and necrosis, as the protocols shown in this work, have a great potential to induce antitumor immunological response: necrotic cells would provoke the necessary inflammatory response to attract defense cells, and apoptotic cells being phagocytized by professional antigen presenting cells would trigger the development of specific antitumor immunological response. Nevertheless, more studies are required to determine if the type of cell death observed for the PDT treatments of this work would be the key for the establishment of a lasting and effective antitumor immunity.

MBPDT, either as monotherapy or in combination with cisplatin was the unique therapy to induce significant damage to DNA (double strand breaks) in the three cell lines (Table 2). Several studies have evaluated the genotoxic potential of photodynamic therapy, using a variety of photosensitizers, light sources and cell lines. Induction of DNA damage by PDT was identified in all works available so far, with singlet oxygen being the species directly related to alterations observed in the DNA. The type and extension of DNA damage vary accordingly to the PS and its concentration, light dose and cell line [36–39].

Results obtained in this work corroborate the previous studies mentioned, particularly concerning MBPDT. The

great extension of DNA damage induced by this therapy was accompanied by increased cell death, mainly with a necrotic profile, either as monotherapy or combined with cisplatin. Preceding studies have shown that extensive DNA damage caused by oxidative stress lead to cell death by necrosis: after genomic injury PARP-1 is activated and catalyzes the hydrolysis of NAD⁺, depleting it from cellular context and causing an energetic failure. That process results in caspase-independent cell death with necrotic features [40–45].

Besides double and single strand breaks, PDT can induce DNA cross-linking, sister chromatid exchange and base oxidation in the DNA, particularly in guanine residues; various studies suggest the formation of the 8-hydroxydeoxyguanosine residue after PDT mediated by methylene blue [36–38, 46]. Thus, we can speculate that, although PGPDt did not cause DNA double strand breaks, other types of DNA damage could be generated by this treatment. This is an interesting hypothesis to be tested in further studies.

To determine if the observed genotoxic action could be mutagenic, we performed the micronuclei (MN) formation assay. MN can originate from acentric chromosomal fragments (missing the centromere) or whole chromosomes incapable of migrating to cell poles during anaphase of cell division. Therefore, micronuclei represent a permanent damage that has been transmitted to the cell's offspring [47]. There was no mutagenic potential for the damage induced by MBPDT, given that the few cells that survived the treatment have lost their clonogenic capacity (Figs. 4 and 5).

Therefore, although MBPDT and MBPDT + cisplatin treatments induce extensive DNA damage, the few cells that survive the treatment cannot propagate the acquired mutations because they do not have any proliferative capacity. By knowing the mechanism of cell death caused by the combined therapy one would have more certainty that this new approach will not cause additional mutations to the cancer cells or their surrounding normal cells, which could complicate the treatment. In addition, although it requires further studies, combining PDT with cisplatin may have a positive effect on the development of specific antitumor immunity, preventing the recurrence of the primary tumor.

Since cisplatin have been used to treat patients with cervical cancer for decades [5], and PDT have been used to treat early cervical cancer in clinical studies ([48–52]; among others), we believe it is completely possible to reproduce our results in vivo. By doing so, the cisplatin dose administered to the patients would be reduced due to its association with PDT because cells are being attacked by two different mechanisms, diminishing the required dose to trigger cell death. This has a very important impact on reducing adverse effects provoked by

antineoplastic drugs since less deleterious effects are observed when lower doses are administered.

Conclusions

Our data showed that, with the methods employed, MBPDT and PGPDT induced cell death to the three cervical cancer cell lines analyzed, with predominant morphological characteristics of necrosis and apoptosis, respectively. However, none of the treatments activated caspase-3.

We also observed that MBPDT, both as monotherapy and as combined therapy with cisplatin, was able to induce DNA double-strand breaks in the three cell lines evaluated, while PGPDT did not. Despite its genotoxicity, MBPDT was not mutagenic since it inhibited the proliferation capacity of surviving cells.

When combining PDT and cisplatin the advantages of each individual treatment are enhanced. Low doses of cisplatin administered prior to PGPDT optimized the result, and MBPDT sensitized tumor cells for cisplatin action. Taken together, those results elicit the potential of such combined therapy in diminishing the toxicity of antineoplastic drugs.

Ultimately, photodynamic therapy mediated by either methylene blue or Photogem as monotherapy or in combination with cisplatin has low mutagenic potential and possibly high immunogenic potential, characteristics that support its safe use in clinical practice for the treatment of cervical cancer.

Abbreviations

AMC: 7-amino-4-methylcoumarin; CICD: Caspase-independent cell death; cisPT: Cisplatin; CUR: Curcumin; DOX: Doxorubicin; DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; FDA: Fluorescein diacetate; HO: Hoechst 33342; LED: Light emitting diode; MB: Methylene blue; MBPDT: PDT mediated by MB; MN: Micronuclei; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; PBS: Phosphate-buffered saline; PDT: Photodynamic therapy; PG: Photogem; PGPDT: PDT mediated by PG; PI: Propidium iodide; PS: Photosensitizer

Acknowledgments

We would like to thank Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP (PADC-FCF) for additional financial support.

Funding

This work received funding from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Grants # 2012/25414-0 and # 2016/05345-4, respectively a Master's degree fellowship of LM de Freitas, and a Regular Research Funding of CR Fontana) and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP (PADC-FCF), responsible for covering the publishing costs of this article.

Availability of data and materials

Any raw data (including original microscopy images and flow cytometry readings) not already presented in this manuscript can be obtained from the authors on reasonable request.

Authors' contributions

LMF designed and carried out the study, conducted the statistical analysis and drafted the manuscript; RBS and JFS acquired the flow cytometry data; TFM and AMB helped design and perform the caspase-3 activity assay; CTS

acquired the fluorescence microscopy images; WV and CPS critically corrected the manuscript; CRF conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Author details

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara– Rod Araraquara-Jau km 01 s/n, Araraquara, São Paulo 14800-903, Brazil. ²Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP Univ de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil.

Received: 12 August 2015 Accepted: 18 January 2017

Published online: 10 February 2017

References

- Mroz P, et al. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011;7(1):75–91.
- Brown SB, Brown EA, Walker I. Review the present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment photodynamic therapy. *Lancet Oncol*. 2004;5:497–508.
- Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009;6(3–4):170–88.
- Zuluaga M-F, Lange N. Combination of photodynamic therapy with anti-cancer agents. *Curr Med Chem*. 2008;15(17):1655–73.
- de Freitas LM, Soares CP, Fontana CR. Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: A novel approach for cervical cancer. *J Photochem Photobiol B*. 2014;140C:365–73.
- Kroemer G, et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16:3–11.
- Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Immunogenic cell death: can it be exploited in Photodynamic therapy for cancer? *BioMed Res Int*. 2013;2013:4821–60.
- Gollnick SO. Photodynamic therapy and antitumor immunity. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012;10:5-40–3.
- Muller M, et al. One, two, three—p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Update*. 2006;9:288–306.
- Coulas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2003;13:115–23.
- Franken NA, et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protocol*. 2006;1(5):2315–9.
- Blásquez-Castro A, et al. Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. *Photochem Photobiol Sci*. 2009;8(3):371–6.
- Chen Y, et al. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Sci*. 2008;99(10):2019–27.
- Tardivo J, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2(3):175–91.
- Tait SWG, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*. 2008;27(50):6452–61.
- Kim HS, Lee M-S. Essential Role of STAT1 in Caspase-Independent Cell Death of Activated Macrophages through the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/STAT1/Reactive Oxygen Species Pathway. *Mol Cell Biol*. 2005;25(15):6821–33.
- Lin Y, et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem*. 2004;279:10822–8.
- Rogakou EP, et al. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9390–5.

19. Watters GP, et al. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res.* 2009;679:50–8.
20. Huang X, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods Mol Biol.* 2006;314:73–80.
21. Lu Y, et al. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa cells. *J Cell Biochem.* 2008;105(6):1451–60. doi:10.1186/s12885-017-3075-1.
22. Kamat JP, Devasagayam TP. Methylene blue plus light-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes: inhibition by nicotinamide (vitamin B3) and other antioxidants. *Chem Biol Interact.* 1996;99(1-3):1–16.
23. Rello S, et al. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis.* 2005;10(1):201–8.
24. Hsieh Y-J, et al. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol.* 2003;194(3):363–75.
25. Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol.* 1996;64:182–7.
26. Walsh JG, et al. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):12815–9.
27. Lüthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007;14:641–50.
28. Timmer JC, Salvesen GS. Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007;14:66–72.
29. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99–104.
30. Bro LE, Krut FAE, Giaccone G. Cell death independent of caspases : a review. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3155–63.
31. Ekert PG, et al. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol.* 2004;165:835–42.
32. Tesniere A, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):3–12.
33. Melcher A, et al. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med.* 1998;4(5):581–87.
34. Goldszmid RS, et al. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4 + and CD8 + T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol.* 2003;171(11):5940–7.
35. Scheffer SRS, et al. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int J Cancer.* 2003;211(2002):205–11.
36. Larmonier N, et al. An atypical caspase-independent death pathway for an immunogenic cancer cell line. *Oncogene.* 2002;21(39):6091–100.
37. Davies J, et al. Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes in vitro and in vivo at concentrations used in clinical chromoendoscopy. *Gut.* 2007;56(1):155–6.
38. Woods JA, et al. The effect of photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study. *Photochem Photobiol.* 2004;79(1):105–13.
39. Epe B, Pflaum M, Boiteux S. DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat Res.* 1993;299(3–4):135–45.
40. McBride TJ, et al. Mutations induced by methylene blue plus light in single-stranded M13mp2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):6866–70.
41. Cipriani G, et al. Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem.* 2005;280(17):17227–34.
42. Shen HM, et al. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5914–22.
43. Alano CC, Ying W, Swanson RA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 2004;279:18895–902.
44. Burkart V, et al. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med.* 1999;5:314–9.
45. Eliasson MJ, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med.* 1997;3:1089–95.
46. Così C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase: early involvement in glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res.* 1994;39:38–46.
47. McNair FI, et al. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells after photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin. *Br J Cancer.* 1997;75(12):1721–9.
48. [Internet] OECD: Paris, France. In: Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, Test Guideline No. 487, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, 2010. <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
49. Shishkova N, Kuznetsova O, Berezov T. Photodynamic therapy for gynecological diseases and breast cancer. *Cancer Biol Med.* 2012;9(1):9–17.
50. Sakamoto M. Safety guidelines for photodynamic therapy in the treatment of early stage cancer and dysplasia of the uterine cervix. *Laser Ther.* 2012;21(1):60–4.
51. Yamaguchi S, et al. Photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology.* 2005;69:110–6.
52. Muroya T, et al. Phase III clinical trial of photodynamic therapy for early cancer and pre-cancerous lesion of the uterine cervix using porfimer sodium (PHE) and excimer dye laser (PDT EDL-1). *Oncol Chemother.* 1992;8:302–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

DNA Damage Response and DNA Repair Genes in Cancer Progression: Good or Bad Guys?

Juliana Ferreira de Sousa¹ and Valeria Valente^{2,3,4*}

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, University of São Paulo State (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

³Center for Cell-Based Therapy-CEPID/FAPESP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

⁴Center for Integrative Systems Biology (CISBi), NAP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Keywords: DNA damage; DNA repair genes; Genomic instability; Cancer progression

Description

Cancer researchers around the world are massively working in order to better understand cancer biology and find promising therapeutic targets to attack cancer cells more efficient and specifically. Once increased genomic instability is a remarkable feature of the different types of cancer, several groups are putting efforts in the characterization of alterations in the DNA damage response (DDR) pathway, a specialized genome surveillance mechanism that protects cells of endogenous and exogenous genotoxic stresses. Loss of function mutations or expression alteration in genes of the DDR machinery and in genes involved in DNA repair execution, which are downstream activated, have been extensively associated with cancer development, progression, malignancy grade, and patient's prognosis and survival [1-14].

DDR activation encompasses a phosphorylation cascade in which numerous proteins are involved. Depending on the type of damage, specific DDR signaling is triggered and determines the activation of different pathways mainly coordinated by the PI3K-like kinases ATM (ataxia-telangiectasia mutated) and ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related). Two major DNA damage sensors undertake the recognition of DNA lesions, the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex that detects DNA double-strand breaks (DSBs), and RPA (replication protein A) and the RAD9-RAD1-HUS1 complex that identify persistent single-stranded DNA regions. These complexes recruit the apical kinases ATM/ATR, which in turn phosphorylate several targets including: 53BP1 (p53-binding protein 1), MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1), TOPBP1 (topoisomerase DNA II binding protein 1), BRCA1 (breast cancer 1, early onset) and the histone variant H2AX. These proteins sustain and amplify DDR signaling and pass-through the signal to effector molecules. ATM is predominantly triggered by DSBs, while ATR responds to the presence of single-stranded DNA generated by DNA replication stress, but there is considerable crosstalk between these pathways in downstream steps. Ultimately, DDR signaling can spread away the DNA lesion site and promotes the engagement of the downstream kinases CHK1 (checkpoint kinase 1) and CHK2 (checkpoint kinase 2), mainly phosphorylated by ATR and ATM, respectively. CHK1 and CHK2 activate two major effectors: p53 and CDC25 (cell division cycle 25) that coordinates cell cycle arrest allowing DNA repair execution by DNA repair proteins also activated in the process. The resume of cell cycle progression occurs only when damage has been completely removed. Otherwise, when extensive damage cannot be properly repaired, DDR can induce senescence or cell death by apoptosis [15].

Therefore, considering the first steps of tumorigenesis, it is classically known that loss of function of genes involved in DDR is a fundamental trigger for cancer development. This multifaceted DDR machinery

was shown to be an inducible barrier for cancer establishment by stopping the cell cycle and inducing cellular senescence or cell death in oncogene-transformed cells [3,4]. So far, the activation of DNA repair genes, which are orchestrated by the DDR proteins, functions as the good guys of tumor initiation blockage. Paradoxically, several studies have also shown that increased expression of DNA repair genes is correlated with the incidence of more aggressive cancers in patients with melanoma [16], bladder [17] and breast cancers [18], squamous cell carcinoma of the oral cavity [19], and glioma [20,21]. These data suggested that once the tumor was initiated and progressed to more malignant stages greater competence in DNA repair is required to avoid the collapse of extremely unstable genomes.

More recently, this dual role of DDR in tumorigenesis (tumor suppressive) and cancer progression (tumor promoting) has been proposed as a mechanism by which cancer cells escape of checkpoint imposed senescence or death and adapt to advanced stages presenting higher levels of replicative stress and genetic instability [22]. Thus, after tumor establishment, the activation of DNA repair genes becomes the bad guy that allows cancer progression. The elevated resistance to radio and chemotherapies observed in highly malignant tumors could be, at least in part, related to this phenomenon [16,23].

Glioblastoma multiforme (GBM), the most common and malignant primary brain tumor affecting adults, is extremely aggressive and resistant to current therapies, which usually include maximal surgical resection, radiotherapy and chemotherapy with the alkylating agent temozolomide (TMZ) [24-26]. The median survival of GBM patients is 14.6 months and the percentage of individuals who lives for five years or more is less than 10% [27,28]. It has been widely demonstrated that the activation of DDR acts as an oncogene-induced biological barrier against GBM development [29-32]. Bartkova et al., showed that DDR is aberrantly and constitutively activated in low-grade astrocytoma and in GBM samples, but not in normal brain or in brain tissues adjacent to the tumor area. More importantly, although GBM presents higher degree of proliferation, the levels of DNA damage were greater in the low-grade astrocytoma than in GBM. These results indicate that somehow DDR seems to be more effective in more aggressive lesions than in low-grade tumors.

***Corresponding author:** Valeria Valente, Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, University of São Paulo State (UNESP), Araraquara, SP, Brazil, E-mail: valenteval@gmail.com

Received June 17, 2015; **Accepted** July 08, 2015; **Published** July 13, 2015

Citation: Sousa JFde, Valente V (2015) DNA Damage Response and DNA Repair Genes in Cancer Progression: Good or Bad Guys? Brain Disord Ther S2: 004. doi:10.4172/2168-975X.S2-004

Copyright: © 2015 Sousa JFde, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

In this context, we have recently showed an independent correlation between the overexpression of HJURP, a novel protein involved in DNA repair and centromeric chromatin assembly, and the worse survival prognosis of GBM patients. Interestingly, we observed that the more aggressive the tumor is, the higher the levels of HJURP expression. We also demonstrated that HJURP function is essential for GBM cell lines survival while non-tumor cells were not significantly affected, suggesting a potential synthetic lethal effect for HJURP silencing in GBM cells [33]. HJURP overexpression was also included in a four-gene signature associated with poor clinical outcome of high-grade gliomas patients [34]. Additionally, XRCC2 and XRCC4, both related with the homologous recombination DNA repair pathway, are also overexpressed in GBM and the knockdown of these genes sensitizes GBM cell lines to radio and chemotherapies [35].

Therefore, if we consider the initial steps of precancerous lesions development, DDR has the important roles of inhibiting uncontrolled proliferation and activating senescence or apoptosis when DNA damage accumulates. Not a coincidence, in the majority of low-grade cancers the pathway of ATM/ATR, the apical kinases that mediates DNA damage signaling, are compromised by loss of function mutations, mainly in TP53 but frequently also in other downstream genes. In contrast, after establishment of early lesions, it seems that along with tumor evolution the activity of these pathways are recovered and exacerbated in order to defend tumor cells from the replicative stress, high mutation rates and severe genomic instability [3,4,22,33,36,37]. Thus, the competence acquired in the DDR pathway, in part through the overexpression of DNA repair genes, allows the survival of progressively more malignant cancer cells despite the excessive genomic instability accumulated.

This scenario highlights the fundamental role DDR presents in cancer progression and points out the potential of this pathway for the identification of promising therapeutic targets. Further research is necessary to elucidate the mechanisms by which endogenous replicative stress and genomic instability accumulation impose a selection pressure over tumor cells for the acquisition of higher competence in DNA repair and also to identify the genetic targets associated with this competence. The characterization of the genetic alteration repertoire related to the enhanced DNA repair capacity could permit the developing of adjuvant therapies that sensitizes tumor cells to the genotoxic agents or even boost the design of novel therapeutic strategies based on synthetic lethal effects for GBM cells.

References

1. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, et al. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378: 789-792.
2. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, et al. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 12: 333-337.
3. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, et al. (2005) Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434: 907-913.
4. Bartkova J, Bakkenist CJ, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Sehested M, et al. (2005) ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. *Cell Cycle* 4: 838-845.
5. Niida H, Murata K, Shimada M, Ogawa K, Ohta K, et al. (2010) Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumour susceptibility in vivo. *EMBO J* 29: 3558-70.
6. Moran A, O'Hara C, Khan S, Shack L, Woodward E, et al (2012) Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer* 11: 235-242.
7. Cancer Genome Atlas Research Network (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-337.
8. Cancer Genome Atlas Research Network (2012) Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489: 519-525.
9. Cancer Genome Atlas Research Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490: 61-70.
10. Golmard L, Caux-Moncoutier V, Davy G, Al Ageeli E, Poirot B, et al. (2013) Germline mutation in the RAD51B gene confers predisposition to breast cancer. *BMC Cancer* 13: 484.
11. Schepeler T, Lamy P, Hvidberg V, Laurberg JR, Fristrup N, et al. (2013) A high resolution genomic portrait of bladder cancer: correlation between genomic aberrations and the DNA damage response. *Oncogene* 32: 3577-3586.
12. Landau DA, Wu CJ (2013) Chronic lymphocytic leukemia: Molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Med* 5: 47.
13. Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511: 543-550.
14. Wadt KAW, Aoude LG, Golmard L, Hansen TV, Sastre-Garau X, et al. (2015) Germline RAD51B truncating mutation in a family with cutaneous melanoma. *Fam Cancer* 14: 337-340.
15. Sulli G, Micco RD, Fagagna FA (2012) Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 12: 709-720.
16. Kauffmann A, Rosselli F, Lazar V, Winnepenninckx V, Mansuet-Lupo A, et al. (2008) High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. *Oncogene* 27: 565-573.
17. Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M, Jensen JL, Marcussen N, et al. (2003). Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nature Genetics* 33: 90-96.
18. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, et al. (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365: 671-679.
19. O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, Singhal S, Weber R, et al. (2005) Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene* 24: 1244-1251.
20. Squatrito M, Holland EC (2011) DNA damage response and growth factor signaling pathways in gliomagenesis and therapeutic resistance. *Cancer Res* 71: 5945-5949.
21. Turner KM, Sun Y, Ji P, Granberg KJ, Hu L, et al. (2015) Genomically amplified Akt3 activates DNA repair pathway and promotes glioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 3421-3426.
22. Bartek J, Mistrik M, Bartkova J (2012) Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. *Nat Struct Mol Biol* 19: 5-7.
23. Eich M, Roos WP, Nikolova T, Kaina B (2013) Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. *Molecular Cancer Therapeutics* 12: 2529-2540.
24. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, et al. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised Phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10: 459-466.
25. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, et al. (2013) Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther* 61: 25-41.
26. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarde F (2015) Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discovery Today* 20: 899-905.
27. Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, et al. (2006) Present and potential future issues in glioblastoma treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther* 6: 719-732.
28. Lefranc F, Facchini V, Kiss R (2007) Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist* 12: 1395-1403.
29. Hoeijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374.
30. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3: 155-168.

31. Bartek J, Bartkova J, Lukas J (2007) DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 26: 7773-7779.
32. Bartkova J, Hamerlik P, Stockhausen MT, Ehrmann J, Hlobilkova A, et al. (2010) Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signaling in human gliomas. *Oncogene* 29: 5095-5102.
33. Valente V, Serafim RB, Oliveira LC, Adorni FS, Torrieri R, et al. (2013) Modulation of HJURP (Holliday Junction-Recognizing Protein) levels is correlated with glioblastoma cells survival. *PLoS One* 8: e62200.
34. de Tayrac M, Aubry M, Saïkali M, Etcheverry A, Surbled C, et al. (2011) A 4-gene signature associated with clinical outcome in high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 17: 317-327.
35. Zheng Z, Loon NGW, Zhang X, Olson JJ, Hao C, et al. (2012) RNAi-mediated targeting of noncoding and coding sequences in DNA repair gene messages efficiently radiosensitizes human tumor cells. *Cancer Research* 72: 1221-1228.
36. DiTulio RA Jr, Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, et al. (2002) 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature Cell Biology* 4: 998-1002.
37. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319: 1352-1355.

Citation: Sousa JFde, Valente V (2015) DNA Damage Response and DNA Repair Genes in Cancer Progression: Good or Bad Guys? Brain Disord Ther S2: 004. doi:[10.4172/2168-975X.S2-004](https://doi.org/10.4172/2168-975X.S2-004)

This article was originally published in a special issue, **Cdk5 and Brain Disorders** handled by Editor(s). Dr. Jyotshnabala Kanungo, National Center for Toxicological Research, USA

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submission>