Luís Francisco Zirnberger Batista

**Mecanismos de indução de apoptose pela
presença de danos ao DNA:**

**Um estudo sobre o papel de p53 na resistência de
células de glioma a agentes quimioterápicos**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Microbiologia).**

São Paulo

2008

Luís Francisco Zirnberger Batista

Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA:

Um estudo sobre o papel de p53 na resistência de células de glioma a agentes quimioterápicos

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

São Paulo

2008

Dedicado à memória do meu pai

Dedicado à minha mãe, uma mulher que
levanta, sacode a poeira e dá a volta por
cima

Agradecimentos

Muito aconteceu durante o período em que trabalhava nesta tese. Se hoje consegui terminá-la foi sem dúvida alguma devido ao teu apoio Pati, que me ajudou em todos os aspectos que possam existir, principalmente emocionalmente e intelectualmente. Pati, só você sabe tudo o que passei, tudo o que passamos; tenho a certeza de que sem você nada disto estaria acontecendo. Você é tudo para mim, e espero fazer por merecer tê-la ao meu lado.

Termino este doutoramento com a certeza de que a ciência torna-se a cada dia mais importante para a sobrevivência da nossa espécie. Fico feliz em poder participar disso e não poderia deixar de agradecer às pessoas que me “moldaram” cientificamente e me fizeram ter ainda mais a certeza que esta é uma batalha que vale a pena lutar! Em primeiro lugar, o Prof. Carlos Menck, pessoa que mais me ensinou sobre o que é Biologia, e como se deve trabalhar com ela. À Dra. Vanessa Chiganças, que me ensinou tudo o que sei sobre morte celular e com a qual aprendi a importância de “manter o foco” durante o longo período do Doutorado. Aos Drs. Alysson Muotri e Rodrigo Galhardo, por me fazerem ver que grandes idéias só aparecem a quem trabalha por elas.

A todas as pessoas do laboratório de Reparo de DNA, onde juntos passamos tantos bons momentos. Alexandre, Alice, André, Apuã, Bárbara, Carol Quayle, Douglas Juliana, Marinalva, Maria Helena, Rafaela, Renata Medina, Regina, Tomás, Vá Sato, Vinagrete e Wanessa, muito obrigado! Um agradecimento em particular aos veteranos das células, que tanta paciência tiveram comigo, e que tanto me ajudaram nestes anos: Carol Berra, Carol Marchetto, Dani, Helots, Kero, Renatinha, Ricardo e Tatiana. E em especial à Melissa, que além de tudo isso ainda colou grau para mim, enquanto eu estava na Alemanha! E claro, também ao pessoal da sessão cinema, Raquel e Stephano! E claro, as caronas da Luciana, sempre uma maneira divertida de terminar o dia!

Os períodos na Alemanha fizeram mais do contribuir para a minha formação científica. Fizem-me também ver que por trás de uma fachada séria e compenetrada, existem algumas das pessoas mais alegres que já conheci. Jamais terei palavras para agradecer aos Profs. Bernd Kaina e Gerhard Fritz e seus respectivos grupos, por me fazerem sentir em casa, mesmo quando estava no “suicide room”! Um agradecimento especial ao Dr. Wynand Roos, que além de ser meu maior parceiro científico, é um grande amigo! E jamais poderia esquecer-me de agradecer à Tina, Eva e Steffen, por tantos bons momentos, em especial uma determinada viagem a Berlin, da qual jamais esquecerei.

Ah, tenho também que agradecer ao pessoal da “Bio 2000”, em especial às portuguesas, Cecília, Lia, Sandra, Vanessa e Zanith! E claro, Luiz, Lucas, Pedroca e Polonês, apesar de vocês terem prejudicado minha média ponderada, agradeço muito por toda a diversão proporcionada!

Aos companheiros de República: Zen, Roger, Wendell, Bixo, Primo e Gerson, por tantas pizzas compartilhadas por tanto tempo!

E, sem dúvida alguma, o maior agradecimento de todos vai para a minha família: minha esposa Patrícia, minha mãe Elenice, Ulysses, avó Dirce, tia Egle, tio Joaquim, Paulo e Rosa, Andrea, Luiz Paulo e Phillipe. Tenho a certeza de que sempre poderemos contar uns com os outros, em qualquer situação. E essa certeza vem do fato de saber que fomos todos criados no ombro de um gigante! Seu Francisco, que não era biólogo, mas sabia mais da vida do que qualquer um que já conheci. Obrigado Vô.

Agradeço também à Universidade de São Paulo, seus docentes e funcionários, que proporcionaram a melhor estrutura possível para a realização desta Tese. Espero fazer jus aos diplomas que carrego. E claro, agradeço à FAPESP e à Capes, pelo apoio financeiro recebido durante meu Doutorado.

Estes romanos são loucos!
(Obelix, gaulês)

Resumo

BATISTA, LFZ. Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA: um estudo sobre o papel de p53 na resistência de células de glioma a agentes quimioterápicos. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A geração de lesões ao DNA possui diversos efeitos biológicos em células de mamíferos, como inibição da replicação e transcrição do DNA, ativação de vias de reparo de DNA, ativação de mecanismos “checkpoints”, mutagênese e indução de morte celular por apoptose. Este último pode ter consequências deletérias para o organismo, como no caso de doenças neurodegenerativas, mas também pode trazer benefícios, como impedir que uma célula com mutações seja perpetuada, possivelmente dando origem a um tumor. Apesar de extensivamente estudado, há ainda muito por se descobrir sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela indução e efetuação de morte celular por apoptose após a geração de danos ao DNA. Um dos agentes genotóxicos capazes de induzir apoptose é a luz ultravioleta (UV), cuja sinalização para este tipo de morte celular parece estar relacionada com o bloqueio da maquinaria de transcrição frente a uma lesão ao DNA. Neste trabalho iremos demonstrar que a replicação do DNA lesado é também um evento necessário para indução de apoptose por luz UV, e que a inibição dessa replicação é capaz de evitar a morte celular mesmo em células incapazes de reparar as lesões geradas pela irradiação. Será mostrado também que os agentes quimioterápicos Temozolomida (TMZ), Nimustina (ACNU), Carmustina (BCNU) e Fotemustina são capazes de induzir apoptose em células de glioblastoma multiforme (GBM) humano, em um processo controlado por *p53*. Se após tratamento com TMZ, *p53* sensibiliza células à indução de apoptose pela regulação da expressão de genes pró-apoptóticos, após tratamento com ACNU/BCNU/Fotemustina *p53* inibe a indução de morte celular, através da regulação da via de reparo responsável por remover as lesões geradas por estes agentes. Além disso, *p53* determina a via apoptótica utilizada por células de glioma tratadas com agentes quimioterápicos, já que células selvagens para este gene executam apoptose preferencialmente pela via extrínseca e células mutadas o fazem exclusivamente pela via intrínseca. As consequências destes resultados para a quimioterapia de pacientes com GBM também serão discutidas.

Palavras-chave: Reparo de DNA. Apoptose. Luz UV. Glioma. Quimioterapia.

Abstract

BATISTA, LFZ. Mechanisms of apoptosis induction by DNA damage: a study on the role of p53 to the resistance that glioma cells present to chemotherapeutical agents. Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Induction of DNA lesions leads to several different endpoints in mammalian cells, such as replication and transcription inhibition, activation of DNA repair pathways, induction of checkpoint mechanisms, mutagenesis and induction of cell death by apoptosis. Although apoptosis induction might be involved in deleterious conditions such as neurodegenerative diseases, it can also bring benefit, as for instance to avoid the uncontrolled propagation of a mutated cell. Albeit being extensively studied, the molecular mechanisms leading to apoptosis induction by DNA damage still remain largely under covered. One of the most extensively studied agents leading to apoptosis induction is ultraviolet light (UV), whose cell-death induction trigger seems to be related to the blockage of the RNA transcription machinery at the site of a lesion. This work provides evidence that the replication of damaged –DNA also works as a trigger for UV-induced apoptosis. Surprisingly, even in DNA repair-deficient cells the inhibition of damaged-DNA replication is able to protect from apoptosis induction. This work also indicates that the chemotherapeutical agents Temozolomide (TMZ), Nimustine (ACNU), Carmustine (BCNU) and Fotemustine are able to trigger apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM) cells, in a manner tightly controlled by *p53*. If after TMZ treatment *p53* sensitizes cells to apoptosis induction through the regulation of pro-apoptotic genes, after treatment with ACNU/BCNU/Fotemustine *p53* inhibits the induction of cell death, by enhancing the repair efficiency of the DNA lesions generated by those agents. On top of that, *p53* also regulates the apoptotic pathway that glioma cells utilize after treatment with those agents, since on the one hand *p53* wild-type cells dye preferentially trough the activation of the extrinsic pathway, and on the other hand *p53*-mutated cells undergo apoptosis exclusively trough the intrinsic pathway. The clinical considerations of these results will also be discussed.

Key-words: DNA repair. Apoptosis. UV light. Glioma. Chemotherapy.

Lista de Figuras

Figura 1: Principais agentes físicos e químicos capazes de danificar a estrutura do DNA.....	20
Figura 2: Mecanismo de formação de ICLs após tratamento com cloroetilnitrosoureas.	26
Figura 3: Esquema representativo da via NER.....	31
Figura 4: Mecanismo de reparo de ICLs.....	38
Figura 5: Efeito da afidicolina na síntese de DNA.....	65
Figura 6: Efeito da afidicolina e da luz UV na síntese de RNA.....	66
Figura 7: Sincronização de células CHO-9 por duplo bloqueio com afidicolina.....	67
Figura 8: Sobrevivência monoclonal após irradiação UV.....	69
Figura 9: Afidicolina inibe apoptose induzida por luz UV.....	70
Figura 10: Indução de apoptose pela luz UV é inibida pela fotorreativação e pela inibição da síntese de DNA.....	72
Figura 11: Análise morfológica de apoptose em células CHO-9 e CHO-27.1.....	73
Figura 12: Ensaio de sobrevivência monoclonal após tratamento com MNNG em células de glioma.....	74
Figura 13: Análise da população sub-G1 após tratamento com MNNG em células de glioma.....	75
Figura 14: Histogramas representativos da cinética de indução de apoptose por 0,1 mM de TMZ em células U87MG (p53wt) e U138MG(p53mt).....	76
Figura 15: Estabilização de p53 após tratamento com TMZ em células U87MG (p53wt).....	77
Figura 16: Efeito de Pifithrin- α na indução de apoptose por MNNG e TMZ em células de glioma.....	78
Figura 17: Inibição da replicação em células de glioma tratadas com TMZ.....	79
Figura 18: Efeito de TMZ na síntese de RNA em células de glioma.....	80
Figura 19: Análise da expressão do receptor FAS após tratamento com TMZ em células de glioma.....	81
Figura 20: Inibição de FAS após tratamento com TMZ em células de glioma.....	82
Figura 21: Atividade de caspases após tratamento com TMZ em células de glioma.....	82

Figura 22: Inibição de PARP após tratamento com TMZ em células de glioma.....	83
Figura 23: Ensaio de sobrevivência monoclonal após irradiação UV em células de glioma.....	84
Figura 24: Indução de apoptose por luz UV em células de glioma.....	86
Figura 25: Confirmação do perfil apoptótico pelo teste de TUNEL.....	87
Figura 26: Atividade de caspase-3 após irradiação UV em células de glioma.....	88
Figura 27: <i>p53</i> inibe apoptose induzida por luz UV em células de glioma.....	90
Figura 28: Efeito da transfecção de <i>p53</i> em células U138MG (<i>p53</i> wt).....	91
Figura 29: Análise da estabilização de <i>p53</i> nuclear após irradiação UV.....	92
Figura 30: Influência de <i>p53</i> na via NER.....	93
Figura 31: Efeito da irradiação UV nas sínteses de DNA e RNA em células de glioma.....	94
Figura 32: Inibição da replicação em células de glioma irradiadas com luz UV.....	95
Figura 33: Inibição do receptor FAS em células de glioma irradiadas com luz UV.....	96
Figura 34: Análise da expressão protéica de Bcl-2, Bax e Bak após irradiação UV.....	97
Figura 35: Tratamento de células de glioma com cisplatina.....	99
Figura 36: Ensaio de sobrevivência monoclonal após tratamento de células de glioma com agentes cloroetilantes.....	101
Figura 37: Análise da cinética de formação de população sub-G1 em células de glioma após tratamento com agentes cloroetilantes.....	102
Figura 38: Análise da população sub-G1 após tratamento de células de glioma com diferentes concentrações de ACNU e BCNU.....	103
Figura 39: Análise de indução de apoptose e necrose por dupla marcação Anexina-V/PI após tratamento com ACNU e BCNU.....	105
Figura 40: Estabilização de <i>p53</i> após tratamento com ACNU.....	106
Figura 41: Inibição de <i>p53</i> aumenta sensibilidade de células de glioma ao tratamento com ACNU e BCNU.....	107
Figura 42: Influência de <i>MGMT</i> na apoptose induzida por ACNU em células de glioma.....	108
Figura 43: Inibição da síntese de DNA após tratamento com ACNU em células de glioma.....	110

Figura 44: Remoção de ICLs do genoma após tratamento com ACNU.....	111
Figura 45: Cinética de indução de γ H2AX após tratamento com ACNU em células de glioma.....	112
Figura 46: Análise de γ H2AX por microscopia de fluorescência.....	113
Figura 47: Expressão de genes de NER após tratamento com ACNU.....	114
Figura 48: Inibição da replicação em células de glioma tratadas com ACNU.....	115
Figura 49: Tratamento de células DN-FADD com ACNU.....	116
Figura 50: Papel da via intrínseca de apoptose após tratamento com ACNU em células de glioma.....	117
Figura 51: Atividade de caspase-3, -7, -8 e -9 após tratamento com ACNU.....	118
Figura 52: Modelo de indução de apoptose por TMZ em células de glioma.....	125
Figura 53: Modelo de indução de apoptose por irradiação UV em células de glioma.....	130
Figura 54: Modelo de indução de morte celular por agentes cloroetilantes em células de glioma.....	136

Lista de Tabelas

Tabela 1: Verificação de apoptose após irradiação UV em células sincronizadas.....	68
---	----

Lista de Abreviações

6-4 PPs: fotoprodutos 6-4

A, T, C, G: adenina, timina, citosina, guanina

ACNU: nimustina

AIF: fator indutor de apoptose

APS: persulfato de amônia

ATP: adenosina trifosfato

BCNU: carmustina

BER: reparo por excisão de bases

BSA: albumina de soro bovina

BRCA: gene associado à tumor de mama

BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina

CAD: DNase ativada por caspase

CCNU: lomustina

CDKs: quinases dependentes de ciclina

CHO: células de ovário de hamster chinês

CPDs: dímeros de pirimidina ciclobutano

CRY: criptocromo

CS: síndrome de Cockayne

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTPs: 2'-deoxinucleotídeos-5'-trifosfatos

DTT: ditioneitol

DSBs: quebras de dupla fita de DNA

EDTA: ácido etilenodiamino teracético

FA: anemia de Fanconi

FACS: amostrador celular ativado por fluorescência

FADD: domínio de morte associado à FAZ

FADU: “fluorescence detected alkalyne DNA-unwinding”

FITC: fluoresceína-5-isotiocianato

GAPDH: gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase

GBM: glioblastoma multiforme

GGR: reparo global do genoma

h: horas

HR: reparo por recombinação homóloga

IAP: proteína inibidora de apoptose

ICLs: crosslinks entre-fitas de DNA

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NER: reparo por excisão de nucleotídeos

O⁶MeG: O⁶-metilguanina

MG: glioma maligno

MGMT: metil-guanina-metil-transferase

mM: milimolar

µg: micrograma

µM: micromolar

MMR: reparo de bases mal-emparelhadas

mt: mutado

min: minutos

MNNG: 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina

MOMP: permeabilização da membrana externa da mitocôndria

NHEJ: reparo por ligação de extremidades não-coesivas

PARP: poli(ADP-ribose)polimerase

PBS: tampão fosfato salino

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

PCR: reação em cadeia de polimerase

phr: gene que codifica para polimerase

PI: iodeto de propídeo

PMSF: fluoreto fenilmetilsulfônico

PRL: luz de fotorreativação

RNA: ácido ribonucléico

RNAPII: RNA polimerase II

ROS: espécies reativas de oxigênio

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TCA: ácido tricloroacético

TCR: reparo acoplado a transcrição

TFIIH: fator de transcrição H da RNA polimerase II

TMZ: temozolomida

TTD: tricotiodistrofia

TUNEL: “terminal deoxynucleotidil transferase uracil nick end labeling”

UV: luz ultravioleta

WHO: organização mundial de saúde

wt: selvagem

XP: xeroderma pigmentosum

XPA-XPG: grupos de complementação xeroderma pigmentosum A a G

XPV: grupo de complementação xeroderma pigmentosum variante

Sumário

1	Introdução.....	19
1.1	Agentes capazes de atingir e danificar o DNA.....	19
1.2	A luz ultravioleta (UV)	20
1.2.1	Lesões geradas pela luz UV	21
1.2.2	Conseqüências biológicas da presença de fotoprodutos no DNA.....	22
1.3	Compostos químicos que danificam o DNA.....	24
1.3.1	Alquilação ao DNA.....	24
1.4	Vias de reparo de DNA.....	27
1.4.1	Reparo por reversão direta da lesão	27
1.4.2	O Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)	29
1.4.2.1	<i>Mecanismo de NER</i>	29
1.4.2.2	<i>Doenças associadas a deficiências em NER</i>	33
1.4.3	O reparo de “crosslinks” no DNA	34
1.4.3.1	<i>Mecanismo de remoção de ICLs</i>.....	35
1.4.3.2	<i>Anemia de Fanconi: conectando o reparo de ICLs e predisposição ao câncer</i>.....	37
1.5	Apoptose: a morte celular ativa	39
1.5.1	Vias de execução de apoptose	40
1.5.2	Apoptose induzida por luz UV.....	42
1.6	<i>p53</i>: o “guardião” do genoma	43
1.6.1	Estrutura, genes homólogos e isoformas.....	44
1.6.2	Ação de <i>p53</i> no controle de danos ao DNA	46
1.7	Glioblastoma multiforme.....	49
2	Objetivos.....	52
3	Material e métodos.....	53
3.1	Cultura celular	53
3.2	Sub-cultivo de células	54
3.3	Congelamento de células	54
3.4	Irradiação com luz UV.....	55
3.5	Fotorreativação.....	55

3.6	Drogas e tratamentos.....	55
3.7	Experimentos de sobrevivência celular a partir de células individualizadas (recuperação clonogênica)	56
3.8	Análise de indução de apoptose	57
3.9	Verificação de síntese de DNA.....	59
3.10	Análise de síntese de RNA	60
3.11	Sincronização do ciclo celular com afidicolina.....	61
3.12	Preparação de RNA e RT-PCR.....	61
3.13	Análise de expressão protéica	61
3.14	Deteção de danos ao DNA por “dot-blot”	62
3.15	Deteção de γ H2AX por imunocitoquímica	63
4	Resultados.....	64
4.1	Papel da replicação do DNA lesado no processo de indução de apoptose por luz UV	64
4.1.1	Efeito da afidicolina nas sínteses de DNA e RNA	64
4.1.2	Apoptose induzida por luz UV é independente da fase do ciclo celular em que as células são irradiadas	66
4.1.3	A replicação do DNA lesado é um sinal para a indução de apoptose por luz UV	68
4.1.4	Inibição da replicação do material lesado em células CHO ϕ r e XPB ϕ r.....	71
4.1.5	Tratamento com afidicolina previne o aparecimento de características morfológicas de apoptose após irradiação UV.....	71
4.2	Indução de apoptose por agentes metilantes em células de glioma humano com diferentes “status” de <i>p53</i>	74
4.2.1	Células de glioma selvagens para <i>p53</i> são mais sensíveis ao tratamento com MNNG .	74
4.2.2	Sensibilidade de células <i>p53</i> wt é decorrente da indução de apoptose por MNNG e TMZ	75
4.2.3	Inibição de <i>p53</i> aumenta a resistência de células U87MG ao tratamento com MNNG e TMZ.....	77
4.2.4	Apoptose induzida por TMZ é dependente de replicação do DNA lesado.....	79
4.2.5	Apoptose induzida por TMZ em células U87MG (<i>p53</i> wt) ocorre pela via extrínseca....	80
4.2.6	Inibição de PARP-1 aumenta a sensibilidade de células U87MG (<i>p53</i> wt) ao tratamento com TMZ.....	83
4.3	Driblando a resistência: indução de apoptose por luz UV em células de glioma humano	84

4.3.1 Células U138MG (p53mt) são mais sensíveis à irradiação UV do que células U87MG (p53wt).....	84
4.3.2 Células mutadas em <i>p53</i> são mais sensíveis à apoptose induzida pela irradiação com luz UV... ..	85
4.3.3 Inibição de <i>p53</i> aumenta a sensibilidade de células U87MG (p53wt) à irradiação por luz UV.....	88
4.3.4 <i>p53</i> aumenta a eficiência do reparo de CPDs em células de glioma.....	92
4.3.5 Bloqueio de síntese de DNA e RNA após irradiação UV.....	94
4.3.6 Apoptose induzida por luz UV é dependente da replicação do DNA lesado.....	95
4.3.7 Vias de apoptose após irradiação UV em células de glioma.....	95
4.3.8 Indução de apoptose em células de glioma pelo UV-mimético cisplatina.....	98
4.4 Tratamento de células de glioma humano com os agentes cloroetilantes ACNU, BCNU e Fotemustina	100
4.4.1 Células de glioma mutadas em <i>p53</i> são mais sensíveis ao tratamento com ACNU, BCNU e Fotemustina.	100
4.4.2 O ⁶ -cloroetilguanina induz apoptose e necrose em células de glioma humano mutadas em <i>p53</i>	101
4.4.3 <i>p53</i> aumenta a resistência de células de glioma ao tratamento com ACNU	104
4.4.4 <i>MGMT</i> impede a indução de apoptose por lesões cloroetilantes	108
4.4.5 <i>p53</i> aumenta a eficiência de reparo de DNA em células de glioma.....	109
4.4.6 Apoptose induzida por ACNU é dependente da replicação do DNA lesado	115
4.4.7 ACNU ativa as vias extrínseca e intrínseca de apoptose em células de glioma.....	116
5 Discussão.....	119
5.1 Apoptose induzida por luz UV é dependente da replicação do DNA lesado.....	119
5.2 <i>p53</i> sensibiliza a indução de apoptose por TMZ em células de glioma.....	121
5.3 Minando a resistência: fotoprodutos induzem apoptose em células de glioma mutadas em <i>p53</i>	126
5.4 Células de glioma mutadas em <i>p53</i> apresentam elevada sensibilidade ao tratamento com agentes cloroetilantes	131
5.5 A importância de <i>p53</i> para a terapia de GBM.....	137
6 Conclusões.....	138
Referências bibliográficas.....	139
Anexo	159
Artigos.....	159

1 Introdução

1.1 Agentes capazes de atingir e danificar o DNA

O reconhecimento do DNA como a molécula responsável pela informação genética dos seres vivos e conseqüentemente pela manutenção das características hereditárias ao longo de gerações, levou a comunidade científica da época a uma idéia completamente errônea: a de que a estrutura primária do DNA era fundamentalmente estável e não estaria sujeita a freqüentes alterações químicas (FRIEDBERG, 1997). Veio de um físico, Erwin Schrödinger, a primeira sugestão de que a constituição química de nossos genes estaria sujeita a reações espontâneas que deveriam alterar a composição química do material genético (SCHRÖDINGER, 1945). Mais que isso, após analisar o clássico trabalho de Max Delbrück e colegas (TIMOFÉEFF-RESSOVSKY *et al.*, 1935) mostrando que raios X eram capazes de quebrar cromossomos, Schrödinger sugere que essas modificações seriam a causa de mutações no que ele chamou de *código hereditário*.

Atualmente, mais de meio século após a descoberta da estrutura do DNA, não restam dúvidas de que a molécula de DNA está realmente sob constante agressão. Uma vasta variedade de agentes químicos e físicos, sejam eles endógenos ou exógenos, assim como próprios erros nos processos de metabolismo de DNA, geram diariamente milhares de lesões na estrutura do DNA (Figura 1). A partir dessas lesões podem ocorrer mudanças na seqüência específica de DNA, que se fixadas durante o processo replicativo dão origem a mutações na estrutura da dupla-hélice. Apesar de servirem como “matéria-prima” para a evolução do genoma, a presença de mutações é preponderantemente deletéria (FRIEDBERG, 2006). Alguns dos principais agentes mutagênicos conhecidos hoje são a luz ultravioleta (UV), os agentes quimioterápicos, irradiação γ , radicais livres e hidrocarbonetos aromáticos. Alguns desses agentes mutagênicos serão descritos a seguir.

Figura 1: Principais agentes físicos e químicos capazes de danificar a estrutura do DNA. As principais lesões induzidas por cada agente também são indicadas. Modificado de (HOEIJMAKERS, 2001).

1.2 A luz ultravioleta (UV)

A investigação dos efeitos biológicos da luz UV marcou o início do estudo do reparo de DNA em diferentes organismos (FRIEDBERG, 1997) e até hoje a irradiação UV está entre os modelos mais utilizados para se estudar as consequências biológicas de danos ao DNA. Muito provavelmente isso se deve à enorme importância ambiental e evolucionária da luz UV, visto que a irradiação solar está presente desde o aparecimento das primeiras formas de vida na Terra (COCKELL *et al.*, 2001).

O Sol é a fonte primária de irradiação UV, sendo que esta representa 45% do espectro da luz solar. A luz UV é comumente dividida em três segmentos, de acordo com seus comprimentos de onda: UV-A, de 320 a 400 nm, UV-B, de 295 a 320 nm e finalmente UV-C, delimitada entre 100 e 295 nm (GARSSSEN *et al.*, 2000). A camada de ozônio da Terra é capaz de absorver eficientemente a radiação até 310 nm, o que impede que a luz UV-C e boa parte da luz UV-B atinja a superfície terrestre (VAN DER LEUN, 2004). No entanto, a depleção da camada de ozônio ocorrida nas últimas

décadas resultou no aumento da intensidade de luz UV-B que vem atingindo a superfície terrestre (NORVAL, 2006). Apesar de a luz UV-B estar associada a algumas respostas benéficas em nosso organismo como, por exemplo, o estímulo da formação de vitamina D, a maior parte dos efeitos da exposição prolongada à luz solar é deletéria. De fato, a luz UV é o principal agente ambiental responsável pela incidência de tumores de pele em populações humanas (WOODHEAD *et al.*, 1999). Visto que estes representam aproximadamente 40% de todos os tumores diagnosticados a cada ano (MILLER *et al.*, 1994), torna-se óbvia a importância deste agente genotóxico para a saúde humana. Além disso, o trabalho pioneiro de Fisher e Kripke demonstrou que a luz UV é capaz de suprimir o sistema imune (FISHER *et al.*, 1977) o que explica parcialmente a influência da luz UV em doenças infecciosas e auto-imunes (NORVAL, 2006).

Conforme dito acima, a luz UV-C não é capaz de atingir a superfície terrestre. No entanto, o fato do DNA ter seu pico máximo de absorção a 260 nm levou a um amplo uso de lâmpadas UV-C, que emitem principalmente a 254 nm, em laboratórios de pesquisa (além disso, este comprimento de onda tem a vantagem adicional de não ser eficientemente absorvido por proteínas). Apesar de hoje saber-se que a irradiação com os diferentes comprimentos de onda pode levar a respostas biológicas diferenciadas, as lesões geradas tanto por UV-A quanto por UV-B ou UV-C são as mesmas, mas devido à maior energia de comprimentos de onda menores, UV-C é capaz de gerar essas lesões mais eficientemente, o que facilita seu uso em estudos científicos. A seguir serão descritos os principais tipos de lesões gerados pela luz UV.

1.2.1 Lesões geradas pela luz UV

- **Dímeros de Pirimidina Ciclobutano (CPDs)**: Ligação covalente entre pirimidinas adjacentes levando à formação de uma estrutura anelar, comumente referida como o anel ciclobutano. É a principal lesão gerada pela luz UV, independentemente do comprimento de onda utilizado (MITCHELL, 1988; KIELBASSA *et al.*, 1997; MOURET *et al.*, 2006). A formação de CPDs é influenciada pela sequência de nucleotídeos do DNA irradiado, sendo que em DNA nu a formação de T<>T CPD é a mais elevada e a de C<>C CPD é a mais baixa, numa relação de 68:3 (SETLOW, 1968). A presença destas lesões no DNA gera uma distorção significativa na dupla-hélice.

- **6-4 Fotoprodutos (6-4 PPs):** O segundo tipo mais comum de lesão gerada pela luz UV (numa proporção de CPD 3:1 6-4PP, (MITCHELL, 1988)) caracteriza-se pela ligação da posição C6 da pirimidina 5' com a posição C4 da pirimidina 3'adjacente, causando uma distorção da dupla-hélice mais pronunciada do que lesões do tipo CPDs (MIZUKOSHI *et al.*, 2001). No DNA irradiado estas lesões são geralmente observadas nas seqüências TC e CC e menos freqüentemente nas seqüências TT e CT. A contribuição relativa de CPDs e 6-4 PPs para citotoxicidade após irradiação UV, assim como o reparo destas duas lesões, será descrito em detalhes mais adiante.

- **Lesões induzidas por radicais de oxigênio (ROS):** Durante os últimos anos grandes esforços têm sido feitos para delinear os efeitos da irradiação UV-A em células humanas. Visto que a irradiação UV-A não é eficientemente absorvida pelo DNA, durante muito tempo se pensou que o estresse genotóxico após exposição a este comprimento de onda se deve principalmente a indução de ROS, que atingem a dupla-hélice formando uma miríade de lesões no genoma. Dentre essas lesões, é dada forte ênfase à formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxoGua) (POUGET *et al.*, 2000). A formação desta lesão pode ser explicada pela formação predominante de $^1\text{O}_2$ após irradiação por UV-A, visto que o oxigênio singlete induz majoritariamente a formação de 8-oxoGua no genoma celular (RAVANAT *et al.*, 2001), uma lesão extremamente genotóxica e mutagênica (WILSON *et al.*, 2007). No entanto, é pouco provável que esta seja a principal lesão responsável pela toxicidade da luz UV-A, visto que o desenvolvimento de novas técnicas de detecção de danos ao DNA (CADET *et al.*, 2005) mostra que neste comprimento de onda a principal lesão formada é também o CPD (KIELBASSA *et al.*, 1997; MOURET *et al.*, 2006).

1.2.2 Conseqüências biológicas da presença de fotoprodutos no DNA

- **Inibição de replicação:** A distorção na dupla-hélice gerada tanto por CPDs quanto por 6-4 PPs funciona como um bloqueio físico para a maquinaria de replicação, impedindo assim a síntese de DNA. Já foi demonstrado que quando a forquilha de replicação encontra um fotoproduto, intermediários de recombinação e de replicação acumulam-se na célula (LOWNDES *et al.*, 2000). No entanto, nos últimos anos foram descobertas diversas polimerases capazes de replicar DNA mesmo na presença de lesões específicas da dupla-fita, chamadas por isso de polimerases translesão (FRIEDBERG,

2005). No caso de fotoprodutos, a polimerase responsável por essa síntese translesão é a DNA polimerase *eta*, que consegue incorporar bases nitrogenadas opostas às lesões do tipo CPD (LEHMANN, 2002).

- **Inibição da transcrição**: lesões do tipo CPDs e 6-4 PPs são um forte impedimento para a síntese de RNA pela RNA polimerase II (RNAPII) (MEI KWEI *et al.*, 2004). Esse bloqueio de transcrição possui diversos efeitos biológicos, como a sinalização para uma via específica de reparo de DNA em regiões transcritas do genoma e a indução de morte celular por apoptose.

- **Sinalização para vias de reparo de DNA**: a presença de fotoprodutos no genoma é um forte indutor de vias de reparo de DNA especializadas na sua remoção. Estas vias serão analisadas em detalhe no decorrer desta Introdução.

- **Indução de “checkpoints”**: “checkpoints” são vias bioquímicas que provocam um atraso ou mesmo um bloqueio na progressão do ciclo celular na presença de danos ao DNA (NYBERG *et al.*, 2002). Essas vias são compostas por *sensores*, que são moléculas capazes de reconhecer danos no DNA, *transdutores*, geralmente representados por quinases que irão ativar as moléculas *efetoras* que podem bloquear o ciclo celular ou mesmo ativar as vias de reparo de DNA (SANCAR *et al.*, 2004).

- **Mutagenese**: conforme descrito acima, existem diversas polimerases translesão em células de mamíferos. No entanto, estas polimerases possuem uma taxa de incorporação errônea de nucleotídeos significativamente maior do que as polimerases replicativas, gerando mutações no DNA (LEHMANN, 2002). Estudos relatam que as lesões CPDs são as responsáveis pela maioria das mutações observadas em células irradiadas com luz UV-B (YOU *et al.*, 2001), possivelmente por serem também as lesões geradas em maior quantidade por este agente genotóxico, além de serem reparadas mais lentamente.

- **Sinalização para morte celular**: a presença de fotoprodutos no DNA funciona como um sinal inicial para a indução de morte celular após irradiação UV (MIYAJI *et al.*, 1995; CHIGANCAS *et al.*, 2000). Um ponto ainda em discussão é a contribuição relativa de CPDs e 6-4 PPs neste processo. Enquanto que em células proficientes em reparo de DNA já foi demonstrado, inclusive *in vivo*, que as lesões do tipo CPD são o principal sinal indutor de apoptose após irradiação UV (SCHUL *et al.*, 2002; JANS *et al.*, 2005), em células deficientes em reparo de DNA foi observado não só que as lesões do tipo 6-

4 PPs são também um sinal importante para essa sinalização (NAKAJIMA *et al.*, 2004; LIMA-BESSA *et al.*, 2008), como podem inclusive ser o principal sinal responsável por esse tipo de morte celular (LO *et al.*, 2005).

1.3 Compostos químicos que danificam o DNA

Infelizmente, a história da pesquisa científica de agentes químicos que danificam o DNA tem como início um evento particularmente triste: o uso de “gás” mostarda como arma durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), que causou milhares de mortes devido à danos ao sistema hematopoiético (BROOKES, 1990). Outro triste exemplo foi o uso do herbicida conhecido como “agente laranja” na Guerra do Vietnam (1961-1971). Usado pelo exército americano e aliados para destruir a vegetação, aumentando assim a visibilidade de soldados vietnamitas, acabou gerando um efeito extremamente tóxico também para os soldados expostos a este agente, já que o mesmo possui em sua fórmula a dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina (TCDD), que aumenta a quantidade de troca de cromátides irmãs em células humanas (ROWLAND *et al.*, 2007).

No entanto, agentes químicos capazes de atingir o DNA passaram a ter um uso mais honrado e importante para a saúde humana, com a verificação que é possível utilizá-los como agentes quimioterápicos no combate a câncer. Na verdade, a maior parte destes agentes em uso atualmente tem como principal alvo a molécula de DNA (KAINA, 2003). Neste campo muita atenção é dada aos agentes alquilantes monofuncionais, usados para tratamento de diversos tipos de tumores como linfomas, melanomas, neuroblastomas ou glioblastomas (KAINA *et al.*, 2007). Dentre os agentes alquilantes mais utilizados podemos citar a procarbazina (Natulan®, Matulane®), a estreptozotocina (Zanosar®), a temozolomida (Temodar®, Temodal®), a carmustina (BiCNU®) ou a fotemustina (Muphoran®). O modo básico de ação dos agentes alquilantes será detalhado a seguir.

1.3.1 Alquilação ao DNA

O tratamento com os agentes descritos acima induz 12 sítios de alquilação ao DNA (BERANEK, 1990; KAINA *et al.*, 2007). A reatividade de agentes alquilantes com grupos específicos de DNA é correlacionada com a “Constante de Swain-Scott” (SWAIN *et al.*, 1953), onde reagentes com baixo valor *S* reagem com grupos menos

nucleofílicos como, por exemplo, a posição O⁶ da guanina, e reagentes com alto valor S reagem com grupos mais nucleofílicos, geralmente átomos de nitrogênio como, por exemplo, a posição N⁷ da guanina (ROBERTS, 1978). Além disso, a taxa de formação dessas lesões também depende da própria estrutura do DNA, visto que tanto as posições O⁶ e N⁷ da guanina se encontram no sulco maior do DNA estando portanto mais acessíveis do que, por exemplo, a posição N³ da adenina, que se encontra protegida pelo sulco menor. Abaixo estão listadas duas das principais lesões geradas pelo tratamento de células humanas com agentes alquilantes.

- **O⁶-metilguanina (O⁶-MeG)**: Apesar de representar não mais do que 8% do total de alquilações presentes no DNA após tratamento drogas metilantes (como a TMZ), a lesão O⁶-MeG é reconhecida como extremamente tóxica, sendo uma potente indutora da morte celular por apoptose (KAINA *et al.*, 1997). A presença desta lesão leva a um emparelhamento errôneo de bases no DNA no momento da replicação, pois a DNA-polimerase irá incorporar uma timina ao invés de uma citosina na dupla-hélice. Isso sinaliza para a via de reparo de emparelhamento errôneo de bases (“MisMatch Repair”- MMR) que irá remover a timina, mas, se a O⁶-MeG não tiver sido reparada, irá incorporar novamente uma timina, levando portanto a um ciclo fútil de remoção e incorporação de timina no sítio oposto à lesão. Esse ciclo fútil é tido como o principal sinal responsável pela indução de apoptose após formação de O⁶-MeG no DNA (PEPPONI *et al.*, 2003).

- **“Crosslinks” entre-fitas de DNA**: Além dos agentes metilantes como a TMZ, existem também agentes com características cloroetilantes, ou seja, capazes de adicionar um radical cloroetil na estrutura do DNA, formando a lesão O⁶-cloroetilguanina. Alguns dos principais agentes cloroetilantes são as cloroetilnitrosoureas como carmustina (BNCU), nimustina (ACNU) e a Fotemustina. Após tratamento com qualquer destes agentes existe a formação da lesão O⁶-cloroetilguanina na estrutura do DNA. Quando não reparadas, estas lesões são rapidamente convertidas no intermediário 1,O⁶-etanoguanina, que após um segundo rearranjo molecular irá formar um ligação cruzada no DNA (“Interstrand-Crosslinks”- ICLs; Figura 2) entre a posição N¹ da guanina e a posição N³ da citosina (LUDLUM, 1997; FISCHHABER *et al.*, 1999). A formação desta lesão no genoma traz graves consequências ao metabolismo do DNA, já que impedem

a abertura da dupla-fita e, portanto, constituem um bloqueio às maquinarias de replicação e transcrição celular (MCHUGH *et al.*, 2001).

Figura 2: Mecanismo de formação de ICLs após tratamento com cloroetilnitrosoureas. A lesão O⁶-cloroetilguanina sofre um primeiro rearranjo molecular, gerando a lesão N1-O⁶-etanoguanina, que por sua vez sofre um segundo rearranjo molecular gerando então o ICL entre a posição N¹ da guanina com N³ da citosina. Modificado de (KAINA *et al.*, 2007)

1.4 Vias de reparo de DNA

Fica claro, portanto, que a constituição físico-química do DNA o torna o alvo perfeito para diferentes agentes, que levam a geração de diferentes lesões na sua estrutura. Alguns destes agentes, como a luz UV ou o oxigênio, são essenciais para a vida da maior parte dos organismos existentes em nosso planeta. Para lidar com a ameaça que a inevitável exposição a esses agentes causa, desde muito cedo na evolução as espécies desenvolveram estratégias para se protegerem contra seus efeitos deletérios. Uma dessas estratégias foi o aparecimento de enzimas especializadas na rápida remoção dessas lesões (MENCK, 2002; COSTA *et al.*, 2003). A maior parte destas enzimas participa de complexas vias de reparo de DNA, responsáveis pela remoção dos diferentes tipos de lesão conhecidos. A seguir serão descritas algumas destas vias.

1.4.1 Reparo por reversão direta da lesão

O mecanismo mais simples, eficiente e acurado de reparo de DNA existente é aquele no qual uma única enzima cataliza a eliminação de uma lesão no DNA em um passo único, e rapidamente restaura a estrutura do DNA para seu estado nativo (FRIEDBERG, 2006). Este tipo de reparo possui diversas vantagens em relação a complexas vias de reparo nas quais participam diversas proteínas, uma vez que não só é mais rápida e consome menos energia, como também é extremamente fidedigna. Existem dois tipos principais de reparo por reversão direta:

- **Fotolases e o reparo de fotoprodutos:** Fotolases são enzimas envolvidas no reparo de fotoprodutos quando ativadas pela absorção de luz visível, num processo chamado de fotorreativação. É o tipo de reparo de fotoprodutos mais eficiente que se conhece, utilizando enzimas específicas para reparar tanto CPDs (CPD-fotoliase) quanto 6-4 PPs (6-4 PP-fotoliase) do genoma celular. Estas enzimas apareceram cedo na evolução e estão presentes nos três domínios da vida, *Archea*, *Bacteria* e *Eukaria*, o que demonstra sua importância na proteção à luz UV (MENCK, 2002). No entanto, apesar da capacidade de fotorreativação estar largamente distribuída entre vertebrados, incluindo marsupiais, mamíferos placentários não apresentam esse tipo de reparo (LI *et al.*, 1993). Em humanos a presença de proteínas pertencentes à família das fotolases/receptores de luz azul parece estar relacionada à manutenção do ciclo

circadiano (THOMPSON *et al.*, 2002). A transfecção do gene da fotoliase (proveniente do marsupial *Potorous Tridactylus*) em culturas de células de mamífero (CHIGANCAS *et al.*, 2000) e em camundongos (SCHUL *et al.*, 2002) mostrou um aumento no reparo de CPDs e na proteção aos efeitos tóxicos da luz UV nesses organismos. Resumidamente, a fotorreativação se inicia quando, expostas à luz visível, as fotoliasas capturam fótons de luz azul. A seguir, a energia desse fóton é utilizada para quebrar a ligação covalente entre as duas pirimidinas adjacentes, restaurando assim a estrutura do DNA (SANCAR, 1996). Note-se que não é um mecanismo de excisão da lesão, simplesmente o dímero de pirimidina é quebrado, o que leva as pirimidinas adjacentes ao seu estado monomérico.

- **Metil-Guanina-Metil-Transferase (MGMT) e o reparo de O⁶-MeG**: MGMT é uma proteína capaz de reparar lesões do tipo O⁶-MeG (ou O⁶-cloroetilguanina) numa reação direta, através da transferência do radical alquil presente na guanina para um resíduo cisteína presente na porção catalítica da enzima (GERSON, 2004). Este é um processo extremamente rápido, que ocorre em menos de 1 s à 37°C (LINDAHL *et al.*, 1982). É importante salientar que uma molécula de MGMT é capaz de reparar somente uma molécula de O⁶-MeG, pois após a transferência do radical alquil, a proteína MGMT é inativada e seguidamente ubiquitinada (SRIVENUGOPAL *et al.*, 1996), o que a torna alvo de degradação pelo proteossomo (XU-WELLIVER *et al.*, 2002). Devido a essa degradação, MGMT não pode ser considerada como uma enzima no sentido clássico, visto que é consumida durante a reação que catalisa; no entanto, é comumente referida como “enzima suicida”. A MGMT é também alvo de fosforilação, sendo que foi demonstrado que sua forma fosforilada é menos eficiente na remoção de O⁶-MeG (MULLAPUDI *et al.*, 2000; SRIVENUGOPAL *et al.*, 2000). Em condições normais MGMT possui localização citoplasmática, sendo translocada para o núcleo somente quando existe a exposição a agentes alquilantes (LIM *et al.*, 1996). Se essa translocação é concomitante à translocação de outras proteínas de reparo, como MSH2 e MSH6, é ainda uma empolgante questão em aberto (CHRISTMANN *et al.*, 2000). Após estudos iniciais mostrarem que células deficientes em MGMT são extremamente sensíveis à indução de morte celular por O⁶-MeG (DAY *et al.*, 1980) muita atenção foi dada ao “status” de MGMT em diferentes tumores humanos

(GERSON, 2004), chegando-se a conclusão de que a eficiência do tratamento quimioterápico com agentes alquilantes é significativamente maior em tumores com baixa atividade de MGMT (ESTELLER *et al.*, 2000; GERSON, 2004; YAN *et al.*, 2005). Atualmente a inativação farmacológica de MGMT pela droga O⁶-benzilguanina é uma estratégia clínica para tratamento de tumores sólidos (KOCH *et al.*, 2007).

1.4.2 O Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)

Em células de mamíferos o principal processo de remoção de lesões capazes de distorcer a dupla-hélice é a via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (“Nucleotide Excision Repair”- NER). Portanto, esta é a via responsável pela eliminação de CPDs e 6-4 PPs do genoma após irradiação UV (WOOD, 1996). NER também é considerada a via de reparo de DNA mais versátil, devido a capacidade de reconhecer uma grande variedade de danos presentes na molécula de DNA (DE BOER *et al.*, 2000; HANAWALT *et al.*, 2003). Esta via de reparo de DNA é composta por cerca de 30 proteínas diferentes, com especial destaque para as proteínas da família XP (xeroderma pigmentosum), que atuam de maneira seqüencial com o intuito de remover, por excisão, a região do DNA contendo a lesão (VOLKER *et al.*, 2001). A via NER é dividida em Reparo Global do Genoma (“Global Genomic Repair”- GGR), que remove lesões presentes em regiões não transcritas do genoma e Reparo Acoplado à Transcrição (“Transcription Coupled Repair”-TCR), que remove lesões presentes na fita transcrita de genes ativos (COSTA *et al.*, 2003; SARASIN *et al.*, 2007). A existência da via de TCR foi descoberta por Hanawalt e colegas, que demonstraram que CPDs presentes na fita transcrita de genes ativos são removidos mais rapidamente do que CPDs localizados nas demais regiões do genoma (BOHR *et al.*, 1985; MELLON *et al.*, 1987). As vias de GGR e TCR, que diferem somente no processo inicial de reconhecimento do dano, serão descritas a seguir.

1.4.2.1 Mecanismo de NER

- **Detecção da lesão:** O primeiro passo da via de NER é o reconhecimento das lesões na estrutura do DNA e é o único passo com diferenças significativas entre GGR e TCR (Figura 3). Na via de GGR, o reconhecimento de lesões é feito pelo complexo XPC-hHR23B (SUGASAWA *et al.*, 1998; VOLKER *et al.*, 2001). Que também é o responsável pelo recrutamento dos fatores de NER subsequentes (YOKOI *et al.*, 2000; SUGASAWA

et al., 2001; VOLKER *et al.*, 2001). Apesar de mutantes em hH23B serem proficientes em NER (NG *et al.*, 2002), foi demonstrado que esta proteína estabiliza e protege XPC de degradação proteossômica (ARAKI *et al.*, 2001; NG *et al.*, 2003), aumentando assim a eficiência do reparo. De particular interesse é o fato do complexo XPC-hH23B ter uma afinidade muito maior por 6-4 PPs do que por CPDs (KUSUMOTO *et al.*, 2001) o que acarreta em uma remoção muito mais rápida de 6-4 PPs do que de CPDs na região não-transcrita do genoma. Foi também demonstrado que o complexo XPE-DDB2 coopera com XPC no reconhecimento de lesões aumentando a eficiência de detecção de CPDs por esta proteína (TANG *et al.*, 2000; FITCH; NAKAJIMA *et al.*, 2003).

Já para a via TCR, o complexo XPC-hH23B é completamente dispensável para o reconhecimento de lesões. Para esta via o bloqueio da RNA polimerase II (RNAPII) pela lesão é o sinal inicial para a subsequente atividade de reparo (BRUECKNER *et al.*, 2007). Aqui, duas proteínas, CSA e CSB ("*Cockayne Syndrome*" A e B) parecem ser necessárias para o recrutamento das demais proteínas do NER, apesar de suas exatas funções ainda não terem sido elucidadas. Sabe-se que CSB reside no complexo de elongação da RNAPII (VAN GOOL *et al.*, 1997) e que interage *in vitro* com este (TANTIN *et al.*, 1997). A translocação de CSA para o núcleo é dependente de CSB (SAIJO *et al.*, 2007), assim como aparentemente o recrutamento das proteínas do TFIIH ("Transcription Factor" IIH), que também participam do NER (TANTIN, 1998).

Figura 3: Esquema representativo da via NER. O reconhecimento da lesão é distinto entre lesões que estão presentes na fita transcrita de genes ativos (TCR) e das demais regiões do genoma (GGR). O NER pode ser dividido entre as etapas de detecção, formação do complexo de reparo, excisão da lesão e a síntese de reparo e ligação. (Ilustração original modificada de Shane McLoughlin).

- **Recrutamento dos demais fatores de NER para o sítio da lesão:** Após o reconhecimento da lesão pelas maquinarias específicas de GGR e TCR, existe o recrutamento das demais proteínas de NER (TFIIH, XPA, RPA e XPG) para o sítio de lesão resultando numa estrutura aberta ao redor da lesão (EVANS *et al.*, 1997). O TFIIH é um complexo protéico composto por 9 proteínas, que além de agir como fator de transcrição e regulação gênica (ZURITA *et al.*, 2003) é fundamental para a atividade de reparo por NER (SARASIN *et al.*, 2007). Duas de suas proteínas, XPB e XPD são helicases, que funcionam de maneira complementar para desenovelar o DNA ao redor do sítio contendo a lesão. Enquanto XPB tem sua atividade no sentido 3'-5', XPD o faz no sentido oposto (COSTA *et al.*, 2003). XPA e RPA ("Replication Protein" A) são proteínas capazes de se ligar ao DNA e sua ação, juntamente com TFIIH, está relacionada com a formação e estabilização do complexo de pré-incisão ao redor da lesão (YANG *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que XPC possui afinidade maior por DNA danificado (TANAKA *et al.*, 1990) e que RPA se liga à fita não danificada oposta à lesão, cobrindo por volta de 30 nucleotídeos e estabilizando assim o complexo pré-incisão (KOLPASHCHIKOV *et al.*, 2001; HERMANSON-MILLER *et al.*, 2002). Mais que isso, a importância de RPA fica demonstrada pela observação de que XPA é capaz de se ligar mais eficientemente à lesões na presença de RPA (VASQUEZ *et al.*, 2002).

- **Excisão da lesão:** A via NER conta com duas endonucleases, XPG e ERCC1-XPF, responsáveis pela excisão do DNA no sítio contendo a lesão. Curiosamente, as incisões são feitas assimetricamente, pois ao passo que XPG, responsável pela incisão na direção 3' da lesão, faz seu corte 2-8 nucleotídeos após a lesão, o complexo ERCC1-XPF o faz no sentido 5' somente de 15-24 nucleotídeos de distância da lesão (EVANS *et al.*, 1997). XPG é recrutado previamente ao sítio da lesão (fazendo parte inclusive do complexo de pré-incisão) e realiza o corte na direção 3' antes de XPF-ERCC1 realizar o corte na direção 5' (MU *et al.*, 1996). Curiosamente, enquanto a atividade 3'-endonuclease da XPG é detectada na ausência de XPF-ERCC1, a atividade 5'-endonuclease desta é dependente da presença de XPG no sítio da lesão (MU *et al.*, 1997; WAKASUGI *et al.*, 1997). A região excisada então se dissocia do DNA, aparentemente mesmo na ausência dos componentes responsáveis pela síntese de DNA na região clivada (MU *et al.*, 1996).

- **Síntese de DNA e ligação:** Após a excisão do DNA contendo a lesão (aproximadamente 30 nucleotídeos) se inicia a síntese de DNA na região clivada. A incisão gerada pela XPF-ERCC1 deixa um grupo hidroxil (OH) no sentido 3', o que significa que esse término já serve como um iniciador para a ação da DNA polimerase (SIJBERS *et al.*, 1996). Nesta fase RPA também tem uma função importante, pois protege a fita-molde contra ação de nucleases e promove a montagem da maquinaria de replicação (COSTA *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* demonstraram que tanto a DNA-polimerase *delta* quanto a DNA polimerase *epsilon* são responsáveis pela síntese de DNA de reparo, ambas auxiliadas por PCNA ("Proliferating cell nuclear antigen") (WOOD *et al.*, 1997). Finalmente, ocorre a ligação da região recém-sintetizada com a sequência original de DNA, pela ação da DNA ligase I (TOMKINSON *et al.*, 1997).

1.4.2.2 Doenças associadas a deficiências em NER

Até bem perto do final da década de 1960 ainda não existiam relatos de células humanas mutadas em genes relacionados ao metabolismo de DNA. Essa situação foi alterada quando James Cleaver, trabalhando com células provenientes de pacientes com xeroderma pigmentosum, fez a descoberta que essas células eram na verdade deficientes em NER (CLEAVER, 1968), o que foi também independentemente comprovado por Richard Setlow (SETLOW *et al.*, 1969). A partir daí, diversas doenças humanas começaram a ser relacionadas a deficiências em reparo de DNA e mais especificamente com NER. Mais que isso, o estudo dessas doenças, como xeroderma pigmentosum, síndrome de Cockayne ou tricotiodistrofia alavancou a pesquisa na área de reparo de DNA e a tornou uma das principais áreas de estudo em ciências biomédicas. A seguir essas doenças serão brevemente descritas.

- **Xeroderma Pigmentosum (XP):** síndrome humana com herança autossômica recessiva caracteriza-se principalmente pela precoce foto-sensibilidade da pele em regiões mais expostas à luz UV, alta incidência de tumores de pele e, ocasionalmente, anormalidades neurológicas progressivas (LEHMANN, 2003). Apresenta grande variabilidade genética, tendo sido identificados sete grupos de complementação gênica, correspondentes a sete proteínas participantes de NER (XPA a XPG), juntamente com o grupo chamado *variante* (XPV). Apesar de apresentar o quadro clínico de pacientes XP, o grupo XPV não é defectivo em NER, mas é mutado numa

polimerase translesão (polimerase *eta*) capaz de transpor lesões do tipo dímeros de pirimidina. Curiosamente, pacientes mutados neste gene não apresentam problemas neurológicos (LEHMANN, 2003). Possui uma incidência de 1:250.000 na Europa e EUA e de 1:40.000 no Japão (ROBBINS *et al.*, 1974; TAKEBE *et al.*, 1977). Até ao momento o único tratamento efetivo para esta doença é a proteção total à exposição à luz solar.

- **Síndrome de Cockayne (“Cockayne Syndrome”- CS)**: doença extremamente rara, transmitida geneticamente de maneira autossômica recessiva. Descrita pela primeira vez na primeira metade do sec. XX foram até ao momento descobertos dois genes associados especificamente a esta síndrome, CSA e CSB que conforme descrito acima, participam da via de TCR. Os pacientes CS apresentam um quadro clínico diverso, como retardo no crescimento pós-natal, retardo mental, envelhecimento precoce e sintomas neurológicos progressivos gerados pela desmielinização. Vale ressaltar que estes pacientes não apresentam frequência elevada de tumores de pele (LEHMANN, 2003).

- **Tricotiodistrofia (TTD)**: apesar do aparecimento desta doença estar na maioria das vezes relacionado a mutações no gene XPD ou XPB, os pacientes TTD não apresentam quadro clínico semelhante a XP, principalmente pela ausência de tumores de pele. Tipicamente os pacientes com TTD apresentam cabelo quebradiço, problemas dentários, ictiose, anormalidades no esqueleto e retardo mental progressivo causado por desmielinização (LEHMANN, 2003).

1.4.3 O reparo de “crosslinks” no DNA

Conforme dito acima, a indução da lesão O⁶-cloroetilguanina no DNA por agentes quimioterápicos pode levar à formação ICLs no DNA. Na verdade, apesar de agentes quimioterápicos não serem os únicos indutores de ICLs, são eles os responsáveis por boa parte dos avanços ocorridos no entendimento dos efeitos biológicos dessas lesões em células humanas. A remoção de ICLs é um dos fenômenos menos conhecidos no campo de reparo de DNA, sendo que não existe, até ao momento, nenhuma indicação de uma via de reparo específica para este tipo de lesão. Ao contrário, como veremos no próximo item, o reparo de ICLs é parcialmente realizado por uma ação conjunta das proteínas pertencentes a via de NER e a via de

reparo homólogo (“Homologous Repair”-HR). É importante ressaltar também que existem diferentes classes de ICLs, sendo que no caso das cloroetilnitrosoureas (como ACNU e BCNU), o tipo mais comum é o formado entre a posição N³ da citosina com a posição N¹ da guanina na fita oposta (LUDLUM, 1997; FISCHHABER *et al.*, 1999). Apesar do tratamento com esses agentes gerar somente 1 a 10% de ICLs (a maioria dos adutos gerados são “crosslinks” intra-fita, ou seja, na mesma fita do DNA) é importante mencionar que são essas as lesões mais relevantes para a fisiologia celular, visto serem elas que exercem a maior parte dos efeitos tóxicos em células humanas (O’CONNOR *et al.*, 1990). A cisplatina é uma exceção, devido à alta toxicidade e à baixa eficiência no reparo dos “crosslinks” intra-fita por ela gerados (JAMIESON *et al.*, 1999).

1.4.3.1 Mecanismo de remoção de ICLs

O reparo de ICLs apresenta um desafio complexo: a lesão está presente nas duas fitas do DNA. A maior parte do que se sabe sobre o reparo deste tipo de lesão foi descrito em bactérias e leveduras. Nestes organismos o reparo de ICLs depende das vias de reparo NER e HR, e existe pouca dúvida sobre a importância destas para a resistência contra agentes cloroetilantes (COLE, 1973; JACHYMCZYK *et al.*, 1981; VAN HOUTEN *et al.*, 1986). No entanto, o reparo de ICLs em células de mamíferos ainda é majoritariamente desconhecido. Aparentemente, apesar de existirem diversos homólogos de levedura implicados em reparo de ICLs em mamíferos, existem também diversos genes que não estão envolvidos com o reparo deste tipo de lesão em leveduras, somente em células de mamíferos. A maior parte dos resultados obtidos em mamíferos vêm de estudos de sensibilidade que diversos mutantes em reparo de DNA apresentam a agentes capazes de gerar ICLs, visto que seus produtos gênicos correspondentes podem estar relacionados ao reparo ou a tolerância contra essas lesões.

- **Ação das proteínas de NER:** A maior parte dos mutantes em NER apresenta sensibilidade moderada a agentes indutores de ICLs. Uma exceção são os mutantes na endonuclease XPF-ERRC1, que são extremamente sensíveis a agentes indutores deste tipo de lesão (HOY *et al.*, 1985; DE SILVA *et al.*, 2000). O modelo mais aceito para o reparo de ICLs postula que no momento em que maquinaria de replicação é barrada pela presença da lesão é gerado um sítio de alta instabilidade genética, que acaba

levando à formação de uma quebra de dupla-fita (“Double Strand Break”- DSB) por um mecanismo ainda desconhecido (DE SILVA *et al.*, 2000). XPF-ERCC1 então clivaria o DNA no sentido oposto a esta DSB, levando a excisão da lesão em uma das fitas do DNA (NIEDERNHOFER *et al.*, 2004). Ainda não está estabelecido se a excisão da lesão na outra fita de DNA é dependente de XPF-ERCC1 (Figura 4). No entanto, outros trabalhos indicam que a formação dessa DSB não ocorre pelo bloqueio da maquinaria de replicação, mas sim pela própria ação da XPF-ERCC1 sendo, portanto, um intermediário no processo de reparo de ICLs (MOGI *et al.*, 2006). Além de XPF-ERCC1, outra proteína de NER aparentemente envolvida no processo de reparo de ICLs é a XPA (GRUENERT *et al.*, 1985; VUKSANOVIC *et al.*, 1987), tendo sido recentemente descrito que esta proteína, juntamente com XPC, é necessária para o reparo de ICLs induzido por psoralenos em células de mamíferos (THOMA *et al.*, 2005).

- **Ação das proteínas de HR:** Diversos mutantes em proteínas da via de HR já foram descritos como sendo altamente sensíveis ao tratamento com agentes indutores de ICLs, dentre eles RAD51, RAD52, XRCC2 e XRCC3 (SANCAR *et al.*, 2004). Esta sensibilidade está relacionada ao aparecimento das DSBs durante o reparo de ICLs (conforme descrito acima), sendo já demonstrado que HR é o principal mecanismo de remoção de DSBs geradas pelo reparo de ICLs. Mutantes em outra via de reparo de quebras de dupla-fita, a via de reparo não-homólogo (“Non-Homologous-End-Joining”- NHEJ), não apresentam aumento na sensibilidade a agentes indutores de ICLs (CALDECOTT *et al.*, 1991; DE SILVA *et al.*, 2000).

- **Reparo de ICLs independente de replicação?** O mecanismo proposto acima é o modelo mais aceito para o reparo de ICLs em células de mamíferos e depende da replicação do DNA, seja para o encontro da maquinaria de replicação com o ICL ou mesmo para a ação das proteínas da via de HR. No entanto, foi demonstrado que em células de mamíferos que não estão replicando o DNA, células mutantes em NER são extremamente sensíveis à indução de ICLs, ao passo que mutantes em HR não o são. Isto levou à proposta de uma segunda via de reparo de DNA, independente de replicação e efetuada somente por proteínas do NER e polimerases translesão (WANG *et al.*, 2001). Neste modelo existe a excisão da região contendo o ICL em uma das fitas do DNA. A seguir ocorre a síntese de DNA nessa região, sendo utilizada como molde a

fita oposta (que ainda contém a lesão). Essa síntese é feita por uma polimerase translesão, ou seja, capaz de polimerizar o DNA mesmo na presença da lesão na fita oposta. Como essas polimerases têm uma alta taxa de incorporação errônea, essa via de reparo tem sido chamada de “sujeita-a-erro”, e de fato foi observado um elevado número de nucleotídeos mal-incorporados após a remoção de ICLs por esta via. Uma das polimerases que pode atuar aqui é a polimerase *eta* (responsável pelo grupo de complementação V de XP). A seguir ocorre a excisão da lesão na outra fita do DNA e novamente a região clivada é preenchida, agora não necessariamente por uma polimerase translesão, visto que a fita oposta não mais contém a lesão.

1.4.3.2 Anemia de Fanconi: conectando o reparo de ICLs e predisposição ao câncer

Descrita pela primeira vez em 1927 por Guido Fanconi (FANCONI, 1927), a anemia de Fanconi (“Fanconi Anemia”-FA) é uma desordem hereditária com herança autossômica que se caracteriza clinicamente pela presença de diversas anormalidades congênitas, falência progressiva da medula óssea e alta incidência de câncer (15.000 vezes mais elevada que a média da população) (ALTER, 2003). A incidência desta doença é de 1:360.000 nascimentos e o diagnóstico é feito geralmente antes dos dez anos de idade (ALTER, 2003). A complexidade genética desta doença segue a complexidade encontrada no quadro clínico, sendo que a partir do isolamento do primeiro gene de FA em 1992 (STRATHDEE *et al.*, 1992) já foram descritos 11 grupos de complementação gênica. Células mutadas nestes genes apresentam elevada sensibilidade e alto número de aberrações cromossômicas após tratamento com agentes indutores de ICLs (D'ANDREA *et al.*, 2003). Apesar de por muito tempo não se conseguir explicar a ação dos genes FA na resposta à ICLs, atualmente já se conhece, mesmo que superficialmente, sua ação. Dos 11 genes responsáveis pelo fenótipo de FA ao menos seis (A, C, E, F, G, L) formam um complexo nuclear que após ser ativado por danos ao DNA monubiquitina FancD2. Quando ubiquitinada, a molécula de FancD2 recruta a molécula de BRCA2 (“Breast Cancer Associated”) para a cromatina, formando *foci* onde também estão presentes as proteínas da via de reparo HR, BRCA1 e Rad51. A formação deste *foci* é essencial para o reparo de DSBs após tratamento com agentes indutores de ICLs (NIEDERNHOFER *et al.*, 2005). Uma descoberta surpreendente e que deixou ainda mais clara a ligação entre FA e o reparo de DSBs por HR foi a verificação

de que o gene que se encontra mutado no grupo de complementação de anemia de Fanconi D1 (FANCD1) é na verdade BRCA2 (HOWLETT *et al.*, 2002).

Figura 4: Mecanismo de reparo de ICLs. Uma DSB é formada no momento que a forquilha de replicação é barrada pela presença de ICLs no DNA. XPF-ERCC1 são responsáveis pela primeira excisão da lesão, que é seguida pelo reparo da DSB por recombinação homóloga. Ocorre então a excisão da lesão na fita oposta de DNA, seguida pela síntese de DNA na região clivada.

1.5 Apoptose: a morte celular ativa

Até o início da década de 1970 o estudo da morte celular definitivamente não era um ponto de muito interesse para a comunidade científica. Essa situação sofreu uma drástica mudança quando Kerr, Wyllie e Currie demonstraram a existência de pelo menos dois tipos distintos de morte celular (KERR *et al.*, 1972). Um deles é a morte por necrose, uma forma violenta e rápida de degradação celular, que afeta um grande número de células numa população, caracterizada pelo aumento no volume citoplasmático, destruição de organelas e rompimento da membrana citoplasmática, levando à liberação de fluidos para o meio extracelular. Um outro tipo de morte celular, denominado apoptose, se caracterizava por ocorrer em células individualizadas geralmente rodeadas por células saudáveis, apresentando condensação do citoplasma e núcleo, manutenção da integridade de organelas, convolução da membrana celular seguida pela sua fragmentação e formação de “corpos apoptóticos”, sem liberação do conteúdo do citoplasma no meio extracelular. O interesse por este campo aumentou ainda mais quando Sydney Brenner, John Sulston e Robert Horvitz perceberam que durante o desenvolvimento do verme *C. elegans* algumas células eram eliminadas de maneira semelhante à descrita por Kerr. Demonstraram ainda que esse tipo de morte celular é controlada por diferentes genes, que atuam de maneira oposta, ou seja, enquanto alguns genes promovem esse tipo de morte, outros o impedem (HORVITZ, 2003). Devido a esse controle gênico, a morte por apoptose passou a ser chamada de morte “programada”, em muitos casos virando até sinônimo (erroneamente) desse fenômeno (ASSUNCAO GUIMARAES *et al.*, 2004).

Atualmente se sabe que a apoptose é um processo vital para o desenvolvimento embrionário, para a manutenção da homeostase tecidual e para o funcionamento do sistema imune. Alterações no processo apoptótico podem levar ao aparecimento de diversas condições patológicas, desde doenças neurodegenerativas até doenças auto-imunes e câncer (CORY *et al.*, 2002; CORY *et al.*, 2003). Diversos estímulos podem induzir a sinalização para apoptose, como danos ao DNA, perturbações no citoesqueleto ou deprivação de fatores de crescimento. Atualmente sabe-se que a apoptose pode ocorrer por diferentes vias, que culminam na ativação de proteases denominadas de caspases, que serão descritas a seguir.

- **Caspases - a maquinaria de demolição celular**: caspases são uma família de cisteína-proteases que clivam seus substratos especificamente após resíduos aspartato (ADAMS, 2003). Em condições normais estão presentes nas células como zimógenos, o que impede a ocorrência não controlada de morte. Após a detecção de algum estímulo apoptótico, as chamadas caspases iniciadoras são ativadas pela dimerização do zimógeno por uma proteína adaptadora (BOATRIGT; RENATUS *et al.*, 2003; BOATRIGT; SALVESEN, 2003), que libera o sítio catalítico da enzima. São estas caspases iniciadoras que irão ativar as caspases efetuatoras, através da clivagem proteolítica dos zimógenos. Por sua vez as caspases efetuatoras são as responsáveis pelo “empacotamento” das células durante a apoptose, através da proteólise de diferentes substratos, que irão acarretar na externalização de fosfolípidos, na condensação e fragmentação nuclear e na desmontagem do citoesqueleto (GREEN *et al.*, 1995). Uma das consequências mais importantes da ativação de caspases é a ativação da nuclease CAD (“Caspase Activated Deoxyribonuclease”), responsável pela degradação internucleossomal do DNA, uma característica marcante neste tipo de morte celular (ENARI *et al.*, 1998). A importância das caspases para o processo apoptótico é tão elevada que alguns autores consideram sua ativação como a característica mais importante para a definição de morte celular por apoptose (KROEMER *et al.*, 2005). A seguir serão descritas as vias de apoptose que levam à ativação das diferentes caspases. O fato das diferentes vias ativarem diferentes caspases torna este processo ainda mais interessante.

1.5.1 Vias de execução de apoptose

Até o momento, duas vias principais de indução de apoptose foram identificadas: a via intrínseca e a via extrínseca. Estas vias serão detalhadas a seguir.

- **Via intrínseca**: a via intrínseca ou mitocondrial de apoptose é definida por um evento fundamental: a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (“Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization”- MOMP) liberando para o citosol diversas proteínas responsáveis pelo desencadeamento da apoptose (SPIERINGS *et al.*, 2005). Controlando essa permeabilização estão as proteínas da família Bcl-2, divididas entre proteínas pró-apoptóticas (promovem MOMP) e anti-apoptóticas (inibem MOMP). Estas proteínas possuem até quatro domínios de homologia com Bcl-2 (BH1 a

BH4) e são divididas em três grupos: Bcl2 (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1), “BH3-only” (Bim, Bik, Bad, Puma, Bid, Noxa) e Bax (Bax, Bak, Bok). A ativação das proteínas do grupo Bax (pró-apoptótico) é fundamental para o desencadeamento de MOMP pois determinam a abertura de poros na membrana externa da mitocôndria. Estas proteínas encontram-se normalmente reprimidas pelas proteínas do grupo Bcl2 (anti-apoptóticas) porém, quando existe um sinal indutor de apoptose, as proteínas do grupo “BH3-only” (pró-apoptóticas) irão inibir as proteínas do grupo Bcl2, levando a abertura dos poros na membrana externa da mitocôndria pelas proteínas do grupo Bax (CHIPUK *et al.*, 2006). Nota-se portanto que a sinalização para apoptose é basicamente determinada pela concentração de proteínas pró e anti-apoptóticas no citoplasma. Uma das proteínas liberadas por MOMP é o *citocromo c* que, quando no citosol, vai se ligar a APAF-1 (“Apoptotic Protease Activating Factor”), causando neste uma mudança conformacional. Esta mudança permite a oligomerização de APAF-1 e o recrutamento de caspase iniciadora-9, formando um heptâmero de aproximadamente 1 megadalton, conhecido por “apoptossomo”. Quando ativada, no apoptossomo, a caspase-9 irá por sua vez ativar as caspases efetadoras 3 e 7, que irão então desencadear a degradação celular. Esta via pode ainda ser controlada pelas proteínas IAP (“Inhibitor of Apoptosis Proteins”) capazes de ubiquitinar as caspases ativadas, levando a sua degradação pelo proteossomo. As IAPs por sua vez são inibidas pelas proteínas Smac/Diablo e Omi, que são liberadas juntamente com *citocromo c* após MOMP (MUNOZ-PINEDO *et al.*, 2006).

- **Via extrínseca:** A via extrínseca de apoptose é iniciada pela ativação dos receptores de membrana da superfamília TNF (Tumor Necrosis Factor) como por exemplo FAS (CD95/Apo1). Quando ativados, geralmente pela ação de ligantes específicos como FAS-L, ocorre a trimerização do receptor (também chamados de “receptores de morte”), o que por sua vez possibilita a ligação de uma molécula de FADD (“Fas Associated Death Domain”) na região citoplasmática desse receptor. FADD então recruta a procaspase-8, através dos domínios efetores de morte homólogos entre essas proteínas. A proximidade dos zimógenos então promove sua dimerização e subsequente autocatálise, levando a ativação da caspase-8 (BOATRIGT; RENATUS *et al.*, 2003). A caspase-8 ativada irá levar a ativação das caspases efetadoras 7 e 10 que

irão então desmontar a estrutura celular. Mais que isso, a caspase-8 pode também ativar as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, em especial Bid e Bim, levando assim a ocorrência de MOMP e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas pela mitocôndria. Devido a isso, a via extrínseca é também chamada de via de amplificação de sinal, já que contribui para a ativação da via mitocondrial de morte (ADAMS, 2003).

1.5.2 Apoptose induzida por luz UV

Conforme descrito acima, a presença de fotoprodutos gerados pela luz UV é um sinal indutor de apoptose, o que explica a elevada sensibilidade que células deficientes em NER apresentam à luz UV. No entanto, uma pergunta ainda não completamente respondida é como a presença dessas lesões no genoma induz um processo que ocorre principalmente no citoplasma celular. Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que a remoção dos fotoprodutos presentes no genoma só é eficaz em inibir a morte celular por um determinado período (8 h após irradiação no caso de células de hamster chinês) (CHIGANCAS *et al.*, 2002). Se removidas após esse tempo, a sinalização para apoptose não é bloqueada, o que significa que essas lesões já foram reconhecidas e processadas, e o sinal para indução de apoptose já foi dado. Neste sentido, dados de nosso laboratório (CHIGANCAS *et al.*, 2000; CHIGANCAS *et al.*, 2002) e de outros (LJUNGMAN *et al.*, 1996) mostram que o bloqueio da RNAPII pela presença de CPDs no genoma correlaciona com forte indução de apoptose em células proficientes e deficientes em reparo de DNA. Confirmando esta idéia, experimentos com camundongos mutados em GGR ou TCR confirmaram que o reparo de CPDs presentes em regiões transcritas do genoma é muito mais eficiente em prevenir os efeitos tóxicos da irradiação UVB (GARSEN *et al.*, 2000). O papel da replicação do DNA lesado após UV é mais controverso. Enquanto que alguns trabalhos apontam que a indução de apoptose por luz UV é independente da replicação do DNA lesado (MIYAJI *et al.*, 1995), estudos mais recentes indicam o contrário (MCKAY *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003). Uma possível explicação para a dependência da replicação do DNA lesado é a indução de DSBs no momento em que a maquinaria de replicação é bloqueada por um fotoproduto (DUNKERN *et al.*, 2002).

No entanto, a indução de apoptose por luz UV não é dependente somente da presença de fotoprodutos na dupla-hélice. Sabe-se que a irradiação UV-B é capaz de ativar o receptor FAS/CD95 (ROSETTE *et al.*, 1996) e que essa ativação direta é capaz de induzir apoptose, independentemente da formação de fotoprodutos no genoma (KULMS; SCHWARZ, 2002; KULMS; ZEISE *et al.*, 2002). Apesar disso, experimentos *in vivo* demonstraram que a sinalização para apoptose por ativação direta do receptor não é relevante, pois camundongos mutados no ligante para FAS (Fas-L) são mais resistentes à indução de apoptose por luz UV, o que indica que sem o ligante específico a via extrínseca de indução de apoptose é comprometida, independente da trimerização direta do receptor pela luz UV (OUHTIT *et al.*, 2000).

1.6 *p53*: o “guardião” do genoma

Durante a década de 1970 já era bem estabelecido que vírus, com genomas de RNA ou DNA, eram capazes de causar câncer em animais. A grande pergunta da época era como a infecção com esses vírus era capaz de iniciar a formação de tumores em animais ou mesmo transformar células em cultura. Foi buscando responder a esta pergunta que em 1979 foi descoberto o gene que iria revolucionar o estudo molecular do câncer: o *p53*.

A descoberta de *p53* foi feita independentemente por diferentes grupos, que identificaram uma proteína de peso molecular de 53 KDa da célula hospedeira, que formava um complexo com uma das sub-unidades do antígeno T do vírus SV40 (LANE *et al.*, 1979). O fato do antígeno T ser uma oncoproteína viral, e da descoberta que células tumorais ou transformadas possuíam uma concentração extremamente elevada de *p53* (CRAWFORD *et al.*, 1984) levou os pesquisadores da época a denominar *p53* de oncoproteína, ou seja, uma proteína relacionada à formação de tumores em animais. No entanto, a descoberta de que *p53* era induzido após a indução de danos ao DNA (MALTZMAN *et al.*, 1984) e que estava mutado em leucemias e células tumorais infectadas por vírus (MOWAT *et al.*, 1985) lentamente iniciaram uma mudança nessa visão. De fato, a partir de 1989 houve uma profunda mudança de paradigma, que mudou por completo o estudo de *p53*. Estudos mostrando que o cDNA de clones selvagens para *p53* era capaz de suprimir o processo de transformação em células de roedores, ao passo que mutantes pontuais não eram,

além da descoberta que diversos tumores humanos continham também mutações pontuais neste gene acabariam por levar ao reconhecimento de *p53* como um gene supressor de tumor (FINLAY *et al.*, 1989; HINDS *et al.*, 1989). Nos anos seguintes o papel de *p53* na proteção do genoma após a indução de danos ao DNA foi confirmada, levando ao “batismo” deste gene como o “Guardião do Genoma” em 1992 (LANE, 1992). Logo em seguida foi descoberto que *p53* era na verdade um ativador transcricional, sendo que seu primeiro alvo descrito foi o inibidor de ciclo celular p21/WAF1 (EL-DEIRY *et al.*, 1992; EL-DEIRY *et al.*, 1993), ligando pela primeira vez *p53* ao controle do ciclo celular.

Atualmente sabe-se que *p53* é um fator de transcrição que se liga a sítios específicos no DNA como um tetrâmero e é capaz de ativar a transcrição de genes que se encontram próximos a seus sítios de ligação (OREN, 2003). As proteínas codificadas por estes genes provavelmente se encontram na casa das centenas e contribuem diretamente para os efeitos biológicos de *p53*, dentre os quais se destacam a inibição do ciclo celular, senescência, diferenciação celular, reparo de DNA e apoptose (SAX *et al.*, 2003). A seguir a estrutura de *p53* será brevemente descrita, assim como o seu papel em reparo de DNA e sinalização para apoptose.

1.6.1 Estrutura, genes homólogos e isoformas

- **Estrutura:** estruturalmente *p53* é dividido em 5 grandes motivos. Os primeiros 100 aminoácidos na região N-terminal contêm o *domínio de transativação* (aminoácidos 20 a 60) (CHANG *et al.*, 1995), fundamental para a função de *p53*, mas sem efeito direto na capacidade de ligação ao DNA. A região N-terminal também contém o *domínio rico em prolina*, situado entre os aminoácidos 60 e 90, contendo 5 cópias do motivo “PXXP”. Este domínio tem sido implicado na regulação de apoptose por *p53* (ZHU *et al.*, 1999). Na região central da proteína (aminoácidos 100 a 300) encontra-se o *domínio de ligação ao DNA*. Este é considerado o principal domínio desta proteína, sendo que 97% de mutações mapeadas de *p53* em tumores humanos se localizam nesta região (OLIVIER *et al.*, 2002), impedindo a ligação de *p53* ao DNA (BULLOCK *et al.*, 2001). Esta região contém também as seqüências mais evolucionariamente conservadas da proteína (YANG *et al.*, 2002). O *domínio de tetramerização* (ou oligomerização) que se encontra entre os aminoácidos 320 a 360, é o responsável pela

forma tetramérica de p53 em solução (CHENE, 2001). Possui também um sinal de exportação nuclear (STOMMEL *et al.*, 1999). Já na região C-terminal encontra-se o *domínio básico* (últimos 30 aminoácidos), capaz de interagir com o DNA numa maneira independente de especificidade de seqüência (FOORD *et al.*, 1991). Este domínio possui múltiplos sítios de ubiquitinação (MICHAEL *et al.*, 2003), e o principal sítio de sumoilação de p53 (GOSTISSA *et al.*, 1999). Possui também diversos sítios de modificações induzidas por estresse, como fosforilação, acetilação e glicosilação (APPELLA *et al.*, 2001).

- **Genes homólogos- p63 e p73**: somente 18 anos após a descoberta de p53 é que se descobriram seus primeiros genes homólogos: p63 e p73 (KAGHAD *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1998). Apesar de estas proteínas serem similares a p53 em estrutura e conterem os domínios de transativação, ligação ao DNA (65% de identidade com p53) e tetramerização, sua função parece ser distinta de p53 e, até ao momento, não existe evidência que permita anotar estes genes como supressores de tumor (YANG *et al.*, 2002). Camundongos deficientes nestes genes não manifestam o aparecimento precoce de tumores característico de animais mutantes em p53, mas apresentam problemas de desenvolvimento e de regeneração tecidual (p63) e problemas neurológicos e inflamatórios (p73) (YANG *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2000). As duas proteínas, no entanto, participam da sinalização para apoptose. Após danos ao DNA, p73 é acetilada por p300 e fosforilada por CHK1, o que resulta no aumento de expressão de genes apoptóticos na célula (COSTANZO *et al.*, 2002). De fato, a perda combinada de p63 e p73 resulta na inabilidade de indução de apoptose após tratamento com agentes genotóxicos (FLORES *et al.*, 2002). A regulação de p63 e p73 é complexa, pois dois promotores separados (um distal e um interno) geram classes distintas de proteínas p63 e p73. As proteínas geradas pelo promotor interno ($\Delta Np63/\Delta p73$) não possuem o domínio de transativação e podem se ligar a promotores responsivos a p53, atuando como verdadeiros antagonistas da expressão gênica promovida por p63, p73 e mesmo p53 (YANG *et al.*, 1998; GROB *et al.*, 2001).

- **Isoformas de p53**: recentemente foi estabelecido que o gene p53 humano também possui uma segunda região promotora, assim como p63 e p73 (BOURDON *et al.*, 2005). O promotor alternativo se localiza internamente (intron 4) e leva à expressão de proteínas truncadas na região N-terminal, iniciadas no códon 133 ($\Delta 133p53$). A

descoberta deste promotor, juntamente com a descoberta de que tanto o intron 9 quanto o intron 2 podem sofrer “splicing” alternativo (GHOSH *et al.*, 2004), leva a conclusão que existam pelo menos nove isoformas de p53 (p53, p53 β , p53 γ , geradas por “splicing” alternativo do intron 9; Δ 133p53, Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , geradas pelo promotor alternativo; Δ 40p53, Δ 40p53 β e Δ 40p53 γ , geradas pelo promotor alternativo e pelo “splicing” alternativo do intron 2). O RNAm dessas variantes de p53 se encontram expressas de uma maneira aparentemente tecido-específica em células humanas. Essa expressão tecido específica mostra que os promotores de expressão de p53 podem ser regulados e esta regulação pode explicar as diferentes respostas que p53 induz em diferentes tipos celulares após um mesmo insulto genotóxico (BOURDON, 2007). Estas diferentes isoformas de p53 possuem diferentes localizações sub-celulares, indicando que podem possuir efeitos biológicos diferenciados. De fato, apesar de esta ser uma área extremamente nova de estudo, já se sabe que as isoformas possuem diferentes sítios de ligação ao DNA e podem modular a expressão de p53 após insulto genotóxico (BOURDON, 2007). O que se pode afirmar é que a descoberta destas isoformas torna a regulação de p53 mais complexa do que se imaginava, e muito deve ser feito nos próximos anos para entender a relação de p53 com suas isoformas.

1.6.2 Ação de p53 no controle de danos ao DNA

- **p53 e o bloqueio do ciclo celular:** Conforme dito acima, p53 é capaz de controlar a expressão de p21, levando ao bloqueio do ciclo celular na fase G1 em células tratadas com agentes genotóxicos (EL-DEIRY *et al.*, 1992; EL-DEIRY *et al.*, 1993). A indução desse “checkpoint” na fase G1 aumenta as chances da célula reparar seu genoma antes do próximo ciclo de replicação do DNA, evitando a fixação de mutações ou mesmo a indução de apoptose (NYBERG *et al.*, 2002). A ação de p53 nesse “checkpoint” na fase G1 se dá através de p21, que se liga e inativa a ciclina E/Cdk2 resultando na hipofosforilação de pRB e bloqueio do ciclo celular (HARPER *et al.*, 1993). Isso acontece pois Rb é um regulador negativo do fator de transcrição E2F, necessário para a expressão de genes da fase S do ciclo celular (SANCAR *et al.*, 2004). Por sua vez, a ativação de p53 após a geração de estresse genotóxico parece ser dependente das quinases ATM (“Ataxia-Telangectasia Mutated”) e ATR (“AT-Related”), visto que células

mutadas em ATM não apresentam atividade de *p21* (DULIC *et al.*, 1994); curiosamente essas células apresentam ativação tardia de *p53* (LU *et al.*, 1993). Além deste papel no controle do “checkpoint” da fase G1, *p53* também controla o ciclo celular na fase G2, através da inibição do complexo ciclina B/Cdc2. Essa inibição é mediada por três alvos transcricionais de *p53*: *GADD45*, *p21* e a família de proteínas 14-3-3 (SANCAR *et al.*, 2004).

- **O papel de *p53* em NER:** A descoberta que *p53* estaria envolvido com a regulação da via NER foi feita em células extraídas em pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni, que exibiam mutações homozigotas ou heterozigotas em *p53* (FORD *et al.*, 1995). Foi verificado que células mutadas em *p53* apresentavam uma baixa eficiência na remoção de CPDs por GGR, sendo que a remoção por TCR dessas lesões permanecia inalterada (SMITH *et al.*, 1995). Curiosamente, o reparo de lesões do tipo 6-4 PPs não é afetado pelo “status” de *p53*, independente da região do genoma onde se encontram (FORD, 2005). Essas características apontavam para um papel de *p53* em genes que participariam somente da via de GGR, não de TCR. De fato, foi demonstrado que *p53* regula a expressão do gene *DDB2* (responsável pelo grupo de complementação XPE) (HWANG *et al.*, 1999), e que a super-expressão desta aumenta o reparo de CPDs por GGR mesmo na ausência de *p53* (FITCH; CROSS *et al.*, 2003). Conforme descrito anteriormente, *DDB2* auxilia no reconhecimento de CPDs por XPC, aumentando assim a eficiência de GGR (FITCH; NAKAJIMA *et al.*, 2003). Mais recentemente, o papel de *p53* em GGR ficou ainda mais claro, com a constatação que regula também a expressão de *XPC* após indução de danos ao DNA (ADIMOOLAM *et al.*, 2002). A importância de *p53* em NER, portanto, parece estar relacionado ao reconhecimento de CPDs presentes em regiões não transcritas do genoma.

No entanto, o fato de *p53* não ser necessário para a via de NER *in vitro* (LEVEILLARD *et al.*, 1996), e a descoberta de que após irradiação UV ocorre a acetilação das histonas, o que acarreta no relaxamento da cromatina (RAMANATHAN *et al.*, 1986) e aumenta a eficiência de reparo de CPDs por NER (SMERDON *et al.*, 1982), levantou a hipótese de *p53* estar influenciando nesta via de reparo de uma maneira independente de sua atividade transcricional. De fato, foi mostrado que *p53* funciona como um fator de acessibilidade para as proteínas de NER (WANG, Q. E. *et al.*, 2003), através do recrutamento da acetiltransferase p300 aos sítios de lesão, o que leva ao

relaxamento global da cromatina e aumenta a eficiência da remoção de CPDs após irradiação UV (RUBBI *et al.*, 2003). De fato, a influência de p53 em NER agindo como um fator de relaxamento da cromatina vem ganhando enorme suporte experimental (ALLISON *et al.*, 2004).

- **p53 e a sinalização para apoptose**: Um dos campos mais estudados na área de p53 é a sinalização para apoptose. A descoberta que este gene controla apoptose se deu em 1991 em células de leucemia mielóide mutadas em p53, onde a re-introdução deste gene era capaz de induzir apoptose, mas podia ser controlada pela interleucina-6 (YONISH-ROUACH *et al.*, 1991). Pouco depois se verificou que essa capacidade de indução de apoptose contribuía para a supressão de crescimento e progressão tumoral *in vivo* (SYMONDS *et al.*, 1994). Após a verificação que p53 contribui também para a indução de apoptose após tratamento de células tumorais com agentes quimioterápicos surgiram também os primeiros trabalhos apontando que o “status” deste gene seria determinante na resposta tumoral à terapia (LOWE *et al.*, 1993; LOWE *et al.*, 1994). De fato hoje se sabe que p53 induz a expressão de diversos genes pró-apoptóticos, que participam não só da via extrínseca e intrínseca de apoptose, mas também da recém-descoberta via do retículo endoplasmático (BOURDON *et al.*, 2002).

Conforme descrito anteriormente, danos ao DNA podem levar ao aumento na expressão de “receptores de morte” presentes na membrana citoplasmática. Esse aumento na expressão de receptores como FAS, KILLER/DR5 ou mesmo do recém descoberto p53RDL1 é dependente de p53 na maioria dos casos estudados (WU *et al.*, 1997; TAKIMOTO *et al.*, 2000; TANIKAWA *et al.*, 2003). Demonstrou-se que a modulação da expressão do receptor de TRAIL (“Tumor-necrosis-factor-Related-Apoptosis Inducing Ligand”), KILLER/DR95 por p53 é capaz de restaurar a sensibilidade de células de câncer de cólon humano à indução de apoptose por quimioterápicos (WANG, S. *et al.*, 2003).

No entanto, apesar desse envolvimento na via extrínseca, p53 mata células preferencialmente pela via mitocondrial (SCHULER *et al.*, 2001). Nesta via, p53 é capaz de regular a transcrição de membros pró-apoptóticos da família Bcl2, como Bax, Bid, Puma e Noxa (MIYASHITA; KRAJEWSKI *et al.*, 1994; ODA *et al.*, 2000; NAKANO *et al.*, 2001; SAX *et al.*, 2002). p53 se liga a seqüências específicas nos promotores destes genes ativando sua transcrição e a deficiência nesta regulação compromete a

habilidade de indução de apoptose em células humanas. Além desta função, p53 controla também a via mitocondrial pela repressão da transcrição de genes anti-apoptóticos da família Bcl2, como Bcl-2, Bcl-xl e survivina (MIYASHITA; HARIGAI *et al.*, 1994; SUGARS *et al.*, 2001; HOFFMAN *et al.*, 2002). Além disso, p53 controla a expressão de genes a jusante da mitocôndria, como APAF-1 (MORONI *et al.*, 2001) e mesmo a expressão de algumas caspases, como a caspase-6 e a caspase-10 (MACLACHLAN *et al.*, 2002; RIKHOF *et al.*, 2003).

Além dessa função como ativador ou repressor transcricional, dados recentes da literatura apontam que p53 pode também controlar a via intrínseca de apoptose de maneira independente de transcrição (CHIPUK *et al.*, 2003), pela interação direta com as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl. A região de ligação com estas proteínas se localiza no domínio de ligação ao DNA de p53 (MIHARA *et al.*, 2003). Surpreendentemente foi demonstrado que quando p53 se acumula no citoplasma pode funcionar de maneira análoga às proteínas “BH3-only”, ativando Bax, causando a permeabilização da membrana mitocondrial externa e levando à indução de apoptose (CHIPUK *et al.*, 2004). Foi também demonstrado que p53 pode se ligar a Bak, causando a liberação de *citocromo c* da mitocôndria (LEU *et al.*, 2004). Com estes resultados fica claro que além do controle transcricional de proteínas da via intrínseca de apoptose, p53 também possui uma função direta, independente de transcrição, na sinalização para morte celular.

1.7 Glioblastoma multiforme

Glioblastoma multiforme (GMB; WHO: astrocitoma nível IV) é o tipo de tumor primário maligno mais freqüente em adultos, com uma freqüência de 2-3 casos por 100.000 habitantes nos Estados Unidos e Europa. Sua denominação provém de sua alta heterogeneidade celular e morfológica e da presença de complexas alterações cromossômicas em suas células (FISCHER *et al.*, 2007). Glioblastomas podem se desenvolver *de novo* (90% dos casos) ou se originar a partir de astrocitomas (nível II e III) para glioblastomas secundários (OHGAKI *et al.*, 2007). Apesar dos dois tipos (primário e secundário) apresentarem lesões genéticas específicas, análises de “microarrays” demonstraram que existem alterações comuns aos dois tipos de glioblastoma, como deleções, ganhos de cromossomos inteiros ou amplificações

(KOSCHNY *et al.*, 2002). É importante destacar que o gene *p53* se encontra freqüentemente mutado em gliomas humanos: 57% dos casos em pacientes com glioblastomas secundários e 17% dos casos em pacientes com glioblastoma primário (OHGAKI *et al.*, 2005). A terapia atual de gliomas consiste na retirada cirúrgica, seguida de radioterapia e/ou quimioterapia concomitante. No entanto, a sobrevida média de pacientes com GMB é de aproximadamente um ano após diagnóstico e mesmo em condições favoráveis, como a detecção precoce, a maior parte dos pacientes morre em menos de dois anos (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2006). O aumento na sobrevida desses pacientes permanece praticamente inalterado nos últimos trinta anos. Um dos principais motivos envolvidos nessa baixa eficácia de tratamento é a alta resistência que células de gliomas apresentam aos agentes quimioterápicos utilizados (STEINBACH *et al.*, 2004).

Os protocolos de quimioterapia para glioblastoma multiforme consistem atualmente do uso de drogas com propriedades cloroetilantes, como as cloroetilnitrosoureas (ACNU, BCNU e fotemustina) ou metilantes, como a procarbazina e a TMZ (STUPP *et al.*, 2006). Esta última é vista como a principal aposta na quimioterapia de gliomas e recentemente foi descrito que o uso de TMZ concomitante à radioterapia resultou num aumento significativo da sobrevivência em pacientes recém-diagnosticados, com a adicional vantagem de não ter causado efeitos tóxicos adicionais (STUPP *et al.*, 2005). Em solução aquosa, TMZ sofre conversão espontânea, formando o agente metilante 5-(3-metiltriazeno-1 γ 1) imidazole-4-carboxamida (MTIC), não necessitando do metabolismo hepático para ativação e sendo administrada pela via oral (FRIEDMAN *et al.*, 2000). Além da baixa toxicidade, um atrativo do uso desta droga para tumores do sistema nervoso central é a sua habilidade em atravessar a barreira hemato-encefálica (PATEL *et al.*, 2003).

Além desses agentes que danificam o DNA, vale mencionar o desenvolvimento de terapias direcionadas a inibir especificamente a progressão de células de tumor, pela inibição de moléculas específicas como receptores de fatores de crescimento e principalmente receptores de tirosina-quinases. Estas moléculas são fundamentais no processo de formação de GBM, pois afetam diversos processos celulares como diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração (AARONSON, 1991). Diversos inibidores dessas moléculas demonstraram atividade antitumoral *in vitro* e alguns

deles, como Leflunomid[®] e Gleevec[®] (inibidores de PDGFR-“platelet-derived growth factor/receptor”) já estão em uso em testes clínicos com pacientes de GBM (HUTTERER *et al.*, 2006). Também vale mencionar que foi em ratos portadores de glioma que foi realizado um dos primeiros testes de terapia gênica com vetores retrovirais, no início da década de 90 (CULVER *et al.*, 1992). No entanto os resultados em pacientes humanos não foram tão animadores e muitos esforços têm sido feitos para desenvolver novos sistemas de entrega gênica mais eficazes em células de glioma, dentre eles os adenovírus, vetores adeno-associados e vetores não virais (KANZAWA *et al.*, 2003).

Nos últimos anos foi descoberta a existência de células tronco tumorais em populações de GBM provenientes de pacientes humanos (SINGH *et al.*, 2003; GALLI *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2004). A descoberta dessas células traz implicações importantes para o tratamento de glioblastomas, visto ter sido demonstrado que além da habilidade em iniciar a progressão tumoral em modelos animais (SINGH *et al.*, 2004), essas células também mostraram elevada resistência frente ao tratamento com agentes quimioterápicos, inclusive a TMZ (LIU *et al.*, 2006). No entanto, apesar de possuir um potencial enorme para o tratamento de GMB em populações humanas, a hipótese de células tronco tumorais ainda não é amplamente aceita e a aplicação prática desta descoberta não deve ocorrer tão cedo.

2 Objetivos

A tese de doutorado apresentada possui dois objetivos principais:

- 1) Determinar se, além do bloqueio da transcrição, a replicação do material genético lesado após a irradiação UV é um sinal necessário para a indução de apoptose em células CHO selvagens e mutadas no gene de reparo XPB. A ferramenta escolhida foi a micotoxina afidicolina, capaz de bloquear o ciclo celular na fase G1.
- 2) Descrever os mecanismos de quimioresistência apresentado por células de glioma humano, após tratamento com os principais agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento desse tipo de tumor. Relacionar essa resistência com o “status” de *p53* em diferentes células de glioma, fundamentando o estudo na capacidade de indução de apoptose e eficiência de vias de reparo de DNA que possam estar envolvidas na remoção de lesões geradas pelos diferentes tratamentos.

3 Material e métodos

3.1 Cultura celular

A primeira parte deste estudo foi realizada com células de ovário de hamster chinês ("Chinese Hamster Ovary cells"- CHO) CHO-9, CHO-27.1, CHO*phr*, XPB*phr*. Células CHO-9 são selvagens, enquanto que células CHO-27.1 são mutadas no gene de reparo de DNA *XPB*. As células CHO*phr* e XPB*phr*, que expressam um gene de fotoliase (*phr*) proveniente de *Potorous tridactylus*, foram geradas pela Dr. Vanessa Chiganças (CHIGANCAS *et al.*, 2000). Resumidamente, vetores plasmidiais contendo o gene *phr* de marsupial foram co-transfectados com o gene de resistência a higromicina em células CHO-9 e CHO-27.1 através do uso de lipofectamina (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Após seleção de células com higromicina-B (400 µg/ml, Invitrogen), os clones com melhores resultados de fotorreativação após irradiação UV foram selecionados. As células CHO-9 e CHO-27.1 foram gentilmente cedidas pelo Dr. MZ Zdzienicka (Universidade de Leiden, Holanda).

O trabalho com as células de glioma humano foi realizado com as linhagens U87MG, U343MG, U138MG, U251MG, LN308, U87DN-FADD, U138DN-FADD, U87MGMT e U138MGMT. As linhagens U87MG e U343MG são selvagens para *p53* e as linhagens U138MG, U251MG e LN308 são mutadas neste gene (ISHII *et al.*, 1999). As linhagens transfectadas com o gene de reparo *MGMT* foram geradas a partir da co-transfecção de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) com o vetor de expressão pSV2MGMT contendo o gene *MGMT* (KAINA *et al.*, 1991) e o plasmídeo pSV2neo para seleção. A transfecção foi feita com o uso do kit Effectene (Qiagen, Hilden, Alemanha). 1,5 µg de pSV2MGMT e 0,2 µg de pSV2neo foram transfectados e os clones selecionados com o uso de G418 (1,5 mg/ml por 72 h e posteriormente mantidos à 0,5 mg/ml; Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha). Os clones resistentes a G418 tiveram a expressão de MGMT testada por "western-blot" e testes de atividade enzimática. As linhagens DN-FADD foram geradas a partir da transfecção de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) com 1,5 µg de pcDNA3-FADD-DN (TEWARI *et al.*, 1995) de maneira semelhante à descrita para as células *MGMT*, exceto pelo fato deste plasmídeo já conter o gene de seleção *neo*. Os clones positivos para DN-FADD eram determinados

por “western-blotting”. Em ambas as construções (*MGMT* e *DN-FADD*), G418 era retirado do meio de cultura durante os experimentos. As células transfectadas com siRNA para p53 foram doadas pelo grupo do Prof. Michael Weller (Universidade de Tübingen, Alemanha) e sua construção está descrita em detalhes em (WISCHHUSEN *et al.*, 2003).

As culturas celulares, tanto de células CHO quanto de células de glioma humano, eram mantidas em garrafas de poliestireno com meio de cultura Eagle modificado por Bulbecco (“Dulbecco Modified Eagle Medium”-DMEM; Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (“Fetal Calf Serum”- FCS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) e 1% de antibiótico-antimicótico (Invitrogen).

3.2 Sub-cultivo de células

Células das diferentes linhagens eram subcultivadas com lavagem com tampão fosfato salino (“Phosphate Buffer Saline” –PBS; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH= 7,6), seguido da adição de tripsina-EDTA pelo tempo necessário para que ocorresse a digestão da matriz protéica responsável pela aderência celular. A reação era então bloqueada pela adição de meio de cultura normal, quando então as células eram ressuspensas e passadas para novas garrafas de cultura.

3.3 Congelamento de células

Células confluentes eram subcultivadas, tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm. O sedimento era então ressuspendido em meio de cultura completo, contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). As células eram então rapidamente transferidas para ampolas de congelamento e mantidas por um mínimo de 4 h à -80°C em “Cryo 1°C freezing container” (Nalgene) contendo isopropanol, o que permite uma diminuição linear da temperatura. Após este período as células eram mantidas à -80°C ou transferidas para um tanque de nitrogênio (N₂) líquido. A eficiência do congelamento era testada por descongelamento, onde o conteúdo de uma ampola de congelamento era transferido para um tubo de centrifugação onde eram adicionados 5 mL de meio de cultura completo. Após centrifugação (1500 rpm, 5 min) o sobrenadante era descartado e o precipitado de células ressuspendido em meio de cultura completo e transferido para garrafas de cultivo.

3.4 Irradiação com luz UV

As células eram lavadas duas vezes com PBS pré-aquecido e a irradiadas com lâmpada germicida de baixa pressão (emitindo preferencialmente à 254 nm, à uma dose de 1,0 J/m²/s). A dose de UV emitida era monitorada por radiômetro (VLX 3W, sensor monocromático CX-254, Marne La Vallee, França).

3.5 Fotorreativação

Células foram iluminadas por 2 h em PBS pré-aquecido, 10 cm acima de lâmpadas fluorescentes (duas lâmpadas “daylight lamps”, Philips 15 W, emissão entre 400-700 nm). A temperatura foi mantida a 37°C.

3.6 Drogas e tratamentos

Afidicolina: dissolvida em H₂O (50%) e etanol (50%) à uma concentração de 1,0 mg/ml e mantida à -20°C. Adicionada ao meio de cultura 1 h antes da irradiação com luz UV, em diferentes concentrações que variavam de 0,1 µg/ml a 1,0 µg/ml. Para os experimentos de indução de apoptose por luz UV, a afidicolina era mantida no meio durante todo o período pós-irradiação (máximo de 72 h).

Carmustina (BCNU): dissolvida em H₂O estéril (concentração de 20 mM), alíquotada e mantida à -20°C até o momento de utilização, onde células de glioma eram tratadas com diferentes concentrações da droga (indicadas nas figuras). A droga era mantida no meio de cultura até o momento de recolha das células para os diferentes experimentos realizados.

Fotemustina: dissolvida em H₂O estéril imediatamente antes do tratamento, onde células de glioma U87 (p53wt) e U138 (p53mt) eram tratadas com diferentes concentrações da droga (indicadas nas figuras). Adicionada diretamente ao meio de cultura celular, as células eram mantidas na presença de Fotemustina até ao momento de serem recolhidas para os diferentes experimentos realizados.

N-metil- N' - nitro- N- nitrosoguanidina (MNNG): dissolvida em DMSO e seguidamente diluída em H₂O estéril. Alíquotas eram mantidas à -80°C até o momento de uso, quando diferentes concentrações da droga eram adicionadas diretamente ao meio de cultura das células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt). As células eram mantidas na presença de MNNG até ao momento de serem recolhidas para os diferentes experimentos realizados.

Nimustina (ACNU): dissolvida em H₂O estéril (concentração de estoque de 10 mM), aliquotada e mantida à -20°C até o momento de utilização, onde células de glioma eram tratadas com diferentes concentrações da droga (indicadas nas figuras). A droga era mantida no meio de cultura até o momento de recolha das células para os diferentes experimentos realizados.

Pifithrin-α: o inibidor específico de p53 Pifithrin-α era diluído em DMSO (13,6 mM), aliquotado e mantido à -20°C até ao momento da utilização. Para experimentos com luz UV, ACNU e BCNU, Pifithrin-α era adicionada imediatamente após tratamento e para experimentos com MNNG e TMZ era adicionada após 72h do tratamento, sempre numa concentração final de 30 μM. Esta diferença no momento da adição deve-se ao tempo necessário para a estabilização de p53 após tratamento com esses diferentes agentes.

Temozolomida (TMZ): diluída em DMSO (concentração de estoque de 35 mM), aliquotada e mantida a -80°C. Células de glioma eram tratadas com diferentes concentrações desta droga, que era adicionada diretamente ao meio de cultura e mantida durante todo o período do experimento. Gentilmente cedida pela Schering-Plough.

DPQ (3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butox]-1(2H)-isoquinolinone): o inibidor específico de PARP foi utilizado na concentração de 2 μM e era adicionado ao meio de cultura de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) juntamente com a droga TMZ. As células eram mantidas nesta condição durante todo o período do experimento.

3.7 Experimentos de sobrevivência celular a partir de células individualizadas (recuperação clonogênica)

Aproximadamente 700 células das linhagens CHO-9 e CHO-27.1 e 1000 células das linhagens de glioma U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro. 8 h a 16 h após o plaqueamento as células foram tratadas com diferentes concentrações dos agentes genotóxicos utilizados (UV, MNNG, ACNU, BCNU). Esse é o tempo necessário para aderência das células na placa e garantia de análise somente de células individualizadas. As células eram mantidas em meio completo e 10 a 12 dias após o tratamento eram fixadas (ácido acético:metanol:H₂O 1:1:8) por 30 minutos e seguidamente coradas (Cristal de violeta

1%) por mais 30 min. Colônias com aproximadamente mais de 15 células eram contadas. A taxa de sobrevivência foi tomada em relação ao número de colônias nas amostras controle (não-tratadas).

3.8 Análise de indução de apoptose

Análise de conteúdo sub-G1 por citometria de fluxo: Diferentes tempos após tratamento (indicado em cada experimento), as células (CHO-9, CHO-27.1, U87MG, U138MG, U87MGMT (p53wt), U138MGMT (p53mt), U87DN-FADD, U138DN-FADD, U87sip53 e U87puro) eram coletadas juntamente com seu sobrenadante e centrifugadas (1500 rpm, 5 min). O precipitado resultante era então fixado com etanol 70% gelado e armazenado por até duas semanas à -20°C . Imediatamente antes da análise as células eram tratadas com RNase A (0,03 mg/ml) e marcadas com iodeto de propídeo ("Propidium iodide"-PI; 16,5 mg/ml) em PBS. O iodeto de propídeo é um análogo do brometo de etídeo, ou seja, um agente capaz de se intercalar entre as bases do DNA. Logo, a fluorescência deste agente corresponde à quantidade de DNA presente na célula. As amostras eram então transferidas para microtubos e a fluorescência resultante da marcação do DNA com PI era analisada por citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Para cada amostra, 10000 células eram analisadas. Os resultados foram obtidos como a porcentagem de núcleos sub-diplóides (Sub-G1; CellQuest e WinMDI Softwares) que representa a fração de células onde ocorreu fragmentação do DNA, característica de morte celular por apoptose (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998).

Análise de apoptose e necrose por marcação dupla Anexina V-FITC/PI:

Aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células das linhagens U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro e 24 h depois eram tratadas com diferentes concentrações de ACNU e BCNU (indicadas nas figuras). As células eram coletadas juntamente com seu sobrenadante e centrifugadas (1500 rpm, 5 min). A seguir as células eram lavadas com PBS e tratadas com tampão de ligação (HEPES 100 mM; NaCl 1,4 M; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 25 mM e BSA 1%). A suspensão celular era então transferida para microtubos onde era então adicionado 2,5 μL de Anexina V – FITC (Pharmingen). Anexina V liga-se aos fosfolipídios fosfatidilserinas, que são externalizados em células que estejam no início do processo de apoptose (ver

Introdução). Por outro lado, células em processo de morte celular, seja por apoptose ou por necrose, são permeáveis à PI, ao contrário de células viáveis. Logo, células viáveis são negativas tanto para Anexina V-FITC quanto para PI, células em apoptose são positivas tanto para Anexina V-FITC quanto para PI e células necróticas são negativas para Anexina-V-FITC, mas positivas para PI. Após incubação no gelo por 15 minutos eram adicionados 430 µL de tampão de ligação e 10 µL de PI (50 µg/mL). As amostras eram imediatamente analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson) e as porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas eram determinadas (WinMDI Software).

Análise de apoptose por TUNEL (“TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling”):

Aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células das linhagens U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram plaquedadas em Lab-Tek Chamber Slides (NUNC, Rochester, NY) e irradiadas após 24 h (UV-C, 30 J/m^2). Devido ao destacamento que geralmente ocorre em células em fase final de apoptose induzida por luz UV, utilizamos o tempo de 96 h após irradiação para fixar as células (paraformaldeído 4%). Para realização do teste de TUNEL foi utilizado o Dead End Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI). Resumidamente, após a fixação as células eram lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100, lavadas novamente com PBS, marcadas com dUTP fluorescente quando era então adicionada a enzima desoxinucleotídeo terminal transferase (rTdT). A fragmentação do DNA característica de células apoptóticas é quantificada pela incorporação de fluoresceína-12-dUTP em pontas 3'-OH livres de DNA, pela ação da enzima transferase. Após o tempo de incubação (1 h a 37°C) as células eram lavadas novamente com PBS e levadas para análise em microscopia de fluorescência (Zeiss, Axiovert 200).

Análise de apoptose por morfologia (laranja de acridina/brometo de etídeo):

Após um período de 48 h da irradiação UV, células CHO-9 e CHO-27.1 foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 10 min e ressuspensas em 20 µL de PBS. Foram adicionados 2 µL de solução contendo os corantes (contendo uma parte de laranja de acridina 100 µg/ml e uma parte de brometo de etídeo 100 µg/ml). As células foram analisadas imediatamente em microscopia de fluorescência. Laranja de acridina cora

células vivas e mortas, enquanto que o brometo de etídeo cora somente células que perderam a integridade da membrana plasmática, ou seja, já comprometidas para a morte seja por apoptose ou necrose. Nesta metodologia, células viáveis aparecem uniformemente verdes e células apoptóticas aparecem laranjas com manchas no núcleo como consequência da condensação da cromatina. Células necróticas também aparecem laranjas, mas sem a condensação da cromatina e de tamanho semelhante ou maior do que células viáveis (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998).

Análise de apoptose por ativação de caspases: Para determinação da atividade das caspases -3, -8 e -9 foram utilizados testes colorimétricos específicos (RD Systems, Tustin, CA). O teste foi utilizado de acordo com as especificações do produtor. Resumidamente, $1,0 \times 10^6$ células das linhagens U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) eram plaqueadas e 24 h depois irradiadas com luz UV (30 J/m^2) ou tratadas com ACNU ($50 \mu\text{M}$). 96 h após irradiação com luz UV ou 72 h após tratamento com ACNU as células eram coletadas e lisadas. O lisado era então transferido para placas “multiwell” de 96 poços, onde era então adicionado o substrato específico para cada uma das caspases e após o tempo de incubação (2 h à 37°C) a atividade era lida por espectofotometria a 405 nm em leitor de ELISA. A atividade das amostras tratadas foi expressa em relação à atividade das amostras controle e apresentada como Unidades Arbitrárias (U.A.).

3.9 Verificação de síntese de DNA

Análise por incorporação de timidina tritiada: Aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células (CHO-9, CHO-27.1, U87MG e U138MG) em placas de Petri (35 mm de diâmetro) foram irradiadas com luz UV e após diferentes tempos (indicados no experimento) eram incubadas em $4,0 \mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -metil-timidina (Amersham Pharmacia Biotech, USA) por 30 min. Nos experimentos com afidicolina células CHO-9 e CHO-27.1 eram mantidas em diferentes concentrações dessa droga (indicadas nas figuras). A marcação com ^3H -metil-timidina era feita em diferentes tempos após a remoção da afidicolina do meio de cultura celular. As células eram então lavadas uma vez com PBS, uma vez com ácido tricloroacético (TCA) 15% por 5 min, seguido de duas lavagens com etanol 100% gelado por 5 minutos. Após retirada do etanol, as células eram mantidas em NaOH 0,3 M por

10 min, raspadas com rodinho policial, separadas em duas alíquotas e transferidas para microtubos. A primeira alíquota foi utilizada para medida de radioatividade em espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman LS 7000) em tubos contendo líquido de cintilação. A segunda alíquota foi utilizada para leitura de absorbância a 260 nm (espectrofotômetro Hitachi U-200) para normalização dos dados. A razão entre radioatividade e absorbância expressa o valor de síntese de DNA.

Análise por incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU): A análise da síntese de DNA por incorporação de BrdU foi feita através do uso do kit de proliferação celular “ELISA BrdU colorimetric assay” (Roche Applied Science), utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, $1,0$ a $5,0 \times 10^4$ células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) eram plaqueadas em microplacas de 96 poços por 24 h antes do tratamento com diferentes concentrações de ACNU. Diferentes tempos após tratamento (indicado na figura) BrdU era adicionado diretamente ao meio de cultura celular por 2 h à 37°C em atmosfera umidificada contendo 7% de CO_2 . O meio de cultura era então removido, as células eram fixadas e imediatamente tinham seu DNA desnaturado. Subseqüentemente as amostras foram incubadas por 90 min com a solução anti-BrdU-POD. Após três lavagens consecutivas com solução específica o substrato era adicionado por 20 min até ao momento da detecção fotométrica a 370 nm em leitor de ELISA. Os valores são expressos em relação às amostras controle, que foram consideradas como 100%.

3.10 Análise de síntese de RNA

Aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células em placas de Petri (35 mm de diâmetro) foram tratadas com TMZ ou luz UV e após diferentes tempos (indicados no experimento) eram incubadas em $4,0 \mu\text{Ci/ml}$ de uridina- H^3 (Amersham Pharmacia Biotech, USA) por 1 h. As células eram lavadas uma vez com PBS, tripsinizadas, separadas em duas alíquotas e transferidas para microtubos. Numa das alíquotas as células eram lisadas (NaCl 300 mM; Tris-HCl pH 8,0 20 mM; EDTA 2 mM; SDS 1% e proteinase K 200 $\mu\text{g/ml}$) e aplicadas sobre papel Whatman 17, que foi lavado uma vez com TCA (15 %) e duas vezes com álcool hidratado comum sobre agitação, para lavagem do material radioativo não incorporado. Quando seco, o papel foi utilizado

para medida de radioatividade em espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman LS 7000) em tubos contendo líquido de cintilação. A segunda alíquota foi utilizada para leitura de absorbância a 260 nm (espectrofotômetro Hitachi U-200) para normalização dos dados. A razão entre radioatividade e absorbância expressa o valor de síntese de RNA.

3.11 Sincronização do ciclo celular com afidicolina

Protocolo modificado de (SPADARI *et al.*, 1984). Aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células (CHO-9) foram plaqueadas em placas de Petri (60 mm de diâmetro) em meio de cultura normal e 24 h após era adicionado afidicolina 0,5 µg/ml por outras 24 h. As amostras eram então lavadas com PBS e seguia-se um período de 8 h onde as células eram novamente mantidas em meio normal. Terminado este tempo as amostras eram novamente tratadas com a mesma concentração de afidicolina por pelo menos 16 h. Esse método permite a sincronização de células em final de fase G1, início de fase S. As amostras eram então fixadas diferentes tempos (que variavam de 0 a 16 h) após a liberação do segundo tratamento com afidicolina, fixadas e marcadas com PI imediatamente antes de serem analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson e CellQuest Software).

3.12 Preparação de RNA e RT-PCR

RNA total de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) tratadas ou não com ACNU foi isolado com o uso do kit “RNA II Isolation” (Macherey-Nagel Düren, Alemanha). 2 µg de RNA foram transcritos em cDNA com a enzima Superscript II (Invitrogen Corporation) em um volume total de 40 µl. Destes, 3 µl foram submetidos a RT-PCR com o uso de primers específicos (MWG Biotechnology, Alemanha) e Red-Taq Ready Mix (Sigma).

3.13 Análise de expressão protéica

Preparação de extratos celulares: Precipitados celulares de amostras controle e tratadas com TMZ ou ACNU foram ressuspensos em tampão de fracionamento “A” (HEPES–KOH 10mM; pH 7,4, EDTA 0,1mM; bis-etileno glicol (b-aminoetil eter) 1mM; sacarose 250mM; Na₃VO₄ 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoridro (PMSF) 0,5 mM e

ditiotreitol (DTT) 10 mM). As amostras eram então lisadas por ciclos de congelamento/descongelamento/vortexação e o lisado era em seguida centrifugado (10000 rpm; 10 min). O sobrenadante contendo as proteínas citoplasmáticas era então isolado. O precipitado contendo os núcleos, organelas e membranas era então ressuspensionado em tampão de fracionamento “B” (Tris 20 mM; EDTA 1 mM; b-mercaptoetanol 1 mM; glicerina 5%; Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 0,5 mM; DTT 10 mM, pH 8,5). Esta suspensão era homogeneizada por sonicação. Após centrifugação (10000 rpm; 10 min) o sobrenadante contendo as proteínas nucleares era isolado. O precipitado contendo a fração de membranas era ressuspensionado em tampão de fracionamento “B” acrescido de Triton X-100 1%. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

“Western-blot”: O protocolo utilizado foi baseado no método descrito em (RENART *et al.*, 1979). 30 mg de proteína extraídos dos diferentes extratos celulares foram separados em géis de poliacrilamida-SDS (10 a 12%). Após separação as proteínas eram transferidas para membrana de nitrocelulose (Protran; Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha). As membranas eram então bloqueadas por 2 h em leite em pó desnatado em TBS (5%) contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T), e incubadas “overnight” a 4 °C com o anticorpo primário. Após 3 lavagens em TBS-T as membranas eram encubadas por 2 h com o anticorpo secundário (acoplado a peroxidase). Os anticorpos primários utilizados foram anti-Bax, anti-Bcl2, anti-ERK2, (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), anti-p53 (Cell Signaling, Dawers, MA), anti-Bak, (Calbiochem). Após lavagem com 0,1% Tween 20 em TBS (3X; 10 min) as membranas eram reveladas com o uso de um sistema de detecção de quimioluminescência (Amersham Biosciences AB).

3.14 Detecção de danos ao DNA por “dot-blot”

Para as análises de “dot-blot”, células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt), U87sip53 e U87sipuro eram irradiadas (30 J/m²) e tinham seu DNA genômico extraído diferentes tempos após essa irradiação. A extração de DNA foi feita com o uso de kit específico e foi feita de acordo com as especificações do produtor (Macherey Nagel, Manheim, Alemanha). Após quantificação do DNA por espectrofotometria a 260/280

nm, 1,0 µg de DNA de cada amostra era aplicado no aparelho de “blotting” e transferido sob vácuo para membranas PVDF. As membranas eram então bloqueadas em leite em pó desnatado (5% em PBS contendo 0,1% Tween) por 2 h e a seguir encubadas por 2 h com o anticorpo primário (1:1000 anti-CPD; Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA). Após lavagem (PBS-Tween 0,1%, 3X, 10min) as membranas eram incubadas com o anticorpo secundário acoplado a peroxidase (1:3000, Santa Cruz). Após lavagem (PBS-Tween 0,1%, 3X, 10min) as membranas eram reveladas com o uso de um sistema de detecção de quimioluminescência (Amersham Biosciences AB).

3.15 Detecção de γ H2AX por imunocitoquímica

Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram plaqueadas em lâminulas dentro de placas de Petri de 60 mm de diâmetro. 72 h após tratamento com 50 µM de ACNU as células eram fixadas em paraformaldeído (4%), seguido de uma segunda fixação em metanol 100% (-20°C, 20 min). As células eram então bloqueadas em 5% BSA em PBS (0,3% Triton-X100). O anticorpo primário (anti- γ H2AX; Upstate) foi então adicionado (1:1000, “overnight” a 4 °C) e após 3 lavagens em PBS (0,3% Triton- X100) era adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 546 (1:3000; Molecular Probes) por 2 h a 37°C. Após três lavagens em PBS (0,3% Triton- X100) era adicionado o marcador nuclear DAPI (100 nM, 15 min). As lâminas eram então montadas em meio “anti-fade” (Glicerol:PBS 1:1, 2.5% DABCO, pH 8,6 com HCL). As células eram analisadas em microscopia de fluorescência (Zeiss, Axiovert 200) e um mínimo de 40 células por ponto tiveram seus “foci” de γ H2AX quantificados.

4 Resultados

4.1 Papel da replicação do DNA lesado no processo de indução de apoptose por luz UV

4.1.1 Efeito da afidicolina nas sínteses de DNA e RNA

Para investigar o papel da replicação do DNA lesado no processo de apoptose induzida por luz UV, foi utilizada a micotoxina afidicolina, extraída do fungo *Cephalosporium aphidicola*. Este composto é um inibidor competitivo das polimerases α e δ , inibindo a ligação de 2'-desoxinucleotídeos-5'-trifosfatos (dNTPs) a estas enzimas (SPADARI *et al.*, 1984). O primeiro passo do projeto foi o de confirmar que esta droga era eficiente em inibir a síntese de DNA no modelo celular utilizado, células CHO selvagens (CHO-9) e mutadas no gene de reparo *XPB* (CHO-27.1). Isso foi feito através de experimentos de incorporação de timidina tritiada (^3H -metil-timidina) onde células CHO-9 e 27.1 eram mantidas em diferentes concentrações de afidicolina (Figura 5A). O resultado deixa claro que já a partir de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ existe uma significativa redução na taxa de síntese de DNA, em ambas as linhagens celulares. Como o tratamento com altas doses de afidicolina é potencialmente tóxico para as células, pela formação de quebras no DNA (HAMMOND *et al.*, 2003), foi utilizada a dose de 0, 1 $\mu\text{g/ml}$ para a maioria dos experimentos seguintes. O tempo necessário para a inibição da síntese de DNA por afidicolina também foi verificado (Figura 5B). Como pode ser observado, já partir de 2 h do tratamento existe uma redução de aproximadamente 70% na síntese de DNA, comprovando a eficácia da droga no modelo celular escolhido.

Como o processo de inibição de transcrição induzido pela irradiação com luz UV já havia sido descrito, inclusive pelo nosso grupo (CHIGANCAS *et al.*, 2002), como um sinal para o desencadeamento de apoptose induzida por luz UV, era fundamental que a afidicolina não interferisse nesse processo. Para isso, células CHO-9 e 27.1 tratadas com 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de afidicolina foram marcadas com uridina tritiada ([5- ^3H]-uridina) e tiveram sua síntese de RNA quantificada (Figura 6). Isso foi feito em células irradiadas ou não com luz UV (40 J/m^2) e pode-se observar que a afidicolina não interfere na

síntese de RNA em nenhuma dessas condições. Ao mesmo tempo, esse resultado confirma que a formação de fotoprodutos pela luz UV acarreta em um forte bloqueio de síntese de RNA, sendo este bloqueio mais efetivo em células deficientes em reparo de DNA (CHO-27.1).

Figura 5: Efeito da afidicolina na síntese de DNA. (A) Curva dose-resposta. As células CHO-9 e CHO-27.1 eram mantidas nas concentrações de afidicolina indicadas por 24 h, quando então eram marcadas com ^3H -metil-timidina por 15 minutos e recolhidas para análise. **(B) Cinética.** As células CHO-9 e CHO-27.1 eram mantidas com 0,1 µg/ml de afidicolina pelos períodos de tempo indicados e então marcadas com ^3H -metil-timidina por 15 minutos. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

Figura 6: Efeito da afidicolina e da luz UV na síntese de RNA. Células CHO-9 e CH-27.1 eram irradiadas (40 J/m^2) e 8 h após eram marcadas com $[5-^3\text{H}]$ -uridina por 1 h. As amostras tratadas com afidicolina ($0,1 \mu\text{g/ml}$) eram mantidas na presença da droga por todo este período. A porcentagem de síntese de RNA é dada em relação às amostras controle, que foram consideradas com 100%. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.1.2 Apoptose induzida por luz UV é independente da fase do ciclo celular em que as células são irradiadas

A potente inibição de replicação do DNA induzida pela afidicolina proporciona o estudo de indução de apoptose após irradiação por luz UV em diferentes fases do ciclo celular. Para isso, células CHO-9 tiveram seu ciclo celular sincronizado em G1/S, através de um duplo-bloqueio de replicação por afidicolina (ver Material e Métodos). Para verificar a eficácia deste protocolo as células eram marcadas com um intercalador de DNA (PI) diferentes tempos (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h) após liberação do segundo ciclo de afidicolina e tinham seu ciclo celular analisado por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 7, não só as células estavam realmente sincronizadas em G1/S, como também existe um claro movimento do pico do histograma para a direita ao longo do tempo, indicando que essas células prosseguiram sincronizadamente pelo ciclo celular, passando pelas fases S (2-4h), G2 (6-8h) e iniciando um novo ciclo celular após 10 h da liberação do bloqueio.

Nesses experimentos metade das amostras era utilizada para verificar essa sincronização e a outra metade era irradiada com luz UV (40 J/m^2) em fases específicas do ciclo celular (G1, S e G2/M). Conforme demonstrado pela Tabela 1, a indução de apoptose nas células irradiadas nas diferentes fases do ciclo celular foi semelhante, o que indica que a fase do ciclo celular na qual são geradas as lesões ao DNA não interfere na sinalização para apoptose induzida pela luz UV.

Figura 7: Sincronização de células CHO-9 por duplo bloqueio com afidicolina. Afidicolina ($0,5 \mu\text{g/ml}$) era adicionada ao meio de cultura de células em crescimento exponencial por 24 h. A droga era então retirada e as células ficavam 16 h em meio normal, quando então era novamente adicionada afidicolina ($0,5 \mu\text{g/ml}$) por um período de 8 h. Após este segundo tratamento as células eram recolhidas e tratadas com PI para análise de ciclo celular por citometria de fluxo nos tempos indicados nos histogramas. A fase do ciclo celular no qual as células se encontram (G1, S, G2) também é indicada. A fluorescência de PI, indicativa da quantidade de DNA, está representada no eixo-x e a quantidade de células no eixo-y.

TABELA 1. Verificação de apoptose após irradiação UV em células sincronizadas

Fase do ciclo celular	Apoptose induzida por luz UV (%)
G ₁	41 (± 4)
S	42 (± 4)
G ₂ /M	45 (± 6)

Tabela 1: Células CHO-9 eram sincronizadas por duplo-bloqueio com afidicolina e irradiadas com luz UV (40 J/m²) diferentes tempos após a retirada da droga (0 h para G₁, 2 h para S e 6 h para G₂). 48 h após a irradiação as células eram recolhidas para análise por citometria de fluxo. Células com conteúdo de DNA sub-G₁ foram consideradas apoptóticas. A sincronização celular pode ser verificada na Figura 7. Cada valor representa a média (+/- desvio-padrão) de três experimentos independentes.

4.1.3 A replicação do DNA lesado é um sinal para a indução de apoptose por luz UV

O próximo passo do projeto foi verificar se a inibição da replicação do DNA lesado pela luz UV teria alguma influência no processo de indução de apoptose após irradiação em células normais e deficientes no reparo de fotoprodutos. Antes de iniciar esses experimentos era necessário obter doses equitóxicas de irradiação UV entre as linhagens estudadas, visto que a deficiência no gene de reparo *XPB* acarreta numa maior sensibilidade à irradiação UV. Para isso foi realizado um experimento de sobrevivência clonogênica (Figura 8), onde células CHO-9 e 27.1 eram irradiadas com diferentes doses de luz UV (indicadas na figura) e sete dias depois tinham suas colônias quantificadas. Observa-se que as células mutadas em *XPB* são mais sensíveis à irradiação por luz UV e, devido a isso, as doses de UV utilizadas nos experimentos seguintes foram determinadas em 40 J/m² para a linhagem proficiente em reparo (CHO-9) e 20 J/m² para a linhagem deficiente em reparo (CHO-27.1).

Figura 8: Sobrevivência monoclonal após irradiação UV. Aproximadamente 1000 células CHO-9 e CHO-27.1 foram plaqueadas e 16 h depois irradiadas com diferentes doses de UV indicadas na figura. Sete dias após a irradiação as células eram fixadas, tinham suas colônias marcadas e quantificadas. A sobrevivência relativa é dada em relação a amostras não-irradiadas, que foram consideradas como 100% de sobrevivência. A figura representa a média de três experimentos independentes.

Com as doses de UV determinadas, células CHO-9 e 27.1 foram irradiadas e mantidas em condições normais de crescimento ou em meio com afidicolina (0,1 $\mu\text{g/ml}$) por todo o período pós-irradiação (48 h ou 72 h), quando então a quantidade de células em apoptose era quantificada por citometria de fluxo. A análise dos histogramas da Figura 9 deixa claro que, quando mantidas na presença de afidicolina, as células proficientes em reparo CHO-9 são mais resistentes à indução de apoptose por luz UV, com a quantidade de células em sub-G1 (indicativo de apoptose) reduzindo de 35% para 5 % após 48 h e de 40% para 14% após 72 h. Surpreendentemente, essa proteção também foi observada nas células deficientes em reparo, CHO-27.1 (Figura

9), ainda que de maneira menos expressiva (de 65% para 26% após 48 h e de 81% para 35% após 72 h).

Figura 9: Afidicolina inibe apoptose induzida por luz UV. Aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células eram irradiadas (40 J/m^2 para CHO-9 e 20 J/m^2 para CHO-27.1) e recolhidas para análise por citometria de fluxo 48 h ou 72 h após a irradiação. As células tratadas com afidicolina ficavam na presença da droga por todo o período pós-UV. A porcentagem de células apoptóticas (sub-G1, M1) é indicada em cada histograma. A fluorescência de PI, indicativa da quantidade de DNA, está representada no eixo-x e a quantidade de células no eixo-y. Na figura são mostrados histogramas representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.1.4 Inibição da replicação do material lesado em células CHO ϕ r e XPB ϕ r

Para uma análise mais profunda da proteção à apoptose conferida pela inibição da replicação após irradiação UV, os mesmos experimentos foram realizados com células CHO-9 e 27.1 que expressam um gene de CPD-fotoliase proveniente do marsupial *Potorous tridactylus* (CHO ϕ r e XPB ϕ r respectivamente) sendo, portanto, capazes de remover CPDs de seu genoma quando expostas a luz visível, processo denominado de fotorreativação (CHIGANCAS *et al.*, 2002). Nestes experimentos (Figura 10) as células CHO ϕ r e XPB ϕ r eram irradiadas (40 J/m² e 20 J/m², respectivamente), fotorreativadas imediatamente (0 h) ou 24 h após irradiação UV e mantidas ou não na presença de afidicolina (0,1 µg/ml) neste período. Os resultados mostram que, se realizada imediatamente após irradiação UV, a fotorreativação é capaz de inibir a sinalização para apoptose em ambas as linhagens celulares. No entanto, se realizada somente 24 h após a irradiação não existe proteção alguma conferida pela fotorreativação, mostrando que sinais secundários já foram disparados e a remoção das lesões já não é capaz de inibir a sinalização para apoptose. No entanto, células mantidas em afidicolina por este período apresentam menor indução de apoptose, independente de serem proficientes ou deficientes em NER, indicando que o impedimento da replicação do DNA lesado bloqueia os sinais secundários responsáveis pelo desencadeamento da morte celular.

4.1.5 Tratamento com afidicolina previne o aparecimento de características morfológicas de apoptose após irradiação UV

Conforme descrito na Introdução, a degradação do material genético é apenas uma das características da morte celular do tipo apoptose. Características morfológicas como a condensação do núcleo e célula são também tidos como marcadores para esse tipo de morte celular. Para a confirmação de que os resultados descritos acima eram realmente devidos a apoptose, foram realizados experimentos de marcação com laranja de acridina e brometo de etídeo, que discrimina morfolologicamente células vivas, apoptóticas e necróticas (ver Material e Métodos). Células CHO-9 e 27.1 foram irradiadas (40 J/m² e 20 J/m², respectivamente), mantidas ou não na presença de afidicolina (0,1 µg/ml) e 48 h após eram marcadas com laranja de acridina/ brometo de etídeo e imediatamente analisadas por microscopia de fluorescência. O resultado

deste experimento está descrito na Figura 11 (11A: foto representativa; 11B: quantificação). Os resultados confirmam os encontrados por citometria de fluxo, mostrando que células mantidas em afidicolina apresentam uma redução nos níveis de apoptose após irradiação com luz UV.

Figura 10: Indução de apoptose pela luz UV é inibida pela fotorreativação e pela inibição da síntese de DNA. Células CHOphr e XPBphr foram irradiadas (40 J/m² e 20 J/m², respectivamente) e mantidas no escuro ou fotorreativadas (PRL-“photoreactivating light”) imediatamente (0 h) ou 24 h após a irradiação UV. As amostras tratadas com afidicolina eram mantidas com a droga durante todo o período pós-UV (48 h). A população sub-G1 representa a porcentagem de células apoptóticas, conforme descrito em Material e Métodos. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

A

CHO-9 Controle (UV = 0 J/m²) UV = 40 J/m² UV = 40 J/m²
Afidicolina 0,1 µg/ml**CHO 27.1** Controle (UV = 0 J/m²) UV = 20 J/m² UV = 20 J/m²
Afidicolina 0,1 µg/ml

B

CHO-9 **CHO 27-1**

Figura 11: Análise morfológica de apoptose em células CHO-9 e CHO-27.1. (A) Aspecto morfológico de células vivas (verdes) e apoptóticas (laranjas) 48 h após irradiação UV. (B) Quantificação de células vivas e apoptóticas em cada condição apresentada em (A). As células foram analisadas em microscopia de fluorescência usando uma objetiva de 40X.

4.2 Indução de apoptose por agentes metilantes em células de glioma humano com diferentes “status” de *p53*

4.2.1 Células de glioma selvagens para *p53* são mais sensíveis ao tratamento com MNNG

Para verificar a sensibilidade de células de glioma humano ao tratamento com agentes metilantes foi inicialmente realizado um experimento de sobrevivência monoclonal. Neste experimento, células de glioma selvagens (U87MG) e mutadas em *p53* (U138MG) foram tratadas com diferentes concentrações de MNNG e 14 dias após tratamento tinham suas colônias quantificadas. O resultado está descrito na Figura 12, onde pode ser observado que as células selvagens em *p53* (U87MG) são mais sensíveis ao tratamento do que células mutadas nesse gene (U138MG).

Figura 12: Ensaio de sobrevivência monoclonal após tratamento com MNNG em células de glioma. Aproximadamente 1000 células U87MG (p53wt; ◆ e linha contínua) e U138MG (p53mt; ■ e linha tracejada) foram tratadas com diferentes concentrações de MNNG e cultivadas por 12 dias até a fixação.

4.2.2 Sensibilidade de células p53wt é decorrente da indução de apoptose por MNNG e TMZ

O próximo passo foi verificar se esta diferença em sensibilidade estaria relacionada com uma maior resistência de células de glioma mutadas em *p53* à indução de apoptose após tratamento com MNNG. Para isso, células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt) e LN308 (p53mt) foram tratadas com 10 μ M de MNNG, e diferentes tempos após tratamento eram recolhidas e fixadas para posterior análise por citometria de fluxo (Figura 13). Neste gráfico fica claro não só que células selvagens são mais sensíveis à indução de apoptose por MNNG, mas também que este é um evento extremamente tardio, ocorrendo somente a partir de 120 h do tratamento.

Figura 13: Análise da população sub-G1 após tratamento com MNNG em células de glioma. Células U87MG (p53wt; $\blacklozenge$ e linha contínua), U138MG (p53mt; $\blacksquare$ e linha tracejada) e LN308 (p53mt; $\bullet$ e linha tracejada) foram tratadas com 10 μ M de MNNG e analisadas por citometria de fluxo diferentes tempos após tratamento. A figura representa a média de três experimentos independentes.

Como o objetivo principal deste projeto era entender o motivo de resistência de células de gliomas à agentes quimioterápicos, foram iniciados os experimentos com o agente metilante TMZ, tido como a principal aposta para o tratamento deste tipo de tumor em populações humanas. Na Figura 14 são mostrados histogramas representativos de indução de apoptose, onde fica claro que, também para TMZ, células U87MG (p53wt) são mais sensíveis do que células U138MG (p53mt) à indução de apoptose. As amostras foram tratadas com 0,1 mM de TMZ.

Figura 14: Histogramas representativos da cinética de indução de apoptose por 0,1 mM de TMZ em células U87MG (p53wt) e U138MG(p53mt). Diferentes tempos após o tratamento (indicados na figura) as amostras eram recolhidas e levadas para análise em citometria de fluxo. A população M1 representa a porcentagem de células apoptóticas (sub-G1). O eixo-x representa a quantidade de DNA e o eixo-y representa a quantidade de células.

4.2.3 Inibição de *p53* aumenta a resistência de células U87MG ao tratamento com MNNG e TMZ.

Para esclarecer o papel de *p53* após tratamento com agentes metilantes em células de glioma era necessário saber se *p53* era estabilizado após tratamento e qual a cinética dessa estabilização. A Figura 15 representa esta análise, através de um “western-blot” para *p53*, a partir de extratos protéicos de células U87MG (*p53*wt) tratadas com 0,1 mM de TMZ. Nota-se que já a partir de 72 h após o tratamento existe uma pronunciada estabilização de *p53* nessas células, o que indica que essa proteína pode estar de alguma forma participando da resposta celular ao tratamento com TMZ.

Figura 15: Estabilização de *p53* após tratamento com TMZ em células U87MG (*p53*wt). Diferentes tempos após tratamento com 0,1 mM de TMZ células U87MG (*p53*wt) tinham seus extratos protéicos extraídos e separados em gel de SDS. A análise de *p53* foi feita através do uso de anticorpo específico para esta proteína. ERK-2 é mostrado como controle endógeno de expressão.

Para confirmar esta hipótese, *p53* foi inibido em células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt) tratadas com MNNG e TMZ. A inibição de *p53* foi atingida com o uso do inibidor específico de *p53* Pifithrin- α , que impede a translocação de *p53* para o núcleo (MURPHY *et al.*, 2004). Os resultados estão mostrados na Figura 16 (16A: células tratadas com MNNG; 16B: células tratadas com TMZ). Enquanto o tratamento com Pifithrin- α (30 μ M) não influenciou a resposta de células U138MG (*p53*mt) em relação à indução de apoptose após MNNG e TMZ, pode-se claramente observar que em células U87MG (*p53*wt) a adição de Pifithrin- α aumenta a resistência à indução de apoptose, indicando, portanto, que *p53* está relacionado a uma maior sensibilidade de células de glioma frente a agentes metilantes. Essa confirmação foi também feita através da inibição de *p53* por siRNA e os resultados podem ser encontrados em Roos *et al.*, (2007).

A

B

Figura 16: Efeito de Pifithrin- α na indução de apoptose por MNNG e TMZ em células de glioma. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com MNNG (A) e TMZ (B) e 96 h após esse tratamento Pifithrin- α (30 μ M) era adicionada ao meio de cultura. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. As amostras foram recolhidas 144 h após tratamento. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.2.4 Apoptose induzida por TMZ é dependente de replicação do DNA lesado

O fato de a indução de apoptose ser um evento tardio após tratamento de células de glioma com agentes metilantes é uma indicação de que este processo não ocorre no ciclo celular no qual foi realizado o tratamento, mas sim nos ciclos subseqüentes a este tratamento. Para estudar a dependência da progressão do ciclo celular para sinalização para apoptose por O⁶-metilguanina, células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com TMZ (0,1 mM) e mantidas em condições normais (meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino) ou em meio depletado de soro. A retirada do soro fetal do meio de cultura reduz a velocidade do ciclo celular, bloqueando as células na fase G1 do ciclo. Como pode ser observado na Figura 17, células U87MG (p53wt) tratadas com TMZ, mas mantidas em meio sem soro fetal, apresentam uma redução de aproximadamente 55% na quantidade de células apoptóticas, indicando que a indução de apoptose por TMZ é dependente da progressão do ciclo celular nestas células. Já nas células U138MG (p53mt) não se observa este fenômeno.

Figura 17: Inibição da replicação em células de glioma tratadas com TMZ. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) eram mantidas em condições normais de proliferação ou então em meio de cultura sem soro fetal bovino. As amostras eram tratadas com TMZ 0,1 mM e eram recolhidas para análise por citometria de fluxo 144 h após tratamento. As amostras sem soro eram mantidas nessa condição por todo o período pós-tratamento. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

Como alguns trabalhos apontam para o bloqueio de transcrição como fator preponderante na indução de apoptose (LJUNGMAN *et al.*, 1996), era necessário checar o efeito do tratamento com TMZ (0,1 mM) na síntese de RNA de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt). Como pode ser observado na Figura 18, o tratamento com TMZ não inibe a síntese de RNA, ao contrário, células U87MG (p53wt) tratadas com esta droga apresentam um aumento no nível de síntese de RNA.

Figura 18: Efeito de TMZ na síntese de RNA em células de glioma. Células U87MG (p53wt; ◆ e linha contínua) e U138MG (p53mt; ■ e linha tracejada) foram tratadas com 0,1 mM de TMZ e diferentes tempos após esse tratamento (indicados na figura) eram marcadas com [5- ³H]-uridina por 1 h e recolhidas para análise. A porcentagem de síntese de RNA é dada em relação às amostras controle, que foram consideradas como 100%. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.2.5 Apoptose induzida por TMZ em células U87MG (p53wt) ocorre pela via extrínseca

O próximo passo do projeto foi o de desvendar a via de apoptose utilizada (intrínseca ou extrínseca) pelas células de glioma após tratamento com TMZ. Como o receptor FAS/CD95 é o responsável pelo desencadeamento da via extrínseca e é controlado por p53, o primeiro ponto a ser observado foi a expressão desse receptor nas células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) tratadas com TMZ (0,1mM). A análise de expressão protéica de FAS por “western-blot” (Figura 19) mostrou que existe um acentuado aumento na expressão deste receptor 120 h após o tratamento com TMZ

nas células selvagens em *p53* (U87MG). É importante notar que é após este tempo de 120 h que se verifica o aparecimento de células em apoptose. Essa observação parece indicar que a indução de apoptose após tratamento com TMZ em células *p53*wt é dependente de FAS, ou seja, ocorre pela via extrínseca.

Figura 19: Análise da expressão do receptor FAS após tratamento com TMZ em células de glioma. Células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt) foram tratadas com 0,1 mM de TMZ e tiveram seus extratos protéicos extraídos diferentes tempos após tratamento, conforme indicado na figura. C representa o controle não tratado. ERK-2 foi utilizado como controle endógeno de expressão protéica.

Para comprovar esta hipótese, a atividade de FAS foi inibida nas células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt), com o uso de um anticorpo neutralizador deste receptor, adicionado 96 h após o tratamento com TMZ. Fica claro na análise da Figura 20 que a inibição de FAS reduz a indução de apoptose nas células U87MG (*p53*wt) em aproximadamente 50%. A inibição do receptor de FAS nas células U138MG (*p53*mt) não trouxe diferenças significativas na resistência dessa célula à indução de apoptose.

Para corroborar esse resultado, a ativação de caspase-8 (específica da via extrínseca) foi quantificada em células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt) tratadas com 0,1 mM de TMZ (Figura 21). Observa-se que a ativação de caspase-8 só é verificada nas células U87MG (*p53*wt), o que confirma que nestas células a indução de apoptose se dá pela via extrínseca. Já quando se analisa a ativação de caspase-3, que participa tanto da via extrínseca quanto da via intrínseca, observa-se que o aumento ocorre nas duas linhagens celulares estudadas, mas é mais pronunciado nas células U87MG (*p53*wt).

Figura 20: Inibição de FAS após tratamento com TMZ em células de glioma. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com 0,1 mM de TMZ e 72 h após este tratamento era adicionado ao meio um anticorpo neutralizador do receptor de membrana FAS, que era re-adicionado a cada 24 h até ao momento da recolha das células para análise (144 h). A população sub-G1 é indicativa de apoptose. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

Figura 21: Atividade de caspases após tratamento com TMZ em células de glioma. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com 0,1 mM de TMZ e 96 h após tratamento as células eram recolhidas e tinham suas atividades de caspase-3 e -8 analisadas por uso de kit específico. O valor é dado em relação à atividade encontrada em amostras controle (que foram consideradas com valor 1). U.A: Unidades Arbitrárias. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.2.6 Inibição de PARP-1 aumenta a sensibilidade de células U87MG (p53wt) ao tratamento com TMZ

Poli (ADP)ribose polimerase 1 (PARP-1) é uma proteína nuclear ativada pela presença de quebras na molécula de DNA. Ao se ligar a estas quebras, PARP transfere grupos (ADP)ribose do NAD^+ para si mesma (auto-ribosilação) ou para outras proteínas nucleares, aumentando a eficiência de vias de reparo de DNA e, conseqüentemente, diminuindo a eficiência de tratamentos quimioterápicos (BOUCHARD *et al.*, 2003). Para verificar se esse poderia ser o caso em células de glioma tratadas com TMZ, as linhagens U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com 0,1 mM de TMZ e mantidas ou não na presença do inibidor de PARP-1, DPQ. Os resultados estão mostrados na Figura 22, onde se pode observar que células selvagens para *p53* (U87MG) apresentam uma sensibilidade ainda maior à indução de apoptose por TMZ quando mantidas com o inibidor de PARP. Curiosamente, as células mutadas em *p53* (U138MG) não apresentam diferença alguma na sensibilidade à TMZ quando tratadas com DPQ. É importante notar que o tratamento com DPQ não se mostrou tóxico para nenhuma dessas linhagens celulares, como pode ser também observado na Figura 22.

Figura 22: Inibição de PARP após tratamento com TMZ em células de glioma. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com 0,1 mM de TMZ e, onde indicado, com o inibidor de PARP DPQ (2 μM). A população sub-G1 é indicativa de apoptose. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.3 Driblando a resistência: indução de apoptose por luz UV em células de glioma humano

4.3.1 Células U138MG (p53mt) são mais sensíveis à irradiação UV do que células U87MG (p53wt)

Conforme descrito na Introdução, *p53* aumenta a eficiência do reparo de DNA de lesões geradas por luz UV, pois regula genes pertencentes à via de reparo GGR. Com isto em mente, foi decidido verificar se a geração de fotoprodutos seria capaz de driblar a resistência que as células de glioma mutadas em *p53* haviam apresentado ao tratamento com os agentes metilantes MNNG e TMZ. O primeiro experimento deste projeto, uma curva de sobrevivência clonogênica (Figura 23), mostrou que, de fato, células U138MG (p53mt) são mais sensíveis à irradiação UV do que células U87MG (p53wt). Com este resultado em mãos, acreditamos que seria interessante investigar mais a fundo as respostas metabólicas que células de glioma apresentam à irradiação por luz UV.

Figura 23: Ensaio de sobrevivência monoclonal após irradiação UV em células de glioma. Aproximadamente 1000 células U87MG (p53wt; ◆ e linha contínua) e U138MG (p53mt; ■ e linha tracejada) foram irradiadas com diferentes doses de UV e cultivadas por 12 dias até a fixação. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.3.2 Células mutadas em *p53* são mais sensíveis à apoptose induzida pela irradiação com luz UV

Para verificar se esta diferença na sensibilidade de células de glioma à luz UV estaria relacionada com indução de apoptose, células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas com diferentes doses de luz UV (UV-C, 254 nm) e 120 h após foram analisadas por citometria de fluxo (Figura 24A). Fica claro que as células mutantes em *p53* são mais sensíveis à indução de apoptose em todas as doses de UV estudadas. Também quando se estuda a cinética de indução de apoptose após UV nestas células (Figura 24B), verifica-se que em todo o período analisado as células U138MG são mais sensíveis à luz UV.

Para confirmar que estes resultados obtidos por citometria de fluxo realmente representam morte celular por apoptose, foi realizado o teste de TUNEL (“TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling”) em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) 120 h após irradiação UV (30 J/m²). Neste sistema, a fragmentação do DNA característica de células apoptóticas é quantificada pela incorporação de fluoresceína-12-dUTP em pontas 3'-OH livres de DNA, pela ação da enzima desoxinucleotíдил terminal transferase. Na Figura 25 observa-se o resultado deste experimento, analisado por microscopia de fluorescência (ver Material e Métodos). Fica claro que a linhagem U138MG (p53mt) possui uma quantidade maior de células positivas para TUNEL, quando comparada à linhagem U87MG (p53wt).

A

B

U87MG (p53wt)

U138MG (p53mt)

Figura 24: Indução de apoptose por luz UV em células de glioma. (A) Cinética. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas com 30 J/m² e recolhidas para análise nos tempos indicados na figura. População sub-G1 é indicativa de apoptose. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. **(B) Curva dose-resposta.** Histogramas representativos de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) irradiadas com diferentes doses de UV, indicadas na figura. A população M1 representa a porcentagem de células apoptóticas (sub-G1). O eixo-x representa a quantidade de DNA e o eixo-y representa a quantidade de células.

Figura 25: Confirmação do perfil apoptótico pelo teste de TUNEL. (A) Imagens representativas. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas com 30 J/m² e 96 h após eram analisadas pelo método de TUNEL por microscopia de fluorescência (ver Material e Métodos). (B) Quantificação. Quantificação do número de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) positivas para TUNEL 96 h após irradiação UV.

Outro marcador importante para a confirmação de morte celular por apoptose é a ativação da caspase-3. Na Figura 26, observa-se a ativação dessa caspase em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) 96 h após irradiação dessas células com 30 J/m². Fica claro que a ativação de caspase-3 é mais pronunciada em células U138MG (p53mt) do que em células U87MG (p53wt), confirmando também que a morte celular observada pelos experimentos de citometria de fluxo é de fato apoptose.

Figura 26: Atividade de caspase-3 após irradiação UV em células de glioma. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas com 30 J/m² e 96 h após eram recolhidas e tinham suas atividades de caspase-3 analisadas por uso de kit específico. O valor é dado em relação à atividade encontrada em amostras controle (que foram consideradas com valor 1). U.A: Unidades Arbitrárias. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.3.3 Inibição de *p53* aumenta a sensibilidade de células U87MG (p53wt) à irradiação por luz UV

Após a confirmação de que a morte celular observada após irradiação UV ocorria por apoptose, o próximo passo foi a confirmação que o “status” de *p53* era o responsável pelas diferenças observadas na sensibilidade destas células. Para isso, inicialmente foi utilizado um segundo par de células de glioma com diferentes “status” de *p53*. A Figura 27A mostra o resultado da irradiação com luz UV das células U343MG

(p53wt) e U251MG (p53mt), onde se confirma que células mutadas em *p53* são mais sensíveis à indução de apoptose pela luz UV. Este resultado foi ainda confirmado pela inibição farmacológica de *p53* (pelo uso de Pifithrin- α) em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) irradiadas com luz UV (30 J/m²). O resultado deste experimento pode ser observado na Figura 27B e indica que a inibição de *p53* nas células U87 (p53wt) acarreta num aumento da sensibilidade destas células frente à irradiação por luz UV. Uma terceira estratégia foi a utilização de células U87MG (p53wt) transfectadas com uma sequência de siRNA específica para *p53* (U87sip53) e com uma sequência vazia (U87puro). Estas células foram doadas pelo grupo do Prof. Michael Weller, da Universidade de Tübingen, Alemanha. Na Figura 27C observa-se o resultado do experimento de irradiação (30 J/m²) das células U87MG (p53wt), U87puro (p53wt), U87sip53 (p53wt) e U138MG (p53mt). Confirmando o papel de *p53*, observa-se que o “knockdown” específico desse gene acarreta num aumento da sensibilidade de células U87MG à indução de apoptose por luz UV.

Para confirmar ainda mais a importância de *p53* na proteção de apoptose induzida por luz UV, foi utilizada também a estratégia inversa, ou seja, a inserção de *p53* nas células U138MG (p53mt). Isso foi feito em colaboração com a Prof. Dra. Eugênia Costanzi, deste mesmo Instituto, que já possuía em seu laboratório vetores retrovirais carregando *p53* (Pclp53SN) ou vazios (PclXSN) para serem usados como controle (“mock”). A seleção das células infectadas foi realizada por seleção positiva contra o antibiótico G418. No entanto, apesar de a infecção ter ocorrido, ou seja, termos conseguido construir as duas novas linhagens (U138p53 e U138mock), os experimentos de resistência à luz UV não mostraram uma reversão ao caráter selvagem. Na Figura 28 pode-se observar que a inserção de *p53* selvagem não foi capaz de reduzir a quantidade de população sub-G1 formada após irradiação com luz UV.

A

B

C

Figura 27: p53 inibe apoptose induzida por luz UV em células de glioma. (A) Confirmação em outro modelo celular. Células U343MG (p53wt) e U251MG (p53mt) foram irradiadas com 30 J/m² de UV e recolhidas para análise por citometria de fluxo 120 h após essa irradiação. (B) Inibição farmacológica de p53. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas com 30 J/m² e recolhidas para análise por citometria de fluxo 120 h após essa irradiação. As amostras tratadas com Pifithrin- α (30 μ M) eram mantidas na presença da droga durante todo o período pós-UV. (C) Inibição de p53 por RNAi. Células U87MG (p53wt), U87puro (p53wt), U87sip53 (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas com 30 J/m² de UV e recolhidas para análise por citometria de fluxo 120 h após essa irradiação. Interno: Verificação da inibição de p53 por RT-PCR. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

Figura 28: Efeito da transfecção de p53 em células U138MG (p53mt). As linhagens U87MG (p53wt), U138MG (p53mt), U138mock (p53mt) e U138p53 (p53mt/wt) foram irradiadas com 30 J/m², 120 h após foram recolhidas e tiveram seu conteúdo genético analisado por citometria de fluxo. A coluna da esquerda representa o Controle para cada linhagem. M1 representa a população sub-G1, indicativa de apoptose. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.

4.3.4 *p53* aumenta a eficiência do reparo de CPDs em células de glioma

Como descrito na Introdução, *p53* é um gene relacionado a diversos aspectos da proteção celular contra diferentes agentes genotóxicos. Para descrever especificamente como *p53* estaria agindo em células de glioma após irradiação UV, o primeiro passo foi a análise da estabilização deste gene após irradiação com 30 J/m^2 de UV. Na Figura 29 está representado um “western-blot” realizado com extratos protéicos nucleares de células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt) extraídos diferentes tempos após irradiação. Como pode ser observado existe uma rápida estabilização, seguida por uma igualmente rápida degradação de *p53* nas células U87MG (*p53*wt).

Figura 29: Análise da estabilização de *p53* nuclear após irradiação UV. Células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt) foram irradiadas com 30 J/m^2 de UV e tiveram seus extratos protéicos nucleares extraídos diferentes tempos após irradiação, conforme indicado na figura. C representa o controle não irradiado. ERK-2 foi utilizado como controle endógeno de expressão protéica.

Para analisar se essa rápida estabilização de *p53* estaria envolvida com o reparo de lesões geradas pela luz UV foi verificada a cinética de remoção de CPDs do genoma de células U87MG (*p53*wt), U138MG (*p53*mt), U87puro (*p53*wt) e U87sip53 (*p53*wt). Isto foi feito através de experimentos de “dot-blot”, onde o DNA extraído diferentes tempos após irradiação UV (30 J/m^2) era marcado com anticorpo anti-CPD (Figura 30A). Fica claro que células mutadas em *p53* (U138MG) ou mesmo células com “knockdown” para este gene são menos eficientes na remoção de CPDs, visto que, mesmo 24 h após irradiação, ainda possuem lesões em seu genoma, ao contrário das células selvagens. Dois genes pertencentes a via de reparo NER são transcricionalmente regulados por *p53*: XPC e DDB2. Como células mutadas em *p53*

apresentaram uma eficiência menor na remoção de CPDs, foi verificada a expressão destes genes diferentes tempos após irradiação UV (30 J/m^2) nas células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt), por PCR semi-quantitativo (Figura 30B). Fica claro que em células mutadas em *p53* (U138MG) a expressão tanto de XPC quanto de DDB2 está comprometida.

A

B

Figura 30: Influência de *p53* na via NER. (A) Remoção de CPDs. Células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt), U87MGpuro (p53wt) e U87MGsip53 (p53wt) foram irradiadas com 30 J/m^2 de UV e tiveram o DNA extraído diferentes tempos após irradiação. A análise por “dot-blot” foi realizada utilizando-se um anticorpo específico para CPDs. **(B) Análise da expressão de XPC e DDB2.** RNAm de XPC e DDB2 foi analisado PCR semi-quantitativo. A expressão relativa de XPC e DDB2 foi estabelecida a partir de amostras controle e normalizada em relação à expressão de GAPDH.

4.3.5 Bloqueio de síntese de DNA e RNA após irradiação UV

A presença de fotoprodutos no genoma é um bloqueio físico para a progressão de DNA e RNA polimerases. Para verificar o metabolismo do DNA de células de glioma após irradiação UV, as sínteses de DNA e RNA em células irradiadas foram quantificadas. A Figura 31A representa os níveis de síntese de DNA de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) diferentes tempos após irradiação UV (30 J/m^2). Enquanto que células U87MG (p53wt) são capazes de retomar a síntese de DNA 6 h após a irradiação, indicando que as lesões começam a ser removidas de seu genoma, células U138MG (p53mt) não apresentam recuperação, mesmo 24 h após a irradiação. A Figura 31B mostra os níveis de síntese de RNA após irradiação (30 J/m^2). O resultado é semelhante ao encontrado para a síntese de DNA, com as células U138MG (p53mt) sendo incapazes de recuperar os níveis de transcrição verificados no controle.

Figura 31: Efeito da irradiação UV nas sínteses de DNA (A) e RNA (B) em células de glioma. Células U87MG (p53wt; $\blacklozenge$ e linha contínua) e U138MG (p53mt; $\blacksquare$ e linha tracejada) foram irradiadas com 30 J/m^2 e diferentes tempos após essa irradiação (indicados nas figuras) eram marcadas com ^3H -metil-timidina (A) ou $[5-^3\text{H}]$ -uridina (B) por 1 h e recolhidas imediatamente para análise por cintilografia. A porcentagem das sínteses de DNA e RNA é dada em relação às amostras controle, que foram consideradas como 100%.

4.3.6 Apoptose induzida por luz UV é dependente da replicação do DNA lesado

Nosso trabalho anterior apontava uma dependência da replicação do DNA lesado no processo de apoptose por luz UV (BATISTA *et al.*, 2006). Para verificar se este fenômeno também ocorria na linhagem de glioma mutada em *p53*, células U138MG foram irradiadas (30 J/m^2) e mantidas em condições normais de crescimento ou em meio depletado de soro fetal bovino, reduzindo assim a velocidade do ciclo celular nessas células. Na Figura 32 observa-se o resultado deste experimento, mostrando que células mantidas na ausência de soro fetal bovino durante o período pós-irradiação são mais resistentes à indução de apoptose por luz UV.

Figura 32: Inibição da replicação em células de glioma irradiadas com luz UV. Células U138MG (p53mt) eram mantidas em condições normais de proliferação ou em meio de cultura sem soro fetal bovino. As amostras eram irradiadas com 30 J/m^2 e eram recolhidas para análise por citometria de fluxo 120 h após tratamento. As amostras sem soro eram mantidas nessa condição por todo o período pós-tratamento. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.3.7 Vias de apoptose após irradiação UV em células de glioma

Para verificar qual a via utilizada para execução de apoptose em células de glioma irradiadas com luz UV, células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas (30 J/m^2) e tiveram a via extrínseca de apoptose inibida, através da neutralização do receptor FAS com o uso de um anticorpo específico. Os resultados estão demonstrados na Figura 33A, onde pode ser observado que apesar de existir

uma ligeira diminuição dos níveis de apoptose encontrados na linhagem U87MG (p53wt) não existe nenhuma mudança na sensibilidade de células U138MG (p53mt). Para confirmar este resultado, as linhagens U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram transfectadas com um gene *FADD* (“FAS Associated Death Domain”) dominante-negativo (*DN-FADD*). Como *FADD* é a primeira molécula que se liga ao receptor FAS após a ativação deste, as células transfectadas com *DN-FADD* são incapazes de entrar em apoptose pela via extrínseca. Os resultados deste experimento estão mostrados na Figura 33B e confirmam que a inibição desta via em células de glioma mutadas em *p53* (U138MG) não altera a sensibilidade destas células à irradiação UV.

Figura 33: Inibição do receptor FAS em células de glioma irradiadas com luz UV. (A) Inibição farmacológica de FAS. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) eram irradiadas (30 J/m²) e recolhidas para análise por citometria de fluxo 120 h após. Onde indicado o receptor FAS era inibido com o uso de um anticorpo neutralizador. Amostras tratadas com 0,1 mM de TMZ são mostradas como controle positivo. (B) Células DN-FADD. Células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt) e as correspondentes U87DN-FADD e U138DN-FADD eram irradiadas (30 J/m²) e recolhidas para análise por citometria de fluxo 120 h após. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. (B) Interno: “western-blot” mostrando a eficiência da transfecção.

As proteínas responsáveis pela efetuação da via intrínseca de apoptose também foram analisadas. A Figura 34 mostra uma análise por “western-blot” de Bcl-2, Bax e Bak, a partir de extratos protéicos de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) irradiadas com 30 J/m² de UV. Na linhagem mutante (U138MG) observa-se uma degradação de Bcl-2, acompanhada pelo aumento na expressão de Bax e Bak, o que indica que estas células estão entrando em apoptose pela via intrínseca. Curiosamente, também nas células U87MG (p53wt) foi verificada a degradação de Bcl-2, no entanto, esta degradação não foi acompanhada pelo aumento na expressão de Bax e Bak.

Figura 34: Análise da expressão protéica de Bcl-2, Bax e Bak após irradiação UV. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram irradiadas com 30 J/m² de UV e tiveram seus extratos protéicos extraídos diferentes tempos após irradiação, conforme indicado na figura. A expressão relativa de Bcl-2, Bax e Bak nos diferentes tempos após UV foi calculada em relação à expressão nas amostras controle e normalizada em relação à expressão do controle endógeno ERK-2.

4.3.8 Indução de apoptose em células de glioma pelo UV-mimético cisplatina

A cisplatina é um agente quimioterápico citotóxico, usado no tratamento de diversos tumores, como pulmão, testículo e cabeça e pescoço (MASTERS *et al.*, 2003). Ao atingir o DNA celular, a cisplatina gera uma variedade de lesões, com destaque para os "crosslinks" de DNA intra-fita, ou seja, na mesma cadeia polinucleotídica. Por este fato, a cisplatina é considerada um UV-mimético, pois as principais lesões geradas pela luz UV são também intra-fita (CPDs e 6-4PPs). Além disso, assim como ocorre com a luz UV, as lesões geradas por cisplatina são também alvo de reparo pela via NER.

Devido a isso, surgiu a idéia de testar a sensibilidade de células de glioma selvagens e mutadas em p53 à cisplatina, no intuito de aproximar este projeto aos protocolos de quimioterapia. No entanto, a análise dos histogramas na Figura 35 mostra que, ao contrário do que ocorre com luz UV, as células U138MG (p53mt) são mais resistentes à indução de apoptose por cisplatina do que as células U87MG (p53wt).

Figura 35: Tratamento de células de glioma com cisplatina. As linhagens U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com diferentes concentrações de cisplatina, conforme indicado na figura. 120 h após o tratamento as células eram recolhidas e seu conteúdo genético era analisado por citometria de fluxo. M1 representa a população sub-G1, indicativa de apoptose. Os histogramas são representativos de três experimentos independentes.

4.4 Tratamento de células de glioma humano com os agentes cloroetilantes ACNU, BCNU e Fotemustina

A seqüência deste projeto estava baseada na busca por agentes quimioterápicos utilizados no tratamento atual de glioblastoma, que conseguissem eliminar a resistência que células de glioma mutadas para *p53* haviam apresentado frente ao tratamento com TMZ (ROOS *et al.*, 2007).

Agentes cloroetilantes induzem a formação de lesões do tipo O⁶-cloroetilguanina, que se não removidas sofrem rearranjos moleculares que levam a formação de ICLs no DNA. Conforme descrito na Introdução, a via de remoção desse tipo de lesão, apesar de ainda não completamente esclarecida, conta com a participação de pelo menos duas proteínas que fazem parte da via NER, XPF e ERCC1. Devido a isto, imaginamos que o tratamento com agentes cloroetilantes poderia levar a uma alta sensibilidade em células de gliomas mutadas em *p53*. Além disso, agentes cloroetilantes estão entre os mais utilizados nos protocolos atuais de terapia de gliomas, dentre eles ACNU, BCNU e Fotemustina. Portanto, esses agentes foram escolhidos para prosseguir o projeto.

4.4.1 Células de glioma mutadas em *p53* são mais sensíveis ao tratamento com ACNU, BCNU e Fotemustina.

O primeiro passo foi verificar se o tratamento com ACNU, BCNU e Fotemustina era de fato tóxico para células de glioma, e, principalmente, se células mutadas em *p53* apresentariam maior sensibilidade ao tratamento do que células selvagens para este gene. Na Figura 36 estão representadas as curvas de sobrevivência monoclonal para os três agentes (36A: ACNU; 36B: BCNU; 36C: Fotemustina). Como pode ser observado, as células U138MG (*p53*mt) são mais sensíveis do que as células U87MG (*p53*wt) ao tratamento com os três agentes testados.

Figura 36: Ensaio de sobrevivência clonogênica após tratamento de células de glioma com agentes cloroetilantes. Aproximadamente 1000 células U87MG (p53wt; $\blacklozenge$ e linha contínua) e U138MG (p53mt; $\blacksquare$ e linha tracejada) foram tratadas com diferentes concentrações de ACNU (A), BCNU (B) e Fotemustina (C) e cultivadas por 12 dias até a fixação. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

4.4.2 O⁶-cloroetilguanina induz apoptose e necrose em células de glioma humano mutadas em *p53*

O modo pelo qual agentes cloroetilantes induzem a morte celular em gliomas era largamente desconhecido no momento em que este projeto foi iniciado. Para descrever este processo, células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) tratadas com ACNU, BCNU e Fotemustina foram analisadas quanto à indução de apoptose. A análise da população sub-G1 diferentes tempos após tratamento (50 μM para ACNU e BCNU e 10 $\mu\text{g/ml}$ para Fotemustina) de células em crescimento exponencial mostram que tanto ACNU (Figura 37A) quanto BCNU (Figura 37B) e Fotemustina (Figura 37C)

induzem apoptose nestas células, apesar de esta ser uma resposta tardia, iniciando em 96 h e aumentando até 144 h após tratamento.

Figura 37: Análise da cinética de formação de população sub-G1 em células de glioma após tratamento com agentes cloroetilantes. Células U87MG (p53wt; ◆ e linha contínua), U138MG (p53mt; ■ e linha tracejada) e para (C) LN308 (p53mt; ● e linha tracejada) foram tratadas com 50 µM de ACNU (A), BCNU (B) e 10 µg/ml de Fotemustina (C) e analisadas por citometria de fluxo diferentes tempos (indicados na figura) após tratamento. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. A figura representa a média de três experimentos independentes.

O resultado também deixa claro que células U87MG (p53wt) são mais resistentes ao tratamento com os três agentes testados do que as células U138MG (p53mt) durante todo o período do experimento. As curvas dose-resposta para ACNU (Figura 38A) ou BCNU (Figura 38B) também confirmaram esta maior sensibilidade. No entanto, devido a dificuldades de obtenção da droga e de manuseio, foi decidido abandonar os experimentos com Fotemustina, passando a se trabalhar exclusivamente com ACNU e BCNU.

A **B**

Figura 38: Análise da população sub-G1 após tratamento de células de glioma com diferentes concentrações de ACNU e BCNU. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com diferentes concentrações de ACNU (A) e BCNU (B), conforme indicado nas figuras. 144 h após o tratamento as células eram recolhidas e analisadas por citometria de fluxo. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. A figura representa a média de três experimentos independentes.

Para confirmar o resultado anterior e para diferenciar entre morte celular apoptótica e necrótica foram realizados experimentos de citometria de fluxo com dupla marcação Anexina V-FITC/PI, após tratamento com diferentes concentrações de ACNU e BCNU. Esta técnica se baseia na ligação da Anexina V conjugada a FITC aos fosfolipídios fosfatidilserinas, que são externalizados em células que estejam no início do processo de apoptose. Logo, células viáveis são negativas tanto para Anexina V-FITC quanto para PI, células em apoptose são positivas tanto para Anexina V-FITC quanto para PI e células necróticas são negativas para Anexina-V-FITC, mas positivas para PI. A análise da fração apoptótica (Figura 39A para ACNU e 39B para BCNU) mostra que estes agentes induzem apoptose tanto em células U87MG (p53wt) quanto em células U138MG (p53mt) e confirmam que as células mutantes para *p53* são mais sensíveis ao tratamento do que as células selvagens. Surpreendentemente, a análise da fração necrótica (Figura 39C para ACNU e 39D para BCNU) mostra que somente células U138MG (p53mt) sofrem este tipo de morte celular, tanto após tratamento com ACNU quanto após tratamento com BCNU, indicando que a presença de *p53* funcional de alguma forma impede a sinalização para este tipo específico de morte celular.

4.4.3 *p53* aumenta a resistência de células de glioma ao tratamento com ACNU

Para verificar a ativação de *p53* após a formação de O⁶-cloroetilguanina no DNA, os níveis protéicos nucleares de *p53* foram analisados por “western-blot”, diferentes tempos após tratamento com ACNU (50 µM) em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt). Na Figura 40 verifica-se que *p53* é estabilizado já a partir de 24 h após o tratamento com ACNU em células U87MG (p53wt), e se mantém durante todo o período analisado. Conforme esperado, não foi detectado *p53* nuclear nas células U138MG (p53mt).

Figura 39: Análise de indução de apoptose e necrose por dupla marcação Anexina-V/PI após tratamento com ACNU e BCNU. (A-B) Análise específica da fração apoptótica de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) 144 h após tratamento com ACNU (A) ou BCNU (B). (C-D) Análise específica da fração necrótica de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) 144 h após tratamento com ACNU (C) ou BCNU (D). Os gráficos representam a média de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Figura 40: Estabilização de p53 após tratamento com ACNU. Localização nuclear de p53 em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) diferentes tempos (conforme indicado) após tratamento com ACNU 50 μ M. C representa o controle não tratado. ERK-2 é mostrado como controle endógeno de expressão.

Para confirmar que esta indução está relacionada com a resistência que estas células apresentam ao tratamento com ACNU e BCNU, células U87MG (p53wt) transfectadas com uma seqüência de siRNA específica para *p53* (U87sip53) foram tratadas com diferentes concentrações dos dois agentes. Os resultados foram comparados aos obtidos em células U87MG (p53wt) transfectadas com uma seqüência vazia (U87puro) e estão mostrados na Figura 41 (41A: ACNU; 41B: BCNU). Observa-se que o “knockdown” de *p53* aumenta a sensibilidade destas células frente aos dois agentes testados. Para corroborar ainda mais esta hipótese foram realizados experimentos onde o inibidor específico de p53 Pifithrin- α , era adicionado ao meio de cultura 1 h antes do tratamento com ACNU (Figura 41C). A análise do gráfico deixa claro que a adição de Pifithrin- α (30 μ M) aumenta a sensibilidade que células U87MG (p53wt) apresentam frente ao tratamento com ACNU. Como esperado, o uso de Pifithrin- α não influi na resposta das células U138MG (p53mt).

Figura 41: Inibição de p53 aumenta sensibilidade ao tratamento com ACNU e BCNU. (A-B) Indução de apoptose 144 h após tratamento com 50 μM de ACNU (A) ou BCNU (B) em células U87MG (p53wt) transfectadas com um vetor vazio (U87mock) ou com uma sequência de siRNA para p53 (U87sip53). (C) Análise de indução de apoptose 144 h após tratamento em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) após tratamento com ACNU 50 μM na presença ou ausência do inibidor de p53 Pifithrin- α (30 μM). População sub-G1 é indicativa de apoptose. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

4.4.4 MGMT impede a indução de apoptose por lesões cloroetilantes

Conforme descrito na Introdução, a enzima de reparo de DNA MGMT é capaz de remover o grupo cloroetil da molécula O⁶-cloroetilguanina e transferi-lo para si mesmo, impedindo a formação do ICL e a conseqüente indução de apoptose. Para demonstrar que o efeito tóxico de ACNU é devido à formação da lesão O⁶-cloroetilguanina, células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram transfectadas com a enzima MGMT (gerando respectivamente as linhagens U87MGMT e U138MGMT). A Figura 42 mostra que a presença de MGMT bloqueia praticamente por completo a indução de apoptose por ACNU, tanto em células U87MG (p53wt) quanto em células U138MG (p53mt). Como a ação de MGMT é específica para O⁶-cloroetilguanina, a proteção verificada pela presença desta molécula após tratamento com ACNU deixa claro que a formação desta lesão é o principal sinal para a indução de apoptose por este agente.

Figura 42: Influência de *MGMT* no tratamento por ACNU. Análise de apoptose induzida por ACNU 50 µM em células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt) e seus respectivos clones transfectados com *MGMT*, U87MGMT Clone 6 e U138MGMT Clone 1. 144 h após tratamento as células eram recolhidas para análise por citometria de fluxo. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. *Interno:* “western-blot” mostrando a eficiência da transfecção com *MGMT*. O gráfico representa a média de três experimentos independentes.

4.4.5 *p53* aumenta a eficiência de reparo de DNA em células de glioma

Tratamento com ACNU provoca o aparecimento de ICLs no DNA, aproximadamente de 8 a 12 h após adição da droga (BELJANSKI *et al.*, 2004). Como ICLs são fortes inibidores de replicação (MCHUGH *et al.*, 2001), o próximo passo foi verificar a síntese de DNA nas células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) tratadas com diferentes concentrações de ACNU (Figura 43). Utilizando o método de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), observa-se que 12 h após o tratamento existe um bloqueio na síntese de DNA tanto em células U87MG (p53wt; Figura 43A) quanto em células U138MG (p53mt; Figura 43B). Fica claro também células U87MG (p53wt) apresentam uma maior inibição na síntese de DNA. No entanto, 48 h após o tratamento observa-se que as células U87MG (p53wt) recuperaram deste bloqueio, com o nível de síntese de DNA similar ao de amostras controle (não tratadas). Já as células U138MG (p53mt) não foram capazes de recuperar os níveis de replicação, ao contrário, as medidas de síntese de DNA continuaram a diminuir. Para verificar se o bloqueio de replicação era de fato uma consequência da formação de ICLs gerados a partir da formação de O⁶-cloroetilguanina, o mesmo experimento foi realizado nas células transfectadas com *MGMT*. A Figura 43C mostra o resultado para as células U87MGMT (p53wt) e a Figura 43D mostra o resultado para as células U138MGMT (p53mt). Fica claro que a presença de *MGMT* evita o bloqueio da replicação em ambas as linhagens celulares, exceto na maior concentração testada (200 µM), o que é provavelmente explicado por insuficientes níveis de *MGMT* para lidar com a quantidade de lesões geradas por esta concentração.

Figura 43: Inibição da síntese de DNA após tratamento com ACNU em células de glioma. A quantificação da síntese de DNA foi feita através do método de incorporação de BrdU (ver Material e Métodos) em células U87MG (A), U138MG (B), U87MGMT (C) e U138MGMT (D). A análise foi feita 12 h e 48 h após tratamento com diferentes concentrações de ACNU (conforme indicado). Os valores são apresentados em relação às amostras controle (não tratadas). Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

A seqüência do projeto foi tentar verificar se a sensibilidade que células mutadas em *p53* apresentam à ACNU também estaria relacionada com uma menor eficiência na remoção de lesões no DNA. Para isso, iniciamos uma colaboração com o grupo do Prof. Alexander Burkle na Alemanha, com o intuito de verificar a quantidade de ICLs gerados pelo tratamento com 50 μ M de ACNU em células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt). A Figura 44 mostra este resultado, realizado pela técnica de FADU (“Fluorometric detected Alkaline DNA Unwinding”) automatizada e adaptada à lesões do tipo ICL. É importante mencionar que este resultado ainda é preliminar, sendo necessária ainda a sua confirmação. No entanto, a análise da figura indica que células U87MG (*p53*wt) possuem um número inicial maior de ICLs, mas estes são removidos após 48 h. Por outro lado, células U138MG (*p53*mt) apesar de apresentarem um número inicial menor de lesões, praticamente não são capazes de removê-las do DNA.

Figura 44: Remoção de ICLs do genoma após tratamento com ACNU. Células U87MG (*p53*wt) e U138MG (*p53*mt) eram tratadas com 50 mM de ACNU e recolhidas diferentes tempos após este tratamento, indicados na figura. O DNA destas células era então marcado com um intercalador de DNA (SybrGreen) irradiado com 16 Gy e submetido a análise por FADU. O gráfico representa um experimento feito em triplicata.

Uma segunda estratégia utilizada para verificar a eficiência de reparo foi a formação de DSBs, que são gerados durante o processamento de ICLs (SCHARER, 2005). Um dos métodos mais utilizados para a análise destas quebras é a fosforilação da histona H2AX (γ H2AX) (MOGI *et al.*, 2006). Devido a isso, os níveis de γ H2AX foram analisados diferentes tempos após tratamento com ACNU (50 μ M) nas células U87MG

(p53wt) e U138MG (p53mt). Na Figura 45 pode-se ver o resultado deste experimento, onde fica claro que nas células U87MG (p53wt) existe uma indução de γ H2AX a partir de 72 h após tratamento, seguida por uma redução, após 96 h e 120 h. Por outro lado, células U138MG (p53mt) apresentam níveis maiores de γ H2AX e esses níveis aumentam durante todo o período analisado, não apresentando a redução observada em células U87MG (p53wt).

Figura 45: Cinética de indução de γ H2AX após tratamento com ACNU em células de glioma. Análise por “western-blot” da fosforilação da histona H2AX em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) diferentes tempos (indicados na figura) após tratamento com 50 μ M de ACNU. C representa o controle não tratado. ERK-2 é mostrado como controle endógeno de expressão.

A fosforilação de H2AX foi também analisada por microscopia de fluorescência (Figura 46). Claramente as células U138MG (p53mt) apresentam um número de “foci” de γ H2AX maior do que células U87MG (p53wt). Este resultado é condizente com a idéia de que as células U87MG (p53wt) foram capazes de reparar as DSBs geradas durante o reparo dos ICLs, enquanto que as células U138MG (p53mt) não o foram.

Figura 46: Análise de γ H2AX por microscopia de fluorescência. (A-B) Imagens representativas de células U87MG (p53wt; A) e U138MG (p53mt; B) tratadas com ACNU 50 μ M. (C) Quantificação do número de "foci" de γ H2AX por microscopia de fluorescência em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) 72 h após tratamento com ACNU 50 μ M. Um mínimo de 40 células foi contado para cada condição (tratada ou não-tratada).

O efeito do tratamento com ACNU na regulação de genes da via de NER também foi investigado, por PCR semi-quantitativo, nas células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt), U87sip53 e U87MGMT tratadas com ACNU (Figura 47). De todos os genes testados, só é possível observar indução de expressão em *XPC* e *DDB2*. Esta indução foi tardia quando comparada à provocada pela luz UV (em torno de 0,5 h) ocorrendo somente 24 h após tratamento e foi específica para as células U87MG (p53wt), sendo atenuada nas células U87sip53 (que apresentam “knockdown” de *p53*). Não foi observada indução nas células U87MGMT, o que indica que a remoção imediata de O⁶-cloroetilguanina, impedindo a formação de ICLs, inibe a indução de genes de NER.

Figura 47: Expressão de genes de NER após tratamento com ACNU. Análise de RNAm de genes de NER (*csa*, *csb*, *ddb2*, *ercc1*, *xpa*, *xpc*, *xpd* e *xpg*) por PCR quantitativo em células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt), U87sip53 e U87MGMT 6 h e 24 h após tratamento com ACNU 50 μ M. GAPDH é mostrado como controle endógeno.

4.4.6 Apoptose induzida por ACNU é dependente da replicação do DNA lesado

Uma das hipóteses mais aceitas para a formação de DSBs durante o processamento de ICLs é de que são formadas durante a fase S do ciclo celular, quando a maquinaria de replicação é bloqueada pela presença da lesão (MCHUGH *et al.*, 2001). Uma consequência lógica disto seria uma maior resistência à tratamentos alquilantes em células que tenham sua proliferação inibida, impedindo o encontro da maquinaria de replicação com o ICL. Devido a isso, o conteúdo sub-G1 após tratamento com ACNU foi comparado entre células U138MG (p53mt) em condições normais de crescimento ou com sua replicação inibida (mantidas em meio de cultura depletado de soro fetal bovino). Na Figura 48 pode-se observar que as células que tiveram sua replicação inibida foram mais resistentes à indução de apoptose por ACNU (50 μ M), quando comparadas as células em proliferação. Este resultado é uma forte indicação de que as DSBs geradas durante a fase S do ciclo celular são o principal fator indutor de apoptose após tratamento com ACNU.

Figura 48: Inibição da replicação em células de glioma tratadas com ACNU. Células U138MG (p53mt) eram mantidas em condições normais de proliferação ou então em meio de cultura sem soro fetal bovino. As amostras eram tratadas com 50 μ M de ACNU e recolhidas para análise 120 h depois. As amostras sem soro eram mantidas nessa condição por todo o período pós-tratamento. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. O gráfico representa a média de um experimento feito em duplicata.

4.4.7 ACNU ativa as vias extrínseca e intrínseca de apoptose em células de glioma

A próxima questão a ser respondida era qual a via de apoptose utilizada pelas células de glioma após tratamento com ACNU. Para isso, foram utilizadas as linhagens U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) transfectadas com gene *FADD* dominante-negativo (DN-FADD). A Figura 49 mostra que células U87DN-FADD são mais resistentes (em torno de 40%) à indução de apoptose por ACNU (50 μ M) em relação a sua linhagem parental. Já para as células U138MG (p53mt) não há diferenças observáveis, indicando que somente em células selvagens para *p53* existe a sinalização de apoptose pela via extrínseca após tratamento com ACNU.

Figura 49: Tratamento de células DN-FADD com ACNU. Células U87MG (p53wt), U138MG (p53mt) e as correspondentes U87DN-FADD e U138DN-FADD foram tratadas com 50 mM de ACNU e recolhidas para análise por citometria de fluxo 144 h após tratamento. A população sub-G1 é indicativa de apoptose. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes.

Em relação à expressão das proteínas reguladoras da via intrínseca de apoptose (Figura 50), pode-se observar que em ambas as linhagens celulares existe um aumento na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, seguido por uma forte degradação desta proteína após 24 h do tratamento com ACNU 50 μ M. Em relação à expressão das proteínas pró-apoptóticas, verifica-se um aumento na expressão de Bax nas duas

linhagens estudadas, enquanto que não foi observada nenhuma variação na expressão de Bak.

Figura 50: Papel da via intrínseca de apoptose após tratamento com ACNU em células de glioma. Análise por “western-blot” da expressão de Bcl-2, Bax e Bak diferentes tempos após tratamento com ACNU 50 μ M em células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt). C representa o controle não tratado. ERK-2 é mostrado como controle endógeno de expressão.

As vias de apoptose utilizadas após tratamento com ACNU foram também estudadas pelo perfil de ativação das caspases iniciadoras –8 (envolvida na via extrínseca) e –9 (envolvida na via intrínseca). Na Figura 51A observa-se que em células U87MG (p53wt) existe ativação de caspase-8 e –9, enquanto que em células U138MG (p53mt) somente caspase-9 é ativada. Foi verificado também o perfil de ativação das caspases efetuatoras –3 (Figura 51A) e –7 (Figura 51B). Observa-se que existe ativação de caspase-3 nas duas linhagens celulares, enquanto que ativação de caspase-7 somente foi verificada na linhagem mutante U138MG.

A

B

Figura 51: Atividade de caspase-3, -7, -8 e -9 após tratamento com ACNU. (A) Análise da ativação das caspases-3 -8 e -9. Células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) foram tratadas com 50 μ M de ACNU e 96 h após eram recolhidas e tinham suas atividades de caspase analisadas por uso de kit específico. O valor é dado em relação à atividade encontrada em amostras controle (que foram consideradas com valor 1). U.A: Unidades Arbitrárias. O gráfico representa a média de três experimentos independentes. (B) Verificação de ativação de caspase-7. Diferentes tempos após tratamento de células U87MG (p53wt) e U138MG (p53mt) com 50 mM de ACNU os extratos protéicos eram extraídos e analisados por “western-blot” com anticorpo específico contra a forma ativa de caspase-7. ERK-2 é mostrado como controle endógeno de expressão.

5 Discussão

5.1 Apoptose induzida por luz UV é dependente da replicação do DNA lesado

Apesar de ser amplamente aceito que a luz UV induz a morte celular por apoptose em células de mamíferos, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não estão completamente esclarecidos. É bem estabelecido que a geração de fotoprodutos após a irradiação age como o sinal inicial para a sinalização para este evento, visto que células deficientes em NER são extremamente sensíveis à indução de apoptose por luz UV (COSTA *et al.*, 2003; LEHMANN, 2003). Além disso, a rápida remoção de fotoprodutos, tanto de CPDs quanto de 6-4 PPs em células provenientes de pacientes com xeroderma pigmentosum é capaz de impedir a sinalização para apoptose em células irradiadas com luz UV (CHIGANCAS *et al.*, 2004; LIMA-BESSA *et al.*, 2008). Por isso, a indução de apoptose por luz UV está relacionada à presença de fotoprodutos não-reparados na molécula de DNA, que acarretariam em eventos secundários capazes de levar a indução de morte celular. Os fotoprodutos funcionam, portanto, como lesões primárias, que precisam ser reconhecidas ou de alguma forma processadas para exercerem seus efeitos citotóxicos. Neste sentido é bem demonstrado que o bloqueio que essas lesões causam à maquinaria de transcrição e a conseqüente inibição da síntese de RNA é um forte indutor de apoptose (LJUNGMAN *et al.*, 1996). Corroborando essa hipótese, a fotorreativação da transcrição após UV correlaciona com a inibição da sinalização para apoptose mesmo em células deficientes em NER (CHIGANCAS *et al.*, 2002). Vale ressaltar que células deficientes em TCR são mais sensíveis à indução de apoptose por luz UV do que células deficientes em GGR (LJUNGMAN *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho era verificar se a replicação do DNA lesado também funciona como um sinal para a indução de apoptose por luz UV. Para tanto, utilizou-se o inibidor de replicação afidicolina em células CHO selvagens e mutadas no gene de reparo *XPB* irradiadas com luz UV (BATISTA *et al.*, 2006). Esta droga se mostrou extremamente eficiente em inibir a síntese de DNA, ao mesmo tempo em que não

interferia na síntese de RNA tornando-se, portanto, numa excelente ferramenta para o estudo. O uso da afidicolina permitiu também o estudo de células sincronizadas no ciclo celular, irradiando especificamente nas fases G1, S ou G2. Estes experimentos demonstraram que a indução de apoptose por luz UV é independente da fase em que se irradiam as células. É importante mencionar que nestes experimentos, independente da fase do ciclo na qual as células foram irradiadas, elas ciclavam normalmente até atingir a fase S do ciclo celular seguinte, pois no período pós-irradiação (48 h), a afidicolina era retirada do meio de cultura. Ao contrário, quando células CHO-9 eram irradiadas em crescimento exponencial e a afidicolina era adicionada ao meio somente no período pós-UV, existia uma inibição significativa de células em apoptose. Este resultado é uma forte indicação de que se a forquilha de replicação não é bloqueada por fotoprodutos, a sinalização para apoptose é inibida. A verificação de apoptose foi feita por fragmentação do DNA e por análise de características morfológicas específicas deste tipo de morte celular. Surpreendentemente, este resultado também foi observado em células mutadas no gene *XPB*, incapazes de remover fotoprodutos de seu genoma. Ou seja, a inibição da replicação do DNA lesado é capaz de impedir a sinalização para apoptose mesmo que as lesões não sejam removidas do genoma. Isso significa que a inibição da replicação não está atuando apenas de maneira passiva, permitindo que a maquinaria de reparo remova as lesões, mas de maneira ativa, impedindo de alguma forma o processamento de fotoprodutos em lesões mais tóxicas ao metabolismo celular (vale ressaltar que nestes experimentos as células foram mantidas em cultura por até 72 h após a irradiação UV). De acordo com estes resultados, foi verificado que o encontro da forquilha de replicação com lesões do tipo fotoprodutos induz a formação de DSBs no genoma de células irradiadas com luz UV (DUNKERN *et al.*, 2002). Corroborando esta hipótese, foi demonstrado que após irradiação UV existe uma grande indução de γ H2AX (um marcador de DSBs) durante a progressão pela fase S do ciclo celular (HALICKA *et al.*, 2005). Os autores deste trabalho viram ainda que o tratamento com afidicolina inibe a formação de γ H2AX, o que indica que a proteção à indução de apoptose conferida pela afidicolina se deve a inibição da formação de DSBs no momento do encontro da forquilha de replicação com o fotoproduto. É importante

ressaltar que DSBs são lesões extremamente tóxicas e agem como forte indutoras de apoptose em diversos modelos celulares (LIPS *et al.*, 2001).

Mas como conciliar estes resultados com os dados que mostram que o bloqueio de transcrição é o sinal preponderante levando a morte celular após irradiação UV? Buscando responder a esta pergunta Ljungman e Lane (2004) propuseram a “hipótese das colisões”, onde argumentam que o número de colisões que normalmente se observa entre as maquinarias de replicação e de transcrição em células de mamíferos (MCGLYNN *et al.*, 2002), seria extremamente aumentado pelo bloqueio da maquinaria de transcrição por fotoprodutos durante a fase S do ciclo celular. Esse aumento das colisões seria então o responsável pela indução de apoptose; até ao momento não existem dados experimentais que confirmem esta hipótese.

Apesar de outras publicações indicarem que a replicação do DNA lesado poderia estar envolvida com a sinalização para apoptose (DUNKERN *et al.*, 2002; MCKAY *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003), este trabalho foi o primeiro a estudar diretamente este tópico, com o uso de um inibidor específico de replicação. Os eventos responsáveis por estes fenômenos ainda permanecem parcialmente desconhecidos, necessitando-se de novas abordagens técnicas para esclarecer esta questão.

5.2 *p53* sensibiliza a indução de apoptose por TMZ em células de glioma

Pacientes sofrendo de GBM apresentam péssimo prognóstico, com tempo médio de sobrevida após diagnóstico de aproximadamente um ano. A terapia atual consiste de cirurgia e radioterapia acompanhada de tratamento com agentes alquilantes, como a TMZ, e cloroetilantes, como ACNU, BCNU e Fotemustina (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2006). Atualmente e no futuro o uso de TMZ e de outros agentes metilantes deverá se tornar o mais indicado, devido à facilidade de administração pela via oral e pela baixa toxicidade se comparado ao tratamento com agentes cloroetilantes (NAGASUBRAMANIAN *et al.*, 2003). Recentemente, um meta-estudo envolvendo 573 pacientes provenientes de 85 centros de tratamento indicou

pela primeira vez que o tratamento com TMZ traz uma significativa melhora no tratamento de pacientes com GBM recém-diagnosticado (STUPP *et al.*, 2005). Este foi também o primeiro estudo que demonstrou que o tratamento com agentes quimioterápicos associados à radioterapia acarreta em aumento da sobrevida média dos pacientes, quando comparado a pacientes tratados somente por radioterapia. Isto levanta a questão de como a TMZ exerce esse efeito. No entanto, o mecanismo de ação desse agente não está totalmente elucidado em células de glioma.

O objetivo deste trabalho foi o de elucidar o modo como TMZ e MNNG (que agem da mesma forma) induzem a morte celular em gliomas (ROOS *et al.*, 2007). O primeiro ponto que vale mencionar foi o fato da indução de morte celular por esses agentes ter sido uma resposta extremamente tardia em nossas células de glioma, ocorrendo de cinco a seis dias após o tratamento. Muito provavelmente este longo tempo para ocorrência de morte celular é o responsável por trabalhos de outros grupos indicarem que TMZ não induz apoptose em células de glioma (HIROSE *et al.*, 2001; KANZAWA *et al.*, 2004). A principal lesão indutora de morte celular em células tratadas com agentes metilantes é a O⁶-MeG (KAINA *et al.*, 1991). Confirmando isto, a transfecção de *MGMT*, responsável pelo reparo de O⁶-MeG, inibiu por completo a indução de apoptose em nossas células (ROOS *et al.*, 2007). Esse resultado indica também que a atividade de *MGMT* pode ser tida como um fator preditivo da eficácia de tratamento de GBM com TMZ.

No entanto, o ponto de maior interesse do trabalho veio da constatação que células de glioma selvagens para *p53* são significativamente mais sensíveis à indução de apoptose por TMZ, quando comparadas a células com *p53* mutado ou inibido. Esta maior sensibilidade de células *p53*wt foi confirmada pelo uso de diferentes células, pela inibição de *p53* por RNAi e pela inibição farmacológica de *p53* com a droga Pifithrin- α . Como as células mutadas em *p53* também sofreram apoptose após tratamento com TMZ (embora tenham apresentado níveis reduzidos desse tipo de morte celular) podemos concluir que, apesar de *p53* não ser absolutamente necessário para a indução de morte após tratamento com este agente, sua presença sensibiliza células de glioma à indução desta resposta. Este é um resultado extremamente relevante para o tratamento de GBM humano, visto que o gene *p53* é um dos mais freqüentemente alterados neste tipo de tumor (ISHII *et al.*, 1999; OHGAKI *et al.*, 2005).

O próximo passo foi verificar como a presença de *p53* sensibiliza células ao tratamento com TMZ. Análises de expressão protéica mostraram que *p53* é estabilizado no núcleo a partir de 72 h após tratamento. Essa estabilização é acompanhada por um acentuado aumento na expressão do “receptor de morte” FAS/CD95, especificamente em células selvagens para *p53*. Para comprovar que este aumento na expressão de FAS em células *p53*wt era responsável pela maior sensibilidade à indução de morte celular, a via extrínseca de apoptose foi inibida farmacologicamente pelo tratamento com um anticorpo neutralizador e também pela transfecção de um gene capaz de expressar uma molécula de FADD dominante-negativa. Em ambas as técnicas, houve uma significativa redução de células apoptóticas na linhagem selvagem para *p53*. Nas células mutantes, a inibição da via de FAS não acarretou em nenhuma diferença na sensibilidade frente à TMZ. Confirmando estes resultados, a caspase-8, específica da via extrínseca, só foi ativada em células selvagens para *p53* e não em células mutadas neste gene. Por outro lado, em células mutadas em *p53* foram observadas características específicas da via intrínseca de apoptose, como degradação de Bcl-2 e ativação de caspase-9 (ROOS *et al.*, 2007). A análise destes dados permite concluir que *p53* sensibiliza células de glioma à indução de apoptose por TMZ pela ativação da via extrínseca de apoptose, enquanto que células mutadas neste gene, apesar de não apresentarem elevados níveis de morte após tratamento, o fazem pela via intrínseca de apoptose. A Figura 52 descreve um modelo de indução de apoptose por TMZ em células de glioma.

PARP-1 é uma enzima nuclear cuja ativação é dependente de quebras no DNA (BENEKE *et al.*, 2004). Quando ativada, PARP-1 liga-se ao DNA transferindo grupos de (ADP)ribose para si mesmo ou para outras proteínas nucleares como histona e DNA polimerases, numa reação dependente de NAD⁺. Uma vez ativada, PARP-1 possui diversos efeitos biológicos como facilitar o reparo de quebras ao DNA, auxiliar a via de reparo BER, regulação de transcrição e replicação ou mesmo indução de morte celular (BOUCHARD *et al.*, 2003). Devido a sua participação em vias de reparo de DNA, surgiu a hipótese de que a inibição de PARP-1 poderia aumentar a eficácia de agentes quimioterápicos, por dificultar a remoção das lesões geradas por estes em células tumorais (TENTORI *et al.*, 2002). Nos últimos anos a descoberta de inibidores específicos de PARP-1 foi alvo de diferentes estudos, que comprovaram o aumento da

eficácia de diferentes agentes quimioterápicos, inclusive a TMZ (CURTIN, 2005; ZAREMBA *et al.*, 2007). Com base nessas informações, PARP-1 teve a sua atividade inibida em células de glioma tratadas com TMZ. Esta inibição acarretou em um aumento da eficácia da TMZ, porém, novamente, somente em células selvagens para *p53*. A provável explicação para o aumento da eficácia de TMZ em células *p53wt* com atividade de PARP-1 inibida é a dependência da replicação do DNA lesado para indução de apoptose. Isso porque foi verificado que no momento da replicação do DNA lesado por TMZ existe a indução de DSBs nas células *p53wt*, que agem como a principal lesão sinalizando para apoptose (ROOS *et al.*, 2007). Como PARP-1 é ativada pela presença dessas DSBs, ela provavelmente está envolvida no reparo dessas lesões, motivo pelo qual a inibição de sua atividade aumenta a sensibilidade destas células à apoptose. No entanto, novos experimentos são necessários para comprovar esta hipótese.

Figura 52: Modelo de indução de apoptose por TMZ em células de glioma. O modelo, construído principalmente a partir de dados gerados nesta tese, está descrito em detalhes na Discussão e em Roos *et al*, (2007).

5.3 Minando a resistência: fotoprodutos induzem apoptose em células de glioma mutadas em *p53*

Os resultados obtidos com TMZ imediatamente levantam a hipótese de que o tratamento com este agente seleciona células mutadas em *p53*, o que pode levar ao aparecimento de tumores recorrentes, que seriam então irresponsivos ao mesmo tratamento. O próximo passo do projeto era tentar induzir apoptose em células de glioma mutadas em *p53*. Se após tratamento com TMZ, *p53* sensibilizava as células devido a sua função pró-apoptótica, a estratégia agora era o de tentar sensibilizar células mutadas em *p53*, buscando lesões cujo reparo fosse mais eficaz na presença de *p53* funcional. Conforme descrito na Introdução, a via de reparo NER é influenciada por *p53*, pois este controla não só a expressão de XPC e DDB2, proteínas pertencentes à via GGR do NER (FORD, 2005), mas também facilita o acesso das enzimas de reconhecimento do dano ao sítio da lesão, através do relaxamento da cromatina (ALLISON *et al.*, 2004).

Os resultados mostram que a geração de fotoprodutos por luz UV funciona como um forte indutor de apoptose em células de glioma mutadas em *p53*. A maior sensibilidade que células com *p53* comprometido apresentam à indução de apoptose por luz UV foi confirmada por diferentes métodos. Primeiramente foram realizados experimentos em diferentes pares de células de glioma (mutados ou não em *p53*). Foram também realizados experimentos com células selvagens expressando uma sequência de siRNA para *p53*, que apresentaram uma sensibilidade maior do que células *p53*wt, mas menor do que células mutadas em *p53*. Outra estratégia foi a inibição farmacológica de *p53*, que também acarretou em aumento da sensibilidade de células *p53*wt à indução de apoptose por luz UV. Já a estratégia inversa, a transfecção de *p53* selvagem em células mutadas neste gene não surtiu efeito, ou seja, não aumentou a resistência frente à luz UV. Isto se deve provavelmente ao fato de *p53* agir como um tetrâmero, e mesmo com moléculas funcionais dessa proteína, ainda existe a chance de moléculas mutadas interferirem na ligação ao DNA (vale lembrar que a linhagem utilizada U138MG não é deletada em *p53*, somente mutada, apresentando alta expressão desta proteína que é seqüestrada no citoplasma). O perfil apoptótico também foi confirmado de diferentes maneiras, como análise de fragmentação de

DNA por citometria, teste TUNEL e ativação de caspases. Os resultados indicam que o tipo de morte celular observada é de fato apoptose.

A seguir foi verificado se a sensibilidade que células de glioma apresentam à luz UV é decorrente de uma menor eficiência da via NER. Experimentos de análise protéica mostram que existe uma rápida estabilização de p53 após irradiação UV, seguida de uma rápida degradação dessa proteína, o que indica a participação desta proteína em um evento imediato da resposta ao dano, como por exemplo, o reparo de DNA. Experimentos de “dot-blot” utilizando anticorpo específico para CPDs confirmaram esta hipótese, já que em células onde p53 se encontra mutado ou mesmo inibido por siRNA, existe uma menor eficiência na remoção dessas lesões, que permanecem na dupla-hélice mesmo após 24 h da irradiação. Já em células selvagens para p53, após 8 h da irradiação já se observa uma significativa redução na quantidade de lesões e 24 h após essas lesões já foram completamente removidas. Como CPDs são as principais lesões geradas por luz UV (MITCHELL, 1988) e p53 não influencia o reparo de lesões do tipo 6-4 PP (EL-MAHDY *et al.*, 2000), pode-se concluir que a baixa eficiência na remoção de CPDs após irradiação UV é o principal motivo levando à sinalização para apoptose em células de glioma mutadas em p53. Apesar de células mutadas em p53 não apresentarem aumento na expressão dos genes de NER XPC e DDB2 após irradiação UV, os resultados aqui mostrados não permitem concluir que este é o motivo por trás da menor eficiência na remoção de lesões do tipo CPD nestas células. Isso não só por já ter sido demonstrado que baixas concentrações das enzimas de NER são suficientes para remoção de lesões (MUOTRI *et al.*, 2002), mas também por haver evidências de que a diminuição na eficiência da remoção de CPDs em células mutadas em p53 está também relacionada à inibição da acetilação de histonas após luz UV, o que prejudica o acesso das proteínas de reparo aos sítios de lesão, visto que nessas condições não ocorre o relaxamento da cromatina após irradiação (RUBBI *et al.*, 2003). Como p53 atua principalmente em GGR (COSTA *et al.*, 2003), pode-se concluir que a sensibilidade destas células frente à luz UV deve-se à presença de lesões na fita não transcrita do DNA. Essa hipótese é corroborada pela alta inibição de síntese de DNA em células mutadas em p53 após irradiação UV. Enquanto que em células selvagens para este gene verifica-se uma recuperação da síntese de DNA a partir de 6 h após a irradiação (aproximadamente o mesmo período que se observa a remoção de

CPDs pelos experimentos de “dot-blot”), células mutadas são incapazes de recuperar a síntese de DNA mesmo 24 h após a irradiação. Além disso, quando mantidas em condições de baixa proliferação celular (depleção de soro fetal bovino do meio de cultura), estas células apresentam uma proteção à indução de apoptose por luz UV. Este resultado, que corrobora nosso trabalho anterior (BATISTA *et al.*, 2006), aponta para um papel de lesões presentes na fita não-transcrita do DNA como importantes sinais indutores de apoptose por luz UV.

No entanto, os resultados de síntese de RNA após irradiação UV vão contra a hipótese de que seria uma deficiência em GGR, e não em TCR, a responsável pela sinalização para apoptose em células mutadas em *p53*. Isso porque essas células não apresentam recuperação na síntese de RNA após UV, o que seria esperado se TCR estivesse funcionando normalmente. Os resultados apresentados aqui não permitem concluir os motivos responsáveis por essa “contradição”. No entanto é tentador especular que *p53* poderia também de alguma forma regular o reparo de CPDs na via TCR, o que na verdade foi recentemente proposto em células humanas irradiadas com luz UV (DREGOESC *et al.*, 2007).

Apesar de resistentes à indução de apoptose por TMZ, células mutadas em *p53* também induziam esta resposta após tratamento. Cabe ressaltar que o faziam pela via mitocondrial de apoptose. Imaginamos, portanto, que para um agente genotóxico ser capaz de induzir altos níveis de apoptose nestas células, teria de ser capaz de ativar essa via mais eficientemente. Esse foi o caso com a luz UV. Além da inibição da via extrínseca (tanto por inibição farmacológica quanto por uso de células DN-FADD) não ter acarretado em nenhuma diferença na sensibilidade destas células, diversas características específicas da via mitocondrial foram observadas após irradiação UV. Entre elas a degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e o aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Como a concentração destas proteínas no citoplasma é que determina a execução de apoptose pela via mitocondrial (SPIERINGS *et al.*, 2005), pode-se concluir que é por esta via que células de glioma mutadas em *p53* executam o processo de morte celular. Curiosamente, células selvagens para *p53* também apresentaram degradação de Bcl-2, porém esta degradação não foi acompanhada de um aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas. Esta degradação pode ter sido ativada pela presença de fotoprodutos no genoma celular,

mas como estes foram rapidamente removidos, não houve a indução de Bax e Bak, impedindo desta maneira a permeabilização da membrana externa da mitocôndria. Na Figura 53 está esquematizado um modelo com as principais observações descritas nesta tese sobre a indução de apoptose por luz UV em células de glioma.

Apesar da luz UV não ser uma alternativa viável para o tratamento de gliomas em pacientes humanos, o conhecimento que um diferente tipo de lesão pode sensibilizar células irresponsivas a tratamentos clássicos como a TMZ poderia ter implicações para o tratamento de GBM. Para avaliar esta hipótese, foi utilizado um “UV-mimético”, ou seja, um agente genotóxico capaz de induzir lesões semelhantes à luz UV, reparadas pela via NER. Um destes agentes é a cisplatina, que assim como luz UV, gera lesões intra-fita no DNA que são alvo de reparo pela via NER (JAMIESON *et al.*, 1999). No entanto, o tratamento com cisplatina mostrou-se mais tóxico em células selvagens para *p53* do que em células mutadas neste gene (ao contrário da luz UV). Uma possível explicação para isso é o fato da cisplatina ser capaz de ativar quinases de estresse, como por exemplo a JNK, independente da geração de danos ao DNA (FRITZ *et al.*, 2006). Curiosamente, outro grupo, trabalhando com a mesma linhagem, U87MG (*p53*wt), mostrou que a inibição farmacológica de *p53* por transfecção de oligonucleotídeos “antisense” aumentava a sensibilidade dessas células ao tratamento com cisplatina (DATTA *et al.*, 2004). Isso implica na constatação que o efeito de cisplatina em células de glioma permanece fundamentalmente desconhecido, e novos experimentos devem ser realizados para esclarecer esta questão.

Figura 53: Modelo de indução de apoptose por irradiação UV em células de glioma. O modelo, construído principalmente a partir de dados gerados nesta tese, está descrito em detalhes na Discussão.

5.4 Células de glioma mutadas em *p53* apresentam elevada sensibilidade ao tratamento com agentes cloroetilantes

A quimioterapia para pacientes com GBM se baseia atualmente no uso de agentes metilantes e também cloroetilantes. Destes, os mais utilizados são o ACNU, o BCNU e a Fotemustina (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2006). O próximo passo do projeto foi verificar a sensibilidade de células de glioma frente ao tratamento com esses agentes (BATISTA *et al.*, 2007). Embora a farmacocinética destes agentes seja ligeiramente diferente, eles são molecularmente similares, induzindo como principal lesão indutora de morte celular a O⁶-cloroetilguanina (KAINA *et al.*, 1991; LUDLUM, 1997). Esta lesão é altamente instável, sofrendo uma série de rearranjos moleculares que culminam na formação de ICLs na estrutura do DNA. Apesar de estes ICLs serem considerados a principal lesão responsável pelos efeitos citotóxicos destes agentes, o seu modo de ação ainda é desconhecido (KAINA *et al.*, 2007).

Surpreendentemente, ensaios de sobrevivência monoclonal mostraram que células mutadas em *p53* são mais sensíveis ao tratamento com estes agentes (ACNU, BCNU e Fotemustina) do que células selvagens para este gene. Analisando essa sensibilidade mais detalhadamente, verificou-se que estes agentes induzem níveis mais elevados de apoptose em células mutadas em *p53* do que em células selvagens. Foi verificado também que em células mutadas em *p53* existia uma significativa indução de necrose após tratamento (responsável por aproximadamente 50% do total de morte celular), fenômeno que não era observado em células selvagens em *p53*. Este é um fato incomum e não havia sido reportado para TMZ, que induz morte celular exclusivamente por apoptose (ROOS *et al.*, 2007). A inibição de *p53* em células selvagens acarreta em um aumento na sensibilidade destas células frente ao tratamento com ACNU ou BCNU. Esta inibição foi alcançada tanto farmacologicamente (pelo uso de Pifithrin- α) como também pela utilização de células expressando uma sequência de siRNA específica para *p53*. Com estes resultados pode-se concluir que a presença de *p53* funcional de alguma forma reduz a sinalização para morte celular, tanto apoptose quanto necrose, em células de glioma tratadas com agentes cloroetilantes. A importância de *MGMT* foi verificada através do uso de células transfectadas com este gene. Nestes experimentos foi verificado que a morte celular induzida por ACNU e BCNU não ocorre em células com atividade de *MGMT*. Isso

significa que a presença de O⁶-cloroetilguanina é o principal sinal para a indução dos efeitos citotóxicos destes agentes. Mais que isso, o drástico efeito de *MGMT* após tratamento com TMZ e ACNU comprova que esta proteína é uma das principais responsáveis pela resistência de células tumorais contra diferentes protocolos quimioterápicos. Devido a isso, a inibição desta enzima de reparo é um procedimento relativamente comum, através da administração do seu inibidor específico O(6)-benzilguanina. Recentemente uma técnica de administração local de O(6)-benzilguanina foi utilizada em pacientes de GBM, concomitante com o uso de TMZ (KOCH *et al.*, 2007). Apesar de não haver comprovação que esta técnica inibe a atividade de *MGMT* em células tumorais, o simples fato de se conseguir realizar este procedimento pode trazer benefícios futuros para o tratamento de gliomas.

A análise protéica da estabilização nuclear de p53 mostrou que 24 h após o tratamento, já existe um pronunciado acúmulo desta proteína no núcleo de células selvagens tratadas com ACNU. Vale lembrar que após tratamento com TMZ o tempo de estabilização de p53 foi de 72 h e após irradiação UV foi de apenas 2 h. Essa diferente cinética de estabilização reflete o diferente papel que p53 desempenha após cada um destes tratamentos. Após UV, p53 estava envolvido no reparo de lesões, enquanto que após tratamento com TMZ p53 estava envolvido na indução de apoptose pela via extrínseca. O tempo de estabilização encontrado após tratamento com ACNU e a resistência de células selvagens ao tratamento, indicam que p53 deve agir na resposta inicial à presença de ICLs no genoma, que são formados aproximadamente 12 h após a indução de O⁶-cloroetilguanina (MCHUGH *et al.*, 2001). Como são fortes inibidores de replicação, um método indireto para a verificação da presença de ICLs no genoma é a quantificação da síntese de DNA. Por incorporação de BrdU, um análogo de timina, verificou-se que células selvagens em p53 possuíam significativa redução da síntese de DNA 12 h após tratamento com ACNU. No entanto, 48 h após o tratamento, a síntese de DNA nestas células já havia voltado ao nível encontrado em amostras não tratadas, uma o que indica que as lesões que bloqueavam a forquilha de replicação não estão mais presentes no genoma. Por outro lado, células mutadas em p53 não apresentavam bloqueio de replicação tão acentuado 12 h após tratamento. No entanto, 48 h após tratamento, a síntese de DNA havia diminuído ainda mais, ou seja, as células mutadas ainda possuíam lesões capazes de

bloquear a síntese de DNA em seu genoma. Como os ICLs são gerados a partir da lesão inicial O⁶-cloroetilguanina, foi verificado se células com atividade de *MGMT* também sofrem bloqueio na síntese de DNA após tratamento com ACNU. Conforme esperado, estas células não sofrem bloqueio nesse bloqueio replicação, pois removem as lesões do tipo O⁶-cloroetilguanina antes destas serem transformadas em ICLs. Somente na concentração mais alta de ACNU testada, 200 µM, é que essas células apresentaram bloqueio, provavelmente devido à quantidade insuficiente de *MGMT* para lidar com as lesões geradas.

Será que esta recuperação da síntese de DNA estaria relacionada com uma maior capacidade de reparo de ICLs em células selvagens para *p53*? Para responder a essa pergunta, foi iniciada uma colaboração com o grupo do Prof. Burkle na Alemanha. O grupo do Prof. Burkle quantificou especificamente o número de ICLs presente no genoma de células de glioma após tratamento com ACNU. Esses experimentos, apesar de ainda necessitarem de confirmação, mostraram que apesar de células selvagens para *p53* possuírem um maior número inicial de ICLs, após 48 h do tratamento a quantidade de ICLs já estava significativamente menor. Este resultado corrobora com o que havia sido observado nos experimentos de incorporação de BrdU. Por outro lado, células mutantes em *p53* possuíam um número menor de ICLs formados inicialmente, mas estes ICLs não eram removidos do genoma mesmo 48 h após o tratamento. Estes resultados indicam que *p53* pode estar envolvido no reparo de ICLs em células de glioma. Conforme descrito na Introdução, durante o reparo de ICLs existe a formação de DSBs como intermediários no processo (MCHUGH *et al.*, 2001). Logo, em células onde existe a remoção de ICLs deve existir um acúmulo inicial de DSBs, seguido por uma redução, significando que a lesão foi reparada. Um dos métodos mais utilizados para a análise destas quebras é a fosforilação da histona H2AX (γ H2AX) (MOGI *et al.*, 2006). Com esta técnica verificou-se que em células *p53* selvagens existe um acúmulo de γ H2AX (até 72 h), seguido por uma redução na quantidade destas lesões. Ao contrário, em células mutadas em *p53* existe também um acúmulo de DSBs, mas esse acúmulo é constante durante todo o período analisado. Estes experimentos foram feitos por análise de expressão por “western-blot” e por microscopia de fluorescência. Para o nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se relaciona *p53* ao reparo de ICLs em células humanas. A observação que células com o ciclo celular inibido são mais

resistentes ao tratamento com ACNU indica que os DSBs gerados durante a fase S são potencialmente as lesões responsáveis pela sinalização para apoptose nessas células. O próximo passo foi descobrir quais os genes de reparo que *p53* poderia estar modulando. Para isso, foi feita uma análise por RT-PCR dos genes envolvidos na via NER em células selvagens para *p53*, mutantes, inibidas por siRNA e transfectadas com *MGMT*. De todos os genes analisados, somente dois apresentaram diferenças significativas, *XPC* e *DDB2*. Estes dois genes apresentaram aumento na expressão após tratamento com ACNU, especificamente em células selvagens para *p53*. Esse aumento não é tão acentuado em células com *p53* inibido por siRNA. De particular interesse é o fato de células selvagens para *p53*, mas transfectadas com *MGMT* não terem apresentado aumento na expressão destes genes. Isso indica que o impedimento da formação de ICLs pela rápida remoção de O⁶-cloroetilguanina do genoma inibe a sinalização para *p53* ativar genes da via de NER. Além disso, a expressão de *XPC* e *DDB2* nas células selvagens para *p53* foi extremamente tardia (24 h) se comparada ao aumento na expressão observado após irradiação UV (2 h), também indicando que somente após a formação do ICL é que existe a modulação da expressão destes genes por *p53*. Corroborando a idéia de um possível papel de *XPC* no reparo de ICLs, foi recentemente descrito que após tratamento de células humanas com PUVA, *XPC* participa do reconhecimento dos ICLs gerados (THOMA *et al.*, 2005). Recentemente, foi descrito também que em células com *XPC* silenciado por longos períodos, o reparo de DSBs é comprometido (DESPRAS *et al.*, 2007). Essa recém-descoberta função de *XPC* pode também explicar a falta de reparo de DSBs durante o processo de reparo de ICLs nas células mutadas em *p53*, visto que estas células apresentam constitutivamente baixos níveis dessa proteína (ADIMOOLAM *et al.*, 2002).

Além de seu papel na regulação de reparo de DNA, *p53* também controla a via de apoptose utilizada pelas células após tratamento com ACNU. Enquanto que células mutadas executaram apoptose somente pela via intrínseca, verificado pela degradação de Bcl-2, expressão de Bax e ativação de caspase-9, células selvagens para *p53* executaram o processo apoptótico tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca. Nessas células, além da degradação de Bcl-2, expressão de Bax e ativação de caspase-9, houve também ativação de caspase-8. Além disso, quando transfectadas com DN-FADD houve uma redução de 50% na quantidade de células apoptóticas após

tratamento com ACNU. Esta ativação de caspase por duas vias é também diferente do que foi encontrado em células selvagens para *p53* tratadas com TMZ, onde apoptose ocorria somente pela via extrínseca. Em células mutadas em *p53*, a transfecção com *DN-FADD* não traz nenhuma diferença na sensibilidade frente a esse agente, tal qual havia descrito para tratamento com TMZ ou com luz UV. A Figura 54 mostra as principais observações deste trabalho sobre a indução de morte celular após tratamento com agentes cloroetilantes em células de glioma.

Os dados apresentados aqui sugerem, portanto, que *p53* controla a sensibilidade de células de glioma tratadas com agentes cloroetilantes determinando a eficiência do reparo de lesões ao DNA. Esta função está em marcante contraste com a função previamente descrita para as mesmas células tratadas com agentes metilantes, onde *p53* não estava envolvido em reparo, mas sim na sinalização para apoptose entre a via intrínseca e extrínseca.

Figura 54: Modelo de indução de morte celular por agentes cloroetilantes em células de glioma. O modelo, construído principalmente a partir de dados gerados nesta tese, está descrito em detalhes na Discussão e em Batista *et al*, (2007).

5.5 A importância de *p53* para a terapia de GBM

A quimioterapia para pacientes com glioma se baseia principalmente em drogas capazes de atingir o DNA, formando lesões em sua estrutura. Os resultados apresentados nesta tese indicam que *p53* pode ser um marcador preditivo de terapia em pacientes com GBM e que, portanto, o “status” de *p53* deveria ser investigado no momento da retirada do tumor. É recomendável que tumores selvagens para *p53* sejam tratados com agentes metilantes (TMZ) e que tumores mutados em *p53* sejam tratados com agentes cloroetilantes (ACNU, BCNU, Fotemustina). Se o “status” de *p53* se modificar ao longo do tratamento (de selvagem para mutado) o regime quimioterápico deveria ser alterado de agentes metilantes para cloroetilantes. O tratamento concomitante de gliomas com TMZ e BCNU está neste momento em testes clínicos (fase 1) em pacientes humanos (RAIZER *et al.*, 2004), havendo suspeitas de elevada toxicidade após uso prolongado destas drogas. No entanto, experimentos realizados em camundongos demonstraram que o uso concomitante destes agentes oferece uma maior proteção à progressão deste tipo de tumor, causando um maior atraso no crescimento, se comparado aos efeitos gerados pelo tratamento com somente um dos agentes (PLOWMAN *et al.*, 1994).

Sabemos que as observações aqui apresentadas representam somente implicações teóricas, visto serem o resultado de experimentos *in vitro*. É possível (e provável) que o tumor *in vivo*, rodeado pelo seu microambiente, apresentará respostas diferentes daquelas observadas nesta tese. Mas certamente estes dados trazem importantes considerações sobre a resistência que células de glioma apresentam aos principais agentes quimioterápicos utilizados, podendo inclusive abrir novos caminhos na pesquisa e tratamento desta doença atualmente devastadora.

6 Conclusões

A análise dos dados contidos nesta tese permite concluir que:

- 1) A indução de apoptose por luz UV independe da fase do ciclo celular na qual as células são irradiadas.
- 2) A replicação do DNA lesado age como um sinal para a indução de apoptose após irradiação UV em células de mamíferos.
- 3) Apoptose induzida por TMZ é sensibilizada por *p53* funcional em células de glioma humano através da modulação da expressão do receptor FAS. Em células mutadas em *p53* os baixos níveis de apoptose encontrados são devidos à sinalização pela via mitocondrial.
- 4) A baixa eficiência de NER em células de glioma mutadas em *p53* é responsável pela elevada sensibilidade que apresentam frente à irradiação pela luz UV.
- 5) Também após tratamento com agentes cloroetilantes como ACNU e BCNU, células de glioma mutadas em *p53* apresentam maior sensibilidade do que células selvagens em *p53*. Esta sensibilidade está relacionada a uma menor eficiência no reparo de ICLs gerados pelo rearranjo molecular da lesão O⁶-cloroetilguanina.
- 6) Células de glioma selvagens em *p53* entram em apoptose preferencialmente pela via extrínseca. Por outro lado, células mutadas em *p53* o fazem exclusivamente pela via intrínseca.
- 7) O “status” de *p53* determina a sensibilidade de células de glioma frente a diferentes tratamentos quimioterápicos atualmente utilizados em pacientes com GBM.
- 8) Propomos que *p53* seja visto como um marcador para quimioterapia de GBM; portanto o “status” desse gene deveria ser verificado no momento da retirada cirúrgica.

Referências bibliográficas

- AARONSON, SA. Growth factors and cancer. Science, v.254, n.5035, p.1146-53, Nov 22, 1991.
- ADAMS, JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev., v.17, n.20, p.2481-95, Oct 15, 2003.
- ADIMOOLAM, S ; FORD, JM. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v.99, n.20, p.12985-90, Oct 1, 2002.
- ALLISON, SJ ; MILNER, J. Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. Carcinogenesis, v.25, n.9, p.1551-7, Sep, 2004.
- ALTER, BP. Cancer in Fanconi anemia, 1927-2001. Cancer, v.97, n.2, p.425-40, Jan 15, 2003.
- AMARANTE-MENDES, GP; BOSSY-WETZEL, E; BRUNNER, T ; GREEN, DR. Apoptosis Essays. Cell: A Laboratory Manual, 1998.
- APPELLA, E ; ANDERSON, CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. European J. Biochem., v.268, n.10, p.2764-72, May, 2001.
- ARAKI, M; MASUTANI, C; TAKEMURA, M; UCHIDA, A; SUGASAWA, K; KONDOH, J; OHKUMA, Y ; HANAOKA, F. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. Journal Biol. Chem., v.276, n.22, p.18665-72, Jun 1, 2001.
- ASSUNCAO GUIMARAES, C ; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. European J. Biochem., v.271, n.9, p.1638-50, May, 2004.
- BATISTA, LF; CHIGANCAS, V; BRUMATTI, G; AMARANTE-MENDES, GP ; MENCK, CF. Involvement of DNA replication in ultraviolet-induced apoptosis of mammalian cells. Apoptosis, v.11, n.7, p.1139-48, Jul, 2006.
- BATISTA, LF; ROOS, WP; CHRISTMANN, M; MENCK, CF ; KAINA, B. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. Cancer Res., v.67, n.24, p.11886-95, Dec 15, 2007.
- BELJANSKI, V; MARZILLI, LG ; DOETSCH, PW. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs. Molecular Pharmacol., v.65, n.6, p.1496-506, Jun, 2004.
- BENEKE, S ; BURKLE, A. Poly(ADP-ribosyl)ation, PARP, and aging. Science Aging Knowledge Environ., v.2004, n.49, p.re9, Dec 8, 2004.
- BERANEK, DT. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. Mutation Res., v.231, n.1, p.11-30, Jul, 1990.

De acordo com:

- BOATRIGHT, KM; RENATUS, M; SCOTT, FL; SPERANDIO, S; SHIN, H; PEDERSEN, IM; RICCI, JE; EDRIS, WA; SUTHERLIN, DP; GREEN, DR ; SALVESEN, GS. A unified model for apical caspase activation. Molecular Cell, v.11, n.2, p.529-41, Feb, 2003.
- BOATRIGHT, KM ; SALVESEN, GS. Mechanisms of caspase activation. Current Opin. Cell Biol., v.15, n.6, p.725-31, Dec, 2003.
- BOHR, VA; SMITH, CA; OKUMOTO, DS ; HANAWALT, PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. Cell, v.40, n.2, p.359-69, Feb, 1985.
- BOUCHARD, VJ; ROULEAU, M ; POIRIER, GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. Experimental Hematol., v.31, n.6, p.446-54, Jun, 2003.
- BOURDON, JC. p53 and its isoforms in cancer. British J. Cancer, v.97, n.3, p.277-82, Aug 6, 2007.
- BOURDON, JC; FERNANDES, K; MURRAY-ZMIJEWSKI, F; LIU, G; DIOT, A; XIRODIMAS, DP; SAVILLE, MK ; LANE, DP. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev., v.19, n.18, p.2122-37, Sep 15, 2005.
- BOURDON, JC; RENZING, J; ROBERTSON, PL; FERNANDES, KN ; LANE, DP. Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. Journal Cell Biol., v.158, n.2, p.235-46, Jul 22, 2002.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem., v.72, p.248-54, May 7, 1976.
- BROOKES, P. The early history of the biological alkylating agents, 1918-1968. Mutation Res., v.233, n.1-2, p.3-14, Nov-Dec, 1990.
- BRUECKNER, F ; CRAMER, P. DNA photodamage recognition by RNA polymerase II. FEBS Lett., v.581, n.15, p.2757-60, Jun 19, 2007.
- BULLOCK, AN ; FERSHT, AR. Rescuing the function of mutant p53. Nature Rev. Cancer, v.1, n.1, p.68-76, Oct, 2001.
- CADET, J; SAGE, E ; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. Mutation Res., v.571, n.1-2, p.3-17, Apr 1, 2005.
- CALDECOTT, K ; JEGGO, P. Cross-sensitivity of gamma-ray-sensitive hamster mutants to cross-linking agents. Mutation Res., v.255, n.2, p.111-21, Sep, 1991.
- CARVALHO, H; DA COSTA, RM; CHIGANCAS, V; WEINLICH, R; BRUMATTI, G; AMARANTE-MENDES, GP; SARASIN, A ; MENCK, CF. Effect of cell confluence on ultraviolet light apoptotic responses in DNA repair deficient cells. Mutation Res., v.544, n.2-3, p.159-66, Nov, 2003.
- CHANG, J; KIM, DH; LEE, SW; CHOI, KY ; SUNG, YC. Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. Journal Biol. Chem., v.270, n.42, p.25014-9, Oct 20, 1995.

- CHENE, P. The role of tetramerization in p53 function. Oncogene, v.20, n.21, p.2611-7, May 10, 2001.
- CHIGANCAS, V; BATISTA, LF; BRUMATTI, G; AMARANTE-MENDES, GP; YASUI, A ; MENCK, CF. Photorepair of RNA polymerase arrest and apoptosis after ultraviolet irradiation in normal and XPB deficient rodent cells. Cell Death Differ., v.9, n.10, p.1099-107, Oct, 2002.
- CHIGANCAS, V; MIYAJI, EN; MUOTRI, AR; DE FATIMA JACYSYN, J; AMARANTE-MENDES, GP; YASUI, A ; MENCK, CF. Photorepair prevents ultraviolet-induced apoptosis in human cells expressing the marsupial photolyase gene. Cancer Res., v.60, n.9, p.2458-63, May 1, 2000.
- CHIGANCAS, V; SARASIN, A ; MENCK, CF. CPD-photolyase adenovirus-mediated gene transfer in normal and DNA-repair-deficient human cells. Journal Cell Sci., v.117, n.Pt 16, p.3579-92, Jul 15, 2004.
- CHIPUK, JE; BOUCHIER-HAYES, L ; GREEN, DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. Cell Death Differ., v.13, n.8, p.1396-402, Aug, 2006.
- CHIPUK, JE; KUWANA, T; BOUCHIER-HAYES, L; DROIN, NM; NEWMAYER, DD; SCHULER, M ; GREEN, DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science, v.303, n.5660, p.1010-4, Feb 13, 2004.
- CHIPUK, JE; MAURER, U; GREEN, DR ; SCHULER, M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. Cancer Cell, v.4, n.5, p.371-81, Nov, 2003.
- CHRISTMANN, M ; KAINA, B. Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. Journal Biol. Chem., v.275, n.46, p.36256-62, Nov 17, 2000.
- CLEAVER, JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. Nature, v.218, n.5142, p.652-6, May 18, 1968.
- COCKELL, CS ; HORNECK, G. The history of the UV radiation climate of the earth--theoretical and space-based observations. Photochemistry Photobiol., v.73, n.4, p.447-51, Apr, 2001.
- COLE, RS. Repair of DNA containing interstrand crosslinks in Escherichia coli: sequential excision and recombination. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.70, n.4, p.1064-8, Apr, 1973.
- CORY, S ; ADAMS, JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Rev. Cancer, v.2, n.9, p.647-56, Sep, 2002.
- CORY, S; HUANG, DC ; ADAMS, JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene, v.22, n.53, p.8590-607, Nov 24, 2003.
- COSTA, RM; CHIGANCAS, V; GALHARDO RDA, S; CARVALHO, H ; MENCK, CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. Biochimie, v.85, n.11, p.1083-99, Nov, 2003.
- COSTANZO, A; MERLO, P; PEDICONI, N; FULCO, M; SARTORELLI, V; COLE, PA; FONTEMAGGI, G; FANCIULLI, M; SCHILTZ, L; BLANDINO, G; BALSANO, C ; LEVRERO, M. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. Molecular Cell, v.9, n.1, p.175-86, Jan, 2002.

- CRAWFORD, LV; PIM, DC ; LAMB, P. The cellular protein p53 in human tumours. Molecular Biol. Med., v.2, n.4, p.261-72, Aug, 1984.
- CULVER, KW; RAM, Z; WALLBRIDGE, S; ISHII, H; OLDFIELD, EH ; BLAESE, RM. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. Science, v.256, n.5063, p.1550-2, Jun 12, 1992.
- CURTIN, NJ. PARP inhibitors for cancer therapy. Expert Rev. Mol. Med., v.7, n.4, p.1-20, Mar 15, 2005.
- D'ANDREA, AD ; GROMPE, M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. Nature Rev. Cancer, v.3, n.1, p.23-34, Jan, 2003.
- DATTA, K; SHAH, P; SRIVASTAVA, T; MATHUR, SG; CHATTOPADHYAY, P ; SINHA, S. Sensitizing glioma cells to cisplatin by abrogating the p53 response with antisense oligonucleotides. Cancer Gene Ther., v.11, n.8, p.525-31, Aug, 2004.
- DAY, RS, 3RD; ZIOLKOWSKI, CH; SCUDIERO, DA; MEYER, SA; LUBINIECKI, AS; GIRARDI, AJ; GALLOWAY, SM ; BYNUM, GD. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. Nature, v.288, n.5792, p.724-7, Dec 25, 1980.
- DE BOER, J ; HOEIJMAKERS, JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis, v.21, n.3, p.453-60, Mar, 2000.
- DE SILVA, IU; MCHUGH, PJ; CLINGEN, PH ; HARTLEY, JA. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. Molecular Cell Biol., v.20, n.21, p.7980-90, Nov, 2000.
- DESPRAS, E; PFEIFFER, P; SALLES, B; CALSOU, P; KUHFITIG-KULLE, S; ANGULO, JF ; BIARD, DS. Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. Cancer Res., v.67, n.6, p.2526-34, Mar 15, 2007.
- DREGOESC, D; RYBAK, AP ; RAINBOW, AJ. Increased expression of p53 enhances transcription-coupled repair and global genomic repair of a UVC-damaged reporter gene in human cells. DNA Repair (Amst), v.6, n.5, p.588-601, May 1, 2007.
- DULIC, V; KAUFMANN, WK; WILSON, SJ; TLSTY, TD; LEES, E; HARPER, JW; ELLEDGE, SJ ; REED, SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. Cell, v.76, n.6, p.1013-23, Mar 25, 1994.
- DUNKERN, TR ; KAINA, B. Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells. Molecular Biol. Cell, v.13, n.1, p.348-61, Jan, 2002.
- EL-DEIRY, WS; KERN, SE; PIETENPOL, JA; KINZLER, KW ; VOGELSTEIN, B. Definition of a consensus binding site for p53. Nature Genet., v.1, n.1, p.45-9, Apr, 1992.
- EL-DEIRY, WS; TOKINO, T; VELCULESCU, VE; LEVY, DB; PARSONS, R; TRENT, JM; LIN, D; MERCER, WE; KINZLER, KW ; VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell, v.75, n.4, p.817-25, Nov 19, 1993.

- EL-MAHDY, MA; HAMADA, FM; WANI, MA; ZHU, Q ; WANI, AA. p53-degradation by HPV-16 E6 preferentially affects the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and sensitizes mammary epithelial cells to UV-irradiation. Mutation Res., v.459, n.2, p.135-45, Mar 20, 2000.
- ENARI, M; SAKAHIRA, H; YOKOYAMA, H; OKAWA, K; IWAMATSU, A ; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature, v.391, n.6662, p.43-50, Jan 1, 1998.
- ESTELLER, M; GARCIA-FONCILLAS, J; ANDION, E; GOODMAN, SN; HIDALGO, OF; VANACLOCHA, V; BAYLIN, SB ; HERMAN, JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. New Engl. J. Med., v.343, n.19, p.1350-4, Nov 9, 2000.
- EVANS, E; MOGGS, JG; HWANG, JR; EGLY, JM ; WOOD, RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. Embo J., v.16, n.21, p.6559-73, Nov 3, 1997.
- FANCONI, G. Familiare infantile perniziosaartige anaemie (pernizioeses blutbild und Konstitution). Jahrbh. Kinderheilk., v.117, p.257-280, 1927.
- FINLAY, CA; HINDS, PW ; LEVINE, AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell, v.57, n.7, p.1083-93, Jun 30, 1989.
- FISCHER, U ; MEESE, E. Glioblastoma multiforme: the role of DSB repair between genotype and phenotype. Oncogene, v.26, n.56, p.7809-15, Dec 10, 2007.
- FISCHHABER, PL; GALL, AS; DUNCAN, JA ; HOPKINS, PB. Direct demonstration in synthetic oligonucleotides that N,N'-bis(2-chloroethyl)-nitrosourea cross links N1 of deoxyguanosine to N3 of deoxycytidine on opposite strands of duplex DNA. Cancer Res., v.59, n.17, p.4363-8, Sep 1, 1999.
- FISHER, MS ; KRIPKE, ML. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.74, n.4, p.1688-92, Apr, 1977.
- FITCH, ME; CROSS, IV; TURNER, SJ; ADIMOOLAM, S; LIN, CX; WILLIAMS, KG ; FORD, JM. The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. DNA Repair (Amst), v.2, n.7, p.819-26, Jul 16, 2003.
- FITCH, ME; NAKAJIMA, S; YASUI, A ; FORD, JM. In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. Journal Biol. Chem., v.278, n.47, p.46906-10, Nov 21, 2003.
- FLORES, ER; TSAI, KY; CROWLEY, D; SENGUPTA, S; YANG, A; MCKEON, F ; JACKS, T. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. Nature, v.416, n.6880, p.560-4, Apr 4, 2002.
- FOORD, OS; BHATTACHARYA, P; REICH, Z ; ROTTER, V. A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. Nucleic Acids Res., v.19, n.19, p.5191-8, Oct 11, 1991.
- FORD, JM. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. Mutation Res., v.577, n.1-2, p.195-202, Sep 4, 2005.

FORD, JM ; HANAWALT, PC. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.92, n.19, p.8876-80, Sep 12, 1995.

FRIEDBERG, EC. Correcting the blueprint of life : an historical account of the discovery of DNA repair mechanisms. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997. xi, 210 p. p.

FRIEDBERG, EC. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. Nature Rev. Mol. Cell Biol., v.6, n.12, p.943-53, Dec, 2005.

FRIEDBERG, EC, WALKER, G. C., SIEDE, W., WOOD, R. D., SCHULTZ, R. A., ELLENBERGER, T. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press. 2006. 9-57 p.

FRIEDMAN, HS; KERBY, T ; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. Clinical Cancer Res., v.6, n.7, p.2585-97, Jul, 2000.

FRITZ, G ; KAINA, B. Late activation of stress kinases (SAPK/JNK) by genotoxins requires the DNA repair proteins DNA-PKcs and CSB. Molecular Biol. Cell, v.17, n.2, p.851-61, Feb, 2006.

GALLI, R; BINDA, E; ORFANELLI, U; CIPELLETTI, B; GRITTI, A; DE VITIS, S; FIOCCO, R; FORONI, C; DIMECO, F ; VESCOVI, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res., v.64, n.19, p.7011-21, Oct 1, 2004.

GARSSEN, J; VAN STEEG, H; DE GRUIJL, F; DE BOER, J; VAN DER HORST, GT; VAN KRANEN, H; VAN LOVEREN, H; VAN DIJK, M; FLUITMAN, A; WEEDA, G ; HOEIJMAKERS, JH. Transcription-coupled and global genome repair differentially influence UV-B-induced acute skin effects and systemic immunosuppression. Journal Immunol., v.164, n.12, p.6199-205, Jun 15, 2000.

GERSON, SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. Nature Rev. Cancer, v.4, n.4, p.296-307, Apr, 2004.

GHOSH, A; STEWART, D ; MATLASHEWSKI, G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. Molecular Cell Biol., v.24, n.18, p.7987-97, Sep, 2004.

GOSTISSA, M; HENGSTERMANN, A; FOGAL, V; SANDY, P; SCHWARZ, SE; SCHEFFNER, M ; DEL SAL, G. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. Embo J., v.18, n.22, p.6462-71, Nov 15, 1999.

GREEN, DR ; MARTIN, SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. Current Opin. Immunol., v.7, n.5, p.694-703, Oct, 1995.

GROB, TJ; NOVAK, U; MAISSE, C; BARCAROLI, D; LUTHI, AU; PIRNIA, F; HUGLI, B; GRABER, HU; DE LAURENZI, V; FEY, MF; MELINO, G ; TOBLER, A. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. Cell Death Differ., v.8, n.12, p.1213-23, Dec, 2001.

GRUENERT, DC ; CLEAVER, JE. Repair of psoralen-induced cross-links and monoadducts in normal and repair-deficient human fibroblasts. Cancer Res., v.45, n.11 Pt 1, p.5399-404, Nov, 1985.

- HALICKA, HD; HUANG, X; TRAGANOS, F; KING, MA; DAI, W ; DARZYNKIEWICZ, Z. Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. Cell Cycle, v.4, n.2, p.339-45, Feb, 2005.
- HAMMOND, EM; GREEN, SL ; GIACCIA, AJ. Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest. Mutation Res., v.532, n.1-2, p.205-13, Nov 27, 2003.
- HANAWALT, PC; FORD, JM ; LLOYD, DR. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. Mutation Res., v.544, n.2-3, p.107-14, Nov, 2003.
- HARPER, JW; ADAMI, GR; WEI, N; KEYOMARSI, K ; ELLEDGE, SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell, v.75, n.4, p.805-16, Nov 19, 1993.
- HERMANSON-MILLER, IL ; TURCHI, JJ. Strand-specific binding of RPA and XPA to damaged duplex DNA. Biochemistry, v.41, n.7, p.2402-8, Feb 19, 2002.
- HINDS, P; FINLAY, C ; LEVINE, AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. Journal Virol., v.63, n.2, p.739-46, Feb, 1989.
- HIROSE, Y; BERGER, MS ; PIEPER, RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. Cancer Res., v.61, n.5, p.1957-63, Mar 1, 2001.
- HOEIJMAKERS, JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature, v.411, n.6835, p.366-74, May 17, 2001.
- HOFFMAN, WH; BIADE, S; ZILFOU, JT; CHEN, J ; MURPHY, M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. Journal Biol. Chem., v.277, n.5, p.3247-57, Feb 1, 2002.
- HORVITZ, HR. Worms, life, and death (Nobel lecture). Chembiochem, v.4, n.8, p.697-711, Aug 4, 2003.
- HOWLETT, NG; TANIGUCHI, T; OLSON, S; COX, B; WAISFISZ, Q; DE DIE-SMULDERS, C; PERSKY, N; GROMPE, M; JOENJE, H; PALS, G; IKEDA, H; FOX, EA ; D'ANDREA, AD. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. Science, v.297, n.5581, p.606-9, Jul 26, 2002.
- HOY, CA; THOMPSON, LH; MOONEY, CL ; SALAZAR, EP. Defective DNA cross-link removal in Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents. Cancer Res., v.45, n.4, p.1737-43, Apr, 1985.
- HUTTERER, M; GUNSILIUS, E ; STOCKHAMMER, G. Molecular therapies for malignant glioma. Wien Med. Wochenschr., v.156, n.11-12, p.351-63, Jun, 2006.
- HWANG, BJ; FORD, JM; HANAWALT, PC ; CHU, G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.96, n.2, p.424-8, Jan 19, 1999.

- ISHII, N; MAIER, D; MERLO, A; TADA, M; SAWAMURA, Y; DISERENS, AC ; VAN MEIR, EG. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. Brain Pathol., v.9, n.3, p.469-79, Jul, 1999.
- JACHYMCZYK, WJ; VON BORSTEL, RC; MOWAT, MR ; HASTINGS, PJ. Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair: the RAD3 system and the RAD51 system. Molecular Gen. Genet., v.182, n.2, p.196-205, 1981.
- JAMIESON, ER ; LIPPARD, SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. Chemical Rev., v.99, n.9, p.2467-98, Sep 8, 1999.
- JANS, J; SCHUL, W; SERT, YG; RIJKSEN, Y; REBEL, H; EKER, AP; NAKAJIMA, S; VAN STEEG, H; DE GRUIJL, FR; YASUI, A; HOEIJMAKERS, JH ; VAN DER HORST, GT. Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene. Current Biol., v.15, n.2, p.105-15, Jan 26, 2005.
- KAGHAD, M; BONNET, H; YANG, A; CREANCIER, L; BISCAN, JC; VALENT, A; MINTY, A; CHALON, P; LELIAS, JM; DUMONT, X; FERRARA, P; MCKEON, F ; CAPUT, D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. Cell, v.90, n.4, p.809-19, Aug 22, 1997.
- KAINA, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. Biochemistry Pharmacol., v.66, n.8, p.1547-54, Oct 15, 2003.
- KAINA, B; CHRISTMANN, M; NAUMANN, S ; ROOS, WP. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair (Amst), May 5, 2007.
- KAINA, B; FRITZ, G; MITRA, S ; COQUERELLE, T. Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. Carcinogenesis, v.12, n.10, p.1857-67, Oct, 1991.
- KAINA, B; ZIOUTA, A; OCHS, K ; COQUERELLE, T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. Mutation Res., v.381, n.2, p.227-41, Nov 28, 1997.
- KANZAWA, T; GERMANO, IM; KOMATA, T; ITO, H; KONDO, Y ; KONDO, S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. Cell Death Differ., v.11, n.4, p.448-57, Apr, 2004.
- KANZAWA, T; ITO, H; KONDO, Y ; KONDO, S. Current and Future Gene Therapy for Malignant Gliomas. Journal Biomed. Biotechnol., v.2003, n.1, p.25-34, 2003.
- KERR, JF; WYLLIE, AH ; CURRIE, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British J. Cancer, v.26, n.4, p.239-57, Aug, 1972.
- KIELBASSA, C; ROZA, L ; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. Carcinogenesis, v.18, n.4, p.811-6, Apr, 1997.

- KOCH, D; HUNDSBERGER, T; BOOR, S ; KAINA, B. Local intracerebral administration of O(6)-benzylguanine combined with systemic chemotherapy with temozolomide of a patient suffering from a recurrent glioblastoma. Journal Neurooncol., v.82, n.1, p.85-9, Mar, 2007.
- KOLPASHCHIKOV, DM; KHODYREVA, SN; KHLIMANKOV, DY; WOLD, MS; FAVRE, A ; LAVRIK, OI. Polarity of human replication protein A binding to DNA. Nucleic Acids Res., v.29, n.2, p.373-9, Jan 15, 2001.
- KOSCHNY, R; KOSCHNY, T; FROSTER, UG; KRUPP, W ; ZUBER, MA. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. Cancer Genet. Cytogenet., v.135, n.2, p.147-59, Jun, 2002.
- KROEMER, G; EL-DEIRY, WS; GOLSTEIN, P; PETER, ME; VAUX, D; VANDENABEELE, P; ZHIVOTOVSKY, B; BLAGOSKLONNY, MV; MALORNI, W; KNIGHT, RA; PIACENTINI, M; NAGATA, S ; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ., v.12 Suppl 2, p.1463-7, Nov, 2005.
- KULMS, D ; SCHWARZ, T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. Biochemistry Pharmacol., v.64, n.5-6, p.837-41, Sep, 2002.
- KULMS, D; ZEISE, E; POPPELMANN, B ; SCHWARZ, T. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. Oncogene, v.21, n.38, p.5844-51, Aug 29, 2002.
- KUSUMOTO, R; MASUTANI, C; SUGASAWA, K; IWAI, S; ARAKI, M; UCHIDA, A; MIZUKOSHI, T ; HANAOKA, F. Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. Mutation Res., v.485, n.3, p.219-27, Apr 4, 2001.
- LANE, DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature, v.358, n.6381, p.15-6, Jul 2, 1992.
- LANE, DP ; CRAWFORD, LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature, v.278, n.5701, p.261-3, Mar 15, 1979.
- LEHMANN, AR. Replication of damaged DNA in mammalian cells: new solutions to an old problem. Mutation Res., v.509, n.1-2, p.23-34, Nov 30, 2002.
- LEHMANN, AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. Biochimie, v.85, n.11, p.1101-11, Nov, 2003.
- LEU, JI; DUMONT, P; HAFEY, M; MURPHY, ME ; GEORGE, DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. Nature Cell Biol., v.6, n.5, p.443-50, May, 2004.
- LEVEILLARD, T; ANDERA, L; BISSONNETTE, N; SCHAEFFER, L; BRACCO, L; EGLY, JM ; WASYLYK, B. Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. Embo J., v.15, n.7, p.1615-24, Apr 1, 1996.
- LI, YF; KIM, ST ; SANCAR, A. Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.90, n.10, p.4389-93, May 15, 1993.
- LIM, A ; LI, BF. The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. Embo J., v.15, n.15, p.4050-60, Aug 1, 1996.

- LIMA-BESSA, KM; ARMELINI, MG; CHIGANCAS, V; JACYSYN, JF; AMARANTE-MENDES, GP; SARASIN, A ; MENCK, CF. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. DNA Repair (Amst), v.7, n.2, p.303-12, Feb 1, 2008.
- LINDAHL, T; DEMPLE, B ; ROBINS, P. Suicide inactivation of the E. coli O6-methylguanine-DNA methyltransferase. Embo J., v.1, n.11, p.1359-63, 1982.
- LIPS, J ; KAINA, B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. Carcinogenesis, v.22, n.4, p.579-85, Apr, 2001.
- LIU, G; YUAN, X; ZENG, Z; TUNICI, P; NG, H; ABDULKADIR, IR; LU, L; IRVIN, D; BLACK, KL ; YU, JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. Mol. Cancer, v.5, p.67, 2006.
- LJUNGMAN, M ; LANE, DP. Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage. Nature Rev. Cancer, v.4, n.9, p.727-37, Sep, 2004.
- LJUNGMAN, M ; ZHANG, F. Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. Oncogene, v.13, n.4, p.823-31, Aug 15, 1996.
- LO, HL; NAKAJIMA, S; MA, L; WALTER, B; YASUI, A; ETHELL, DW ; OWEN, LB. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. BMC Cancer, v.5, p.135, 2005.
- LOWE, SW; BODIS, S; MCCLATCHEY, A; REMINGTON, L; RULEY, HE; FISHER, DE; HOUSMAN, DE ; JACKS, T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. Science, v.266, n.5186, p.807-10, Nov 4, 1994.
- LOWE, SW; RULEY, HE; JACKS, T ; HOUSMAN, DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell, v.74, n.6, p.957-67, Sep 24, 1993.
- LOWNDES, NF ; MURGUIA, JR. Sensing and responding to DNA damage. Current Opin. Genet. Dev., v.10, n.1, p.17-25, Feb, 2000.
- LU, X ; LANE, DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? Cell, v.75, n.4, p.765-78, Nov 19, 1993.
- LUDLUM, DB. The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. Cancer Invest., v.15, n.6, p.588-98, 1997.
- MACLACHLAN, TK ; EL-DEIRY, WS. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.99, n.14, p.9492-7, Jul 9, 2002.
- MALTZMAN, W ; CZYZYK, L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. Molecular Cell Biol., v.4, n.9, p.1689-94, Sep, 1984.
- MASTERS, JR ; KOBERLE, B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. Nature Rev. Cancer, v.3, n.7, p.517-25, Jul, 2003.

- MCGLYNN, P ; LLOYD, RG. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. Nature Rev. Mol. Cell Biol., v.3, n.11, p.859-70, Nov, 2002.
- MCHUGH, PJ; SPANSWICK, VJ ; HARTLEY, JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. Lancet Oncol., v.2, n.8, p.483-90, Aug, 2001.
- MCKAY, BC; BECERRIL, C; SPRONCK, JC ; LJUNGMAN, M. Ultraviolet light-induced apoptosis is associated with S-phase in primary human fibroblasts. DNA Repair (Amst), v.1, n.10, p.811-20, Oct 1, 2002.
- MEI KWEI, JS; KURAOKA, I; HORIBATA, K; UBUKATA, M; KOBATAKE, E; IWAI, S; HANDA, H ; TANAKA, K. Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct. Biochemistry Biophys. Res. Commun., v.320, n.4, p.1133-8, Aug 6, 2004.
- MELLON, I; SPIVAK, G ; HANAWALT, PC. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. Cell, v.51, n.2, p.241-9, Oct 23, 1987.
- MENCK, CF. Shining a light on photolyases. Nature Genet., v.32, n.3, p.338-9, Nov, 2002.
- MICHAEL, D ; OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. Seminaires Cancer Biol., v.13, n.1, p.49-58, Feb, 2003.
- MIHARA, M; ERSTER, S; ZAIKA, A; PETRENKO, O; CHITTENDEN, T; PANCOSKA, P ; MOLL, UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. Molecular Cell, v.11, n.3, p.577-90, Mar, 2003.
- MILLER, DL ; WEINSTOCK, MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. Journal Am. Acad. Dermatol., v.30, n.5 Pt 1, p.774-8, May, 1994.
- MITCHELL, DL. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. Photochemistry Photobiol., v.48, n.1, p.51-7, Jul, 1988.
- MIYAJI, EN ; MENCK, CF. Ultraviolet-induced cell death is independent of DNA replication in rat kangaroo cells. Photochemistry Photobiol., v.61, n.5, p.454-8, May, 1995.
- MIYASHITA, T; HARIGAI, M; HANADA, M ; REED, JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. Cancer Res., v.54, n.12, p.3131-5, Jun 15, 1994.
- MIYASHITA, T; KRAJEWSKI, S; KRAJEWSKA, M; WANG, HG; LIN, HK; LIEBERMANN, DA; HOFFMAN, B ; REED, JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. Oncogene, v.9, n.6, p.1799-805, Jun, 1994.
- MIZUKOSHI, T; KODAMA, TS; FUJIWARA, Y; FURUNO, T; NAKANISHI, M ; IWAI, S. Structural study of DNA duplexes containing the (6-4) photoproduct by fluorescence resonance energy transfer. Nucleic Acids Res., v.29, n.24, p.4948-54, Dec 15, 2001.
- MOGI, S ; OH, DH. gamma-H2AX formation in response to interstrand crosslinks requires XPF in human cells. DNA Repair (Amst), v.5, n.6, p.731-40, Jun 10, 2006.

- MORONI, MC; HICKMAN, ES; LAZZERINI DENCHI, E; CAPRARA, G; COLLI, E; CECCONI, F; MULLER, H ; HELIN, K. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. Nature Cell Biol., v.3, n.6, p.552-8, Jun, 2001.
- MOURET, S; BAUDOUIN, C; CHARVERON, M; FAVIER, A; CADET, J ; DOUKI, T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.103, n.37, p.13765-70, Sep 12, 2006.
- MOWAT, M; CHENG, A; KIMURA, N; BERNSTEIN, A ; BENCHIMOL, S. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. Nature, v.314, n.6012, p.633-6, Apr 18-24, 1985.
- MU, D; HSU, DS ; SANCAR, A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. Journal Biol. Chem., v.271, n.14, p.8285-94, Apr 5, 1996.
- MU, D; WAKASUGI, M; HSU, DS ; SANCAR, A. Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease. Journal Biol. Chem., v.272, n.46, p.28971-9, Nov 14, 1997.
- MULLAPUDI, SR; ALI-OSMAN, F; SHOU, J ; SRIVENUGOPAL, KS. DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumour cells. Biochemistry J., v.351 Pt 2, p.393-402, Oct 15, 2000.
- MUNOZ-PINEDO, C; GUIO-CARRION, A; GOLDSTEIN, JC; FITZGERALD, P; NEWMAYER, DD ; GREEN, DR. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.103, n.31, p.11573-8, Aug 1, 2006.
- MUOTRI, AR; MARCHETTO, MC; SUZUKI, MF; OKAZAKI, K; LOTFI, CF; BRUMATTI, G; AMARANTE-MENDES, GP ; MENCK, CF. Low amounts of the DNA repair XPA protein are sufficient to recover UV-resistance. Carcinogenesis, v.23, n.6, p.1039-46, Jun, 2002.
- MURPHY, PJ; GALIGNIANA, MD; MORISHIMA, Y; HARRELL, JM; KWOK, RP; LJUNGMAN, M ; PRATT, WB. Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. Journal Biol. Chem., v.279, n.29, p.30195-201, Jul 16, 2004.
- NAGASUBRAMANIAN, R ; DOLAN, ME. Temozolomide: realizing the promise and potential. Current Opin. Oncol., v.15, n.6, p.412-8, Nov, 2003.
- NAKAJIMA, S; LAN, L; KANNO, S; TAKAO, M; YAMAMOTO, K; EKER, AP ; YASUI, A. UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells. Journal Biol. Chem., v.279, n.45, p.46674-7, Nov 5, 2004.
- NAKANO, K ; VOUSDEN, KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Molecular Cell, v.7, n.3, p.683-94, Mar, 2001.
- NG, JM; VERMEULEN, W; VAN DER HORST, GT; BERGINK, S; SUGASAWA, K; VRIELING, H ; HOEIJMAKERS, JH. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. Genes Dev., v.17, n.13, p.1630-45, Jul 1, 2003.

- NG, JM; VRIELING, H; SUGASAWA, K; OOMS, MP; GROOTEGOED, JA; VREEBURG, JT; VISSER, P; BEEMS, RB; GORGELS, TG; HANAOKA, F; HOEIJMAKERS, JH ; VAN DER HORST, GT. Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. Molecular Cell Biol., v.22, n.4, p.1233-45, Feb, 2002.
- NIEDERNHOFER, LJ; LALAI, AS ; HOEIJMAKERS, JH. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. Cell, v.123, n.7, p.1191-8, Dec 29, 2005.
- NIEDERNHOFER, LJ; ODIJK, H; BUDZOWSKA, M; VAN DRUNEN, E; MAAS, A; THEIL, AF; DE WIT, J; JASPERS, NG; BEVERLOO, HB; HOEIJMAKERS, JH ; KANAAR, R. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. Molecular Cell Biol., v.24, n.13, p.5776-87, Jul, 2004.
- NORVAL, M. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. Progr Biophys. Mol. Biol., v.92, n.1, p.108-18, Sep, 2006.
- NYBERG, KA; MICHELSON, RJ; PUTNAM, CW ; WEINERT, TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. Annual Rev. Genet., v.36, p.617-56, 2002.
- O'CONNOR, PM ; KOHN, KW. Comparative pharmacokinetics of DNA lesion formation and removal following treatment of L1210 cells with nitrogen mustards. Cancer Commun., v.2, n.12, p.387-94, 1990.
- ODA, E; OHKI, R; MURASAWA, H; NEMOTO, J; SHIBUE, T; YAMASHITA, T; TOKINO, T; TANIGUCHI, T ; TANAKA, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science, v.288, n.5468, p.1053-8, May 12, 2000.
- OHGAKI, H ; KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol., v.109, n.1, p.93-108, Jan, 2005.
- OHGAKI, H ; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. American J. Pathol., v.170, n.5, p.1445-53, May, 2007.
- OLIVIER, M; EELES, R; HOLLSTEIN, M; KHAN, MA; HARRIS, CC ; HAINAUT, P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. Human Mutat., v.19, n.6, p.607-14, Jun, 2002.
- OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. Cell Death Differ., v.10, n.4, p.431-42, Apr, 2003.
- OUHTIT, A; GORNY, A; MULLER, HK; HILL, LL; OWEN-SCHAUB, L ; ANANTHASWAMY, HN. Loss of Fas-ligand expression in mouse keratinocytes during UV carcinogenesis. American J. Pathol., v.157, n.6, p.1975-81, Dec, 2000.
- PATEL, M; MCCULLY, C; GODWIN, K ; BALIS, FM. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. Journal Neurooncol., v.61, n.3, p.203-7, Feb, 2003.
- PEPPONI, R; MARRA, G; FUGGETTA, MP; FALCINELLI, S; PAGANI, E; BONMASSAR, E; JIRICNY, J ; D'ATRI, S. The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. Journal Pharmacol. Exp. Ther., v.304, n.2, p.661-8, Feb, 2003.

- PLOWMAN, J; WAUD, WR; KOUTSOUKOS, AD; RUBINSTEIN, LV; MOORE, TD ; GREVER, MR. Preclinical antitumor activity of temozolomide in mice: efficacy against human brain tumor xenografts and synergism with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Cancer Res., v.54, n.14, p.3793-9, Jul 15, 1994.
- POUGET, JP; DOUKI, T; RICHARD, MJ ; CADET, J. DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. Chemistry Res. Toxicol., v.13, n.7, p.541-9, Jul, 2000.
- RAIZER, JJ; MALKIN, MG; KLEBER, M ; ABREY, LE. Phase 1 study of 28-day, low-dose temozolomide and BCNU in the treatment of malignant gliomas after radiation therapy. Neuro Oncology, v.6, n.3, p.247-52, Jul, 2004.
- RAMANATHAN, B ; SMERDON, MJ. Changes in nuclear protein acetylation in u.v.-damaged human cells. Carcinogenesis, v.7, n.7, p.1087-94, Jul, 1986.
- RAVANAT, JL; DOUKI, T ; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. Journal Photochem. Photobiol. B., v.63, n.1-3, p.88-102, Oct, 2001.
- RENART, J; REISER, J ; STARK, GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.76, n.7, p.3116-20, Jul, 1979.
- RIKHOF, B; CORN, PG ; EL-DEIRY, WS. Caspase 10 levels are increased following DNA damage in a p53-dependent manner. Cancer Biol. Ther., v.2, n.6, p.707-12, Nov-Dec, 2003.
- ROBBINS, JH; KRAEMER, KH; LUTZNER, MA; FESTOFF, BW ; COON, HG. Xeroderma pigmentosum. An inherited diseases with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair. Annual Intern. Med., v.80, n.2, p.221-48, Feb, 1974.
- ROBERTS, JJ. The repair of DNA modified by cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic chemicals. Advanced Radiation Biology, v.7, p.211-435, 1978.
- ROOS, WP; BATISTA, LF; NAUMANN, SC; WICK, W; WELLER, M; MENCK, CF ; KAINA, B. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. Oncogene, v.26, n.2, p.186-97, Jan 11, 2007.
- ROSETTE, C ; KARIN, M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. Science, v.274, n.5290, p.1194-7, Nov 15, 1996.
- ROWLAND, RE; EDWARDS, LA ; PODD, JV. Elevated sister chromatid exchange frequencies in New Zealand Vietnam War veterans. Cytogenetics Genome Res., v.116, n.4, p.248-51, 2007.
- RUBBI, CP ; MILNER, J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. Embo J., v.22, n.4, p.975-86, Feb 17, 2003.
- SAIJO, M; HIRAI, T; OGAWA, A; KOBAYASHI, A; KAMIUCHI, S ; TANAKA, K. Functional TFIIH is required for UV-induced translocation of CSA to the nuclear matrix. Molecular Cell Biol., v.27, n.7, p.2538-47, Apr, 2007.

- SANCAR, A. No "End of History" for photolyases. Science, v.272, n.5258, p.48-9, Apr 5, 1996.
- SANCAR, A; LINDSEY-BOLTZ, LA; UNSAL-KACMAZ, K ; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annual Rev. Biochem., v.73, p.39-85, 2004.
- SARASIN, A ; STARY, A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. DNA Repair (Amst), v.6, n.2, p.265-9, Feb 4, 2007.
- SATHORNSUMETEE, S ; RICH, JN. New treatment strategies for malignant gliomas. Expert Rev. Anticancer Ther., v.6, n.7, p.1087-104, Jul, 2006.
- SAX, JK ; EL-DEIRY, WS. p53 downstream targets and chemosensitivity. Cell Death Differ., v.10, n.4, p.413-7, Apr, 2003.
- SAX, JK; FEI, P; MURPHY, ME; BERNHARD, E; KORSMEYER, SJ ; EL-DEIRY, WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. Nature Cell Biol., v.4, n.11, p.842-9, Nov, 2002.
- SCHARER, OD. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. Chembiochem, v.6, n.1, p.27-32, Jan, 2005.
- SCHRÖDINGER, E. What is life? : the physical aspect of the living cell. Cambridge [Eng.] New York: University Press ; Macmillan. 1945. viii, 91 p. p.
- SCHUL, W; JANS, J; RIJKSEN, YM; KLEMMANN, KH; EKER, AP; DE WIT, J; NIKAIDO, O; NAKAJIMA, S; YASUI, A; HOEIJMAKERS, JH ; VAN DER HORST, GT. Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice. Embo J., v.21, n.17, p.4719-29, Sep 2, 2002.
- SCHULER, M ; GREEN, DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. Biochemistry Soc. Trans., v.29, n.Pt 6, p.684-8, Nov, 2001.
- SETLOW, RB. The photochemistry, photobiology, and repair of polynucleotides. Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol., v.8, p.257-95, 1968.
- SETLOW, RB; REGAN, JD; GERMAN, J ; CARRIER, WL. Evidence that xeroderma pigmentosum cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage to their DNA. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.64, n.3, p.1035-41, Nov, 1969.
- SIJBERS, AM; DE LAAT, WL; ARIZA, RR; BIGGERSTAFF, M; WEI, YF; MOGGS, JG; CARTER, KC; SHELL, BK; EVANS, E; DE JONG, MC; RADEMAKERS, S; DE ROOIJ, J; JASPERS, NG; HOEIJMAKERS, JH ; WOOD, RD. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. Cell, v.86, n.5, p.811-22, Sep 6, 1996.
- SINGH, SK; CLARKE, ID; TERASAKI, M; BONN, VE; HAWKINS, C; SQUIRE, J ; DIRKS, PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res., v.63, n.18, p.5821-8, Sep 15, 2003.
- SINGH, SK; HAWKINS, C; CLARKE, ID; SQUIRE, JA; BAYANI, J; HIDE, T; HENKELMAN, RM; CUSIMANO, MD ; DIRKS, PB. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature, v.432, n.7015, p.396-401, Nov 18, 2004.

- SMERDON, MJ; LAN, SY; CALZA, RE ; REEVES, R. Sodium butyrate stimulates DNA repair in UV-irradiated normal and xeroderma pigmentosum human fibroblasts. Journal Biol. Chem., v.257, n.22, p.13441-7, Nov 25, 1982.
- SMITH, ML; CHEN, IT; ZHAN, Q; O'CONNOR, PM ; FORNACE, AJ, JR. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. Oncogene, v.10, n.6, p.1053-9, Mar 16, 1995.
- SPADARI, S; PEDRALI-NOY, G; FALASCHI, MC ; CIARROCCHI, G. Control of DNA replication and cell proliferation in eukaryotes by aphidicolin. Toxicology Pathol., v.12, n.2, p.143-8, 1984.
- SPIERINGS, D; MCSTAY, G; SALEH, M; BENDER, C; CHIPUK, J; MAURER, U ; GREEN, DR. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. Science, v.310, n.5745, p.66-7, Oct 7, 2005.
- SRIVENUGOPAL, KS; MULLAPUDI, SR; SHOU, J; HAZRA, TK ; ALI-OSMAN, F. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. Cancer Res., v.60, n.2, p.282-7, Jan 15, 2000.
- SRIVENUGOPAL, KS; YUAN, XH; FRIEDMAN, HS ; ALI-OSMAN, F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Biochemistry, v.35, n.4, p.1328-34, Jan 30, 1996.
- STEINBACH, JP ; WELLER, M. Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. Journal Neurooncol., v.70, n.2, p.247-256, Nov, 2004.
- STOMMEL, JM; MARCHENKO, ND; JIMENEZ, GS; MOLL, UM; HOPE, TJ ; WAHL, GM. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. Embo J., v.18, n.6, p.1660-72, Mar 15, 1999.
- STRATHDEE, CA; GAVISH, H; SHANNON, WR ; BUCHWALD, M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. Nature, v.358, n.6385, p.434, Jul 30, 1992.
- STUPP, R; HEGI, ME; VAN DEN BENT, MJ; MASON, WP; WELLER, M; MIRIMANOFF, RO ; CAIRNCROSS, JG. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. Oncologist, v.11, n.2, p.165-80, Feb, 2006.
- STUPP, R; MASON, WP; 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; EISENHAEUER, E ; MIRIMANOFF, RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New Engl. J. Med., v.352, n.10, p.987-96, Mar 10, 2005.
- SUGARS, KL; BUDHRAM-MAHADEO, V; PACKHAM, G ; LATCHMAN, DS. A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53. Nucleic Acids Res., v.29, n.22, p.4530-40, Nov 15, 2001.
- SUGASAWA, K; NG, JM; MASUTANI, C; IWAI, S; VAN DER SPEK, PJ; EKER, AP; HANAOKA, F; BOOTSMA, D ; HOEIJMAKERS, JH. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the

- initiator of global genome nucleotide excision repair. Molecular Cell, v.2, n.2, p.223-32, Aug, 1998.
- SUGASAWA, K; OKAMOTO, T; SHIMIZU, Y; MASUTANI, C; IWAI, S ; HANAOKA, F. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. Genes Dev., v.15, n.5, p.507-21, Mar 1, 2001.
- SWAIN, CG ; SCOTT, CB. Quantitative correlation of relative rates. Comparison of hydroxide ion with other nucleophilic reagents toward alkyl halides, esters, epoxides acyl halides. Journal of the American Chemical Society, v.75, p.141-47, 1953.
- SYMONDS, H; KRALL, L; REMINGTON, L; SAENZ-ROBLES, M; LOWE, S; JACKS, T ; VAN DYKE, T. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. Cell, v.78, n.4, p.703-11, Aug 26, 1994.
- TAKEBE, H; MIKI, Y; KOZUKA, T; FURUYAMA, JI ; TANAKA, K. DNA repair characteristics and skin cancers of xeroderma pigmentosum patients in Japan. Cancer Res., v.37, n.2, p.490-5, Feb, 1977.
- TAKIMOTO, R ; EL-DEIRY, WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. Oncogene, v.19, n.14, p.1735-43, Mar 30, 2000.
- TANAKA, K; MIURA, N; SATOKATA, I; MIYAMOTO, I; YOSHIDA, MC; SATOH, Y; KONDO, S; YASUI, A; OKAYAMA, H ; OKADA, Y. Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. Nature, v.348, n.6296, p.73-6, Nov 1, 1990.
- TANG, JY; HWANG, BJ; FORD, JM; HANAWALT, PC ; CHU, G. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. Molecular Cell, v.5, n.4, p.737-44, Apr, 2000.
- TANIKAWA, C; MATSUDA, K; FUKUDA, S; NAKAMURA, Y ; ARAKAWA, H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. Nature Cell Biol., v.5, n.3, p.216-23, Mar, 2003.
- TANTIN, D. RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne syndrome group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIH components xeroderma pigmentosum B and p62. Journal Biol. Chem., v.273, n.43, p.27794-9, Oct 23, 1998.
- TANTIN, D; KANSAL, A ; CAREY, M. Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. Molecular Cell Biol., v.17, n.12, p.6803-14, Dec, 1997.
- TENTORI, L; PORTARENA, I ; GRAZIANI, G. Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. Pharmacol Res., v.45, n.2, p.73-85, Feb, 2002.
- TEWARI, M ; DIXIT, VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. Journal Biol. Chem., v.270, n.7, p.3255-60, Feb 17, 1995.
- THOMA, BS; WAKASUGI, M; CHRISTENSEN, J; REDDY, MC ; VASQUEZ, KM. Human XPC-hHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks. Nucleic Acids Res., v.33, n.9, p.2993-3001, 2005.

- THOMPSON, CL ; SANCAR, A. Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. Oncogene, v.21, n.58, p.9043-56, Dec 16, 2002.
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, NW; ZIMMER, KG ; DELBRUCK, M. Über die natur der genmutation und der genkostruktur. Nachr. Ges., v.1, p.189-245, 1935.
- TOMKINSON, AE ; LEVIN, DS. Mammalian DNA ligases. Bioessays, v.19, n.10, p.893-901, Oct, 1997.
- VAN DER LEUN, JC. The ozone layer. Photodermatology Photoimmunol. Photomed., v.20, n.4, p.159-62, Aug, 2004.
- VAN GOOL, AJ; CITTERIO, E; RADEMAKERS, S; VAN OS, R; VERMEULEN, W; CONSTANTINOU, A; EGLY, JM; BOOTSMA, D ; HOEIJMAKERS, JH. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. Embo J., v.16, n.19, p.5955-65, Oct 1, 1997.
- VAN HOUTEN, B; GAMPER, H; HOLBROOK, SR; HEARST, JE ; SANCAR, A. Action mechanism of ABC excision nuclease on a DNA substrate containing a psoralen crosslink at a defined position. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.83, n.21, p.8077-81, Nov, 1986.
- VASQUEZ, KM; CHRISTENSEN, J; LI, L; FINCH, RA ; GLAZER, PM. Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.99, n.9, p.5848-53, Apr 30, 2002.
- VOLKER, M; MONE, MJ; KARMAKAR, P; VAN HOFFEN, A; SCHUL, W; VERMEULEN, W; HOEIJMAKERS, JH; VAN DRIEL, R; VAN ZEELAND, AA ; MULLENDERS, LH. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. Molecular Cell, v.8, n.1, p.213-24, Jul, 2001.
- VUKSANOVIC, L ; CLEAVER, JE. Unique cross-link and monoadduct repair characteristics of a xeroderma pigmentosum revertant cell line. Mutation Res., v.184, n.3, p.255-63, Nov, 1987.
- WAKASUGI, M; REARDON, JT ; SANCAR, A. The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair. Journal Biol. Chem., v.272, n.25, p.16030-4, Jun 20, 1997.
- WANG, QE; ZHU, Q; WANI, MA; WANI, G; CHEN, J ; WANI, AA. Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. DNA Repair (Amst), v.2, n.5, p.483-99, May 13, 2003.
- WANG, S ; EL-DEIRY, WS. Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy. Proceedings Natl. Acad. Sci. U S A, v.100, n.25, p.15095-100, Dec 9, 2003.
- WANG, X; PETERSON, CA; ZHENG, H; NAIRN, RS; LEGERSKI, RJ ; LI, L. Involvement of nucleotide excision repair in a recombination-independent and error-prone pathway of DNA interstrand cross-link repair. Molecular Cell Biol., v.21, n.3, p.713-20, Feb, 2001.
- WILSON, DM, 3RD ; BOHR, VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. DNA Repair (Amst), v.6, n.4, p.544-59, Apr 1, 2007.

- WISCHHUSEN, J; NAUMANN, U; OHGAKI, H; RASTINEJAD, F ; WELLER, M. CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. Oncogene, v.22, n.51, p.8233-45, Nov 13, 2003.
- WOOD, RD. DNA repair in eukaryotes. Annual Rev. Biochem., v.65, p.135-67, 1996.
- WOOD, RD ; SHIVJI, MK. Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes? Carcinogenesis, v.18, n.4, p.605-10, Apr, 1997.
- WOODHEAD, AD; SETLOW, RB ; TANAKA, M. Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer. Journal Epidemiol., v.9, n.6 Suppl, p.S102-14, Dec, 1999.
- WU, GS; BURNS, TF; MCDONALD, ER, 3RD; JIANG, W; MENG, R; KRANTZ, ID; KAO, G; GAN, DD; ZHOU, JY; MUSCHEL, R; HAMILTON, SR; SPINNER, NB; MARKOWITZ, S; WU, G ; EL-DEIRY, WS. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. Nature Genet., v.17, n.2, p.141-3, Oct, 1997.
- XU-WELLIVER, M ; PEGG, AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Carcinogenesis, v.23, n.5, p.823-30, May, 2002.
- YAN, L; DONZE, JR ; LIU, L. Inactivated MGMT by O6-benzylguanine is associated with prolonged G2/M arrest in cancer cells treated with BCNU. Oncogene, v.24, n.13, p.2175-83, Mar 24, 2005.
- YANG, A; KAGHAD, M; CAPUT, D ; MCKEON, F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. Trends Genet., v.18, n.2, p.90-5, Feb, 2002.
- YANG, A; KAGHAD, M; WANG, Y; GILLET, E; FLEMING, MD; DOTSCH, V; ANDREWS, NC; CAPUT, D ; MCKEON, F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. Molecular Cell, v.2, n.3, p.305-16, Sep, 1998.
- YANG, A; SCHWEITZER, R; SUN, D; KAGHAD, M; WALKER, N; BRONSON, RT; TABIN, C; SHARPE, A; CAPUT, D; CRUM, C ; MCKEON, F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature, v.398, n.6729, p.714-8, Apr 22, 1999.
- YANG, A; WALKER, N; BRONSON, R; KAGHAD, M; OOSTERWEGEL, M; BONNIN, J; VAGNER, C; BONNET, H; DIKKES, P; SHARPE, A; MCKEON, F ; CAPUT, D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. Nature, v.404, n.6773, p.99-103, Mar 2, 2000.
- YANG, Z; ROGINSKAYA, M; COLIS, LC; BASU, AK; SHELL, SM; LIU, Y; MUSICH, PR; HARRIS, CM; HARRIS, TM ; ZOU, Y. Specific and efficient binding of xeroderma pigmentosum complementation group A to double-strand/single-strand DNA junctions with 3'- and/or 5'-ssDNA branches. Biochemistry, v.45, n.51, p.15921-30, Dec 26, 2006.
- YOKOI, M; MASUTANI, C; MAEKAWA, T; SUGASAWA, K; OHKUMA, Y ; HANAOKA, F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. Journal Biol. Chem., v.275, n.13, p.9870-5, Mar 31, 2000.

YONISH-ROUACH, E; RESNITZKY, D; LOTEM, J; SACHS, L; KIMCHI, A ; OREN, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. Nature, v.352, n.6333, p.345-7, Jul 25, 1991.

YOU, YH; LEE, DH; YOON, JH; NAKAJIMA, S; YASUI, A ; PFEIFER, GP. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. Journal Biol. Chem., v.276, n.48, p.44688-94, Nov 30, 2001.

ZAREMBA, T ; CURTIN, NJ. PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. Anticancer Agents Med. Chem., v.7, n.5, p.515-23, Sep, 2007.

ZHU, J; JIANG, J; ZHOU, W; ZHU, K ; CHEN, X. Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. Oncogene, v.18, n.12, p.2149-55, Mar 25, 1999.

ZURITA, M ; MERINO, C. The transcriptional complexity of the TFIIH complex. Trends Genet., v.19, n.10, p.578-84, Oct, 2003.

Anexo

Artigos

Na seguinte ordem:

- 1) *Photorepair of RNA polymerase arrest and apoptosis after ultraviolet irradiation in normal and XPB deficient rodent cells.* Chiganças V, **Batista LFZ**, Brumatti G, Amarante-Mendes GP, Yasui A e Menck CFM. **Cell Death and Differentiation**, 2002.
- 2) *Involvement of DNA replication in ultraviolet-induced apoptosis of mammalian cells.* **Batista LFZ**, Chiganças V, Brumatti G, Amarante-Mendes GP e Menck, CFM. **Apoptosis**, 2006.
- 3) *Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine.* Roos WP, **Batista LFZ**, Naumann S, Wick W, Weller M, Menck CFM e Kaina B. **Oncogene**, 2007.
- 4) *Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks.* **Batista LFZ**, Roos WP, Christmann M, Menck CFM e Kaina B. **Cancer Research**, 2007.
- 5) *p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C induced apoptosis due to impaired CPD removal.* **Batista LFZ**, Roos WP, Kaina B e Menck CFM. **Submetido**.
- 6) *How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis.* **Batista LFZ**, Kaina B, Meneghini R e Menck CFM. **Submetido**.
- 7) *Homologous Recombination.* Dennis C, Feuerhahn S, Hendriks, Maffini S, **Batista LFZ**, Engelward B e Essers J. Summary report on Homologous Recombination Session at Noordwijkerhout. <http://www.dna-repair.nl/knowledge/knowledge.php> (E-pub only), 2006.